

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales

Tesis doctoral



*COMBINACIÓN DE RESVERATROL Y N-ACETILCISTEÍNA
COMO PREVENCIÓN DE LA HIPOACUSIA INDUCIDA POR
KANAMICINA Y FUROSEMIDA EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE OTOTOXICIDAD LOCAL EN RATAS
WISTAR*

**Fernando García Alcántara
2016**

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

La dirección de esta tesis se ha llevado a cabo por los doctores:

Teresa Rivera Rodríguez

Isabel Varela-Nieto

El trabajo de esta tesis doctoral ha sido financiado con los siguientes proyectos de investigación:

- Proyecto de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Príncipe de Asturias FIB-PI/141108 -“Prevención de muerte de células sensoriales cocleares mediante agentes antioxidantes y factores neurotróficos en un modelo experimental de ototoxicidad en rata”. Investigador principal: Teresa Rivera Rodríguez. 2009-2010.
- Proyecto FIS PI 10/00394 – “Modulación de muerte de células sensoriales cocleares mediante IGF-1 e inhibidores de TGF-beta, en un modelo experimental de ototoxicidad en ratas”. Investigador principal: Teresa Rivera Rodríguez. 2010-2015.

A mi familia

*“Si podéis curar, curad. Si no podéis curar,
calmad. Si no podéis calmar, consolad”*

Augusto Murry

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se inició no mucho tiempo después de reincorporarme al Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias tras mi período de formación como residente en ese Servicio y una etapa como médico especialista en el Hospital La Mancha Centro de Alcázar de San Juan, y es el resultado de muchos años de esfuerzo que, sin dudarlo, no hubiera sido posible sin la aportación, el altruismo y la comprensión de muchas otras personas.

En primer lugar, quisiera mostrar mi más profundo agradecimiento a las doctoras Teresa Rivera Rodríguez e Isabel Varela Nieto, directoras de esta tesis, por su incondicional apoyo, por su inestimable dedicación, por lo mucho que me han enseñado y por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo. Teresa, muchas gracias por abrirme las puertas al mundo de la investigación, cada vez más abrupto, difícil y escabroso para nosotros, los clínicos. Y gracias también por tu amistad, que en momentos tan difíciles como los vividos, no deja de ser un muy cotizado privilegio. Isabel, muchas gracias por acogerme de forma tan generosa en el maravilloso equipo que diriges dentro de tu laboratorio y por haber entendido e interpretado en su justa medida las distancias entre la investigación básica y la clínica, gracias a lo cual, esto también ha sido posible.

No quiero dejar de expresar también un agradecimiento muy especial a Silvia Murillo Cuesta y Raquel Martínez Vega, sin las que no tengo ninguna duda de que este trabajo no habría sido posible. Silvia, muchas gracias por tu siempre absoluta e incondicional disposición para cualquier ayuda que te he solicitado. Y muchas gracias también por lo mucho que me has aportado, tanto en el terreno experimental como en el personal. Raquel, cuántas horas también contigo en las que, en consonancia con lo que las situaciones requerían, siempre has actuado de forma sensata, moderada y a la vez, firme. Siempre os recordaré con mucho cariño.

A Julio Contreras, por su disposición y sus consejos tan válidos en la parte técnica, por su inestimable ayuda en la histología y por el interés que siempre ha mostrado en el abordaje quirúrgico. A Rafael Cediel, por su incalculable aportación en la parte fotográfica y por su nutrida sabiduría en tantos campos, que tan útil es en muchos momentos. A Lourdes, Ada, Marta, María Gracias por tratarme como a uno más cuando me he “colado” en el laboratorio sin avisar.

Al Servicio de Evaluación Neurofuncional No Invasiva del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, por la extraordinaria rigurosidad y profesionalidad desarrollada en la parte funcional de este trabajo.

Al Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols de Madrid, por el procesamiento de las muestras para el estudio genético.

A Javier Pérez, del Servicio de Imagen Científica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, por su ayuda tan importante con las figuras.

A Rosa Trueba, responsable de la Biblioteca del Hospital Universitario Príncipe de Asturias, por su eterna disposición y por lo fácil que me ha hecho lo difícil durante toda la realización de esta tesis.

A Lorena Sanz López, gracias por no negarte nunca a ayudarme y por el impulso que, con tu ejemplo, me has dado en momentos difíciles de esta tesis.

A Javier Olarieta Soto, compañero y amigo que ha sabido escucharme y transmitirme valores importantes y equilibrio en momentos muy duros, sin los que, tal vez, me habría faltado energía para continuar con este proyecto. Muchas gracias amigo, y sabes que alguien más te lo estará agradeciendo mucho eternamente.

A todos los Residentes del Hospital Universitario Príncipe de Asturias, gracias por comprender y aceptar mi situación en los momentos importantes de la realización de este trabajo.

A mis queridísimas hermanas Mamen, Chiqui y Lola. Y por supuesto a mis cuñados Andrés, Javi y Jose. No tiene dimensión el agradecimiento cuando lo que se quiere agradecer es la conjunción de una serie de elementos que han constituido una familia con los valores fundamentales que conducen a un sentido de lealtad absoluto para los demás. Muchas gracias a todos, porque esto para mí ha sido un estímulo vital para la consecución de este trabajo.

Quiero también agradecer de corazón la importancia que ha tenido para mí durante todo este proyecto el haberme sentido uno más en mi otra familia. Gracias Amparo y Andrés, porque sé que para vosotros soy un hijo más. Y muchas gracias en especial a ti, José Ramón, por haber ejercido de segundo padre en muchas de las

ausencias a las que me ha obligado este trabajo. No me arrepiento en absoluto de ello si mis pequeños entienden y asumen los importantes valores que les transmites.

A mis padres, que aunque nunca podrán ser testigos de la culminación de esta aventura, siguen siendo una guía fundamental en mi vida y en todo lo que en ella ocurre, incluido este trabajo. Nunca podré dejar de estar eternamente agradecido, y allá donde estéis, siempre estaréis en mi mente.

Y por supuesto, gracias a mi familia, que es lo que verdaderamente da sentido a mi vida. A Irene, la persona que más quiero y la que más paciencia ha tenido en todo este largo camino. Esto no es lo único que sería imposible sin ti, también todo lo demás, porque tú eres mi mundo y la verdadera razón por la que sigo con mis propósitos, que son también los tuyos. Y a la luz que me guía y me hace sonreír aún en los peores momentos, mis pequeños, Marcos y Hugo. No hay nada en este mundo que pueda agradecer más que el teneros.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y UNIDADES	21
1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 Epidemiología de la hipoacusia	29
1.2 Clasificación de la hipoacusia neurosensorial.....	29
1.3 Modelos experimentales de ototoxicidad	31
1.3.1 Principios de la distribución de fármacos a nivel del oído interno	
1.3.2 Sistemas para la administración local de fármacos en el oído interno	
1.3.2.1 Aplicación intratimpánica	
1.3.2.2 Administración intracoclear	
1.3.2.2.1 Sistemas de infusión continua	
1.3.2.2.2 Administración a través de un implante coclear	
1.3.2.2.3 Sistemas alternativos de microfluidos	
1.4 Ototoxicidad por kanamicina y furosemida.....	46
1.5 Papel de los antioxidantes en la prevención de daño celular a nivel del oído interno.....	53
1.5.1 Enzimas antioxidantes	
1.5.2 Agentes depuradores de sustancias oxidantes	
1.5.2.1 Quelantes de metales	
1.5.2.2 Sustancias que contienen tiol	
1.5.2.3 Otras moléculas antioxidantes	
1.5.3 Moléculas que actúan a nivel de la cascada de señales de las especies oxígeno reactivas (ROS)	
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
2.1 Hipótesis.....	67
2.2 Objetivos.....	67
2.2.1 Objetivos principales	
2.2.2 Objetivos secundarios	

3. MATERIAL Y MÉTODOS	69
3.1 Consideraciones éticas.....	71
3.2 Animales de experimentación.....	71
3.3 Diseño experimental	72
3.3.1 Validación del método de ototoxicidad local y comparación con la administración sistémica	
3.3.2 Determinación de la capacidad de otoprotección de resveratrol y N-acetilcisteína	
3.4 Instrumental.....	74
3.4.1 Instrumental quirúrgico	
3.4.2 Equipo de anestesia	
3.4.3 Equipo de Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral	
3.4.4 Microscopio	
3.5 Anestesia	76
3.6 Procedimiento quirúrgico	76
3.6.1 Anatomía quirúrgica	
3.6.2 Abordaje quirúrgico	
3.7 Administración de los tratamientos	81
3.7.1 Validación del método de ototoxicidad local y comparación con la administración sistémica	
3.7.2 Determinación de la capacidad de otoprotección de resveratrol y N-acetilcisteína	
3.8 Evaluación de la función auditiva	82
3.8.1 Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral	
3.9 Estudio histológico y análisis transcriptómico	86
3.9.1 Perfusión y fijación	
3.9.2 Extracción coclear	
3.9.3 Postfijación	
3.9.4 Inclusión y corte	
3.9.5 Tinción y estudio histológico	
3.9.6 Análisis transcriptómico	
3.10 Estudio estadístico	92

4. RESULTADOS	95
4.1 Validación y comparación del método de ototoxicidad local con el método de administración sistémica de kanamicina y furosemida	97
4.1.1 La administración sistémica de kanamicina y furosemida produce una sordera profunda	
4.1.2 La realización de una bullostomía para acceder a la ventana redonda y la colocación sobre ésta de un fragmento de gelfoam no afectan a la función auditiva	
4.1.3 La aplicación directa sobre la ventana redonda del gelfoam embebido con kanamicina y furosemida produce una sordera moderada	
4.2 Determinación del potencial otoprotector de la administración intraperitoneal de resveratrol y N-acetilcisteína	110
4.2.1 La administración local de kanamicina y furosemida afecta a la función auditiva	
4.2.2 El tratamiento sistémico con resveratrol y N-acetilcisteína atenúa la hipoacusia inducida por los ototóxicos	
4.2.3 El tratamiento sistémico con resveratrol y N-acetilcisteína produce cambios en la expresión de citoquinas relacionadas con la inflamación	
4.2.4 El tratamiento sistémico con resveratrol y N-acetilcisteína produce cambios en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante	
5. DISCUSIÓN	125
5.1 Validación y comparación del método de ototoxicidad local con el método de administración sistémica de kanamicina y furosemida	127
5.1.1 Justificación del empleo de kanamicina y furosemida	
5.1.2 Administración sistémica de kanamicina y furosemida	
5.1.3 Administración local de kanamicina y furosemida	
5.1.3.1 <i>Elección del animal de experimentación</i>	
5.1.3.2 <i>Elección del abordaje quirúrgico</i>	
5.1.3.3 <i>Transferencia de los ototóxicos al oído interno</i>	
5.1.3.4 <i>Farmacocinética de los ototóxicos dentro del oído interno</i>	
5.1.3.5 <i>Resultados funcionales y cambios histológicos</i>	

5.2 Determinación del potencial otoprotector de la administración intraperitoneal de resveratrol y N-acetilcisteína	148
5.2.1 Afectación del umbral auditivo tras la administración local de kanamicina y furosemida	
5.2.2 Combinación de dos antioxidantes: resveratrol y NAC	
5.2.3 Curso del efecto protector	
5.2.4 Tonotopía de la ototoxicidad y perfil del daño celular	
5.2.5 Expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias	
5.2.6 Expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante	
6. CONCLUSIONES.....	163
7. BIBLIOGRAFÍA.....	167
8. ANEXO.....	193

ABREVIATURAS Y UNIDADES

LISTADO DE ABREVIATURAS

3-NT	3-Nitrotirosina
ABR	Auditory Brainstem Response
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AP-1	Factor de transcripción denominado <i>Activator Protein 1</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín Trifosfato
Bcl-2	Familia proteica célula B – linfoma 2
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
CCE	Células Ciliadas Externas
CCI	Células Ciliadas Internas
CEE	Comunidad Económica Europea
COX1	Ciclooxigenasa 1
COX2	Ciclooxigenasa 2
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DAB	Diaminobencidina
dB	Decibelios
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
DPOAE	Otoemisiones acústicas por productos de distorsión

DS	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ENNI	Evaluación Neurofuncional No Invasiva
ENR	Especies reactivas de nitrógeno
ESM	Error estándar de la media
FDA	Food and Drugs Administration (Administración de Medicamentos y Fármacos)
FUR	Furosemida
GPX	Glutation peroxidasa
GSH	Glutation
GST	Glutation-S-Transferasa
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor - 1</i>
IL10	Interleuquina 10
IL1β	Interleuquina 1 β
IL4	Interleuquina 4
IL6	Interleuquina 6
INE	Instituto Nacional de Estadística
JNK	Quinasas del dominio N-terminal de c-Jun
KAN	Kanamicina
LDL	Low Density Lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)
L-NAME	L-N(omega)-Nitroarginina metil ester
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
NAC	N-acetilcisteína

NADPH	Dinucleótido de nicotinamida – adenina fosfato, forma reducida
NFκB	Factor nuclear κB
NGE	Neuronas del Ganglio Espiral
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintasas del Óxido Nítrico
NOX3	Enzima de la familia de las NADPH oxidasas
NOX4	Enzima de la familia de las NADPH oxidasas
NT-3	Neurotrofina-3
OC	Órgano de Corti
p38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Familia de Proteínas Disulfuro Isomerasa
PEATC	Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral
PEG-SOD	Polietilenglicol-Superóxidodismutasa
PGE2	Prostaglandina E2
RESV	Resveratrol
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa – Transcriptasa inversa (Reverse transcriptase)
SOD	Superóxidodismutasa
SPL	Nivel de presión sonora
Tgfβ1	Factor de crecimiento tumoral β1

TNF	Factor de necrosis tumoral
Tnfa	Factor de necrosis tumoral α
TORCH	Toxoplasma – Rubéola – Citomegalovirus – Herpes Simple
TUNEL	TdT-mediated -dUtp Nick End Labeling
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VR	Ventana Redonda

UNIDADES

μg	Microgramos
dB	Decibelios
kg	Kilogramo
KHz	Kilohercios
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimoles
ms	Milisegundos
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
pps	Pulsos por segundo

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de la hipoacusia

La hipoacusia es el trastorno congénito más frecuente en el mundo desarrollado. Una función auditiva normal permite al sujeto la conexión activa con el mundo exterior y favorece la comunicación y el aprendizaje, con lo que no es difícil entender la repercusión tan importante que puede llegar a tener la pérdida auditiva tanto en el ámbito personal como social del individuo.

Aunque su inicio, frecuentemente insidioso y progresivo, dificulta la estimación exacta de la prevalencia, se estima que aproximadamente 1 de cada 500 recién nacidos presentan una pérdida auditiva mayor de 40 dB (1). El problema se incrementa con la edad, y se considera que un 16% de los adultos presentan una pérdida bilateral superior a 25 decibelios (dB) (2) y a partir de los 80 años cerca de la mitad de la población va a estar afectada. Como además es conocido el aumento de la esperanza de vida en los países en vías de desarrollo, la incidencia de esta enfermedad está claramente en aumento.

En cuanto a la población sorda en España, la única referencia hasta hoy es la que aporta la Encuesta del Instituto Nacional de Estadística (Encuesta INE, 2000), que cifra la población con discapacidad auditiva en torno a 1.000.000 de personas, con una tasa de 31,07 personas por cada 1000 habitantes, entre las que más de 100.000 presentan sordera profunda. La incidencia de hipoacusia severa en el recién nacido sin factores de riesgo se estima en 1 por cada 1000 y 5 por cada 1000 recién nacidos padece una sordera de distinto tipo y grado. Esta incidencia se incrementa progresivamente en las poblaciones de más edad.

1.2 Etiología y clasificación de la hipoacusia neurosensorial

A diferencia de la hipoacusia conductiva, con un fácil diagnóstico etiológico derivado de la historia clínica y la exploración, la etiología de la hipoacusia neurosensorial es difícil de establecer en la mayoría de las ocasiones. Determinadas consideraciones en la historia clínica pueden ayudar en este sentido, siendo importante determinar el comienzo y la progresión de la hipoacusia, su asociación con otros síntomas otológicos como otalgia, otorrea, acúfeno o vértigo, una exposición

prolongada a ruido intenso, el uso de medicamentos o drogas ototóxicas y por último, la existencia de antecedentes familiares de hipoacusia.

La hipoacusia neurosensorial puede deberse a múltiples factores. En el recién nacido, 1 por cada 1000 presentan hipoacusia severa, de los que la mitad se atribuyen a causas genéticas y la otra mitad a causas adquiridas. Dentro de las causas genéticas, aproximadamente un 20% de las hipoacusias serán una manifestación más de una enfermedad sindrómica y un 80% se presentarán como hipoacusias no sindrómicas.

Las causas de hipoacusia no genética se pueden resumir con el siguiente esquema:

- A. Causas prenatales:** infecciones durante el embarazo (TORCH, sífilis, VIH), ototóxicos maternos, patologías sistémicas del embarazo (diabetes, hipotiroidismo materno, hipertensión arterial), síndrome alcohólico-fetal, drogas de abuso materno.
- B. Causas perinatales:** hipoxia – anoxia perinatal, prematuridad y bajo peso al nacimiento, hipertensión pulmonar persistente, oxigenación extracorpórea, ventilación mecánica, hiperbilirrubinemia, ototóxicos.
- C. Causas postnatales:** traumatismos craneales, exposición a ruido, infecciones (meningitis, parotiditis, sífilis), ototóxicos, enfermedad inmunomediada del oído interno, fistula perilinfática, enfermedades metabólicas como el hipotiroidismo, enfermedades neoplásicas (neurinomas del acústico, tumores del ángulo pontocerebeloso, tumores del hueso temporal, neoplasias hematológicas), alcohol, tabaco, enfermedades idiopáticas (enfermedad de Menière, sordera brusca idiopática) y presbiacusia.

La hipoacusia neurosensorial se refiere a dos entidades que pueden estar presentes en mayor o menor medida, por un lado la hipoacusia sensorial, donde predomina la alteración de las células cocleares, y por otro lado la hipoacusia neuronal, donde las más afectadas son las neuronas auditivas.

La presbiacusia representa la forma más frecuente de hipoacusia neurosensorial y se diagnostica típicamente en un paciente de edad adulta con hipoacusia de causa no identificable en la historia clínica, pese a que, muy probablemente, en todos los

pacientes diagnosticados de presbiacusia ésta tenga un origen multifactorial. La clasificación de Schuknecht en 1993 para la presbiacusia (3) sigue siendo la referencia principal para el diseño de todos los estudios aunque la investigación reciente ha permitido ampliar el marco de dicha clasificación.

Tras la presbiacusia, las causas más frecuentes de hipoacusia neurosensorial son la ototoxicidad farmacológica y la exposición a ruido. Dentro de la ototoxicidad por fármacos, los más frecuentemente implicados son los antibióticos (72%), siendo los aminoglucósidos los antibióticos ototóxicos más habituales (47% de todas las causas de ototoxicidad). Generalmente, cada uno de los aminoglucósidos es capaz de producir un daño *irreversible* tanto del órgano auditivo como del órgano vestibular, aunque típicamente afecta más a uno que al otro. Otros medicamentos con potencial ototóxico son los macrólidos (claritromicina, eritromicina, azitromicina), los diuréticos de asa (furosemida y ácido etacrínico), los salicilatos, la quinina y algunos antineoplásicos (cisplatino, carboplatino).

1.3 Modelos experimentales para la administración directa de sustancias a nivel del oído interno

La administración directa de fármacos en el oído interno ha generado en los últimos años un interés creciente tanto en la investigación básica como en la clínica por considerarse un método más eficaz que la aplicación sistémica. La razón fundamental es que a pesar de utilizar dosis más bajas, el medicamento que se aplica localmente puede alcanzar una mayor concentración en el oído interno que la que se conseguiría con su administración sistémica. Además, con la administración local pueden evitarse los potenciales efectos secundarios tras el tratamiento con las dosis inevitablemente altas que se requieren a nivel sistémico y por tanto, la aplicación podría extenderse a los casos más restringidos o incluso a aquellos casos en los que por cualquier circunstancia la administración sistémica esté contraindicada.

Cada vez existen más sustancias candidatas para el tratamiento de los trastornos del oído interno, y sin embargo, el descubrimiento de estas sustancias ocurre de forma mucho más rápida que el perfeccionamiento de los métodos para su administración, existiendo todavía numerosas dificultades técnicas por superar. Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas influyen en la farmacocinética y distribución

intracoclear. Pero aún así se carece de algunas reglas generales sobre cuestiones más importantes que aún no tienen una respuesta adecuada, entre las que se pueden mencionar las siguientes:

- 1) ¿En qué concentración y en cuánto tiempo alcanza la sustancia el oído interno?
- 2) ¿Cómo influyen los diferentes métodos o protocolos de administración en la concentración y en el tiempo en que las sustancias alcanzan el oído interno?
- 3) ¿Cuáles son las variables que intervienen en el tiempo para alcanzar la diana y en la concentración que consigue la sustancia dentro del oído interno?

Por tanto, urge profundizar en el desarrollo de los sistemas y en la adecuación de los protocolos para la administración local de estas sustancias.

Hasta el momento, existen dos rutas principales para la administración directa de sustancias en el oído interno (**fig. 1**):

a) Intracoclear o intravestibular:

En la actualidad, raramente se realiza la apertura del oído interno en humanos con el único propósito de administrar un fármaco. La administración intracoclear o intravestibular generalmente queda limitada a situaciones donde la apertura del oído interno se ha producido con otros fines, por ejemplo durante la cirugía de un implante coclear (4), o cuando la intención con la sustancia aplicada es ablativa (5).

b) Intratimpánica (extracoclear):

De forma esquemática y desde una perspectiva general, lo que busca la administración intratimpánica es el contacto de la sustancia con la membrana de la ventana redonda (VR), suponiendo que tras atravesar esta membrana penetrará en la escala timpánica y se extenderá por el oído interno para alcanzar las células sensoriales, las células de soporte y las fibras nerviosas aferentes. Y con este objetivo se han diseñado hasta el momento varios sistemas de administración para su uso en seres humanos y en animales de experimentación (6). Se pueden realizar *inyecciones intratimpánicas* repetidas con o sin visión directa de la VR (7). El fármaco puede aplicarse embebido en una esponja de gelatina o de gelfoam que se coloca directamente sobre la VR (8). Puede

emplearse un hidrogel como portador para estabilizar el volumen de la sustancia a aplicar (9,10). Con este propósito se han utilizado también polímeros biodegradables que contienen el fármaco y se aplican sobre la VR (11,12). Otros sistemas emplean catéteres parcial o totalmente implantables o minibombas osmóticas que permiten llevar a cabo una administración continua o discontinua del fármaco (13-15).

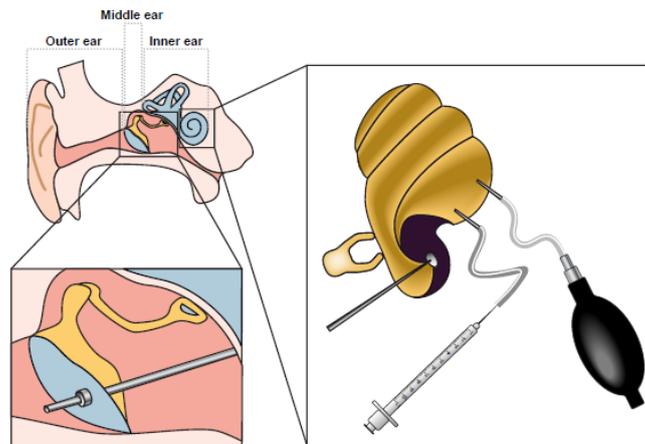


Figura 1. Representación de las dos rutas de administración de sustancias en el oído interno. Tomado de Rivera T et al. *Curr Drug Deliv.* 2012;9(3):231-42.

En el resultado de cualquier método de administración local de fármacos influyen la eficacia de dicho método, su seguridad y su reproductibilidad. Pero también, y de forma crítica, hay que considerar la farmacocinética de la sustancia dentro del oído interno. Los estudios experimentales sobre la distribución de sustancias en el oído interno son técnicamente difíciles debido a las pequeñas distancias, a la geometría y a la dificultad en el acceso al oído interno en muchas especies. Sin embargo, las nuevas técnicas de muestreo combinadas con métodos cuantitativos para la interpretación de resultados han conducido a una comprensión básica de la distribución de una sustancia dentro del oído interno tras la administración local (16,17). Y ya se encuentran trabajos que realizan simulaciones con programas informáticos que están ayudando a establecer los principios básicos de esta distribución, como el de Plontke SK y Salt AN (6), que simula la distribución de metilprednisolona en la cóclea de cobayas para diferentes

sistemas de administración en base a parámetros cinéticos ya publicados en estudios anteriores.

Pero la idea de la aplicación tópica de fármacos en el oído interno no es nueva. Desde hace décadas se conoce la aplicación de anestésicos locales y aminoglucósidos para el tratamiento de determinados trastornos del oído interno. Hasta el momento, la forma de administración intratimpánica más extendida es la inyección de gentamicina en el oído medio de pacientes con enfermedad de Menière (5,18-20). La gentamicina es tóxica para las células sensoriales del sistema vestibular y por tanto reduce la sintomatología vertiginosa en estos pacientes. Existen también numerosas publicaciones relativas a la administración local de glucocorticoides para el tratamiento de la sordera brusca (21-24), de la enfermedad de Menière (25,26), del acúfeno (27-29) y de la enfermedad inmunomediada del oído interno. Otras sustancias probadas en seres humanos incluyen anestésicos locales, algunos neurotransmisores y algunos antagonistas de neurotransmisores (30). El empleo de determinados factores de crecimiento, sustancias antioxidantes y sustancias inhibidoras de la apoptosis ha suscitado también un interés creciente en las últimas décadas. Las publicaciones con experimentación animal difundidas hasta el momento demuestran resultados prometedores tras la administración local de sustancias a nivel del oído interno para la prevención del daño celular provocado por el ruido o por medicamentos ototóxicos (31-39). Para conseguir un tratamiento más sostenido se han empleado también virus como vectores así como otros vectores no virales que permiten la transferencia de genes al oído interno relacionados con el desarrollo celular. Un ejemplo de ello es el gen *Math1*, también conocido como *Atho1*, un gen regulador clave en el desarrollo de las células ciliadas, con el que, empleando vectores adenovirales, se ha conseguido demostrar la inducción de regeneración celular a nivel del oído interno y una mejora de los umbrales auditivos tras su integración en células no sensoriales (40).

1.3.1 Principios generales de la distribución de fármacos a nivel del oído interno

Para aprobar la aplicación de un fármaco se requieren estudios de su farmacocinética, de su toxicidad y de la eficacia del método de aplicación. Ya se ha mencionado la escasez actual de respuestas para muchas preguntas relacionadas con la

administración local de sustancias a nivel del oído interno, y entre ellas destacan todas las que se relacionan con la farmacocinética del fármaco que se está probando. Para interpretar la farmacocinética de cualquier medicamento dentro del oído interno es preciso conocer los principios generales de su distribución.

El oído interno es una estructura geoméricamente compleja, con grandes espacios extracelulares rellenos de líquido (escalas vestibular y timpánica), cada uno de ellos con múltiples interfases entre los distintos espacios y a la vez entremezclados con otros compartimentos externos como la circulación sistémica sanguínea y la cavidad del oído medio.

La transferencia de sustancias a la escala timpánica a través de la VR parece ser un proceso principalmente pasivo. La velocidad a la que la sustancia atraviesa la membrana de la VR depende del tamaño de dicha membrana, de su geometría y de las características de su permeabilidad tisular. La permeabilidad de la membrana puede verse a su vez influenciada por la aplicación simultánea de otras sustancias (41) o por cambios en la presión intracocular producidos por alteraciones en la distensión de la membrana (42).

Las escalas vestibular y timpánica contienen perilinfa, un fluido de composición iónica similar a otros fluidos extracelulares como el líquido cefalorraquídeo. La perilinfa se produce predominantemente a nivel local, a través de la vascularización sanguínea coclear, y genera un ambiente favorable para la función de las células sensoriales y las neuronas. Por el contrario, la endolinfa presenta una composición única, con una elevada concentración de potasio que proporciona la base electroquímica para la función de las células sensoriales. La endolinfa se produce principalmente en la estría vascular y se secreta a la escala media por las células marginales de dicha estría. A diferencia de otros fluidos orgánicos, en condiciones normales los líquidos del oído interno no se mueven en exceso, ni de forma activa ni de forma pasiva, por lo que las sustancias aplicadas localmente se distribuyen generalmente de forma lenta y predominantemente por difusión pasiva (43). El coeficiente de difusión de cada sustancia es el que gobierna su distribución y éste depende de las características físicas de las moléculas o partículas de las que está compuesta dicha sustancia, siendo el peso molecular el que juega el papel más importante (44).

En base a su relación con el modiolo (el núcleo central de la cóclea), se ha clasificado la distribución de fármacos en el oído interno en *radial* y *longitudinal* (45). La distribución radial se refiere a las comunicaciones entre escalas paralelas de la misma espira y las comunicaciones con el sistema vascular. Las comunicaciones entre la escala timpánica y la escala vestibular a través de la pared lateral parecen ser particularmente rápidas (46). La comunicación con el torrente sanguíneo se produce a través de las células endoteliales de los capilares en la pared lateral, lo que proporciona una hermética barrera hemato-laberíntica comparable a la barrera hemato-encefálica. La distribución longitudinal incluye la difusión y el flujo longitudinal a lo largo de las escalas. Otras comunicaciones longitudinales incluyen las que se producen entre la escala vestibular y la timpánica a través del helicotrema en el ápex coclear y la comunicación abierta entre la parte basal de la escala vestibular y el vestíbulo (*fig. 2*).

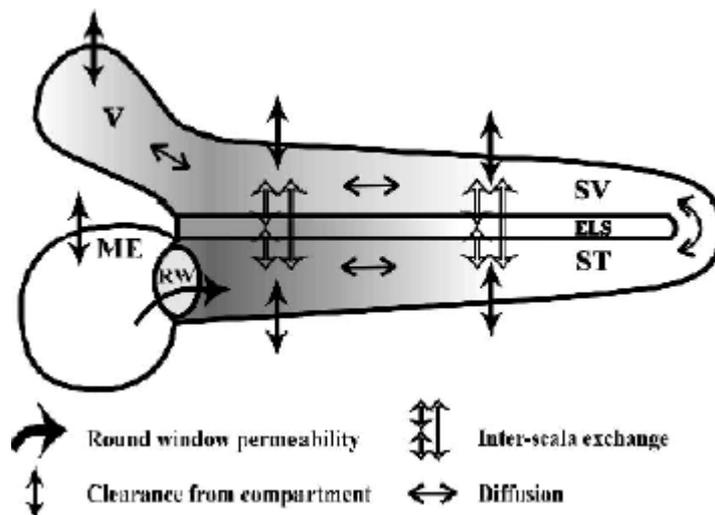


Figura 2. Representación esquemática de la entrada de sustancias a través de la VR y su transporte y eliminación a nivel del oído interno. Tomado de *Plontke SK et al. Otol Neurotol 2002;23: 967-974. (17)*. RW: ventana redonda; ME: oído medio; ST: escala timpánica; SV: escala vestibular; ELS: espacio endolinfático; V: vestíbulo.

1.3.2 Sistemas para la administración local de fármacos en el oído interno

El objetivo de este apartado es explicar con más detenimiento los métodos disponibles en la actualidad para la aplicación local de sustancias a nivel del oído interno, los cuales se han mencionado de forma más elemental en un apartado anterior.

Como ya se ha comentado, hasta el momento existen dos rutas principales para la administración directa de sustancias en el oído interno, la intratimpánica y la intracoclear, con sus diferentes variables que dependen del modo de aplicación:

1.3.2.1 Aplicación intratimpánica

La aplicación local de fármacos directamente sobre el nicho de la VR puede realizarse de varias formas. La sustancia puede administrarse directamente para producir una penetración activa en la VR o indirectamente a través de vehículos portadores de la sustancia que producen una forma de difusión pasiva (45).

La forma de administración intratimpánica más frecuentemente empleada y la más sencilla es la inyección intratimpánica de una solución que contenga la sustancia, bien directamente con una aguja fina, o bien a través de una miringotomía con o sin tubo transtimpánico. El protocolo puede incluir una inyección simple, varias inyecciones repetidas o la aplicación continua a través de un microcateter (15,47,48). Otra forma de administración intratimpánica que trata de mantener el contacto de la sustancia con la membrana de la VR es el empleo de una pequeña mecha posicionada sobre el nicho de la ventana a través un tubo de drenaje transtimpánico, de tal forma que el extremo distal de la mecha se coloca en el conducto auditivo externo para que el paciente pueda aplicar intermitentemente el medicamento (MicroWick Silverstein™) (49) (fig. 3).

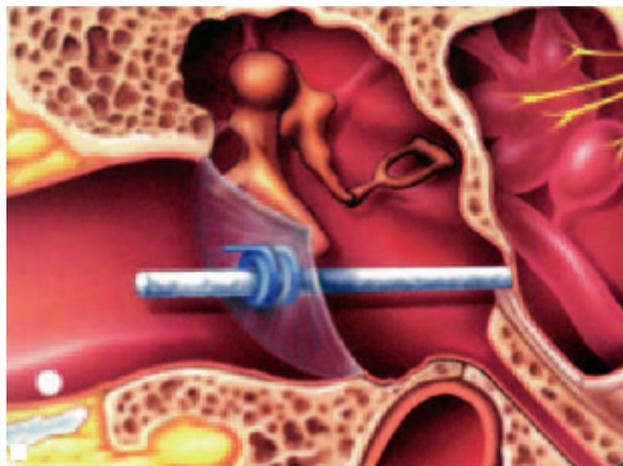


Figura 3. Representación del sistema MicroWick Silverstein™. Tomado de Plontke SK y Salt AN. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006;68(6):386-92.

Un inconveniente de estos métodos es la ausencia de control tanto de la concentración que la sustancia alcanza en la VR como de la duración de contacto del fármaco con la membrana de la VR. Ambas circunstancias son importantes para conocer la cantidad de fármaco que alcanza la cóclea. El tiempo que el fármaco permanece dentro del oído medio no es controlable, sin embargo, se sabe que parte de la cantidad administrada se pierde por drenaje a través de la trompa de Eustaquio o por reabsorción a través de la mucosa del oído medio. Ello ha provocado el desarrollo de métodos en animales de experimentación que intentan aumentar el tiempo de permanencia de las sustancias a nivel del oído medio. Es lo que se conoce como métodos pasivos, en los que el fármaco se administra junto con polímeros u otros compuestos cuya base fundamental es la estabilización del volumen aplicado. Entre los vehículos portadores utilizados en estos métodos se encuentran los *hidrogeles*, que aunque facilitan el acceso del fármaco al oído interno, tienen el inconveniente de ser sensibles a cambios tanto químicos (pH, cambios iónicos, interacción con determinadas moléculas) como físicos (temperatura, presión, potencial eléctrico). Los hidrogeles más empleados para el tratamiento de los trastornos del oído interno son sustancias biodegradables, siendo los más habituales el ácido hialurónico, de aplicación incluso en seres humanos (50), o los polímeros de glutaraldehído combinados con colágeno (11,45). El principal papel de estos polímeros biodegradables es la difusión controlada de los agentes activos y el control de la desintegración del polímero, que es lo que provoca la liberación de la sustancia. Entre sus ventajas están una cinética de liberación específica útil para protocolos de administración prolongados y la posibilidad de dirigir los fármacos a dianas específicas donde son liberados. Son de especial interés los llamados “polímeros inteligentes”, capaces de modificarse en respuesta a cambios químicos, físicos o eléctricos, lo que puede permitir incorporarlos a sistemas implantables autorregulados de administración de fármacos. Una desventaja de estos polímeros es la pequeña cantidad de sustancia que pueden portar (51).

Otros vehículos descritos en la literatura son el *pegamento de fibrina* (52) y las *esponjas de gelatina o de gelfoam* reabsorbibles (8,10).

La *nanotecnología* es otra forma de aplicación intratimpánica que ha suscitado gran interés en los últimos años, aunque hasta la fecha sólo se ha probado en animales de laboratorio. Las *nanopartículas* son partículas con diámetros inferiores a 1000 nm

(53). Las que se emplean para la administración local de sustancias en el oído interno nunca superan los 200 nm. Las nanopartículas generadas a partir del ácido poliláctico/glicólico forman una partícula biodegradable con potencial para albergar el medicamento en su interior y liberarlo de forma sostenida (54,55), y se ha conseguido demostrar que alcanzan la cóclea tanto tras su administración sistémica como tras su administración local a nivel de la VR, con una mayor concentración intracoclear tras la administración local (12). Se han empleado también nanocápsulas lipídicas (56) y de otros materiales que pueden ser biodegradables o no biodegradables, dependiendo del perfil farmacocinético y del tipo de aplicación deseados. También se han utilizado matrices de sílice con una dispersión de moléculas electromagnéticas, las cuales, una vez expuestas al campo magnético, indican la localización exacta de los depósitos en el interior de la cóclea (45). El problema de la nanotecnología es que permanece en una fase muy precoz de desarrollo y se requiere mucha más investigación para su aplicación en el tratamiento de trastornos del oído interno en seres humanos. Mirando hacia delante, los factores que probablemente influirán de manera determinante en su posible aplicación en humanos serán aquellos que afecten a cuestiones de biocompatibilidad, perfiles de liberación y bioseguridad.

Otros vehículos utilizados son los *vectores virales*, que se consideran prometedores para el tratamiento de las enfermedades del oído interno, pero encuentran sus limitaciones en cuestiones de bioseguridad y no aseguran la especificidad tisular ni celular.

En otras publicaciones encontramos los *liposomas* como vehículos para la administración de fármacos a nivel del oído interno (57), considerándolos prometedores para su empleo en determinados métodos de terapia génica, especialmente porque pueden combinarse con ácido desoxirribonucleico (ADN) y por tanto transferirse a numerosos tipos de células. Estos liposomas pueden introducirse en el interior de la cóclea mediante microinyecciones (45).

A pesar de ello, con todos estos métodos no es fácil predecir las dosis, los intervalos entre dosis o la duración del tratamiento que se requieren para conseguir un determinado objetivo terapéutico. Existe además otro factor que contribuye a la variabilidad de la aplicación intratimpánica, que es la anatomía. Puede existir un exceso

de tejido conectivo o tejido adiposo que obstaculiza la transferencia de la sustancia, o las llamadas pseudomembranas del nicho de la VR, estimándose que aproximadamente un tercio de los sujetos presentan obstrucciones de la membrana de esta ventana (58). La exploración de la VR con un microendoscopio previa a la aplicación del fármaco puede ser útil para superar estos obstáculos (7).

Todos los procedimientos anteriores aplican directamente la sustancia en el nicho de la VR. El otro gran grupo de métodos de administración intratimpánica introduce la sustancia en el oído medio, suponiendo que ésta alcanzará la VR y tras atravesar su membrana llegará al oído interno. Dentro de este grupo destacan las ***minibombas osmóticas total o parcialmente implantables***, que proporcionan un suministro de la sustancia continuo, constante y controlado y debido a su pequeño tamaño son mínimamente invasivas. Con los otros métodos, pequeñas variaciones de la permeabilidad de la membrana de la VR en el seno de grandes gradientes de fármaco a su través contribuyen de manera significativa a variaciones en los niveles de fármaco que alcanzan la perilinfa. La administración continua del fármaco mediante minibombas osmóticas surge en un intento de controlar mejor la cantidad de sustancia a nivel de la VR y evitar grandes gradientes de la misma en intervalos pequeños. En general, el acceso a la VR se logra a través de un orificio en la bulla (bullostomía) que permite la colocación de la propia minibomba o de un microtubo conectado a un reservorio que se implanta a nivel subcutáneo. Típicamente, la minibomba contiene un volumen de 100 μ l, 200 μ l ó 2 ml, con velocidades de flujo que oscilan desde 0,11 a 10 μ l/h (45). La bomba tiene una membrana semi-permeable externa rodeada por un agente osmótico conductor que a su vez alberga un reservorio de fármaco impermeable. La entrada de agua en la cámara del agente osmótico ejerce presión sobre el depósito de la droga, para después ser expulsada a través de la cánula (13,59,60) (**fig. 4**).

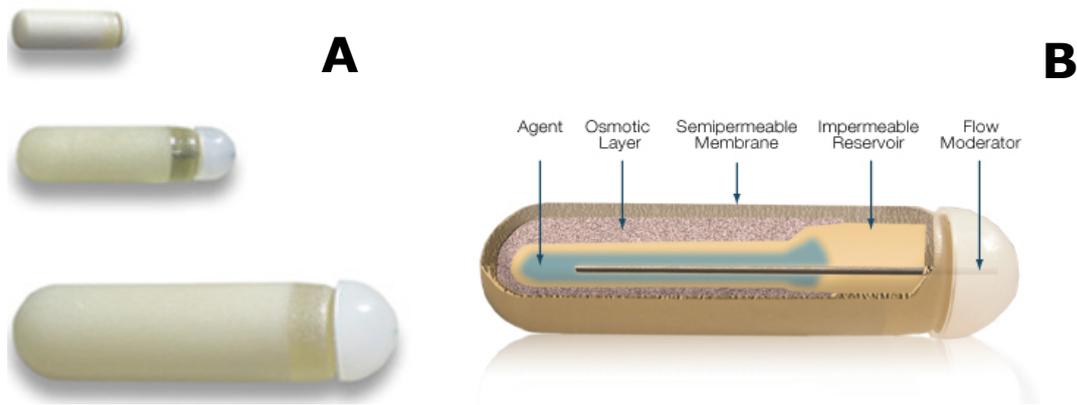


Figura 4. A: Los 3 volúmenes de minibomba comercializados por Alzet. **B:** Componentes de una minibomba osmótica. Tomado de: http://www.alzet.com/products/ALZET_Pumps/howdoesitwork.html. Acceso 20 de enero de 2016.

La más empleada en animales de experimentación es la minibomba ALZET (DURECT™, Co., Cupertino, USA) (13). En el año 2000 Prieskom y Miller modificaron la microcánula del dispositivo permitiendo un mayor tiempo de infusión además de una posible dosificación en forma de bolos (60).

Un dispositivo para la administración discontinua de la sustancia que se ha empleado en animales pero todavía no ha sido aprobada en seres humanos es el TIDDS® (Totally Implantable Drug Delivery System) (59,61). La bomba se manipula manualmente y libera un volumen de 5 o 10 µl, existiendo un reservorio implantado a nivel subcutáneo se va rellenando a demanda.

Aunque en seres humanos se han empleado varios sistemas de catéteres experimentales, el mejor caracterizado hasta la fecha es el microcatéter de VR de DURECT (RwµCath™, DURECT™, Co., Cupertino, USA) (23,30,62).

Las principales desventajas de las minibombas osmóticas son la imposibilidad de modificar dosis o intervalos de dosificación del fármaco, la incapacidad del investigador para detener la administración externamente (sin extraer el sistema) y la duración limitada de la administración, lo que requiere una nueva cirugía para acceder al dispositivo si se plantea continuar el tratamiento durante más tiempo.

Hasta la fecha, las minibombas sólo se han empleado en animales para la investigación de nuevas terapias, y a pesar de los avances significativos en este campo, su desarrollo se ve obstaculizado por la incapacidad para definir protocolos estandarizados para la recuperación y análisis de muestras de líquidos del oído interno durante los estudios preclínicos en animales. De hecho, la mayor parte de los resultados de estos estudios no incluyen la medición de la concentración del fármaco en la VR o en el oído medio, utilizando en su lugar la velocidad de eliminación del líquido para estimar la concentración aproximada. La medición de la concentración intracoclear del fármaco es difícil incluso en los estudios experimentales con animales. Por lo tanto, la cuantificación eficiente de estas concentraciones tanto en el oído medio como en el oído interno requiere un desarrollo más avanzado de estos sistemas.

1.3.2.2 Administración intracoclear

La segunda forma de administración local de fármacos es la administración intracoclear, que permite una mayor concentración de sustancia dentro del oído interno que la administración extracoclear.

El progreso en el desarrollo de métodos para la administración intracoclear de fármacos se ha visto estimulado por los avances paralelos en los abordajes quirúrgicos al oído interno y en los sistemas de minibombeo basados en la tecnología de microfluidos. El abordaje para el acceso intracoclear generalmente se realiza mediante una cocleostomía a escasos milímetros de la VR, lo que da acceso habitualmente a la rampa timpánica, aunque tanto la escala media como la escala vestibular se han explorado también como rutas de acceso (*fig. 5*).

Es también posible un acceso directo a la rampa timpánica a través de la membrana de la VR. Y se ha descrito además el acceso a la cóclea a través de la región más medial del canal semicircular lateral e incluso a través del saco endolinfático (47).



Figura 5. Cocleostomía con fresa de 0,5 mm a escasos mm de la VR

Uno de los principales desafíos de la administración intracoclear es el establecimiento de conexiones sólidas del fluido administrado con el espacio intracoclear (sellado inicial) que eviten las fugas de líquido, aunque éstas pueden producirse por otras vías como por ejemplo el acueducto coclear, lo que, pese a conseguir mayores concentraciones intracocleares de sustancia que con la administración extracoclear, no hace esperable una biodisponibilidad (porcentaje de fármaco que penetra en el oído interno) del 100%. Otra dificultad de estos métodos es el rechazo frecuente de la cánula provocado por reacción de cuerpo extraño.

De los métodos utilizados hasta ahora, se pueden distinguir tres formas de administración intracoclear:

1.3.2.2.1 Sistemas de infusión continua

Entre estos sistemas se describen las *inyecciones directas de fármaco con una jeringa*, que se han empleado para la transferencia de genes, la administración de liposomas y la de otros agentes capaces de reducir el daño asociado a la colocación del implante coclear (63-67). Esta forma de administración presenta escasas complicaciones y se ha utilizado tanto en estudios clínicos como de experimentación animal. Sin embargo, las inyecciones directas pueden alterar la homeostasis endolinfática y por tanto deben limitarse a aquellos casos en los que la audición no dependa de ella.

Una variante de las inyecciones directas consiste en el cierre de la cóclea tras implantar la aguja de la jeringa conectando ésta a un sistema de infusión con bomba. Esta variante se ha utilizado de forma experimental sobre todo para establecer modelos cinéticos para el transporte de drogas en la rampa timpánica. Estos modelos sirven de base para el desarrollo de sistemas de bombeo miniaturizados, fundamentalmente minibombas osmóticas (68-70).

Del mismo modo que en la administración intratimpánica, en la administración intracoclear juegan un papel importante las *minibombas osmóticas*, y ya se ha demostrado su seguridad y su efectividad en animales de laboratorio. Estas minibombas han sido útiles por ejemplo para estudiar el efecto de diversos fármacos en la conservación y otoprotección celular y neuronal (71,72) y para el estudio de nuevos tratamientos como algunos factores de crecimiento y neurotrofinas (72,73).

Borkholder publicó un interesante sistema de administración intracoclear con minibomba de infusión que emplea la cocleostomía para acoplar la minibomba y la combina con una canalostomía en el canal semicircular lateral para reducir los gradientes de concentración y mejorar el transporte de fármacos y su llegada a la parte apical (74) (**fig. 6**).

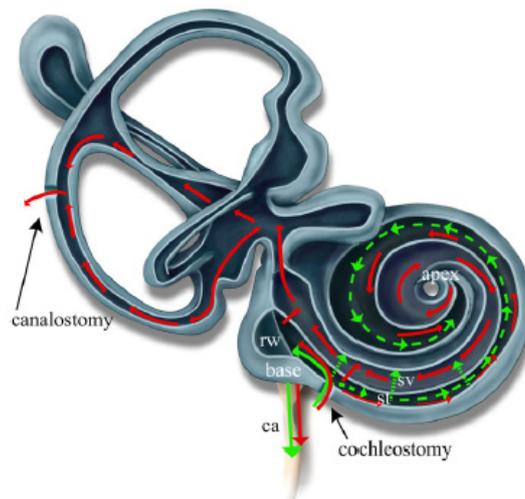


Figura 6. Representación esquemática del sistema de administración intracoclear de Borkholder que ilustra el gradiente de concentración durante la infusión continua con y sin la presencia de canalostomía posterior y cómo con esta última se reduce el gradiente basal – apical y mejora el transporte de la sustancia hasta el apex. Tomado de *Borkholder DA, et al. Hear Res. 2010;268(1-2):2-11*. rw: ventana redonda; ca: acueducto coclear.

1.3.2.2 Administración a través de un implante coclear

Una de las rutas de administración intracoclear más coherente consiste en la integración del sistema de administración del fármaco al dispositivo del implante coclear, ya que éste se implanta directamente dentro de la cóclea y por tanto proporciona una vía muy propicia para la administración de sustancias dentro del oído interno. Estos sistemas suelen incluir el uso de polímeros liberadores de fármacos que revisten el dispositivo del implante y a su vez llevan integrado el sistema de infusión con minibomba.

Una de las aplicaciones más frecuentes de este sistema de administración es la aplicación de factores neurotróficos capaces de preservar las células del ganglio espiral y por tanto mejorar la audición en pacientes implantados. (75,76). Una de las fuerzas impulsoras de este enfoque es el deseo de limitar el daño estructural producido por el implante coclear, lo que podría permitir que estos implantes se utilicen en pacientes con menor pérdida auditiva que los que se incluyen en las indicaciones convencionales. De hecho, estos sistemas utilizan habitualmente un electrodo más corto que el convencional o bien insertan sólo parcialmente el electrodo habitual, lo que limita la región del daño a la de las frecuencias más altas. Determinadas sustancias como los esteroides han demostrado reducir al mínimo el trauma quirúrgico, lo que también puede ampliar la indicación del implante a una población más amplia que la actual (77).

1.3.2.2.3 Sistemas alternativos de microfluidos

Los sistemas de administración continua descritos en el apartado anterior se ven obstaculizados por la baja tasa de aclaramiento del fluido coclear y por tanto, por el volumen limitado de fármaco que puede introducirse en la cóclea en un período de tiempo determinado. Estas dificultades se ven agravadas por los relativamente largos y estrechos circuitos dentro del espacio coclear y por el difícil acceso quirúrgico, sobre todo a las zonas más apicales. El trabajo mencionado anteriormente del grupo de Borkholder, (74) donde incorporan una canalostomía posterior para reducir el gradiente de concentración, pone de relieve este desafío relativo al traslado de fármacos hacia la zona apical. Se ha descrito un sistema alternativo para la administración de fármacos que surge para superar esta limitación y que se basa en mantener un volumen neto de

liberación igual a cero mediante la infusión y retirada de un volumen constante de fármaco de manera cíclica (78-80).

Otros sistemas alternativos en fase de investigación emplean minibombas o sistemas de jeringa acoplados a bombas de infusión, disponibles comercialmente y programados para producir una infusión cíclica con fases de abstinencia. Un ejemplo de estas investigaciones se ha llevado a cabo utilizando 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX), un antagonista del receptor de glutamato. Se trata de un ensayo que relaciona el transporte y concentración del fármaco con su ubicación en la escala timpánica. El objetivo de este trabajo era establecer un modelo cinético básico para la administración intracoclear centrado principalmente en la difusión de sustancias (81).

Otros sistemas más complejos tratan de incorporarse a los modelos de próxima generación, entre los que se mencionan mecanismos de blindaje a proteínas en la perilinfa o sistemas de aclaramiento a través de determinadas estructuras y tejidos cocleares.

1.4 Ototoxicidad por kanamicina y furosemida

La ototoxicidad se define como la alteración bioquímica o estructural del oído interno o del nervio cócleo-vestibular debida a la acción directa de fármacos o sustancias tóxicas, dando como resultado una alteración transitoria o más frecuentemente permanente de la función auditiva y/o del equilibrio.

En algunos trabajos se presentan hasta 130 sustancias ototóxicas (82), aunque las más citadas en la literatura son: aminoglucósidos, salicilatos, quinina, antineoplásicos (sobre todo cisplatino), macrólidos y diuréticos de asa.

Cada ototóxico tiene preferencia de acción por alguna de las regiones diferenciadas del oído interno, aunque puede afectar simultáneamente a varias de ellas. Las sustancias más cocleotóxicas son: dihidroestreptomicina, kanamicina, neomicina, amikacina, cisplatino, netilmicina y salicilatos. Las preferentemente vestibulotóxicas son: estreptomicina, gentamicina y tobramicina. Por último, las de mayor afinidad por la estría vascular son los diuréticos de asa y el cisplatino.

La incidencia de ototoxicidad por aminoglucósidos varía ampliamente en la literatura con cifras que oscilan del 2 al 25%. El mecanismo de acción de estos agentes se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas. Los aminoglucósidos se unen a la subunidad ribosomal 30S de las bacterias y bloquean la iniciación de la síntesis proteica tras generar una lectura errónea del ARN mensajero (ARNm) y fomentar la terminación prematura de la traducción del ARNm.

Se requiere todavía mucha investigación hasta conocer todos los mecanismos moleculares y celulares de la ototoxicidad por aminoglucósidos, aunque existen ya muchos estudios que han comenzado a destapar algunas incógnitas sobre ellos.

Se sabe que tras la administración sistémica, los aminoglucósidos alcanzan la cóclea muy rápidamente, en minutos. Sin embargo se requieren varios días de tratamiento, incluso semanas, hasta que se desarrolla la ototoxicidad, lo que sugiere la existencia de unos complejos mecanismos celulares y moleculares. Una vez alcanzan la cóclea, los aminoglucósidos pueden penetrar en la escala media por varias regiones, entre las que se describen la membrana de Reissner, la estría vascular (en ambos casos con entrada del aminoglucósido entre las células marginales o a través de ellas) y la membrana basilar (83). Una vez en la escala media, se desconoce la forma exacta en la que las células ciliadas absorben los aminoglucósidos. Se han propuesto para ello dos mecanismos fundamentales, la endocitosis a nivel de la superficie apical de la célula (84) y el transporte a través de los canales de transducción mecanoeléctrica localizados en la parte superior de los estereocilios (85) (*fig. 7*).

La *kanamicina* (KAN) produce toxicidad predominantemente a nivel cocleal del mismo modo que los otros aminoglucósidos, es capaz de ejercer su efecto ototóxico mediante diversos mecanismos que se resumen a continuación:

a) Susceptibilidad individual:

Un factor importante para la ototoxicidad por aminoglucósidos es la predisposición genética (86). La herencia predominantemente materna de este aumento de susceptibilidad individual sugiere una implicación mitocondrial y se han encontrado numerosas mutaciones del ADN mitocondrial asociadas a ello (87), entre ellas la más

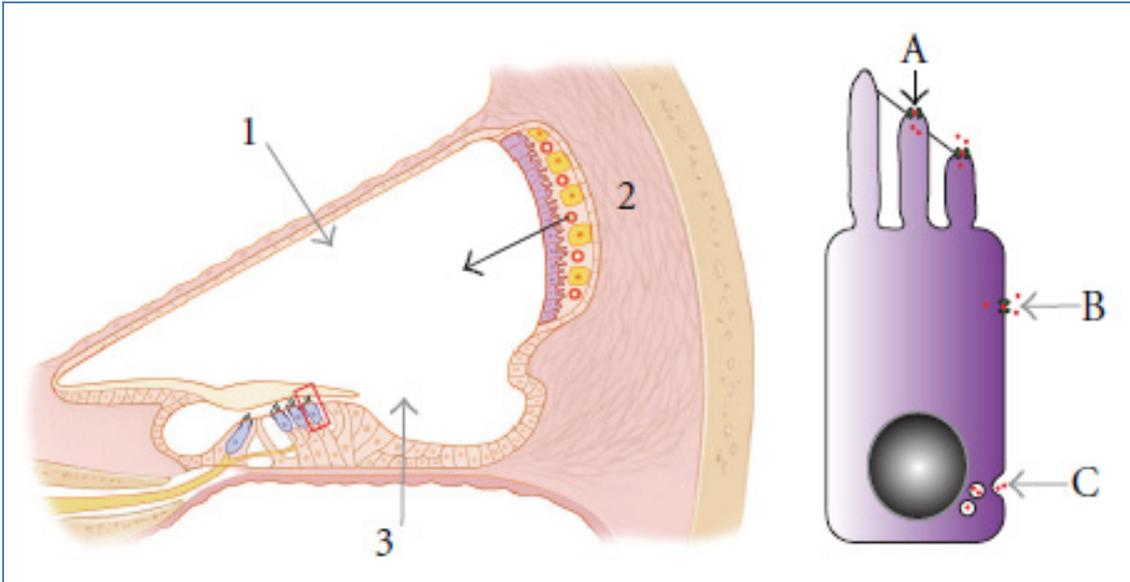


Figura 7. Representación esquemática de los posibles mecanismos de entrada de los aminoglucósidos en el oído interno. La penetración en la escala media podría producirse a través de la membrana de Reissner (1), de la estría vascular (2) y de la membrana basilar (3). Por la membrana de Reissner y la estría vascular la entrada se produce a través y entre las células marginales. A nivel de la membrana basilar los aminoglucósidos podrían penetrar a través de los canales de conducción mecanoeléctrico localizados en los estereocilios de las células ciliadas (A), por mecanismo de endocitosis en la membrana apical o basolateral (A, B o C), a través de canales TRP (A, B, o C) o de receptores ATP (A). Tomado de: *Huth ME et al. Int J Otolarygol 2011:1-19.*

conocida, la mutación A1555G. Estas mutaciones mitocondriales, aunque presentes en todos los órganos, tienen un efecto predominantemente cocleotóxico, siendo casi nula la toxicidad a nivel del órgano vestibular y del riñón. Esto se atribuye a que, entre otras alteraciones, estas mutaciones provocan una disminución de la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) mitocondrial con el consiguiente compromiso de la actividad de bomba iónica, lo que a su vez conduce a una disminución del potencial endococlear y a una disfunción de la estría vascular. Este compromiso de la estría podría explicar la mayor afectación coclear que vestibular en estos pacientes.

b) Integración de la kanamicina en las células ciliadas:

Aunque el mecanismo de entrada de los aminoglucósidos en la célula ciliada es complejo, parece ser que juegan un papel importante tanto la endocitosis como el transporte a través de los canales iónicos localizados en el extremo de los estereocilios de las células ciliadas. (84,85). Hashino y Shero (84) confirmaron la presencia de KAN en vesículas intracelulares 27 horas tras su administración sistémica. La importancia de

los canales iónicos como ruta de entrada de los aminoglucósidos en la célula ciliada se sustenta por la exacerbación del daño ototóxico cuando se combina con la exposición a ruido, ya que el estímulo acústico aumenta la probabilidad de apertura de estos canales (88).

c) Apoptosis y muerte de células ciliadas:

Los aminoglucósidos dañan la célula ciliada de forma directa o indirecta, induciendo primero una desorganización del estereocilio para terminar con la muerte celular apoptótica. La presencia de los aminoglucósidos dentro de las células ciliadas conduce a un aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (89). En la formación de las ROS parece jugar un papel importante la presencia de sales de hierro, mediante el establecimiento de enlaces de este mineral con el fármaco que actúan como generadores de radicales libres e inductores de muerte celular por otras vías de señalización. Esto podría explicar el incremento de la toxicidad por aminoglucósidos en presencia de una elevación de las concentraciones séricas de hierro (90). Las ROS pueden afectar a la permeabilidad de las membranas y pueden alterar determinadas proteínas y ácidos nucleicos interfiriendo por tanto con la función de enzimas, canales iónicos y receptores de membrana. Y aún más importante es su capacidad de actuar como señales o mediadores de cambios en la función, proliferación y diferenciación celular, teniendo el coeficiente redox intracelular un importante papel en la regulación de la expresión génica y un papel crucial en el inicio de la muerte celular, incluso en ausencia de estrés celular. La forma natural con la que la célula trata de protegerse de estas ROS es mediante la producción de antioxidantes intrínsecos como el glutathion (GSH). Sin embargo, cuando el acúmulo de ROS supera la capacidad de los sistemas intrínsecos de protección, se produce la muerte celular por apoptosis.

Se distinguen fundamentalmente dos rutas de apoptosis implicadas en la toxicidad de las células ciliadas por los aminoglucósidos:

1) *Vía extrínseca de la apoptosis:* mediada por receptores de muerte celular, que cuando se estimulan, activan las caspasas mediadoras de la apoptosis. Entre estos receptores se encuentran los de la familia TNF (factor de necrosis tumoral), aunque el prototipo de receptores de muerte celular es el receptor FAS, que activa la caspasa-8, la

cual inicia una cascada para la activación de la caspasa-3, la caspasa-6 y la caspasa-7, responsables últimas de ejecutar la degradación celular.

2) **Vía intrínseca de la apoptosis:** Es la principal vía apoptótica, desencadenada fundamentalmente por estímulos no dependientes de receptores como el déficit de citoquinas, las lesiones del ADN y el estrés citotóxico. La consecuencia principal de esta vía apoptótica es la permeabilización de la membrana mitocondrial, que provoca la liberación de factores proapoptóticos desde la mitocondria al citoplasma de la célula, fundamentalmente citocromo-C, el cual inicia la apoptosis mediante la activación de la caspasa-9, la cual subsecuentemente activa las caspasas 3, 6 y 7 produciendo finalmente la muerte celular. La permeabilidad de la membrana mitocondrial y los mecanismos de la vía intrínseca de la apoptosis están regulados por proteínas de la familia célula-B linfoma-2 (Bcl-2) (91), que actúan controlando la muerte celular y las señales de supervivencia en la mitocondria. Las proteínas de la familia Bcl-2 pueden ser anti o proapoptóticas. Las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas son capaces de ligarse a las proapoptóticas neutralizando las señales de estas últimas, de tal forma que al inicio del daño ototóxico, el equilibrio entre proteínas Bcl-2 pro y antiapoptóticas determinará si se inicia o no la muerte celular.

Otro grupo de mediadores en la muerte celular por apoptosis es el de las protein quinasas activadas por mitógeno (MAPK), entre las que destacan las quinasas del dominio N-terminal de c-Jun (JNK), presentes en el citoplasma. Las JNK se activan en respuesta al daño celular y, una vez activadas, desencadenan una serie de señales que preceden a la liberación de citocromo-C mitocondrial y a la consiguiente activación de las caspasas. Se ha comprobado un aumento de la actividad JNK en varios experimentos tras tratamiento con aminoglucósidos (36).

El resultado final tras todos estos complejos mecanismos es la muerte celular apoptótica, que en el caso del oído interno es la consecuencia tanto de la acumulación de ROS, como de las alteraciones del ADN nuclear, de la alteración energética mitocondrial y de la interrupción de los fenómenos reparativos celulares (*fig. 8*).

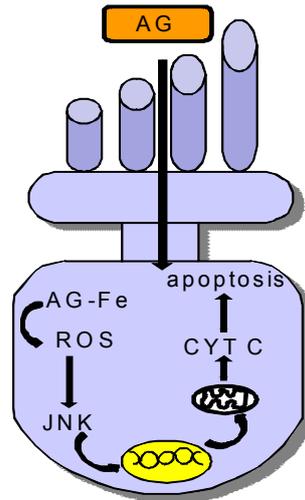


Figura 8. Representación esquemática de los posibles mecanismos de ototoxicidad de los aminoglucósidos.

La entrada del aminoglucósido en la célula ciliada produce la muerte celular por la vía dependiente de las caspasas o por mecanismos independientes. Los pasos representados en la figura son los siguientes: (1) Unión del aminoglucósido a los cilios a través de los canales transductores de membrana; (2) formación de un complejo hierro-aminoglucósido capaz de reaccionar con donantes de electrones como el ácido araquidónico, lo que da lugar a la formación de ROS; (3) activación de JNK; (4) translocación nuclear para activar genes en la vía de la muerte celular; (5) activación de genes mitocondriales; (6) liberación de citocromo C; (7) activación de la apoptosis por la vía de las caspasas. *AG*: aminoglucósidos; *AG-Fe*: Complejo aminoglucósido – hierro; *CYT C*: citocromo C.

La pérdida auditiva provocada por la KAN suele comenzar como una pérdida de tipo perceptivo bilateral y de inicio en las frecuencias más altas, ampliándose al resto de las frecuencias en pacientes sometidos a dosis repetidas, siendo por lo tanto proporcional a la dosis acumulativa recibida. Aproximadamente un 30% de los pacientes presentan acúfeno y son menos frecuentes las alteraciones del equilibrio.

La cascada de cambios histológicos producidos en el oído interno tras exposición a KAN comienza habitualmente por la pérdida de células ciliadas externas (CCE), inicialmente en la tercera hilera de la espira basal de la cóclea (alteraciones morfológicas, desaparición y fusión de los estereocilios) para después progresar hacia la porción apical en concordancia con la progresión de la pérdida auditiva. La progresión del daño continuaría con la pérdida de las células ciliadas internas (CCI) y de las células de sostén del OC, seguida de la de las fibras nerviosas y las neuronas del ganglio espiral (NGE). Por último, y de forma secundaria podrían verse afectados la mayoría de los circuitos neuronales de la vía auditiva.

Respecto a los diuréticos de asa, los más conocidos son la furosemida (FUR) y el ácido etacrínico, que ejercen su acción en el riñón, a nivel de la parte gruesa ascendente del asa de Henle. El diurético más empleado es la FUR, reservándose generalmente el ácido etacrínico para pacientes con escasa respuesta a la furosemida.

La *FUR* actúa bloqueando la reabsorción de sodio y cloro a nivel del túbulo proximal del riñón. Una preocupación común con el uso de diuréticos de asa a dosis elevadas es la ototoxicidad. Las concentraciones a las que la FUR es ototóxica no han sido aún bien establecidas. En algunos trabajos se consideran tóxicas para el oído interno concentraciones séricas a partir de 50 µg/ml (92) aunque existen grandes diferencias entre las distintas publicaciones. Aún con esta variabilidad, los estudios sugieren que la ototoxicidad aparece con dosis extremadamente altas.

Los mecanismos fisiopatológicos que producen la ototoxicidad por FUR no son del todo conocidos. Se ha demostrado un aumento de la concentración de sodio y disminución de la de potasio a nivel de la endolinfa tras la administración intravenosa de FUR (93), así como una reducción dosis dependiente del potencial endococlear (94). Se ha publicado también su participación en la inducción de cambios en la tensión de oxígeno a nivel del líquido perilinfático, lo que podría asociarse a una isquemia de la estría vascular (95). En algunos trabajos informan sobre la capacidad de la FUR para inhibir la fosforilación oxidativa en la mitocondria renal de ratas así como la actividad succinil deshidrogenasa en las células ciliadas del OC de cobayas (94). Parece muy probable que la FUR ejerza su efecto ototóxico por algún tipo de inhibición enzimática, lo que a nivel de la estría vascular podría producir una discapacidad para mantener la homeostasis iónica y por tanto una disminución reversible del potencial endococlear y de la sensibilidad auditiva. Se presume también una posible alteración transitoria en la función motora de las CCE (96).

Se conoce muy bien que los diuréticos de asa potencian el efecto ototóxico de los aminoglucósidos. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a esta potenciación no se han aclarado hasta la fecha. Algunos autores lo han relacionado con el daño anóxico que produce el diurético de asa a nivel del epitelio de la estría vascular, que transformaría un potencial endococlear normalmente positivo en otro negativo, lo que favorecería la entrada en la endolinfa de los aminoglucósidos, que presentan una carga positiva (97).

Histológicamente, los cambios producidos por la FUR afectan sobre todo a la estría vascular e incluyen edema intercelular, disrupción de los capilares y degeneración de la capa intermedia celular (94). Aunque menos frecuentes, también pueden producirse cambios degenerativos en las CCE, inicialmente a nivel de la espira basal de la cóclea. Algunos estudios han podido observar también cambios mitocondriales y en el laberinto vestibular, con degeneración de las células ciliadas tanto tipo I como tipo II en la ampolla y en la mácula (98).

Clínicamente la ototoxicidad por FUR produce una pérdida auditiva transitoria o permanente, bilateral y simétrica y de predominio en las frecuencias más altas (93). Aún así, parece ser más frecuente la afectación reversible, con una recuperación total o parcial de la función auditiva entre 30 minutos y 24 horas tras la administración (99). No son infrecuentes la aparición de vértigo y acúfeno asociados a la hipoacusia, también reversibles en la mayoría de los casos.

Los pacientes con más riesgo de presentar ototoxicidad tras la administración de FUR son aquellos con una función renal alterada, los que reciben tratamiento concomitante con aminoglucósidos, los recién nacidos pretérmino y los pacientes que reciben una infusión intravenosa rápida de FUR.

1.5 Papel de los antioxidantes en la prevención de daño en el oído interno

La principal función de los antioxidantes es inactivar las ROS y por tanto reducir el efecto tóxico del oxígeno. Se especula que las ROS están implicadas en más de 100 situaciones clínicas (100). Estas especies se producen in vivo durante la respiración mitocondrial y tras la autooxidación de moléculas químicas y biológicas. Las ROS son también contaminantes ambientales y pueden formarse por ionización y radiación ultravioleta. Contienen un número impar de electrones que las hacen químicamente reactivas y extremadamente tóxicas para estructuras celulares y subcelulares. Algunas de estas ROS son capaces de aumentar la expresión de receptores de adhesión celular, aumentar la permeabilidad vascular, producir roturas en la cadena del ADN, perturbar la función endotelial y alterar estructuras proteicas y carbohidratos. Por todos estos

mecanismos las ROS podrían contribuir a la ototoxicidad, y de hecho, se considera que juegan un papel fundamental en la misma.

Existen estudios que atribuyen una participación clave a las ROS en el envejecimiento y la presbiacusia (101). En la cóclea, no todos los tipos celulares presentan la misma vulnerabilidad a las especies ROS, siendo las CCE las que más vulnerables parecen, y sobre todo las de la base coclear. Las células de soporte son mucho más resistentes a los radicales libres. Esto podría explicarse por la existencia de diferentes patrones de expresión proteica entre los diferentes tipos de células cocleares. De hecho, se ha comprobado que los niveles de GSH, un antioxidante intrínseco como ya se ha mencionado, son superiores en las CCE del ápex coclear que en las de la base (102). Por otra parte, la NADPH oxidasa 3 (NOX3), una enzima de la familia dinucleótido de nicotinamida – adenina fosfato (NADPH) oxidasas, responsables de la producción de superóxido, se expresa específicamente en las células ciliadas y en las NGE (103).

En términos generales, el daño oxidativo puede ser consecuencia bien de un exceso de producción de ROS o bien de un fallo en los mecanismos para la eliminación de estas especies altamente reactivas. Por lo tanto, se pueden plantear tres estrategias principales para evitar el estrés oxidativo en el oído interno: 1) *Desintoxicación de ROS mediante enzimas antioxidantes*, 2) *Intercepción de ROS mediante agentes depuradores de sustancias oxidativas* y 3) *Inhibición de la cascada de señales de las ROS (fig. 9)*.

Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse a su vez en dos grandes grupos: enzimáticos y no enzimáticos. Los enzimáticos incluyen sustancias que eliminan ROS mediante reacciones catalíticas, como por ejemplo la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa o la glutatión peroxidasa (GPX). Los sistemas antioxidantes no enzimáticos incluyen sustancias intra o extracelulares de bajo peso molecular que además pueden clasificarse en antioxidantes de acción directa (agentes depuradores y transgresores de cadena) y antioxidantes de acción indirecta (agentes quelantes) (104).

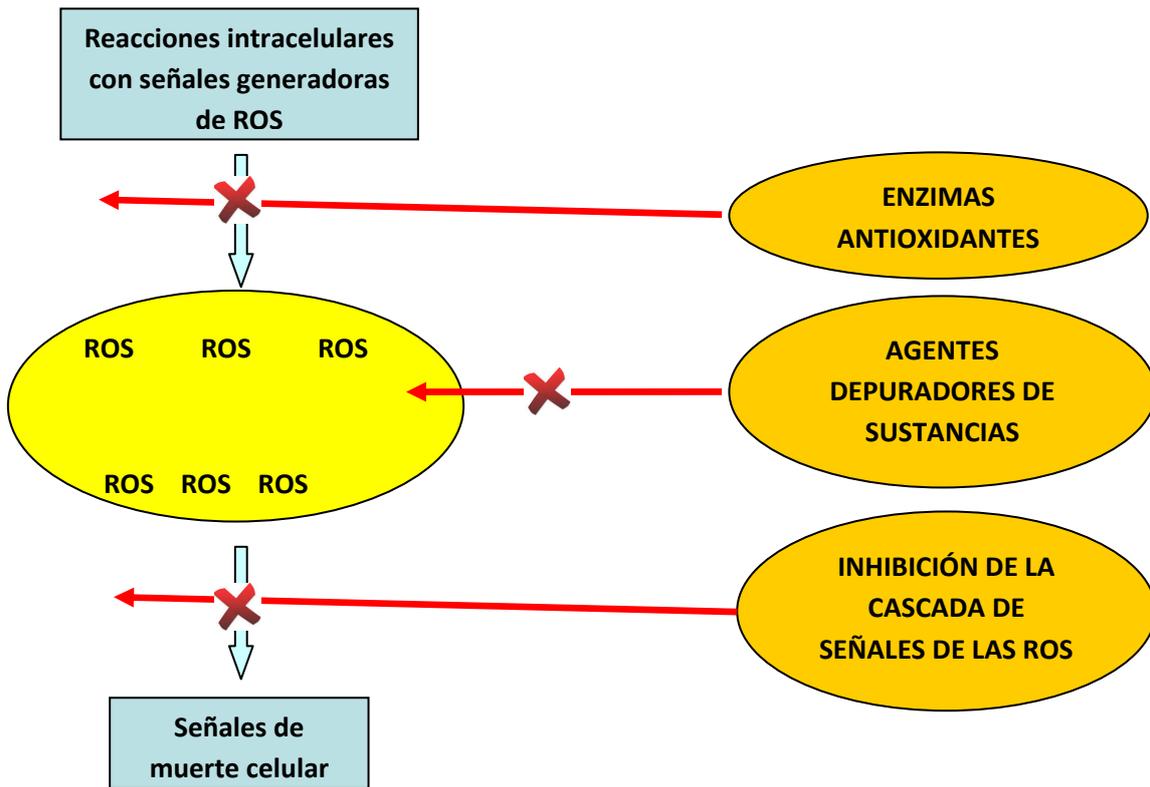


Figura 9. Representación esquemática de las posibles estrategias para evitar el estrés oxidativo

1.5.1 Enzimas antioxidantes

La importancia de las enzimas antioxidantes en seres humanos se soporta actualmente en la literatura por las grandes diferencias interindividuales en la vulnerabilidad a los medicamentos ototóxicos. Ejemplos de ello son la asociación de la ototoxicidad inducida por cisplatino al polimorfismo de la **glutación-S-transferasa (GST)** (105) o las diferencias en la vulnerabilidad de las células ciliadas a los aminoglucósidos asociadas a diferentes niveles de expresión de la **SOD** (106). Existen modelos genéticos en ratón que no expresan SOD en los que se ha demostrado mayor susceptibilidad al trauma acústico (107). La susceptibilidad de las células ciliadas a los aminoglucósidos también es menor en cobayas con una sobreexpresión de **catalasa** y SOD mediada por vectores adenovirales (108).

Como estrategias para la otoprotección se encuentran también en la literatura múltiples sustancias que o bien activan enzimas antioxidantes o bien inactivan enzimas oxidantes. El **alopurinol** es un inhibidor de la **xantina oxidasa** que ha demostrado

protección contra el trauma acústico (109). De igual manera, una **SOD de acción prolongada unida covalentemente a poletilenglicol (PEG-SOD)** conserva los umbrales auditivos en ratas expuestas a ruido intenso (109). Los **agonistas de los receptores de adenosina**, que incrementan la actividad coclear de la **GPX** y de la **SOD**, protegen contra la toxicidad inducida por cisplatino (110). El **ebseleño** es un compuesto seleno-orgánico liposoluble muy utilizado como antioxidante en experimentación animal que actúa por un mecanismo similar a la **GPX** (111).

Además del metabolismo enzimático de las especies derivadas del oxígeno, otras enzimas intracelulares canalizan la producción de especies reactivas de nitrógeno (ENR), de suma importancia para el estrés oxidativo junto con las ROS. El óxido nítrico (NO) es la forma más frecuente de ENR y se produce endógenamente a partir de la oxidación de L-arginina a L-citrulina, catalizada por una familia de enzimas, las **sintasas de óxido nítrico (NOS)**. Los inhibidores de las NOS como el **L-N(omega)-Nitroarginina metil ester (L-NAME)** o la **aminoguanidina** disminuyen los cambios en la audición y la pérdida de células ciliadas tras la administración de ototóxicos y la exposición a ruido intenso (112,113).

1.5.2 Agentes depuradores de sustancias oxidantes

En la actualidad existe un gran interés por determinadas moléculas intra o extracelulares de bajo peso molecular que actúan como depuradoras de sustancias oxidantes y que presentan un elevado potencial terapéutico. Entre estas moléculas se pueden mencionar las siguientes:

1.5.2.1 Quelantes de metales

El estrés oxidativo se acompaña en mayor o menor medida de una alteración en la homeostasis de los iones metálicos, incluyendo los metales de transición con actividad redox, es decir, el hierro y el cobre. Por tanto, la terapia con quelantes de estos metales supone una estrategia prometedora para prevenir la ototoxicidad. Ejemplos de ello son los quelantes de hierro como la **deferroxamina** o el **2,3-dihidroxibenzoato**, que han demostrado una mejoría en la función auditiva y en la pérdida de células ciliadas en cobayas sometidas a tratamiento con aminoglucósidos (114,115).

1.5.2.2 Sustancias que contienen tiol

Los *tioles* o *complejos sulfidrilo* de bajo peso molecular son sustancias electrofílicas que pueden actuar directamente como depuradores de radicales libres. Además, los tioles aumentan la captación de cisteína con el consiguiente incremento de la síntesis de GSH intracelular.

Los principales tioles empleados en la literatura como estrategia para la protección del daño a nivel del oído interno son la *N-acetilcisteína (NAC)*, la *amifostina*, el *dietilditiocarbamato*, la *erdosteína*, el *GSH*, el *ácido lipoico*, la *L* y *D-metionina*, el *metiltiobenzoato*, la *tiopronina*, el *tiosulfato de sodio*, la *tiourea* y el *carboxilato de oxotiozolidina* (104).

Los suplementos de GSH han demostrado prevenir la toxicidad inducida por cisplatino en cobayas (116). Se han encontrado también variaciones en los niveles de enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH y en la concentración de GSH en relación con la edad y en determinadas situaciones de estrés oxidativo como la que se produce con la exposición a cisplatino (117).

La administración local y sistémica de D-metionina protege contra la ototoxicidad inducida por cisplatino en roedores (34,118).

La *NAC* fue el primer depurador de radicales libres empleado para probar la protección contra la ototoxicidad inducida por KAN (119). Algunos estudios muestran otoprotección en el tratamiento con cisplatino con la administración local o sistémica de *NAC* en ratas y cobayas (120,121) y con la combinación de dos tioles, la *NAC* y el tiosulfato de sodio (122).

Como se puede comprobar, existe un soporte importante en la literatura respecto a la protección de los tioles contra la toxicidad inducida por cisplatino, sin embargo, la inquietud que provoca la disminución de los efectos antioncológicos de este fármaco cuando se combina con estas sustancias ha limitado el uso clínico de las mismas. Además de la protección contra ototóxicos, la *NAC* ha demostrado otoprotección frente al ruido (123-125).

Por último, la literatura hace también referencia a la prevención de toxicidad por aminoglucósidos con muchos de estos compuestos tiónicos (118,126-128).

1.5.2.3 Otras moléculas antioxidantes

Otras sustancias antioxidantes que han demostrado su efecto otoprotector por la capacidad de eliminar especies oxígeno-reactivas son la *vitamina-E* (129,130), el *salicilato* (131), determinados *extractos de hierbas que contienen flavonoides* (132), el *ginkgo biloba* (133), la *vitamina-C* (134), la *coenzima Q10* (135) y el *magnesio* (134).

A pesar de la gran cantidad de antioxidantes descritos en la literatura, existen muy pocos ensayos clínicos en seres humanos con estas sustancias como para poder extraer conclusiones firmes sobre su eficacia y seguridad. Entre estos ensayos clínicos pueden mencionarse algunos con salicilato y NAC que han demostrado disminuir la hipoacusia inducida por gentamicina (128,136), y otro estudio que ha demostrado protección para la hipoacusia inducida por quimioterápicos derivados del platino en pacientes con tumores cerebrales malignos (137).

1.5.3 Moléculas que actúan a nivel de la cascada de señales de las ROS

La exposición a ruido intenso y la administración de fármacos ototóxicos dan lugar a una acumulación de ROS que induce la liberación del citocromo C desde la mitocondria mediante la activación de las JNK y de la p38MAPK (p38 *mitogen-activated protein kinase*). El citocromo C induce a su vez la activación de las caspasas-8, 9 y 3, formando parte esta última de la vía intrínseca de la apoptosis.

La fosforilación de c-Jun, un componente del factor de transcripción *Activator Protein 1* (AP-1), por la JNK en su extremo N-terminal, es un acontecimiento central en la apoptosis de las células ciliadas y neuronas cocleares durante el estrés oxidativo. La *inhibición del sistema JNK* ha demostrado prevenir la muerte de células ciliadas cocleares y vestibulares tras tratamiento con aminoglucósidos (138). Con la inhibición de JNK se ha conseguido también disminuir la hipoacusia inducida por ruido (139). Entre los inhibidores empleados del sistema JNK se encuentran el *CEP-1347* y el *KT-7515*.

Otra posible diana terapéutica es la vía de la p38 α MAPK, que como se ha mencionado anteriormente, también se activa durante el estrés oxidativo. La importancia de la *inhibición de estas MAPK* puede comprobarse en estudios que emplean *minociclina*, una tetraciclina de segunda generación, para bloquear esta vía e

impedir así la activación de las caspasas apoptóticas, disminuyendo de esta manera la pérdida de células ciliadas inducida por gentamicina *in vitro* (140,141). En otro trabajo consiguen el mismo resultado tras exposición a ruido *in vivo*. Los inhibidores de p38 α MAPK empleados en este caso fueron el **SB202190** y el **SB203580** (142).

Terapia combinada con antioxidantes

Como se ha visto, en la literatura se describen numerosas sustancias antioxidantes con potencial para el tratamiento de la hipoacusia inducida por ruido o por fármacos ototóxicos. Los estudios emplean fundamentalmente dos estrategias para el uso de estas sustancias: bien un tratamiento simple con un antioxidante o bien el tratamiento combinado con varios antioxidantes. Actualmente existe una tendencia a la estrategia de la combinación, con estudios que incluso combinan múltiples antioxidantes (143). Uno de los motivos para ello es asumir la oxidación del propio antioxidante y por tanto, su actuación como radical libre cuando se emplea como única sustancia. Otro motivo es que cada antioxidante dirige su acción hacia una sola diana de la vía oxidativa, existiendo sin embargo diferentes tipos de ROS en diferentes compartimentos celulares que requerirían antioxidantes específicos en el lugar correcto y en el momento preciso para una neutralización química eficiente de las mismas.

La mejor combinación de antioxidantes debería estar basada en los principios de antioxidación conocidos científicamente, poseer un efecto protector para las células y neuronas presentes en el oído interno y ejercer su efecto disminuyendo el estrés oxidativo y la inflamación y mejorando la función inmunológica. Además, cualquier combinación de antioxidantes debería poder demostrar su beneficio en ensayos clínicos controlados en seres humanos.

Tanto la distribución orgánica como el mecanismo de acción difieren entre las distintas sustancias antioxidantes. También son importantes las dosis empleadas y el esquema de administración, ya que los niveles alcanzados presentan grandes fluctuaciones en función de que se administren una o varias veces al día. Estas razones hacen también más recomendables los diseños que combinan varios antioxidantes.

Todas estas circunstancias condicionan la escasez de estudios clínicos en seres humanos relacionados con la eficacia de estas sustancias, siendo preponderantes los modelos de experimentación animal y los estudios celulares *in vitro*.

En nuestro trabajo se ha empleado la combinación de NAC y resveratrol (RESV). La *NAC* se ha comentado en párrafos anteriores incluida en el grupo de los tioles. Se trata de un precursor de glutatión (GSH) por participar en su síntesis mediante el suministro de cisteína y ya se han expuesto varios estudios en modelos animales que sustentan su potencial en la prevención del daño en el oído interno inducido por ruido o por fármacos ototóxicos, tanto cuando se emplea de forma aislada como en combinación con otras sustancias. En seres humanos se ha empleado durante años en el ámbito clínico de forma segura como antídoto en la sobredosis por acetaminofeno y como mucolítico en infecciones respiratorias. Son muy escasos sin embargo los estudios clínicos en humanos relacionados con su potencial otoprotector (144), y por supuesto, carecemos de ensayos clínicos aleatorios al respecto.

El *RESV* es otra sustancia antioxidante que fue identificada por primera vez como un ingrediente de las raíces secas del *Polygonum cuspidatum*, de predominio en Japón y en China. De hecho, el extracto de *Polygonum* se ha utilizado en la medicina tradicional japonesa y china para el tratamiento de infecciones por hongos, erupciones cutáneas, trastornos hepáticos y enfermedades cardiovasculares (145). La piel de la uva es la fuente principal de RESV aunque también está presente hasta en más de 70 frutas (arándano, mora, jaca, maní, etc.) y en una amplia variedad de flores y hojas como el árbol de la orquídea en forma de mariposa, el pino silvestre, la flor de lirio del maíz, el eucalipto, etc. Se ha descrito también una síntesis endógena de RESV en respuesta a determinadas situaciones de estrés como la privación de agua, el exceso de radiación ultravioleta y las infecciones fúngicas (146). Además de estas fuentes naturales, el vino blanco y el vino tinto también contienen RESV.

Son muchas las actividades biológicas atribuidas al RESV, y sin embargo, todas ellas se han publicado solamente en modelos animales experimentales. La gran mayoría de los resultados de estos experimentos necesitan todavía reproducirse en seres humanos. Entre estas actividades se encuentran las siguientes:

a) *Liberación de radicales libres:*

El RESV se considera un potente antioxidante natural que actúa liberando algunas ROS intracelulares. Esta propiedad es, entre otras, la responsable de que numerosos estudios atribuyan al RESV beneficios como la disminución del riesgo de infarto agudo de miocardio, la mejoría de la función ventricular postisquémica, la prevención contra la apoptosis de células miocárdicas, la activación de señales de supervivencia celular y la inhibición de señales de muerte celular (147).

b) *Regulación de la homeostasis redox*

El RESV es capaz de regular la homeostasis redox (término abreviado para las reacciones de reducción – oxidación) gracias a su capacidad de mantener las concentraciones de algunas enzimas antioxidantes como la Gpx, la GST y la glutatión reductasa (148). También se conoce que el RESV previene la oxidación de la *low density lipoprotein* (LDL), ya que es un potente inhibidor de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la misma.

c) *Inhibición de la agregación plaquetaria:*

La agregación plaquetaria es el factor más determinante en el proceso de la arterioesclerosis. Se ha demostrado una disminución dosis dependiente de esta agregación plaquetaria tras tratamiento con RESV *in vitro* (149).

d) *Propiedades antineoplásicas:*

Se ha demostrado una potencial actividad antineoplásica del RESV en varios tipos de tumores tanto en el inicio de los mismos, como durante su evolución y progresión a estadios más avanzados. Un ejemplo de ello es la inducción de muerte de células tumorales en cultivos celulares *in vitro* procedentes de células de cáncer colorrectal de seres humanos tras 48 horas de exposición a 100 mM de RESV (150).

e) *Propiedades antiinflamatorias:*

El RESV ha demostrado una actividad beneficiosa frente a la respuesta inflamatoria mediante la inhibición de la expresión de las ciclooxigenasas 1 (COX1) y 2 (COX2) (151). También ha mostrado en modelos animales *in vitro* una

reducción de la producción de prostanglandina E2 (PGE2) (152) y una disminución de la actividad de células B, células T y macrófagos (153).

f) Neuroprotección

Hay publicaciones que informan sobre la protección del RESV contra la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson en modelos experimentales *in vitro* de líneas celulares procedentes de animales o de humanos (154,155).

Desde el punto de vista farmacológico, todas estas actividades biológicas convierten al RESV en una sustancia con un amplio espectro de dianas. En lo que respecta a su papel en la prevención de daño a nivel del oído interno, una de sus actividades más importantes quizá sea la inhibición de la actividad MAPK (156), aunque son muchas las otras vías enzimáticas en las que el RESV podría estar implicado.

Una de las incógnitas respecto al tratamiento con RESV es su dualidad funcional, pudiendo ejercer tanto una actividad antiapoptótica en la prevención de enfermedades cardiovasculares y en la prevención de la hipoacusia inducida por ototóxicos (157,158), como una actividad inductora de muerte celular apoptótica en determinados tumores malignos, lo que le atribuye un potencial antineoplásico. De todas las publicaciones relativas al RESV se deduce que las relacionadas con la prevención del cáncer y por tanto englobadas en el contexto de inducción de apoptosis, emplean el RESV a altas concentraciones. Por el contrario, las que persiguen actividad antiapoptótica para prevención sobre todo de enfermedades cardiovasculares, utilizan concentraciones más pequeñas. Esto lleva a pensar que los beneficios clínicos que proporciona el RESV se producen de una manera dosis – dependiente y que la búsqueda de un determinado efecto terapéutico no puede basarse exclusivamente en aumentar la dosis del mismo, lo que, como ocurre con otros fármacos, también conlleva la posibilidad de efectos adversos indeseables. Aún así, dependiendo del efecto que se pretenda, pueden ser necesarias concentraciones elevadas.

En conclusión, se puede decir que el entendimiento cada vez más refinado de los mecanismos implicados en la ototoxicidad ha generado un interés creciente en el

empleo de sustancias antioxidantes como terapia potencial para los trastornos del oído interno. Sin embargo, pese a que estos tratamientos deberían poder emplearse simultáneamente con las terapias que suponen un riesgo ototóxico, no existe en la actualidad ningún fármaco aprobado por la *Food and Drugs Administration* (FDA) con esta finalidad. Se necesitan por tanto ensayos controlados aleatorios que establezcan con certeza no sólo los beneficios de estas sustancias antioxidantes en seres humanos, sino también las dosis y los esquemas terapéuticos más adecuados para conseguirlos y para evitar los efectos adversos indeseables asociados a ellas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Pese a la notable incidencia de la hipoacusia neurosensorial en la población mundial, actualmente sólo es posible para ella un tratamiento rehabilitador mediante prótesis auditivas e implantes cocleares.

Los pacientes con hipoacusia neurosensorial de origen coclear sufren la muerte de las células ciliadas sensoriales. Esta situación puede reproducirse en modelos animales que emplean sustancias ototóxicas.

Dada la conocida capacidad de ciertas sustancias antioxidantes para inhibir los fenómenos inflamatorios y prevenir la muerte por apoptosis y/o necrosis de células sensoriales y neuronales, nuestra hipótesis de trabajo es que el tratamiento *in vivo* con sustancias antioxidantes como la NAC y el RESV podría modular la pérdida auditiva y la muerte de células ciliadas en la cóclea tras un daño ototóxico.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos principales

1. Validar un modelo de ototoxicidad local en la rata consistente en la aplicación directa sobre la VR de una combinación de dos ototóxicos, la KAN y la FUR, empleando como vehículo el gelfoam.
2. Estudiar la eficacia de la administración combinada de dos antioxidantes, la NAC y el RESV, para prevenir o modular los cambios morfológicos y funcionales de la cóclea, objetivados mediante estudio histológico convencional y potenciales evocados auditivos de tronco cerebral, en el modelo de ototoxicidad local en ratas validado previamente.

2.2.2 Objetivos secundarios

1. Comparación de la administración directa sobre la VR de KAN y FUR con la administración sistémica de ambos ototóxicos, objetivado mediante estudio histológico convencional y potenciales evocados auditivos de tronco cerebral.

2. Estudiar en el modelo de ototoxicidad local en rata los cambios en la expresión coclear de genes relacionados con el estrés oxidativo, con la defensa antioxidante y con la síntesis de citoquinas pro y antiinflamatorias tras el tratamiento con NAC y RESV.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño del trabajo comprende dos fases:

1. Validación de la administración directa de KAN y FUR en la VR como método de ototoxicidad local en rata Wistar y comparación de dicho método con la administración sistémica de estas sustancias.
2. Determinación del potencial otoprotector de una combinación de RESV y NAC tras su administración intraperitoneal.

3.1 Consideraciones éticas

El manejo de los animales se realizó respetando las recomendaciones y normas éticas recogidas en la literatura internacional (159-161), la Directiva Europea 86/609/CEE y reguladas en España por el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre de 2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (162) y la ley 32/2007, de 8 de noviembre de 2007 para el cuidado de animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (163).

Los ensayos han sido aprobados por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y por el de la Fundación de Investigación del Hospital Universitario Príncipe de Asturias, habiéndose planteado respetando al máximo la norma de reducir el número de animales de experimentación al mínimo que permite obtener resultados con significación estadística.

3.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 67 ratas Wistar de género masculino de 8 semanas de edad al comienzo del estudio y 250 – 300 g de peso. Todos los animales se mantuvieron bajo un ambiente controlado con un ciclo de luz / oscuridad de 12 horas y recibieron alimento y agua *ad libitum*.

Los animales se dividieron en grupos para:

1. Validar el método de ototoxicidad local con una solución concentrada de KAN y FUR embebida en gelfoam y posicionada directamente sobre la

membrana de la VR y comparar dicho método con la administración sistémica de los ototóxicos.

2. Determinar la capacidad otoprotectora de una combinación de RESV y NAC contra la administración local de KAN y FUR.

3.3 Diseño experimental

3.3.1 Validación del método de ototoxicidad local y comparación con la administración sistémica

Los animales se distribuyeron en cuatro grupos experimentales (*fig. 10*):

- **Grupo 1. Administración sistémica:** Seis ratas que recibieron una inyección única de KAN subcutánea y FUR intravenosa y otras tres que recibieron la administración de suero salino también por vía sistémica.
- **Grupo 2. Administración sobre la VR:** Este grupo se subdividió a su vez en tres grupos:
 - **Grupo 2a:** Seis ratas sometidas exclusivamente al procedimiento quirúrgico, sin administración de ningún tratamiento, que representaron el grupo control de cirugía.
 - **Grupo 2b:** Seis ratas en las que se colocó sobre la VR un fragmento de gelfoam embebido con suero salino.
 - **Grupo 2c:** Seis ratas en las que se colocó sobre la VR un fragmento de gelfoam embebido con una solución concentrada de KAN y FUR.

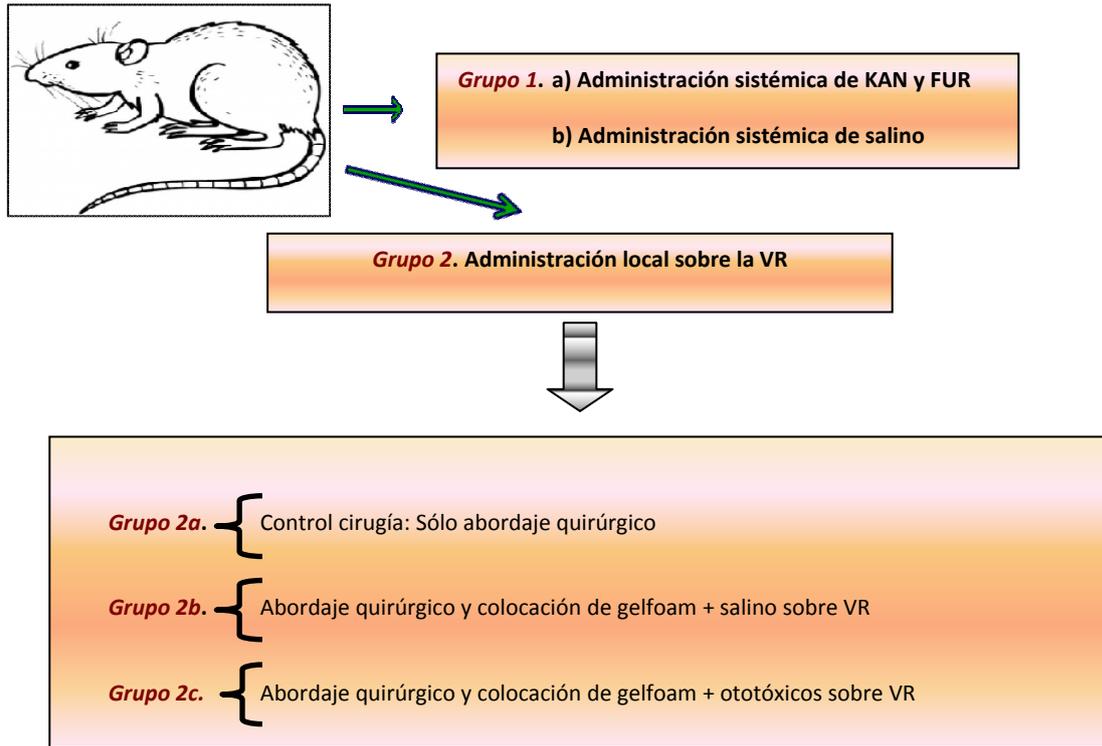


Figura 10. Representación esquemática de los grupos de animales en la fase de validación del método de ototoxicidad local

3.3.2 Determinación de la capacidad de otoprotección de RESV y NAC

Se emplearon 44 ratas que fueron sometidas a un daño ototóxico mediante la aplicación directa sobre la VR de gelfoam embebido con una solución concentrada de KAN y FUR, método ya validado en la fase anterior de este estudio. Estos animales se distribuyeron en dos grupos:

- **Grupo 1:** 25 ratas que recibieron una dosis intraperitoneal diaria de RESV y NAC durante 5 días, comenzando el día anterior a la cirugía destinada a la colocación sobre la VR del gelfoam embebido con la solución de ototóxicos.
- **Grupo 2:** 19 ratas que recibieron una dosis intraperitoneal de suero salino en un volumen similar al del grupo 1 y con el mismo esquema cronológico.

Con las ratas de este estudio se realizaron a su vez dos ensayos, un ensayo a tiempo corto ($n = 26$: *Salino* = 11; *RESV + NAC* = 15) en el que el sacrificio se realizó a los 3 días desde el inicio de la aplicación local de los ototóxicos (5 días desde el inicio del

tratamiento con antioxidantes), y otro ensayo a tiempo largo ($n = 18$: *Salino* = 8; *RESV + NAC* = 10) en el que las ratas se sacrificaron a los 21 días (*fig. 11*).

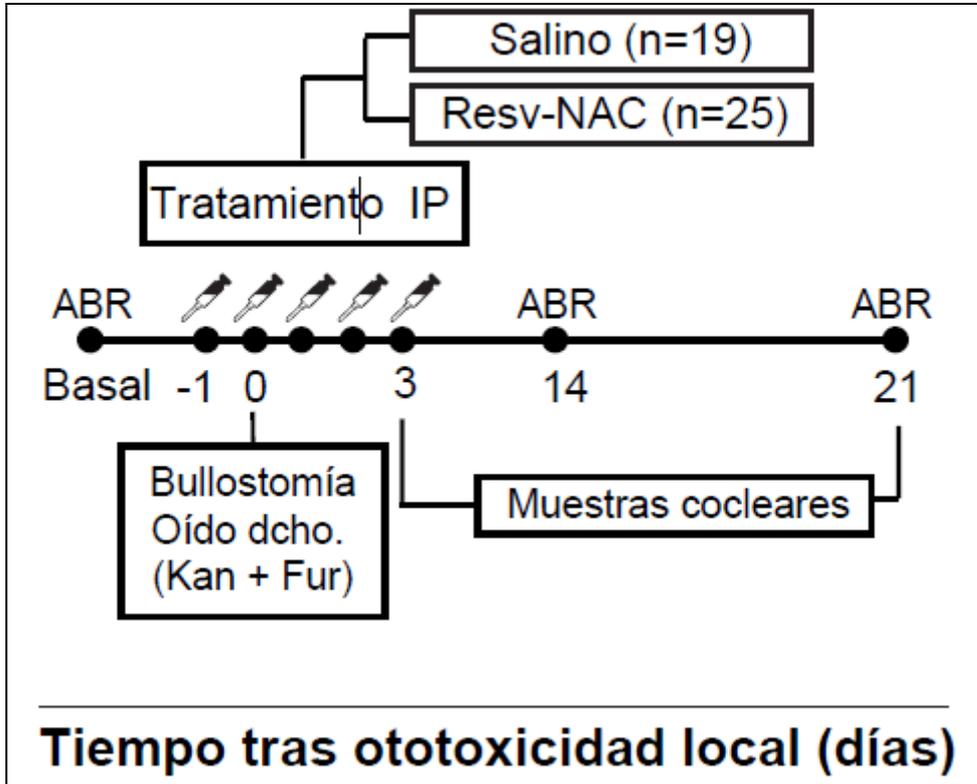


Figura 11. Representación esquemática del experimento con antioxidantes. Después del ABR basal, las ratas se trataron con RESV + NAC intraperitoneal o con salino durante 5 días. En el segundo día de tratamiento se realizó una bullostomía en el oído derecho (OD) y se colocó un fragmento de gelfoam embebido con la solución concentrada de KAN y FUR sobre la membrana de la VR. La evaluación auditiva se realizó con ABR a los 3, 14 y 21 días después de la cirugía. Para el estudio histológico y el estudio genético se extrajeron muestras cocleares 3 y 21 días después de la bullostomía. *IP*: intraperitoneal; *ABR*: Auditory Brainstem Response.

3.4 Instrumental

3.4.1 Instrumental quirúrgico

Para el procedimiento quirúrgico que se detallará en el siguiente apartado se empleó instrumental de cirugía convencional e instrumental microquirúrgico de rutina, del que se utilizaron fundamentalmente un microgancho angulado, un microgancho en ángulo

de 90°, un punzón, una micropinza angulada, una microtijera y una micropinza para cuerpos extraños de Hartmann-Wullstein.

3.4.2 Equipo de anestesia

Se empleó un equipo de anestesia inhalatoria apto para animales de laboratorio (Alcyon Anesthesia Workstation, Alcyon Ibérica, España) compuesto por rotámetro con flujo máximo de 4 l/min, vaporizador de isoflurano y posibilidad de ventilación mecánica. Cuenta además con una cámara de metacrilato para realizar la inducción y una mascarilla – mesa quirúrgica para el mantenimiento anestésico. Está dotado de un sistema de aspiración y filtrado para los gases sobrantes tanto de la mascarilla como de la cámara.

3.4.3 Equipo de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral

La exploración funcional auditiva en las ratas se efectuó con la técnica de Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral, también conocida por su terminología inglesa como *Auditory Brainstem Response* (ABR). La técnica forma parte de la oferta del Servicio de Evaluación Neurofuncional No Invasiva del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). Es reproducible y proporciona una información funcional cuantitativa in vivo. El registro se realizó en una cámara anecoica y sonoamortiguada y los estímulos se generaron por el equipo TDT System 3TM con un procesador RP2.1 y un atenuador PA5, reproduciéndose a través de un altavoz electrostático TDT de campo libre ED1. Para generar los estímulos sonoros (*clicks* y tonos puros) se empleó el software SigGeRPTM (Tucker – Davis Technologies, FL, EE.UU.). Los estímulos fueron calibrados utilizando el software SigCal y un micrófono ACO Pacifics de ¼ pulgada. La respuesta se analizó con el software BioSigRPTM (Tucker – Davis Technologies) (164).

3.4.4 Microscopio

En la primera parte del trabajo destinada a validar el método de ototoxicidad se empleó un microscopio óptico convencional (Leitz Wild M715, Switzerland).

En la segunda parte del trabajo se utilizó un microscopio de cirugía otológica (OPMI pico, Carl Zeiss Surgical GmbH, Alemania) trabajando con las posiciones de enclavamiento 0,6x, 1x y 1,6x.

3.5 Anestesia

El método empleado para la anestesia (tanto para el procedimiento quirúrgico como para el estudio funcional auditivo) fue distinto en cada una de las dos fases del trabajo. Así, en la primera fase para validar el método de ototoxicidad las ratas se anestesiaron mediante la inyección intraperitoneal de ketamina (Imalgene, Merial, España; 100 mg/kg), xilazina (Rompun 2%, Bayer, España; 10 mg/kg) y buprenorfina (Buprex, Shering-Plough, España; 0,01 mg/kg), utilizando la pérdida de reflejos como control de la profundidad anestésica. Primero se pierden los reflejos de estación (postura) y seguidamente el reflejo podal. Durante el procedimiento anestésico es necesario también controlar los signos vitales (respiración y latido) y mantener en un rango estable la temperatura corporal del animal, para lo cual se empleó una manta eléctrica de agua circulante.

En la segunda fase del trabajo para determinar el potencial otoprotector de la mezcla de antioxidantes se empleó una anestesia general inhalatoria.

3.6 Procedimiento quirúrgico

3.6.1 Anatomía quirúrgica

El hueso temporal de la rata se localiza posteriormente al hueso escamoso. La bulla timpánica es una cavidad proporcionalmente grande en la rata, con las paredes inferior y anterior redondas y lisas (*fig. 12*). La membrana timpánica y la apófisis mastoides constituyen la pared lateral de la bulla. La mastoides es realmente una prolongación de esta bulla y carece de celdillas aéreas. La mayoría de las estructuras del oído medio se

localizan en la pared medial de la bulla, siendo la cóclea la estructura más relevante, que proyecta su eje mayor dentro de la bulla en una dirección anterior y ligeramente inferior.

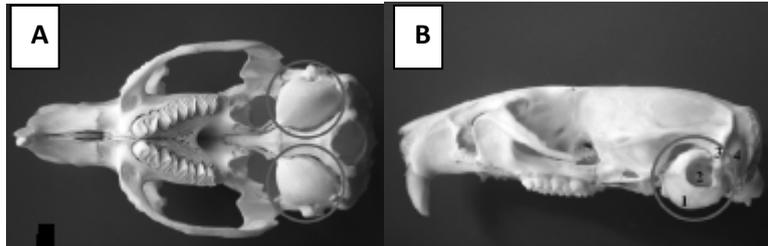


Figura 12. Base del cráneo de una rata mostrando la bulla timpánica.
 A: Visión inferior. B: Visión lateral bulla izquierda. Tomado de
Albuquerque AA et al. Braz J Otorhinolaryngol 2009;75(1):43-9

3.6.2 Abordaje quirúrgico

Una vez anestesiadas las ratas se comprobó la pérdida del reflejo de retirada y se colocaron sobre una manta termorregulada, rasurando el pelo del cuello, desinfectando la piel expuesta con povidona yodada y girando ligeramente la cabeza hacia la izquierda para exponer el oído derecho. El procedimiento quirúrgico para exponer la VR se adaptó tomando como referencia publicaciones previas (165,166). Todas las intervenciones se realizaron en el oído derecho, aprovechando el oído izquierdo como control intra-animal.

El abordaje comenzaba con una incisión longitudinal desde el ángulo de la mandíbula hasta el manubrio esternal, despegando un colgajo de piel y tejido subcutáneo para exponer un campo quirúrgico en el que debían visualizarse el músculo masetero, el músculo esternocleidomastoideo y la glándula submaxilar, de un tamaño grande en la rata. Esta glándula se disecaba y desplazaba medialmente hasta exponer el músculo digástrico, cuya inserción posterior a nivel del hueso occipital en la rata se relaciona íntimamente con la bulla timpánica, armazón óseo de pared fina y configuración redondeada que contiene las estructuras del oído medio e interno. Otras estructuras expuestas eran la vena facial, el tronco principal del nervio facial y el nervio

hipogloso. El siguiente paso consistía en realizar un orificio en la región posterolateral de la bulla (bullostomía) con un gancho otológico sin botón de 15 cm de longitud y punta de 1 mm (Karl Storz GmbH & Co. KG., Tuttlingen, Alemania), para después ampliarlo con una micropinza auricular de Hartmann-Wullstein de 8,5 cm de longitud y terminal de 1mm (Karl Storz GmbH & Co. KG., Tuttlingen, Alemania), permitiendo así tanto la visualización de la arteria estapedial y del nicho de la VR como la acomodación sobre la membrana de dicha ventana del fragmento de gelfoam embebido con salino o con la solución concentrada de los ototóxicos. Finalmente se procedía al cierre de la bullostomía con cemento dental (Durelon®) y se suturaba la piel con seda 4/0 (*figs. 13 a 18*).



Figura 13. Incisión cutánea desde el ángulo mandibular hasta el manubrio esternal, con descarga sobre la rama mandibular.

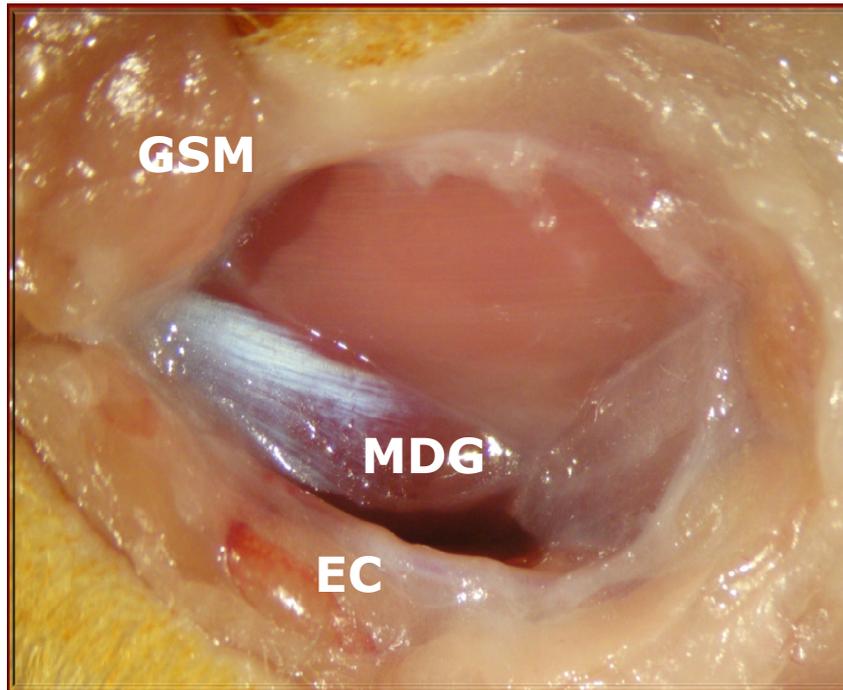


Figura 14. Exposición de la glándula submaxilar (GSM), que se desplaza medialmente, del músculo esternocleidomastoideo (ECM) y del músculo digástrico (MDG)

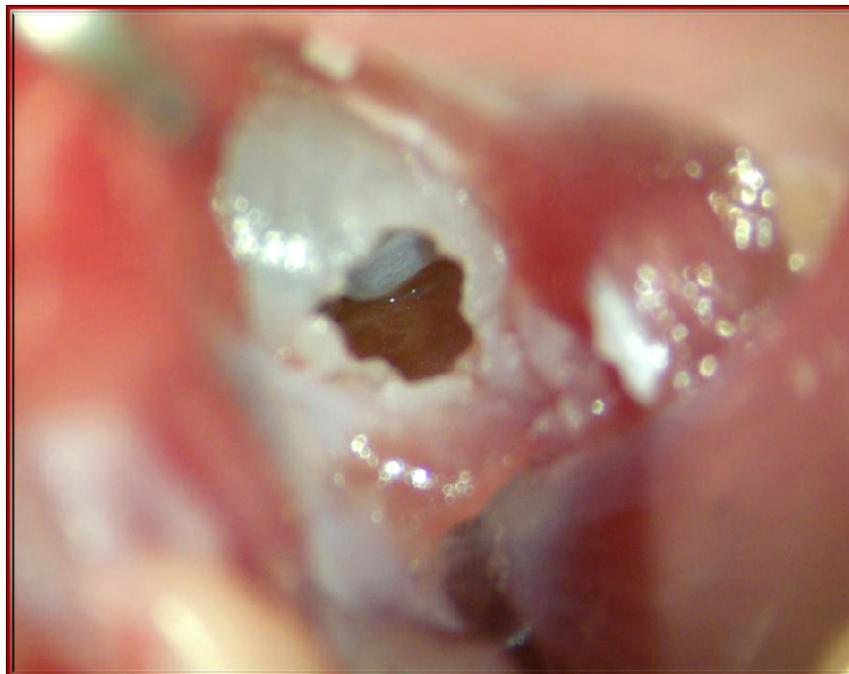


Figura 15. Realización de la bullostomía tras sección del vientre posterior del músculo digástrico. Se pueden apreciar ya la arteria estapedial y el nicho de la VR

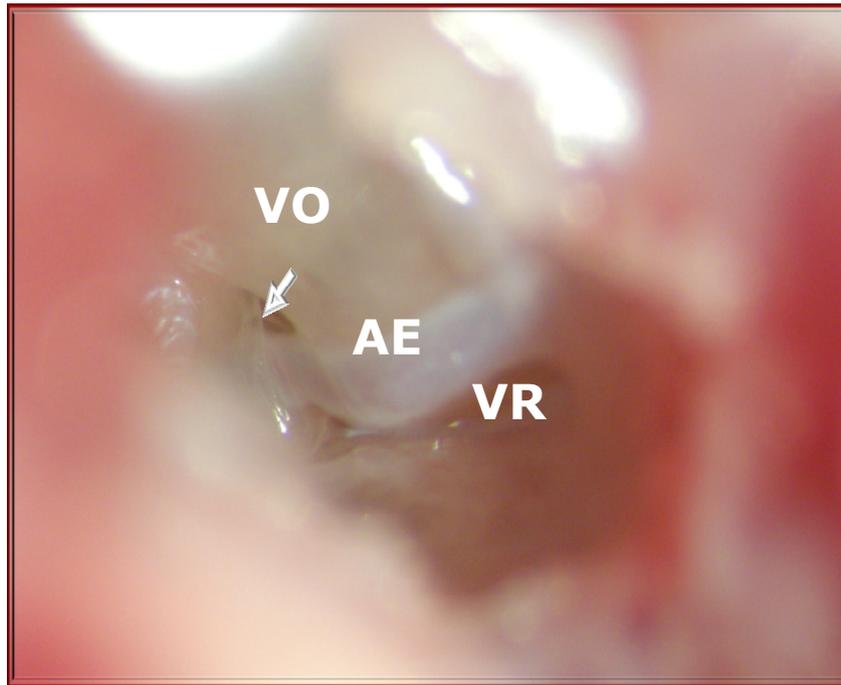


Figura 16. Macrofotografía de la imagen anterior donde se aprecian claramente la ventana oval (VO), la arteria estapedial (AE) y la VR.

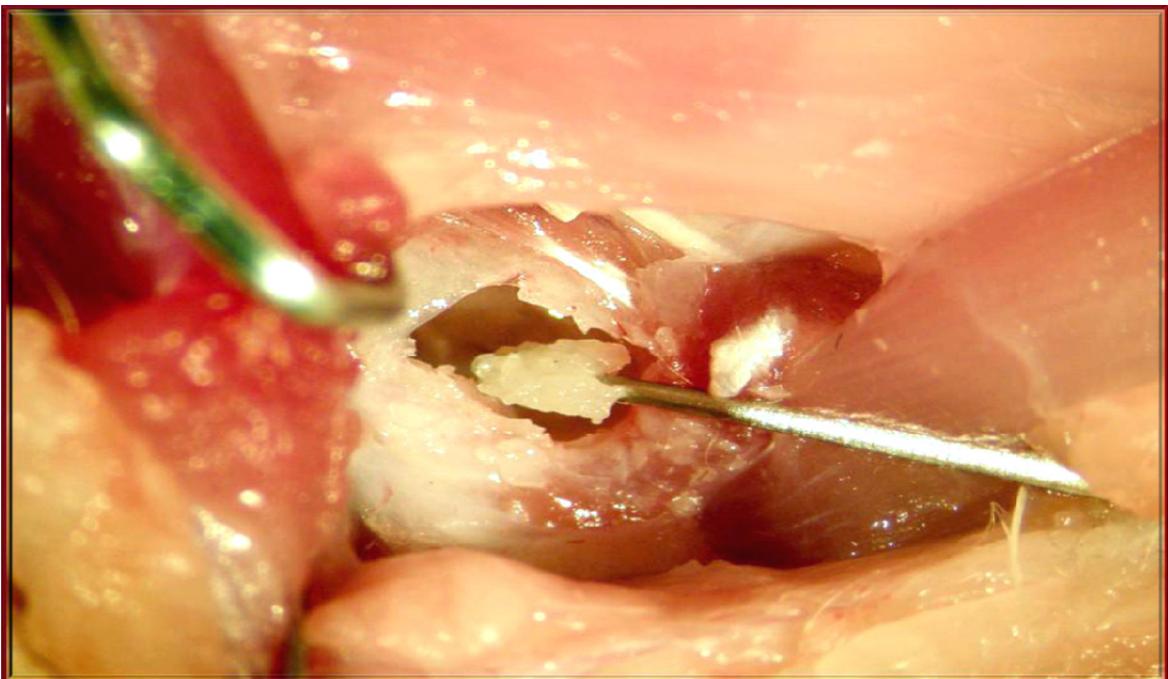


Figura 17. Se está colocando el fragmento de gelfoam sobre la VR con un microgancho

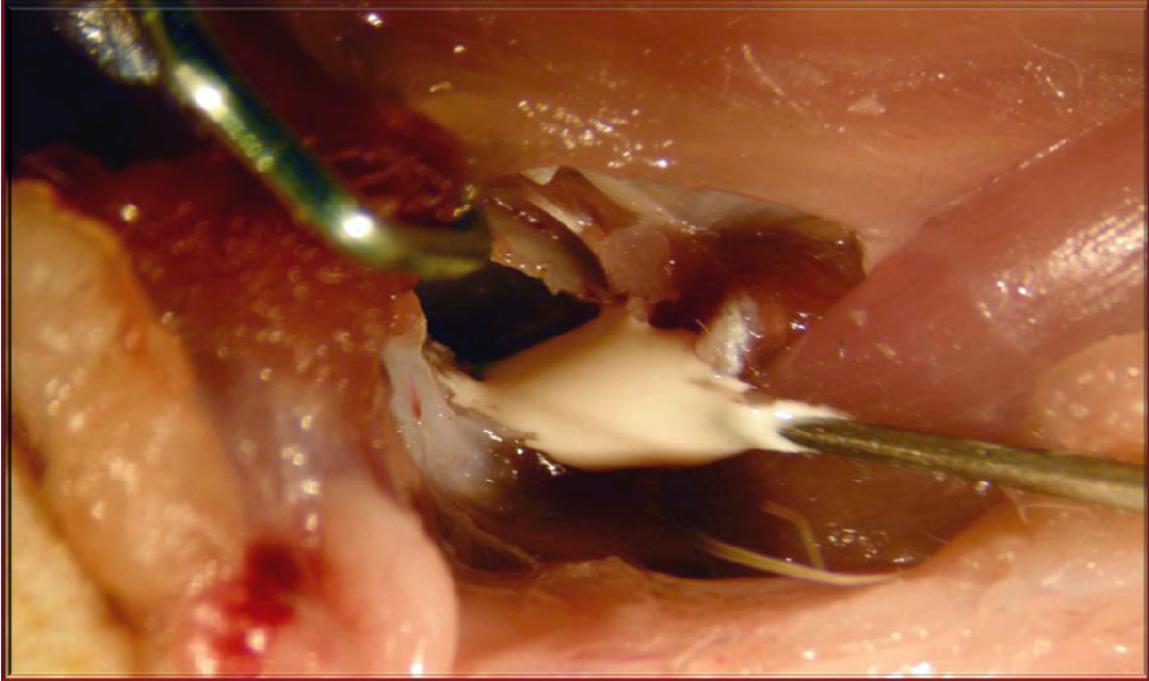


Figura 18. Cierre de la bullostomía con cemento dental

3.7 Administración de los tratamientos

3.7.1 Validación del método de ototoxicidad local y comparación con la administración sistémica

La ototoxicidad sistémica fue provocada en todas las ratas mediante una inyección única de KAN subcutánea (400 mg/kg, Fagron Ibérica, España) y FUR intravenosa (100 m/kg, Fluka), utilizando en este caso como vía la vena caudal del animal y guiándonos de una técnica ya descrita (167). La combinación de KAN con un diurético con intención ototóxica fue utilizada por primera vez en cobayas, empleando como diurético de asa el ácido etacrínico (168) o la FUR (169). En estudios posteriores podemos encontrar esta combinación adaptada a ratones, produciendo en ellos la pérdida de casi toda la población de células cocleares (170,171). En el grupo control se llevó a cabo la administración intravenosa de suero salino.

La administración local sobre la VR requirió inicialmente la preparación de una solución altamente concentrada de KAN (200 mg/ml) y FUR (50 mg/ml). Esto se consiguió diluyendo las sustancias en una solución salina tamponada con fosfato (PBS)

0,1 M y, tras calentamiento y agitación suaves, añadiendo NaOH 1 N hasta que la solución alcanzaba un pH de 8,5. Este procedimiento permitió obtener una concentración de ototóxicos más elevada que las disponibles comercialmente. Finalmente, un fragmento de gelfoam fue embebido con 50 µl de esta solución concentrada (acumulando por tanto 10 mg de KAN y 2,5 mg de FUR), el cual se colocaba en íntimo contacto con la membrana de la VR.

3.7.2 Determinación de la capacidad de otoprotección de RESV y NAC

En esta fase del trabajo todas las ratas fueron sometidas al método de ototoxicidad local descrito previamente, administrando la solución concentrada de KAN y FUR embebida en gelfoam directamente sobre la membrana de la VR. No obstante, el gelfoam fue embebido con 75 µl de la solución de ototóxicos, a diferencia de la fase anterior, donde se emplearon 50 µl. Por otro lado, los animales se dividieron en dos grupos: un grupo que recibió una dosis diaria intraperitoneal de RESV (10 mg/kg/día, Sigma Aldrich Química, Madrid, España) y NAC (400 mg/kg/día, Sigma) durante 5 días continuos, comenzando el día previo a la cirugía para administrar la mezcla ototóxica, y otro grupo que recibió una dosis diaria intraperitoneal de un volumen similar de suero salino, también durante 5 días continuos y empezando el día anterior a la cirugía (*fig. 11*). El RESV fue disuelto previamente en 100% etanol (Sigma) a 50 mg/ml para mejorar su solubilidad y posteriormente en salino (B-Braun Medical, Barcelona, España), para obtener una concentración final de 4%, según describen Yumusakhuylyu et al. (157). La NAC fue igualmente disuelta en salino a 100mg/ml y ambas soluciones se almacenaron a 4°C hasta su uso.

3.8 Evaluación de la función auditiva

A todas las ratas se les realizó una primera exploración de ABR para confirmar que eran normoyentes.

En la primera parte del trabajo, tanto en el grupo en el que se realizó la administración sistémica de los ototóxicos como en el grupo en el que éstos se administraron directamente sobre la membrana de la VR, la evaluación de la función

auditiva con ABR se realizó al inicio del estudio y una semana después de la administración de los ototóxicos. Las ratas con un umbral inicial superior a 35 dB_{SPL} fueron excluidas del experimento.

En la segunda fase del trabajo para estudiar la capacidad de otoprotección de la combinación de antioxidantes, los animales se dividieron en dos grupos, uno en el que la prueba de ABR se realizó al inicio del estudio y a los 3, 14 y 21 días después de la cirugía para administrar la mezcla ototóxica sobre la membrana de la ventana redonda (ensayo a tiempo largo), y otro en el que esta prueba sólo se hizo al inicio y a los 3 días de la cirugía (ensayo a tiempo corto). Del mismo modo que en la fase anterior se excluyeron las ratas con un umbral inicial mayor de 35 dB_{SPL} (*fig 11*).

3.8.1 Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral

Mediante los ABR se registran los potenciales eléctricos generados en varias estaciones del sistema auditivo en respuesta a estímulos sonoros y se caracterizan por tener una latencia corta. La respuesta obtenida consiste en una serie de ondas que aparecen en los 10 ms siguientes a la presentación de estos estímulos.

La secuencia de picos en el registro de ABR refleja la actividad sináptica de los núcleos consecutivos a lo largo de la vía auditiva en el tronco del encéfalo. Se han identificado 5 picos positivos (I-V) en roedores correspondientes a la cóclea y nervio auditivo (I), núcleo coclear (II), complejo olivar superior (III), lemnisco lateral (IV) y colículo inferior (V) respectivamente (*172*) (*fig. 19*).

Para realizar el ABR se introdujo al animal en una cámara cerrada anecoica y sonoamortiguada, minimizando así tanto las interferencias sonoras con el exterior como la reverberación interna (*173*). Posteriormente se colocaron tres electrodos de aguja de acero inoxidable a nivel subcutáneo, uno en la región lumbar de la rata (electrodo tierra), otro en el vértex (electrodo positivo) y el último debajo del pabellón auditivo que se iba a evaluar (electrodo de referencia). Las agujas de los electrodos estaban siempre bien afiladas para poder atravesar la piel de la rata. En caso contrario podrían doblarse y producir más interferencias. Se consideró muy importante medir la

distancia que había entre el oído y el altavoz de campo abierto para evitar artefactos, debiendo ser siempre de 5 cm.

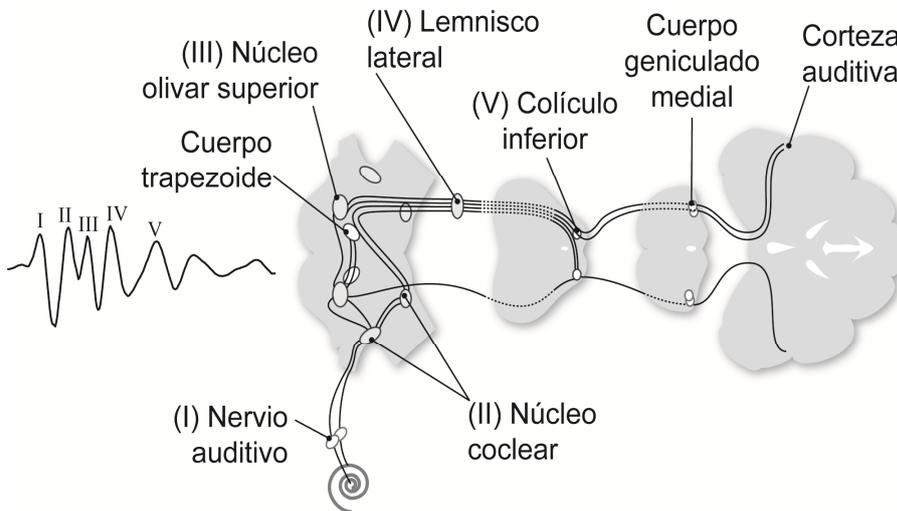


Figura 19. Esquema de la vía auditiva indicando las estructuras principales y su correspondencia con los picos de ABR. En una onda de ABR se pueden distinguir 5 picos característicos (I-V), cada uno de los cuales tiene un sustrato neural específico. Tomado de *Murillo Cuesta et al. Mol Med 2012;18:260-269.*

Para realizar el registro se empleó un equipo de neurofisiología capaz de emitir sonidos en el espectro de las ultrafrecuencias (0-48 kHz). Se presentaban dos estímulos acústicos diferentes generados con el software SigGenRPTM (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA), estímulos tipo *click* y estímulos con tonos puros. Estos estímulos son sistemáticamente verificados cada seis meses en el Servicio de Evaluación Funcional No Invasiva del Instituto de Investigaciones Biomédicas ‘Alberto Sols’, donde se realizaron las pruebas y, en caso de incorrecciones, debidamente calibrados.

Los estímulos se generaban por el equipo TDT System 3TM con un procesador RP2.1 y un atenuador PA5 y se reproducían a través de un altavoz electrostático TDT de campo libre ED1. Los estímulos tipo *click* (con rango de frecuencias desde 0 a 48 kHz) son pulsos cuadrados de 0,1 ms de duración con una frecuencia de presentación de 30 pulsos por segundo (pps). Los estímulos con tonos puros (4, 8, 16, 28 y 40 kHz) son ondas sinusoidales únicas de 5 ms (2,5 ms de ascenso y descenso cada uno, sin

meseta) que se presentaban a una frecuencia de 50 pps. Las respuestas para ambos estímulos se promediaban 1.000 veces (*fig. 20*).

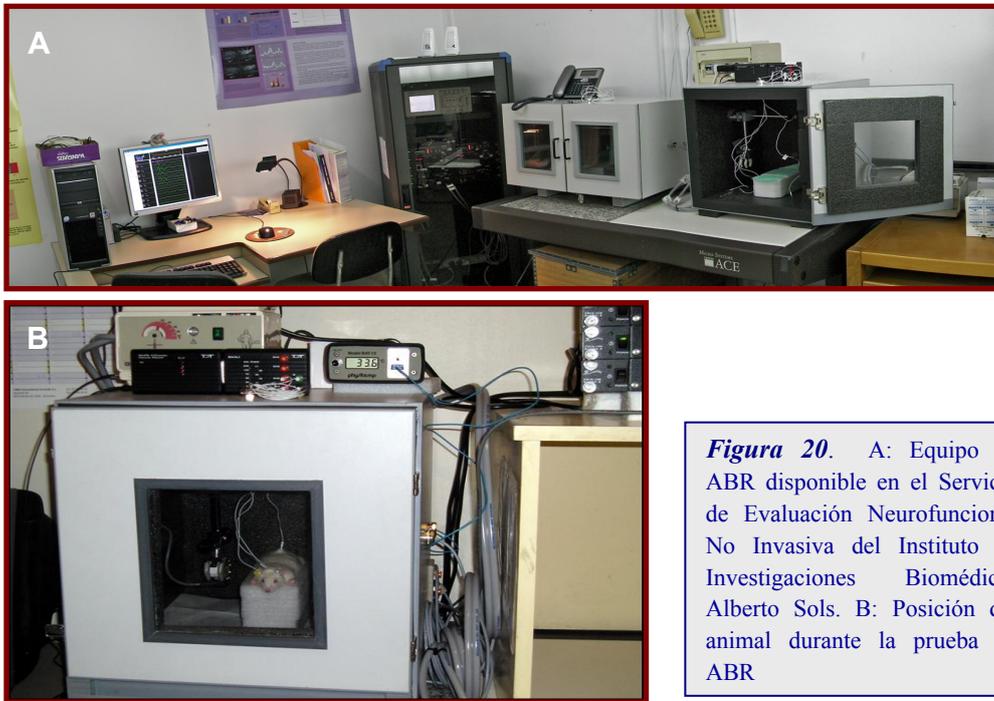


Figura 20. A: Equipo de ABR disponible en el Servicio de Evaluación Neurofuncional No Invasiva del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. B: Posición del animal durante la prueba de ABR

Se obtuvieron así las señales eléctricas que permitieron hacer el análisis electrofisiológico. La respuesta eléctrica fue amplificada, registrada, promediada y analizada con el software BioSigRPTM (Tucker-Davis™ Technologies). Las ondas de ABR se recogieron en intervalos de 5 y 10 dB_{SPL} a partir de la intensidad máxima de 90 dB_{SPL}, hasta 10 dB_{SPL} en el estímulo tipo click y 20 dB_{SPL} en los tonos puros.

Los umbrales de audición se determinaron para cada tipo de estímulo como el nivel de intensidad más bajo en el que la señal de ABR era identificable por encima de la actividad de fondo. Se determinaron también las latencias de los picos del ABR (I, II, III IV y V) y las latencias interpico (I-II, I-IV, II-IV) para el estímulo tipo click a 20 dB_{SPL} por encima del umbral de audición. Los audiogramas se obtuvieron a partir de los umbrales ABR para los estímulos con tonos puros (4, 8, 16, 28 y 40 kHz), proporcionando así información sobre el estado del OC en las diferentes regiones, desde la base hasta el ápex (*fig. 21*).

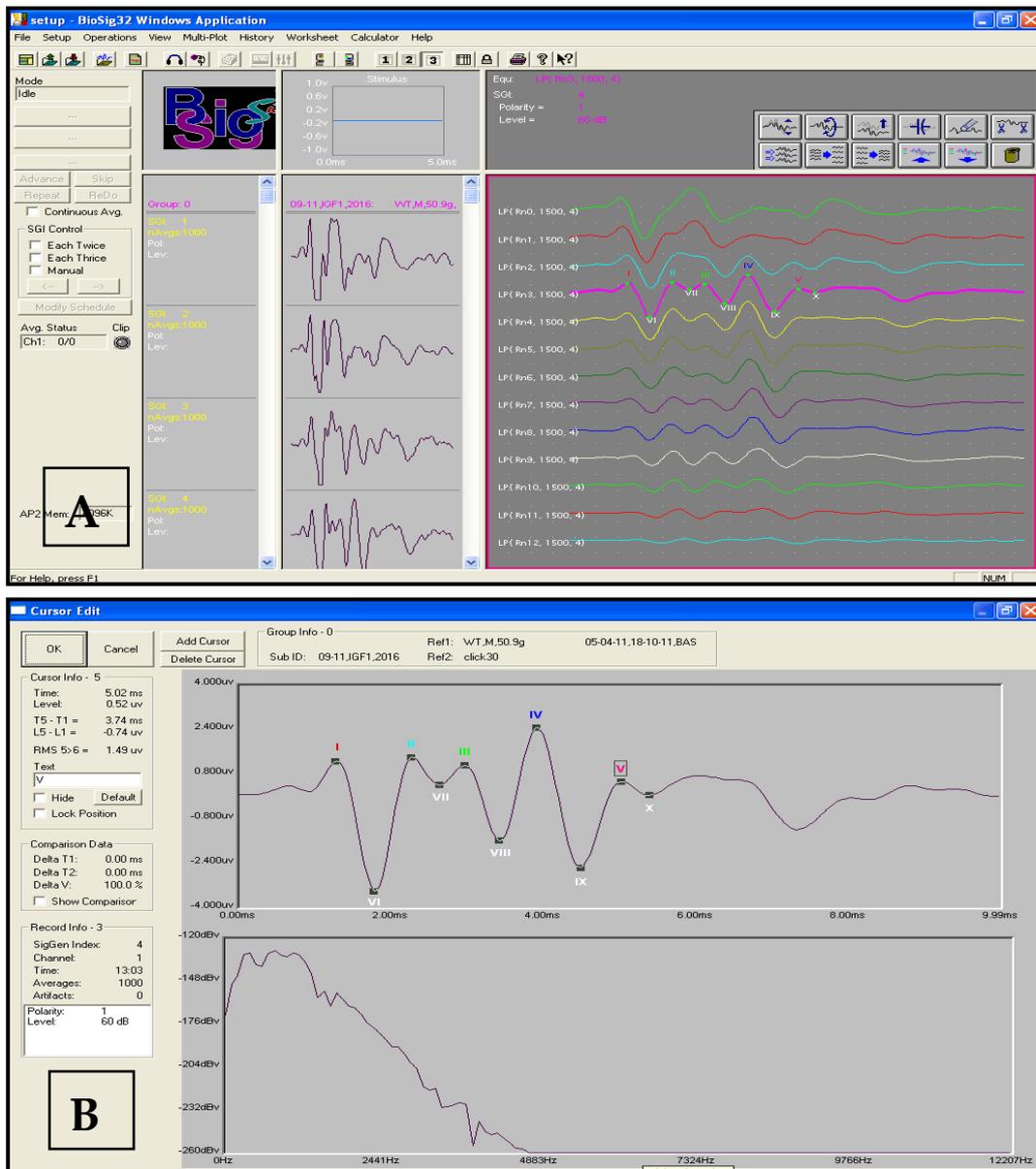


Figura 21. Prueba de ABR con estimulación tipo click realizada con el programa BioSigRPTM. A: Ondas ABR en intensidades decrecientes. Al reducirse la intensidad del estímulo, la amplitud de la onda ABR disminuye y las latencias se incrementan. El umbral es la intensidad más baja en la que se distingue la onda ABR. **B:** Detalle de una onda por encima del umbral. Los 5 picos característicos (I-V) y sus correspondientes valles (VI-X) aparecen señalados.

3.9 Estudio histológico y análisis transcriptómico

En la primera parte del trabajo para comparar la administración sistémica con la local, las ratas se sacrificaron a las 2 semanas del inicio del estudio.

En la segunda fase del trabajo el sacrificio de las ratas se realizó en un grupo 3 días después de la cirugía para la aplicación local de la solución ototóxica (5 días desde el inicio del tratamiento intraperitoneal con antioxidantes o con suero fisiológico) y en otro grupo a los 21 días de la cirugía. En esta fase llegaron al final del estudio un total de 36 ratas, de las que 14 se emplearon para estudio histológico (7 para el ensayo a tiempo corto y 7 para el ensayo a tiempo largo) y 22 para el estudio de expresión de genes (11 para el ensayo a tiempo corto y 11 para el ensayo a tiempo largo).

Los pasos a seguir para el análisis de las muestras cocleares se describen en los siguientes apartados:

3.9.1 Perfusión y fijación

Los animales se anestesiaron en profundidad mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetoquinol, Lure, Francia; 0,12 mg/kg). Se realizó una fijación intravital con el objeto de reducir el tiempo de autólisis y mejorar el procesamiento de las cócleas.

Una vez anestesiada, la rata se situaba en decúbito dorsal y se realizaba una incisión por debajo de la apófisis xifoides para eliminar la piel de la zona torácica y, con ayuda de unas pinzas y unas tijeras, levantar la fascia torácica en la zona más próxima a las uniones intercostales, teniendo cuidado de no lesionar la pleura y el pericardio. Se realizaba una toracotomía cuadrangular de base superior de tal manera que pudiera levantarse toda la pared anterior del tórax en forma de delantal.

El siguiente paso consistía en clampar la aorta descendente abdominal, realizar un corte en la aurícula derecha y puncionar con una aguja el ventrículo izquierdo, conectando dicha aguja a una bomba de perfusión que contenía una solución de suero salino tamponado con fosfato (PBS) al 10% (*fig. 22*). Perfundiendo a presión esta solución a través del ventrículo izquierdo-aorta se buscaba la eliminación de toda la sangre del lecho vascular.

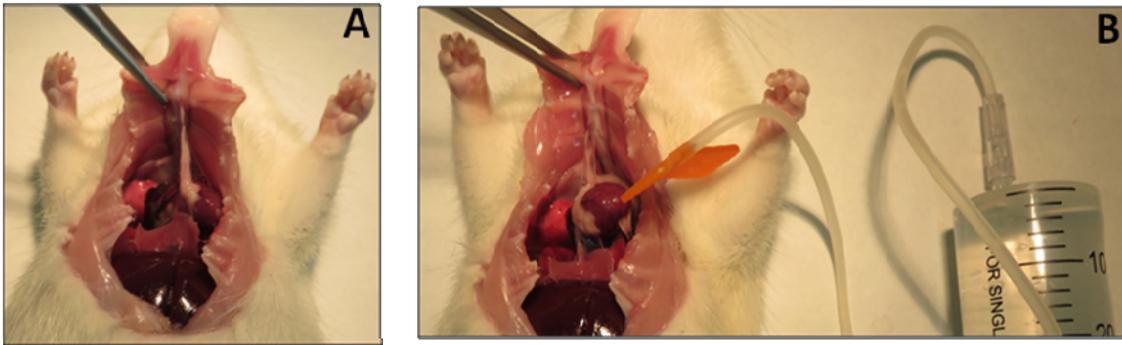


Figura 22. **A:** Toracotomía cuadrangular de base superior para levantar la pared anterior del tórax en forma de delantal. **B:** Punción del ventrículo izquierdo tras clampar la aorta descendente abdominal y realizar un corte en la aurícula derecha. La aguja está conectada al sistema de perfusión.

Seguidamente se sustituía el PBS de la bomba por paraformaldehído al 4% (Merck, Darmstadt, Alemania) en un pH 7,5 y 0,1 M para conseguir la fijación de los tejidos. La perfusión de paraformaldehído se realizaba de forma rápida inicialmente, y lenta seguidamente, durante 20 a 30 minutos.

3.9.2 Extracción coclear

Para extraer las cócleas se decapitaba a la rata con una guillotina y se realizaba una incisión sagital en la línea media del cráneo. Se separaban los músculos craneales y, con ayuda de unas tijeras fuertes, se abría el hueso occipital por su línea media, lo que permitía extraer el encéfalo dejando toda la cavidad craneal al descubierto. La localización del quiasma óptico permitía realizar un corte paralelo a él, entre ambas bullas timpánicas (*fig. 23*). Una vez individualizadas las bullas, se limpiaban de restos musculares, contenido encefálico y otros tejidos y se realizaba la apertura de las mismas con un punzón, evitando siempre la pared medial, que es donde se implanta la cóclea, con su eje mayor orientado anteroinferiormente.

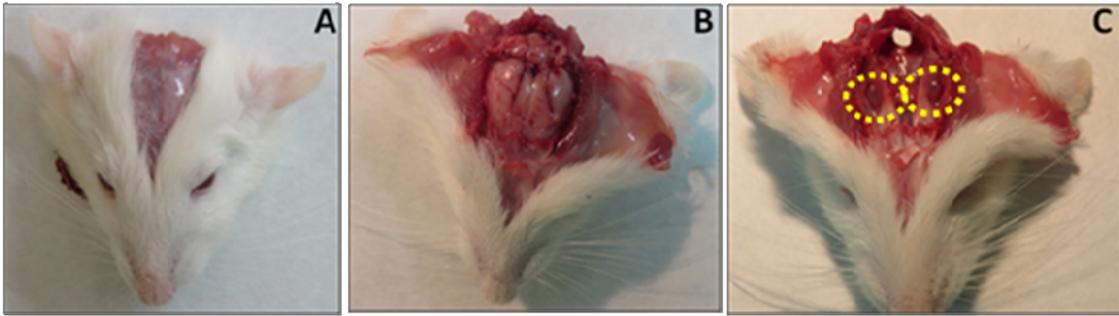


Figura 23. Pasos para la extracción coclear. **A:** Tras decapitar a la ratona se realiza una incisión sagital en la línea media del cráneo. **B:** Exposición de la masa encefálica tras apertura del hueso occipital por la línea media. **C:** Visión cenital del quiasma óptico y ambos huesos temporales tras extraer el encéfalo. Se aprecian claramente las dos bullas timpánicas (rodeadas por líneas amarillas de puntos), que contienen la cóclea.

3.9.3 Postfijación

Tras su extracción, las cócleas se mantenían en paraformaldehído 4% en agitación suave durante 12 horas a 4°C. Tras este paso, se realizaban lavados a 4°C con PBS 0,1 M durante 5 minutos a un pH de 7,4 y se procedía a la inclusión de las mismas en una solución descalcificadora de hueso, el ácido etilendiaminotetracético (EDTA 0,8 M, pH 6,5), donde se mantenían durante una semana a 4° C en agitación. La solución se cambiaba cada 3 días. Una vez finalizado el proceso de descalcificación se procedía al lavado con PBS y a la inclusión de las muestras en parafina.

3.9.4 Inclusión y secciones

Las muestras fijadas y descalcificadas se lavaban varias veces más en PBS y se incluían en parafina líquida (Panreac Química) tras deshidratación con soluciones de etanol (Merck) a concentración creciente y de xilol (Scharlab, Sentmenat, Barcelona), según se describe en Camarero et al. (174) . Con la ayuda de un microtomo automático (Leica RM 2255), se realizaron secciones de 5 µm de grosor sobre los bloques de parafina paralelas al eje longitudinal de la cóclea (mediomodiolares), obteniéndose muestras representativas del ápex, la escala media y la base para llevar a cabo el estudio histológico y de la citoarquitectura coclear. Las secciones se almacenaron a 4°C hasta su uso.

3.9.5 Tinción y estudio histológico

Para el estudio histológico de la cóclea se emplearon secciones de parafina utilizando la tinción de Nissl con violeta de cresilo al 1%. Antes de la tinción, las secciones ya montadas se deshidrataron con etanol a concentraciones crecientes (70%, 96% y 100%) durante 15 segundos en cada una de ellas y se cubrieron utilizando Depex (C. Alvarez, Ref. 10-8500, España) como medio de montaje.

Con la ayuda de un microscopio Zeiss Diaplan al que se acopló una cámara digital Leitz (Leitz DFC300 FXC) se estudiaron la morfología y citoarquitectura coclear, observando la pérdida de CCE, CCI, NGE y la arquitectura del túnel de Corti. Se obtuvieron fotografías con los objetivos 4x, 20x, 40x y 63x usando los mismos parámetros de iluminación para cada objetivo. La captura se realizó mediante el software DP Controller (v.1.1.1.65) (*fig. 24*).

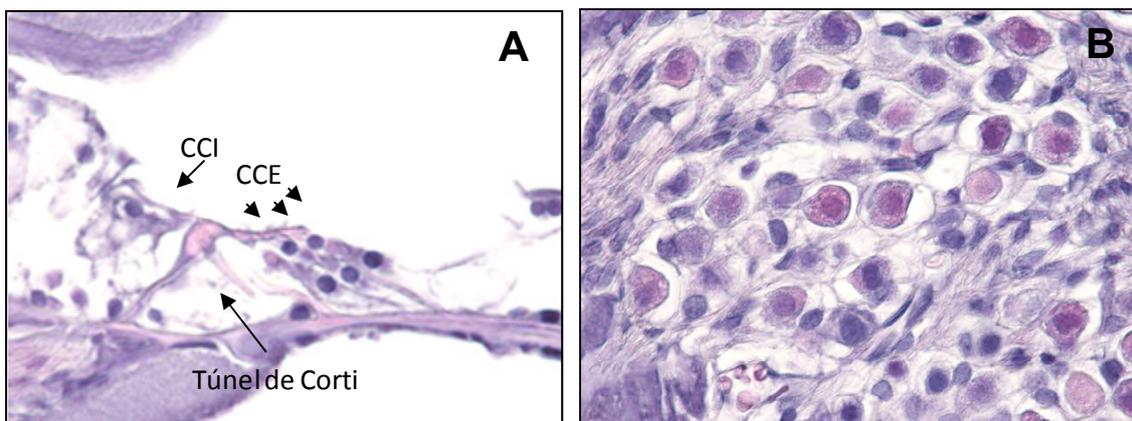


Figura 24. Imagen representativa del estudio histológico de una muestra coclear en una rata control tras tinción con violeta de cresilo. **A:** Las células ciliadas externas (CCE), las células ciliadas internas (CCI) y el túnel de Corti muestran una disposición normal. **B:** Ganglio espiral con una densidad neuronal normal.

3.9.6 Análisis transcriptómico

Considerando la oxidación y la inflamación fenómenos importantes en la ototoxicidad inducida por los aminoglucósidos, en la segunda fase del trabajo se estudiaron los cambios en la expresión coclear tanto de genes relacionados con el estrés

oxidativo y la defensa antioxidante como de genes que codifican para las principales citoquinas pro y antiinflamatorias.

Para el estudio de expresión de genes (tanto genes relacionados con la oxidación como genes que expresan citoquinas) se realizó la extracción del ARN y reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa inversa (RT-qPCR). Las ratas se anestesiaron profundamente con CO₂ y las cócleas se extirparon rápidamente preservándolas en RNAlater (Qiagen, Valencia, CA, USA). Tras homogeneizar el tejido, se extrajo todo el ARN de cada par de cócleas empleando el Micro Kit RNeasy (Quiagen). La cantidad y calidad de este ARN fueron determinadas mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) y un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La retrotranscripción de este ARN en ADN complementario (ADNc) se realizó empleando 250 ng del ARN total de cada muestra y transcripción inversa (RT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron procesadas en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols de Madrid. La amplificación del ADNc no se realizó igual en el análisis de genes relacionados con la oxidación que en el de genes relacionados con la expresión de citoquinas. Para los genes relacionados con la oxidación, la amplificación del ADNc se llevó a cabo mediante un PCR *array* específico para ratas (Rat oxidative stress and antioxidant defense RT2 profiler PCR array, nº de catálogo PARN-065A, SA Biosciences Corp., Frederick, MD, USA) (175) con PCR en tiempo real. Este *array* emplea la Master Mix para PCR de SYBR Green (Applied Biosystems) y detecta simultáneamente la expresión de un panel de 84 genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante, incluyendo adicionalmente 5 cebadores de genes *housekeeping* (genes de control endógeno) [proteína ribosomal larga P1 (*Rplp1*); hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (*Hprt1*); proteína ribosomal L13A (*Rpl13a*); lactato deshidrogenasa A (*Ldha*); y actina beta (*Actβ*)] y 7 pozos para probar la contaminación de ADN genómico no transcrito y el rendimiento de la PCR. El análisis de los datos de expresión génica se realizó en este caso con el programa de Análisis de Datos del Array RT2 Profiler PCR, Versión 4.0. Como gen de control endógeno se empleó el de la actina beta (*Actβ*).

Para el análisis de la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias, tras extracción del ARN y retrotranscripción, el ADNc se amplificó empleando sondas específicas TaqMan MGB (Applied Biosystems) con PCR en tiempo real. Las citoquinas estudiadas en este caso fueron *Il1 β* , *Il4*, *Il6*, *Il10*, *Tnfa* y *Tgf β 1*. Se empleó la fosfolipoproteína ribosomal P0 (*Rplp0*) como gen de control endógeno.

Para evaluar los cambios en la expresión de genes tanto de oxidación y defensa antioxidante como de citoquinas se utilizó la metodología $\Delta\Delta\text{Ct}$. La fórmula empleada para calcular el nivel relativo de expresión génica fue $2^{-\Delta\text{Ct}}$, donde $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{GOI}) - \text{avg.}(\text{Ct}(\text{HKG}))$, siendo GOI cada uno de los genes de interés, y HKG el gen *housekeeping* elegido. El *fold change* ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) se refiere a la media de expresión normalizada del gen ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) en la muestra problema dividida por la media de expresión normalizada del gen en la muestra control. El *fold-regulation* representa los resultados de *fold change* de una forma biológicamente significativa. Valores de *fold change* mayores de uno indican una regulación al alza o positiva. Valores de *fold change* menores de uno indican una regulación a la baja o negativa.

3.10 Estudio estadístico

En la primera parte del trabajo para validar el método de ototoxicidad local y compararlo con el de la administración sistémica, se emplearon pruebas no paramétricas (Kruskal – Wallis y prueba de Mann – Whitney) para analizar los resultados de ABR, utilizando para ello el programa SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL). Los datos se presentan como la media \pm DS (desviación estándar) y los resultados se consideraron significativos con valores de $p < 0,05$.

En la segunda parte del trabajo para estudiar el potencial otoprotector de RESV y NAC, los resultados ABR se probaron previamente para los supuestos paramétricos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Cuando no se cumplían estos supuestos, los datos se analizaron utilizando las pruebas no paramétricas de Kruskal – Wallis y Mann – Whitney. Cuando sí se cumplían se siguió un modelo mixto lineal, considerando el tratamiento (RESV + NAC o salino) como los factores entre grupo, y los resultados de ABR en los diferentes momentos como el análisis de medidas repetidas, empleando para ello el software SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL). Además, se realizó un T-test para

evaluar la significación de la diferencia entre dos medias muestrales (RESV + NAC o salino). Los datos se presentan como la media \pm ESM (error estándar de la media) y los resultados se consideraron significativos con valores de $p < 0,05$ (significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Para los datos de expresión génica, se consideraron dos comparaciones pareadas: oído derecho frente a oído izquierdo en el grupo tratado con solución salina (salino + ototóxicos frente a salino) y oído derecho en el grupo tratado con RESV + NAC frente a oído derecho en el grupo tratado con solución salina (RESV + NAC + ototóxicos frente a salino + ototóxicos). El análisis estadístico de significación de *fold change* se llevó a cabo con el programa basado en Excel de Análisis de Datos del Array RT2 Profiler PCR 4.0. Los valores de p se calculan en base a una prueba T de Student de los valores replicados $2^{-\Delta Ct}$ para cada gen en el grupo control y en los grupos de tratamiento. Las diferencias se consideraron significativas con valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Validación y comparación del método de ototoxicidad local con el método de administración sistémica de KAN y FUR

4.1.1 La administración sistémica de KAN y FUR produce una sordera profunda

El estudio basal de ABR no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales en ninguno de los parámetros analizados. El umbral basal de audición en respuesta a los estímulos tipo *click* fue en torno a 30 dB_{SPL} (31 ± 3 dB_{SPL}).

Los animales del grupo 1 recibieron una inyección única de KAN subcutánea y FUR intravenosa según se explicó en el apartado 3.3.1, lo que produjo una hipoacusia severa y estadísticamente significativa en todos ellos ($p < 0,01$). En la mitad de las ratas (3/6) se apreció tras estimulación con clicks una media de incremento del umbral de aproximadamente 50 dB_{SPL} (48 ± 12 dB_{SPL}) una semana después de la administración. En la otra mitad no se detectaron respuestas evocadas en el ABR ni con la máxima intensidad de estimulación (umbral superior a 90 dB_{SPL}) por lo que en estos animales no se determinaron las latencias pico ni los umbrales auditivos tras la estimulación con clicks.

Los umbrales ABR en respuesta a estímulos puros de 4 a 40 kHz mostraron también un incremento estadísticamente significativo en todas las frecuencias tras las inyecciones sistémicas cuando se compararon con los valores basales ($p < 0,01$, $n=3$). Específicamente el incremento de umbral fue de 55 ± 7 dB_{SPL} en respuesta a estímulos de 40 kHz, de $50,8 \pm 6$ dB_{SPL} en 28 kHz, de 50 ± 5 dB_{SPL} en 16 kHz, de $45,8 \pm 8$ dB_{SPL} en 8 kHz y de 45 ± 7 dB_{SPL} en 4 kHz. Estos resultados reflejan un daño en todas las regiones de la cóclea, aunque algo mayor en las regiones basales (**fig. 25**).

En cuanto a las latencias pico, se apreció un incremento de la latencia de la onda I de aproximadamente 0,25 ms tras la inyección sistémica cuando se comparó con las medidas basales ($p < 0,05$, $n=3$). Este retraso se extendió a lo largo de la vía auditiva, pero no afectó significativamente a las latencias interpico I-II ni II-IV, lo que sugiere un daño limitado exclusivamente a la cóclea y no a la vía auditiva central (**Tabla 1**).

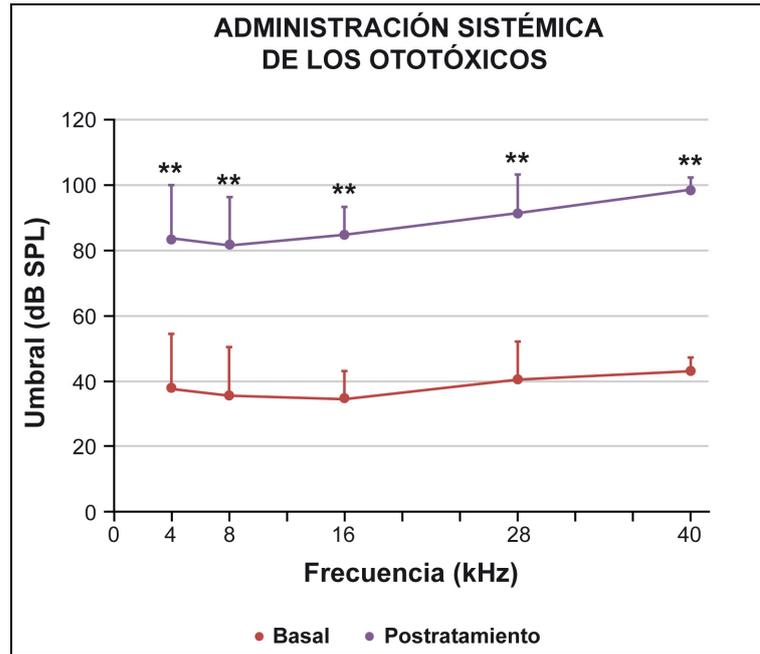


Figura 25. Comparación del audiograma basal con el audiograma tras administración sistémica de los ototóxicos. Se aprecia un incremento estadísticamente significativo en todas las frecuencias. Se muestra la media \pm DS y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $**p < 0,01$

Se llevó a cabo un estudio control paralelo con 3 ratas a las que se inyectó suero salino en lugar de KAN y FUR sin encontrar diferencias en los parámetros estudiados en ningún momento del estudio.

Tabla 1. Latencias pico e interpico (*media ± DS*) en el grupo de tratamiento sistémico, con un incremento de la latencia I sin afectación de las latencias interpico.

**p* < 0,05. LP: latencia pico. LIP: latencia interpico

Grupo Administración Sistémica		
Momento		
Media ± DS (ms)		
	BASAL	POSTRATAMIENTO
LP I	1,24 ± 0,05	1,51 ± 0,25*
LP II	2,20 ± 0,08	2,32 ± 0,29
LP III	2,98 ± 0,25	3,25 ± 0,61
LP IV	3,75 ± 0,13	4,20 ± 0,40*
LP V	4,79 ± 0,35	5,32 ± 0,45
LIP I - II	0,96 ± 0,08	0,90 ± 0,06
LIP II - IV	1,55 ± 0,10	1,57 ± 0,19

El estudio histológico demostró cambios severos en todas las espiras de la cóclea, pero de forma más relevante en la espira basal, con la presencia de un epitelio plano, reflejo de una pérdida casi completa de células ciliadas en el OC, tanto CCE como CCI, y un colapso completo del túnel de Corti. Se comprobó también una disminución considerable de la densidad de NGE (**fig. 26**). En las espiras media y apical los cambios fueron menos relevantes y variaban desde la pérdida parcial aislada de CCE a la pérdida de CCE e internas.

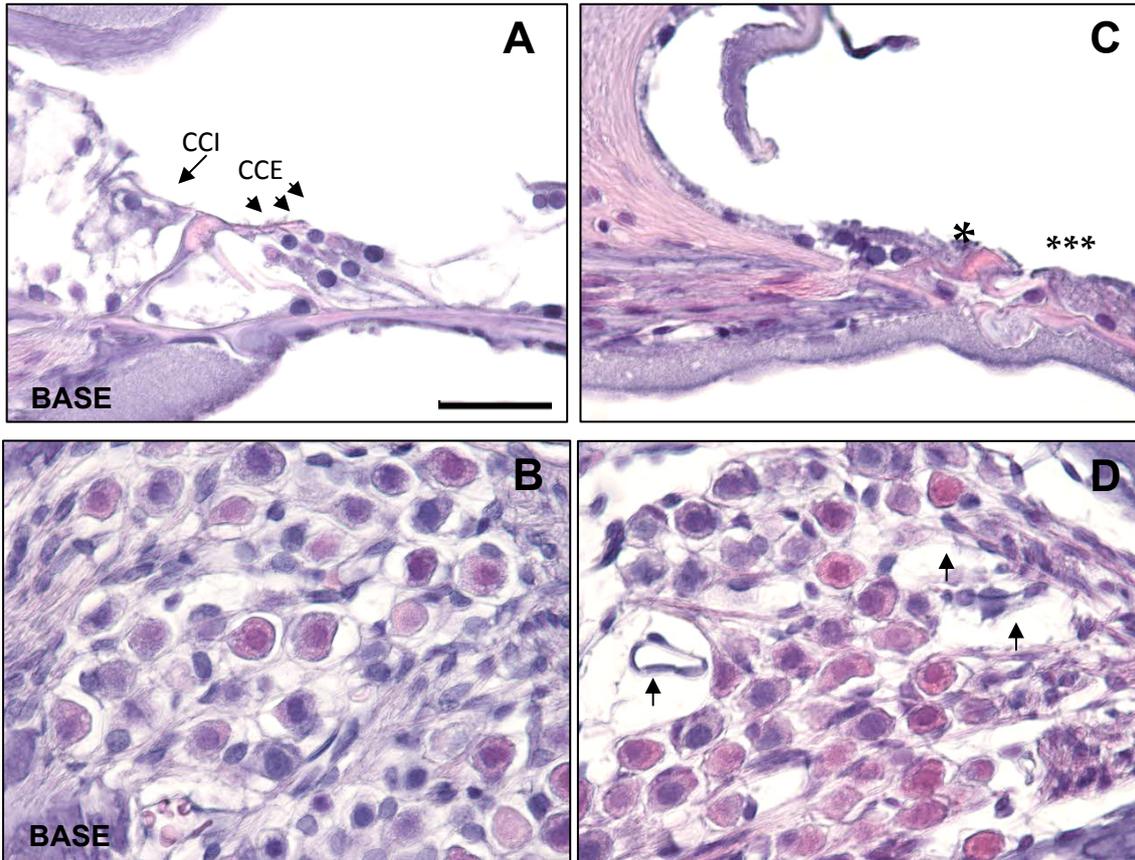


Figura 26. Morfología coclear tras tinción con cresil violeta. A, B: Microfotografías representativas de secciones del OC en la base coclear dentro del grupo de ratas control tratado con suero salino sistémico, con una disposición celular normal dentro del OC (A) y una densidad neuronal normal a nivel del ganglio espiral (B). **C, D:** Microfotografías representativas de secciones del OC en la base coclear dentro del grupo de ratas tratadas con KAN y FUR sistémica, con una pérdida casi completa de CCE y CCI (*asteriscos negros*), un colapso completo del túnel de Corti (C) y una disminución de la densidad neuronal a nivel del ganglio espiral (*flechas*) (D). Barra de escala: 25 μ m (A - D)

Un aspecto a considerar con este protocolo de administración fue una elevada tasa de mortalidad, especialmente relevante cuando la inyección intravenosa se realizaba con anestesia general.

4.1.2 La realización de una bullostomía para acceder a la VR y la colocación sobre ésta de un fragmento de gelfoam no afectan a la función auditiva

Los resultados funcionales demostraron que el procedimiento quirúrgico descrito para acceder a la VR no alteraba la función auditiva.

En el grupo control de la cirugía (grupo 2a), la media de los umbrales ABR una semana después de la cirugía fue similar a la de los umbrales basales, tanto en respuesta a estímulos tipo *click* (31 ± 2 dB_{SPL} basal y postbullostomía, n=6) como en respuesta a tonos puros en el rango de 4 a 40 kHz (**fig. 27**).

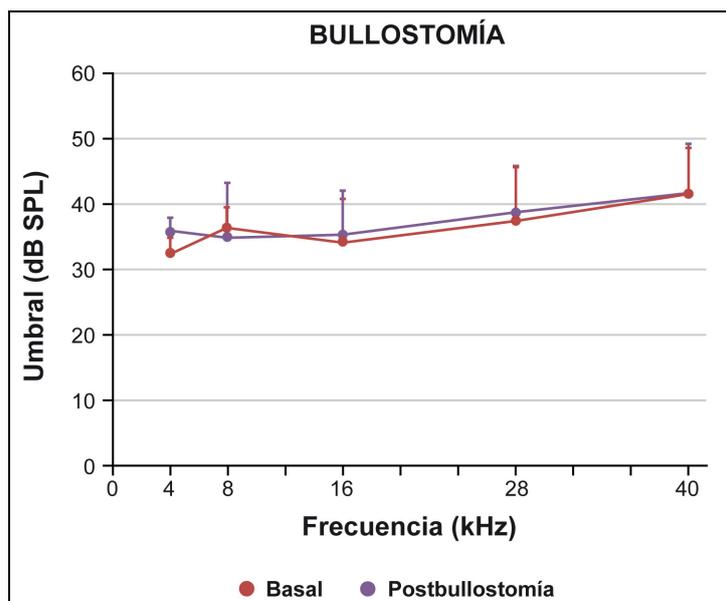


Figura 27. Comparación del audiograma basal con el audiograma tras realizar la bullostomía. La media de los umbrales una semana después de la cirugía fue similar a la de los umbrales basales en todos los tonos, sin diferencias estadísticamente significativas. Se muestra la media \pm DS.

Los otros parámetros analizados, incluyendo las latencias pico y las latencias interpico, tampoco sufrieron alteraciones significativas en el grupo control de cirugía (**Tabla 2**) y menos aún se observaron cambios significativos en la morfología del OC ni en la densidad de NGE.

Tabla 2. Latencias pico e interpico (*media ± desviación estándar*) tras realización de una bullostomía, sin diferencias significativas con la situación basal.
LP: latencia pico. LIP: latencia interpico

Grupo Control Cirugía		
Momento		
Media ± DS (ms)		
	BASAL	POSTBULLOSTOMÍA
LP I	1,25 ± 0,02	1,25 ± 0,04
LP II	2,25 ± 0,05	2,21 ± 0,07
LP III	2,94 ± 0,18	2,84 ± 0,08
LP IV	3,77 ± 0,07	3,72 ± 0,22
LP V	4,70 ± 0,22	4,57 ± 0,20
LIP I - II	0,99 ± 0,06	0,97 ± 0,05
LIP II - IV	1,52 ± 0,07	1,50 ± 0,17

Del mismo modo que en el grupo anterior, los parámetros analizados en el estudio de ABR de las ratas del grupo 2b (colocación sobre la VR de un fragmento de gelfoam embebido con suero salino) no presentaron diferencias significativas con los controles, lo que fue importante para demostrar que el vehículo empleado no afectaba significativamente a la función auditiva. La media de los umbrales ABR en este grupo en respuesta a estímulos tipo *click* fue de 32 ± 3 dB_{SPL} en situación basal y de 34 ± 4 dB_{SPL} una semana después de la colocación sobre la VR del gelfoam embebido en suero salino. Las medias ± DS de las latencias pico e interpico en este grupo se pueden visualizar en la **tabla 3** (grupo 2b, n = 6).

Tabla 3. Latencias pico e interpico (*media ± desviación estándar*) una semana después de la aplicación sobre la VR de gelfoam con suero salino, sin diferencias significativas con la situación basal. LP: *latencia pico*. LIP: *latencia interpico*

Grupo Administración Local de gelfoam + salino		
Momento		
Media ± DS (ms)		
	BASAL	POSTRATAMIENTO
LP I	1,29 ± 0,03	1,29 ± 0,05
LP II	2,30 ± 0,04	2,30 ± 0,08
LP III	2,99 ± 0,03	3,00 ± 0,17
LP IV	3,83 ± 0,06	3,88 ± 0,07
LP V	4,75 ± 0,25	4,89 ± 0,13
LIP I - II	1,01 ± 0,06	1,01 ± 0,06
LIP II - IV	1,53 ± 0,07	1,58 ± 0,03

La **fig. 28** muestra la ausencia de diferencias significativas entre el audiograma basal en respuesta a tonos puros de 4 a 40 kHz y el obtenido después de la aplicación directa sobre la VR del gelfoam con salino.

En concordancia con los resultados funcionales, no se apreciaron alteraciones significativas en la citoarquitectura coclear ni se produjo una pérdida significativa de células ciliadas o de NGE, con unos resultados histológicos muy parecidos a los de las **figs. 26A y 26B**.

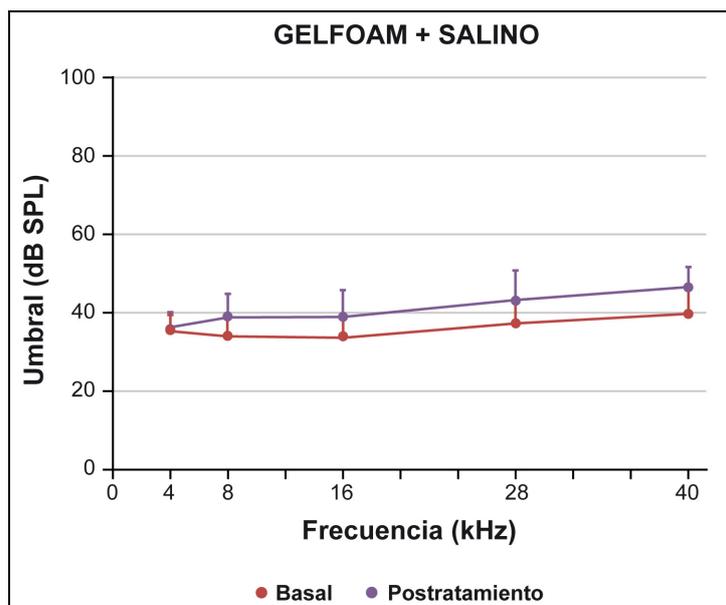


Figura 28. Comparación del audiograma basal con el audiograma tras aplicación sobre la VR del gelfoam embebido con suero salino. La media de los umbrales una semana después de la cirugía fue similar a la de los umbrales basales en todos los tonos, sin diferencias estadísticamente significativas. Se muestra la media \pm DS.

4.1.3 La aplicación directa sobre la VR de gelfoam embebido con KAN y FUR produce una sordera moderada

La aplicación directa sobre la VR de un fragmento de gelfoam embebido con una solución concentrada de KAN y FUR produjo también un efecto ototóxico significativo en las ratas, con algunas diferencias con respecto a la administración sistémica de estas sustancias.

Tomando como referencia algunas publicaciones sobre datos farmacológicos referentes al oído interno (174,176) se estimó como dosis inicial para producir daño funcional aquella que correspondiese a un 5 – 10% de la dosis sistémica de KAN y FUR, de tal manera que en nuestro experimento se utilizaron dosis de 20 mg/kg de KAN y 5 mg/kg de FUR. Teniendo en cuenta el pequeño volumen de la bulla timpánica en ratas (43,177) y el peso corporal medio de estos animales, se empleó una solución altamente concentrada de KAN (200 mg/ml) y FUR (50 mg/ml) en PBS-NaOH (pH 8,5) para poder embeber el gelfoam en un pequeño volumen (50 μ l) de esta solución que contuviese la dosis deseada de cada una de las sustancias. Esta solución no estaba

disponible comercialmente, por lo que se preparó de forma específica para este propósito.

Al estudiar los umbrales auditivos tras estimulación con *clicks* en este grupo de animales (grupo 2c, n = 6) se apreció un aumento significativo de los mismos de aproximadamente 30 dB_{SPL}, siendo el umbral basal 32 ± 3 dB_{SPL} y el postquirúrgico 63 ± 12 dB_{SPL}, diferencias que resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

El audiograma tras la bullostomía y aplicación directa sobre la VR del gelfoam con la solución concentrada de KAN y FUR reflejó también un incremento estadísticamente significativo del umbral en todas las frecuencias estudiadas ($p < 0,01$, $n = 6$), que fue particularmente manifiesto en las frecuencias medias y altas (16 y 40 kHz). Específicamente el incremento de umbral fue de $39,1 \pm 5$ dB_{SPL} en respuesta a estímulos de 40 kHz, de $42,3 \pm 6$ dB_{SPL} en 28 kHz, de $37,5 \pm 8$ dB_{SPL} en 16 kHz, de $35,83 \pm 7$ dB_{SPL} en 8 kHz y de $37,53 \pm 8$ dB_{SPL} en 4 kHz. Estos resultados reflejan un daño en todas las regiones de la cóclea, aunque algo mayor en las regiones basales (*fig. 29*).

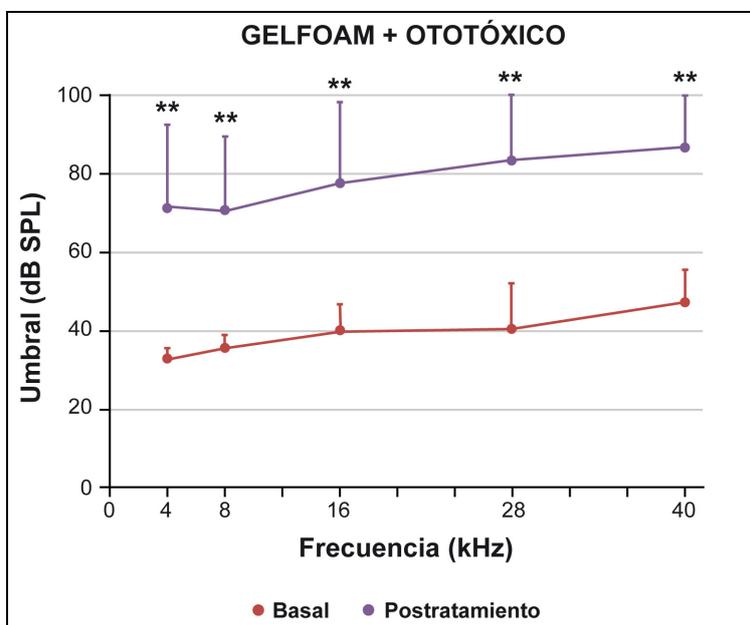


Figura 29. Comparación del audiograma basal con el audiograma tras aplicación sobre la ventana redonda del gelfoam embebido con la solución concentrada de KAN y FUR. Se aprecia un incremento estadísticamente significativo del umbral en todas las frecuencias, especialmente en las frecuencias medias y altas. Se muestra la media \pm DS y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $**p < 0,01$.

Las múltiples comparaciones estadísticas de la media de umbrales auditivos indicaron que una semana después de la cirugía existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$, $n = 6$ en cada uno de los grupos) en el umbral de las ratas que recibieron la administración local de la mezcla ototóxica (grupo 2c) cuando se comparó tanto con el de las ratas control de cirugía (grupo 2a) como con el de las ratas a las que se administró localmente el gelfoam embebido con suero salino (grupo 2b). Cuando estos umbrales se compararon con los del grupo de animales a los que se realizó la administración sistémica (grupo 1) se comprobó un incremento del umbral auditivo significativamente menor en las ratas tras administración directa del gelfoam con KAN y FUR ($p < 0,01$, $n = 6$) (fig. 30).

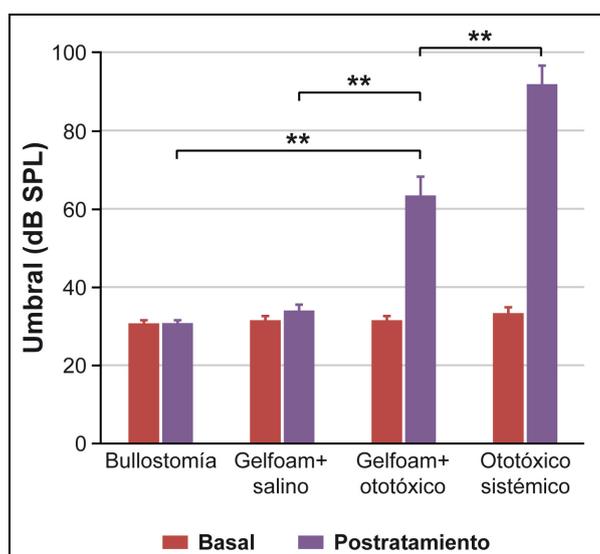


Figura 30. Comparación entre el umbral basal y el umbral postratamiento en todos los grupos. Se aprecia un incremento estadísticamente significativo al comparar la media de los umbrales una semana después de la cirugía dentro del grupo de ratas que recibió la administración local del gelfoam con la mezcla ototóxica (grupo 2c) con la media de los umbrales una semana después de la cirugía tanto dentro del grupo de ratas en el que sólo se realizó la bullostomía (grupo 2a) como dentro del grupo de ratas en el que se realizó la aplicación local del gelfoam embebido con suero salino (grupo 2b). Al comparar la media de los umbrales entre el grupo de ratas tras administración local de los ototóxicos y el grupo de ratas tras administración sistémica, se aprecia un incremento de la misma menor en el primer grupo de forma estadísticamente significativa. Se muestra la media \pm DS y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $**p < 0,01$.

Por el contrario, pese a que los umbrales ABR en respuesta a estimulación con tonos puros fueron mayores en los animales que recibieron la administración sistémica, no difirieron significativamente con los que recibieron la administración local en ninguna de las frecuencias analizadas. Las diferencias entre el umbral basal y el umbral postratamiento fueron estadísticamente significativas en todas las frecuencias, tanto en el grupo de administración sistémica de los ototóxicos como en el grupo de administración local ($p < 0,01$) (fig. 31).

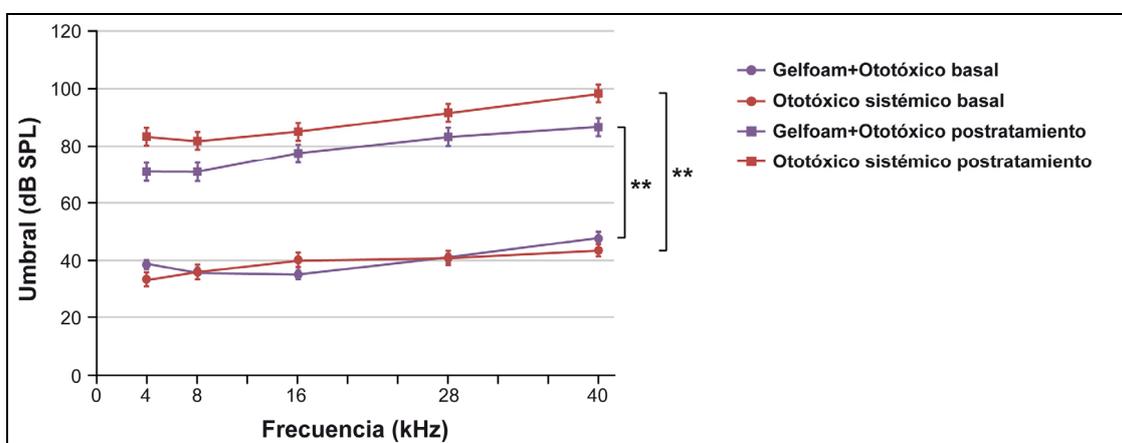


Figura 31. Audiograma basal y postratamiento en los grupos de administración local y administración sistémica de los ototóxicos. La media de los umbrales ABR una semana después del tratamiento es superior en todas las frecuencias en el grupo de ratas en el que se realizó la administración sistémica de los ototóxicos, sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas al compararla con la media de los umbrales ABR una semana después del tratamiento en el grupo de ratas en el que se realizó la administración local de los ototóxicos. Si se aprecian diferencias estadísticamente significativas al comparar la media de los umbrales basales con la media de los umbrales después del tratamiento tanto en el grupo de administración local como en el grupo de administración sistémica de los ototóxicos. Se muestra la media \pm DS y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $**p < 0,01$.

De estos resultados se puede deducir que, aunque consistente, el daño coclear producido tras la administración local de los ototóxicos fue menos severo que tras su inyección sistémica.

Tras analizar las latencias se comprobó que la administración local de los ototóxicos produjo un incremento de todas las latencias pico y las latencias interpico. Existieron diferencias estadísticamente significativas para las latencias pico I ($p < 0,05$,

$n = 6$) y II ($p < 0,01$, $n = 6$) antes y después del procedimiento, pero no para las latencias interpico I - II ni II - IV, lo que podría indicar un daño predominante en la vía auditiva periférica (**Tabla 4**).

Tabla 4. Latencias pico e interpico (*media \pm desviación estándar*) en el grupo de administración del gelfoam con ototóxico sobre la VR.

* $p < 0,05$. † $p < 0,01$. LP: *latencia pico*. LIP: *latencia interpico*

Grupo Administración Local de gelfoam + ototóxicos		
Momento		
Media \pm DS (ms)		
	BASAL	POSTRATAMIENTO
LP I	1,29 \pm 0,03	1,46 \pm 0,22*
LP II	2,25 \pm 0,08	2,52 \pm 0,20†
LP III	2,91 \pm 0,08	3,33 \pm 0,22
LP IV	3,80 \pm 0,07	4,08 \pm 0,29
LP V	4,77 \pm 0,22	5,12 \pm 0,46
LIP I - II	0,96 \pm 0,09	1,06 \pm 0,09
LIP II - IV	1,55 \pm 0,03	1,56 \pm 0,12

Tanto en las ratas control de cirugía (grupo 2a) como en las que recibieron la aplicación local del gelfoam con suero salino (grupo 2b), el número y la disposición de las CCI y de las CCE fueron los típicos del OC, con una densidad normal de NGE (**fig. 32**).

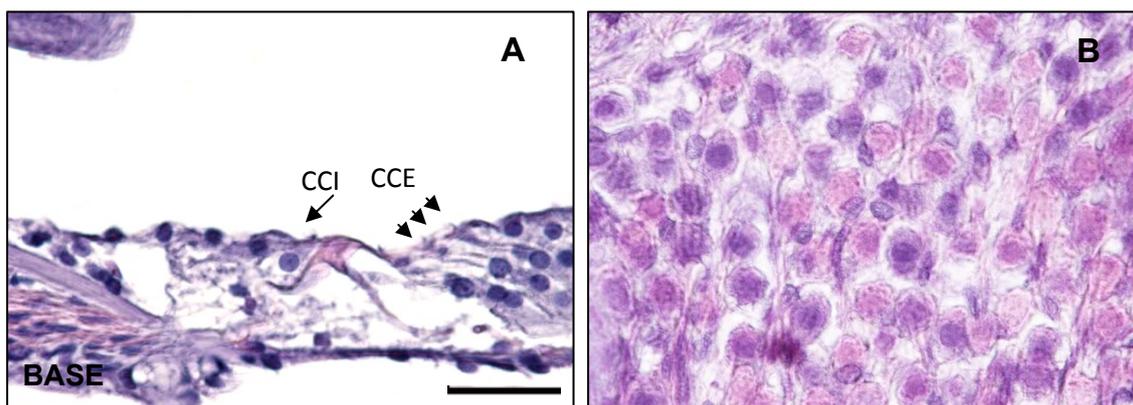


Figura 32. Morfología coclear tras tinción con cresil violeta. Microfotografías representativas de secciones del OC en la base coclear dentro del grupo de ratas tratadas con gelfoam + suero salino sobre la VR. **A:** disposición celular normal dentro del OC; **B:** densidad normal de NGE. CCI: células ciliadas internas. CCE: células ciliadas externas. Barra de escala: 25 μ m (A, B)

Por el contrario, en las ratas a las que se aplicó localmente el gelfoam con la mezcla ototóxica (grupo 2c), se apreció una degeneración severa en las secciones cocleares de la espira basal, con desaparición de las células ciliadas, tanto externas como internas, un colapso completo del túnel de Corti y una disminución de la densidad neuronal a nivel del ganglio espiral (**figs. 33A y 33B**), hallazgos similares a los que se apreciaron en las ratas a las que se administraron los ototóxicos por vía sistémica (grupo 1) (**figs. 26C y 26D**).

En las espiras media y apical se produjo un daño variable entre los distintos animales de los grupos 2c y 1, que oscilaba entre la pérdida aislada de CCE y la pérdida completa de células ciliadas, tanto externas como internas. Se observó también una disminución de la densidad neuronal a nivel del ganglio espiral en las secciones cocleares del grupo 2c, con una expansión de los espacios intercelulares (**fig. 33C y 33D**). Los animales con menos afectación de CCI en las espiras media y apical presentaban también menos afectación de la densidad neuronal a nivel del ganglio espiral (*datos no mostrados*).

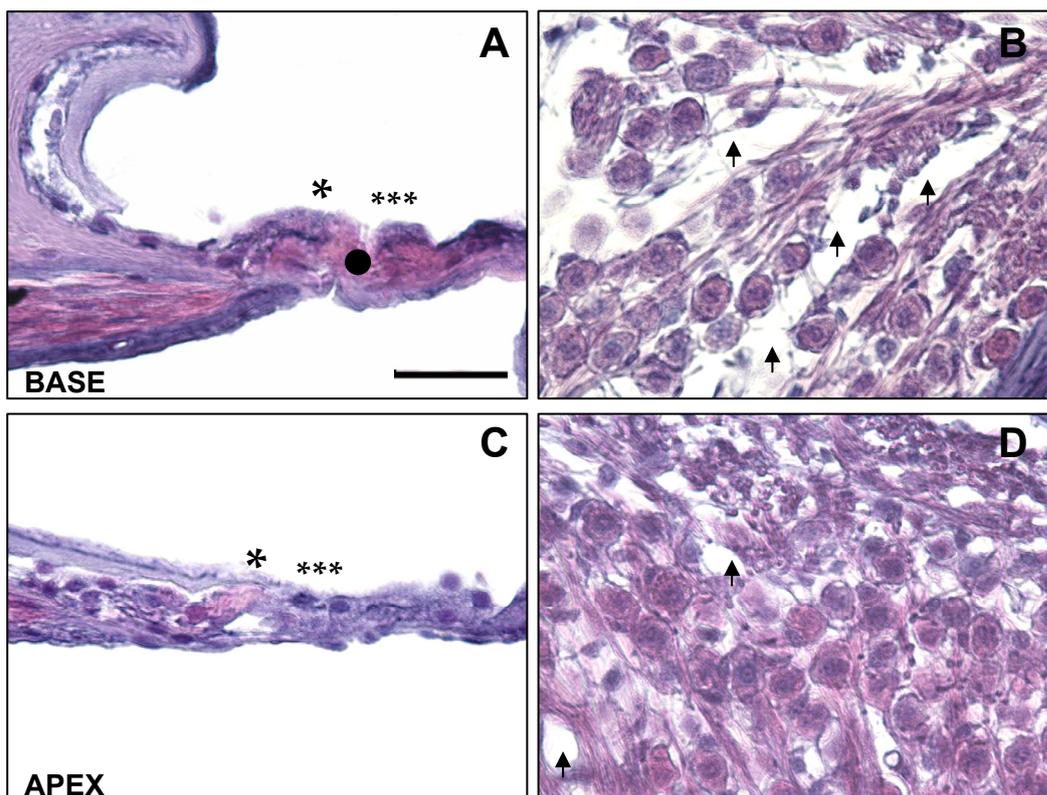


Figura 33. Morfología coclear tras tinción con cresil violeta. A, B: Microfotografías representativas de secciones del OC sobre la base coclear dentro del grupo de ratas tratadas con gelfoam + KAN y FUR sobre la VR, con una pérdida de CCE y CCI (*asteriscos negros*), un colapso del túnel de Corti (*circulo negro*) y una disminución de la densidad de NGE (*flechas*). C, D: Microfotografías representativas de secciones del OC sobre la espira apical de la cóclea dentro del mismo grupo de ratas. Se aprecia una pérdida parcial de CCE (*asteriscos negros*) y una disminución de la densidad de NGE (*flechas*), aunque menos marcada que en la espira basal. Barra de escala: 25 μ m (A – D).

4.2 Determinación del potencial otoprotector de la administración intraperitoneal de RESV y NAC

4.2.1 La administración local de KAN y FUR afecta a la función auditiva

Como se ha mencionado anteriormente, en esta fase del estudio se aplicó sobre la membrana de la VR el fragmento de gelfoam embebido con 75 μ l de la solución concentrada de KAN y FUR, lo que produjo un incremento estadísticamente significativo de los umbrales ABR tras estimulación tanto con *clicks* como con tonos puros de 8 a 40 kHz ($p < 0,01$), como puede apreciarse al comparar el umbral basal 7 días antes de la administración quirúrgica de la mezcla ototóxica con los umbrales a los

3, 14 y 21 días después de dicha administración, especialmente en el grupo tratado con suero salino (*fig. 34*).

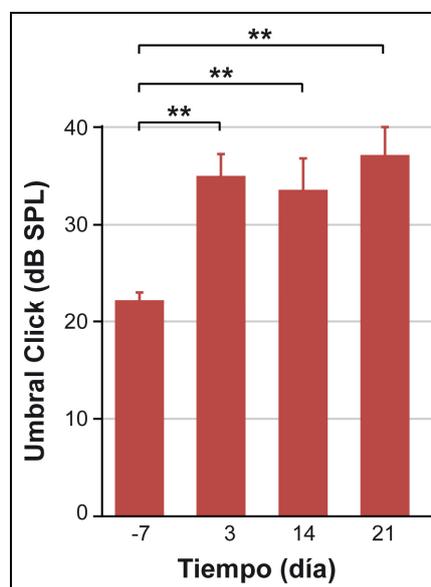


Figura 34. Comparación del umbral basal con los umbrales 3, 14 y 21 después de administrar el gelfoam con la mezcla ototóxica sobre la VR, en el grupo tratado con suero salino y no con los antioxidantes (estimulación con clicks). Se aprecia un incremento estadísticamente significativo de la media de umbrales ABR a los 3, 14 y 21 días desde la aplicación local de gelfoam embebido con la mezcla ototóxica, cuando se compara con la media de los umbrales basales. Se muestra la media \pm ESM y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $**p < 0,01$.

Respecto al audiograma, se produjo un incremento estadísticamente significativo de la media de umbrales a los 3, 14 y 21 días desde la aplicación local de la mezcla ototóxica al compararla con la media de los umbrales basales en todas las frecuencias estudiadas, pero especialmente en las frecuencias más altas y de forma más evidente en el grupo de ratas tratadas con suero salino (*fig. 35*).

Sin embargo, los aumentos del umbral en esta fase del estudio, tanto tras la estimulación con *clicks* como con la estimulación con tonos puros, fueron más moderados que los que se produjeron en la primera fase, lo que puede comprobarse al revisar la *fig. 29*.

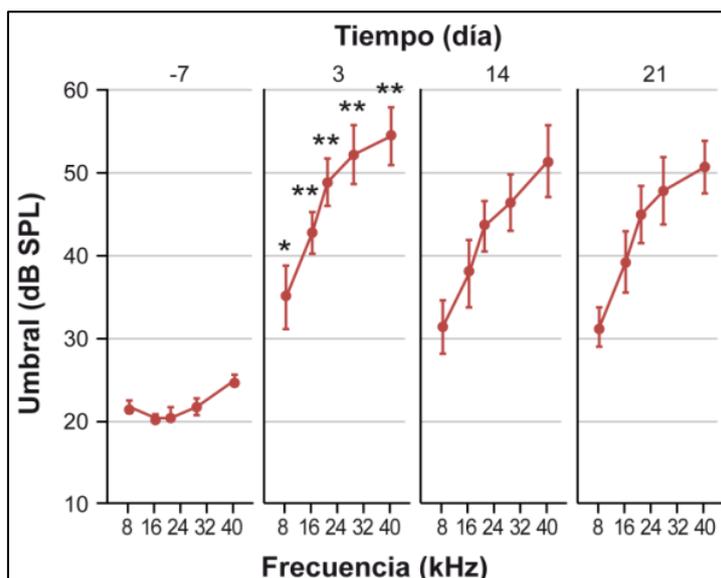


Figura 35. Comparación del audiograma basal con el audiograma 3, 14 y 21 después de administrar el gelfoam con la mezcla ototóxica sobre la VR, en el grupo tratado con suero salino y no con los antioxidantes (estimulación con tonos puros). Se aprecia un incremento estadísticamente significativo en la media de los umbrales ABR a los 3, 14 y 21 días desde la aplicación local de la mezcla ototóxica. Se muestra la media \pm ESM y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

Los cambios histológicos más importantes en este grupo se produjeron en la espira basal de la cóclea, con la pérdida de CCE y CCI. Se comprobó también un colapso del túnel de Corti y una disminución de la densidad de NGE (*fig. 36*). Los cambios histológicos en las espiras media y apical variaban entre las ratas, desde la pérdida predominante de CCE hasta la pérdida completa de células ciliadas.

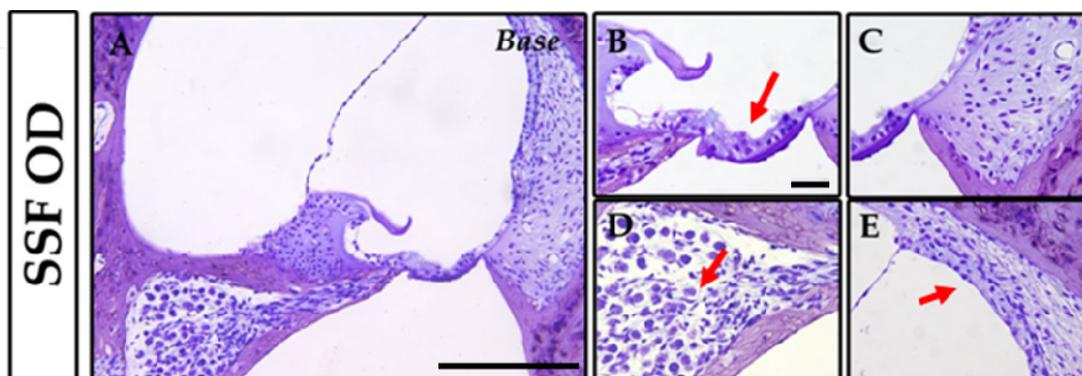


Figura 36. Morfología coclear tras tinción con cresil violeta. Imágenes representativas de una sección del órgano de Corti sobre la espira basal de la cóclea de un oído derecho (el sometido a la aplicación local de gelfoam + ototóxico) dentro del grupo de ratas tratadas con suero salino intraperitoneal en el ensayo a tiempo largo (21 días tras la aplicación del ototóxico). **A:** Sección sobre la espira basal. **B, C, D, E:** Macrofotografías: **B:** OC con destrucción de CCE (flecha) y CCI y disrupción del túnel de Corti. **C:** Ligamento espiral. **D:** Ganglio espiral con áreas de hipodensidad neuronal (flecha). **E:** Estria vascular con pérdida de algunas células epiteliales (flecha). Barras de escala: 150 μ m (A); 25 μ m (B, C, D, E).

4.2.2 El tratamiento sistémico con RESV y NAC atenúa la hipoacusia inducida por los ototóxicos

Los umbrales ABR en respuesta a los *clicks* a los 3, 14 y 21 días después de la aplicación sobre la VR de la mezcla ototóxica en el oído derecho fueron de forma estadísticamente significativa menores en las ratas tratadas con RESV + NAC que en las tratadas con suero salino ($p < 0,01$). Los umbrales basales fueron también de forma estadísticamente significativa menores que los umbrales a los 3 días de la administración de la mezcla ototóxica, tanto en las ratas tratadas con salino ($p < 0,01$) como en las ratas tratadas con RESV + NAC ($p < 0,05$) (**fig. 37**).

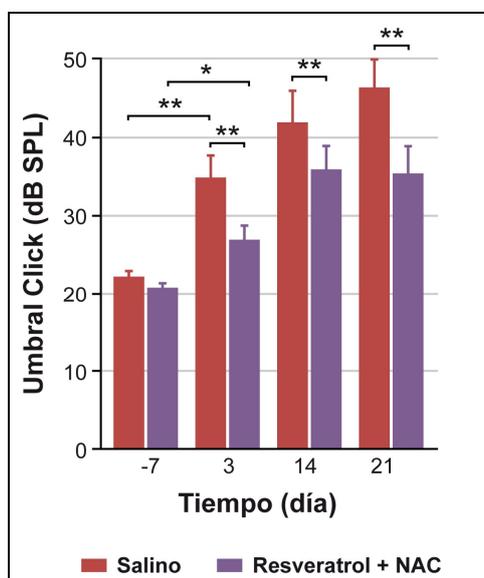


Figura 37. Comparación de la media de umbrales ABR tras estimulación con clicks en el oído derecho dentro del grupo de ratas tratadas con suero salino con la media de los umbrales dentro del grupo tratado con RESV y NAC 7 días antes y 3, 14 y 21 días después de administrar el gelfoam con la mezcla ototóxica sobre la VR. Se aprecian unos umbrales de forma estadísticamente significativa menores en las ratas tratadas con RESV + NAC que en las tratadas con suero salino a los 3, 14 y 21 días desde la administración local de los ototóxicos. También se observan unos umbrales basales de forma estadísticamente significativa menores que los umbrales a los 3 días de la administración local tanto en el grupo de ratas tratadas con salino como en el tratado con RESV + NAC, aunque estas diferencias fueron más significativas en el primer grupo. Se muestra la media \pm ESM y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

En respuesta a los tonos puros de 8 a 40 kHz, la administración local de la mezcla ototóxica produjo un incremento notable del umbral en todas las frecuencias estudiadas en ambos grupos, pero al final del tratamiento, en las ratas tratadas con RESV + NAC los umbrales fueron de forma estadísticamente significativa más bajos que en las ratas tratadas con suero salino. El incremento del umbral fue especialmente manifiesto en las respuestas evocadas por los tonos de frecuencias más altas (*fig. 38*).

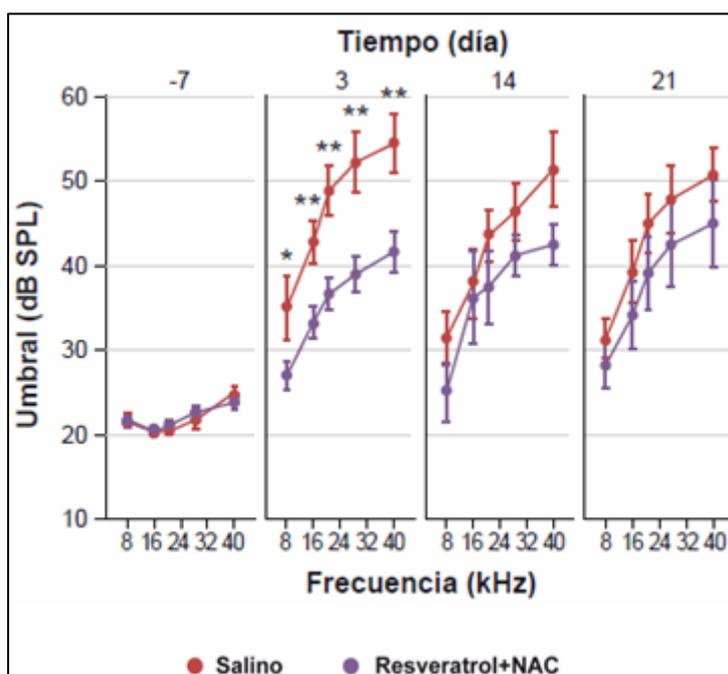


Figura 38. Comparación en el oído derecho del audiograma dentro del grupo de ratas tratadas con suero salino con el del grupo tratado con RESV y NAC, 7 días antes y 3, 14 y 21 después de administrar el gelfoam con la mezcla ototóxica sobre la VR. Se aprecia un incremento del umbral en todas las frecuencias tras aplicar la mezcla ototóxica, pero tanto a los 3 como a los 14 y 21 días desde dicha aplicación, las ratas tratadas con RESV y NAC presentaron unos umbrales de forma estadísticamente significativa menores que los de las ratas tratadas con suero salino. El incremento del umbral es más importante en las frecuencias más altas. Se muestra la media \pm ESM y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Como puede apreciarse en la *fig. 38*, el efecto protector del RESV y la NAC se observó de forma evidente en las fases iniciales del experimento, coincidiendo con el fin del tratamiento con las sustancias antioxidantes, con umbrales de forma estadísticamente significativa menores en las ratas tratadas con RESV + NAC que en las

tratadas con salino ($p < 0,01$ en todas las frecuencias salvo en 8 kHz, con $p < 0,05$). Sin embargo, este efecto fue amortiguándose progresivamente hasta el final del estudio.

Comparando el audiograma a los 3 días de administrar los ototóxicos con el audiograma a los 14 y 21 días, se aprecia que las ratas que no recibieron tratamiento con antioxidantes experimentaron una recuperación de 5 – 10 dB_{SPL} a partir del día 14 tras la administración de la mezcla ototóxica en todas las frecuencias estudiadas, lo que podría reflejar una reversibilidad espontánea del daño. No se observaron sin embargo variaciones importantes a los 14 y 21 días en las ratas tratadas con RESV y NAC, y aunque las diferencias entre el grupo tratado con salino y el tratado con RESV y NAC fueron menores a los 14 y 21 días que a los 3 días, en parte probablemente debido a esta recuperación espontánea del umbral y en parte a la pérdida gradual del efecto protector de los antioxidantes, estas diferencias seguían siendo estadísticamente significativas entre ambos grupos, con menor umbral en todas las frecuencias para las ratas tratadas con las sustancias antioxidantes ($p < 0,05$).

En el ensayo a tiempo corto (3 días tras la aplicación de la mezcla ototóxica), el estudio histológico de las muestras cocleares del oído derecho, es decir, el oído sobre el que se aplicó la mezcla ototóxica, mostró una pérdida de CCE y CCI a nivel de la espira basal y una disminución de la densidad de NGE, sin diferencias significativas entre el grupo tratado con suero salino y el grupo tratado con RESV + NAC (**fig. 39**).

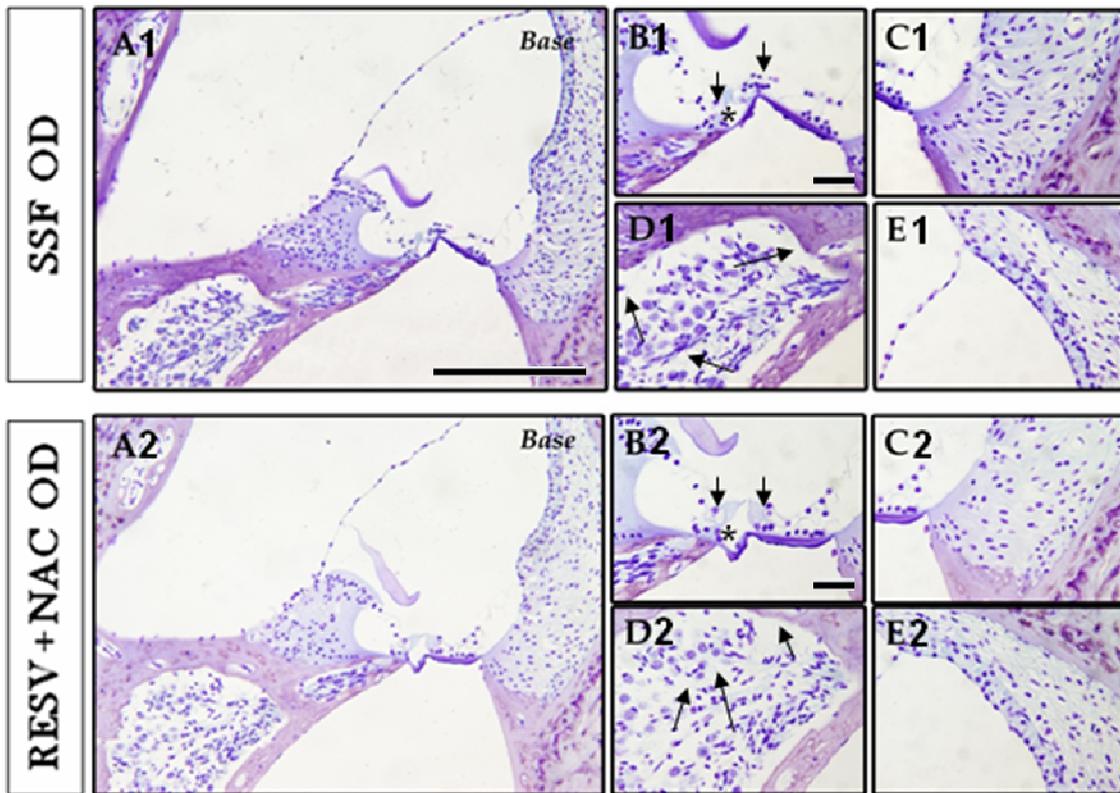


Figura 39. Morfología coclear tras tinción con cresil violeta. Microfotografías representativas de secciones del OC sobre la base coclear del oído derecho (el sometido a la aplicación local de gelfoam + ototóxico) en el ensayo a tiempo corto (3 días tras la aplicación del ototóxico). **A1 – E1:** Grupo de ratas tratadas con suero salino intraperitoneal. **A2 – E2:** Grupo de ratas tratadas con RESV + NAC. Las lesiones son parecidas en ambos grupos. **A1, A2:** Secciones sobre la espira basal. Macrofotografías: **B1, B2:** OC con destrucción de CCE y CCI (*flechas*) y disrupción del túnel de Corti (*asterisco*). **C1, C2:** Ligamento espiral. **D1, D2:** Ganglio espiral con áreas de hipodensidad neuronal (*flechas*). **E1, E2:** Estría vascular. Barras de escala: 150 μm (A1, A2); 25 μm , resto.

A nivel de la espira media no se encontraron alteraciones histológicas significativas, preservándose las CCE, las CCI y las NGE (**fig. 40**). Esto podría explicarse por la mayor proximidad de la escala basal a la VR, zona donde se aplicaron los ototóxicos. Otro argumento se basa en la mayor susceptibilidad de las células ciliadas en la espira basal que asumen algunos trabajos (178,179). Y otro podría ser el conocido gradiente de concentración basal-apical, que condicionaría una dificultad para el acceso de los ototóxicos a las regiones más distales de la cóclea.

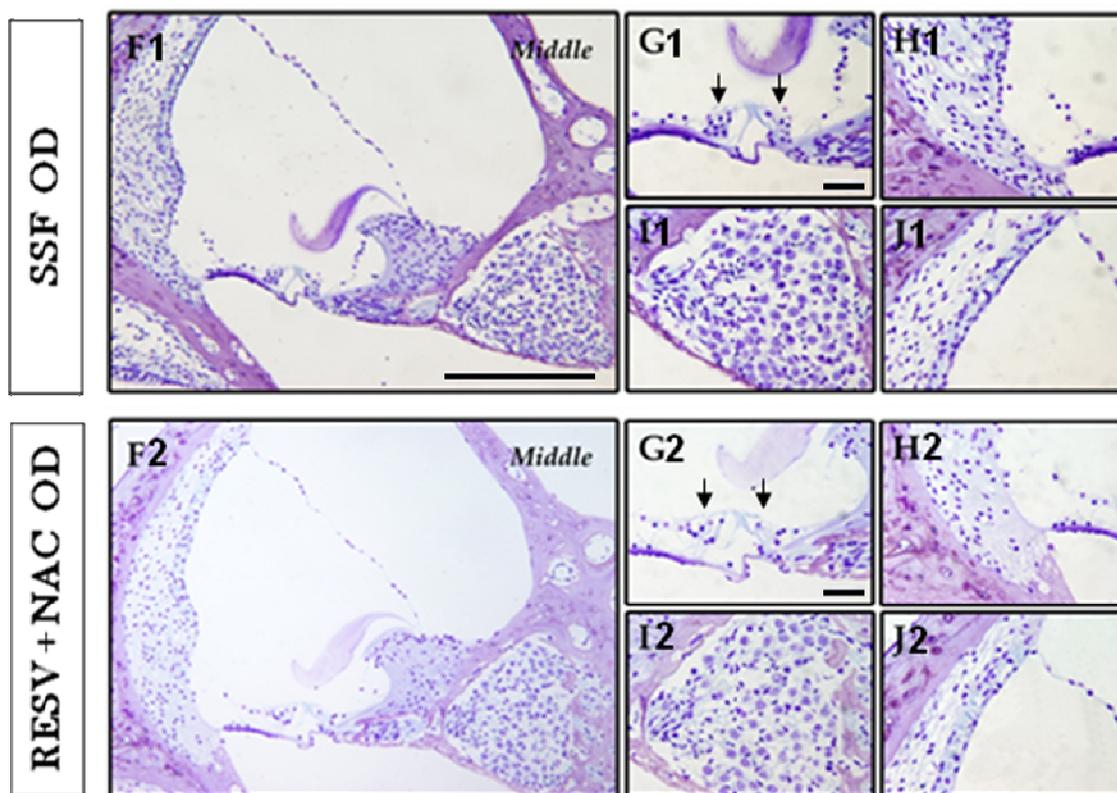


Figura 40. Morfología coclear tras tinción con cresil violeta. Microfotografías representativas de secciones del OC sobre la espira media coclear del oído derecho (el sometido a la aplicación local de gelfoam + ototóxico) en el ensayo a tiempo corto (3 días tras la aplicación del ototóxico). **F1 – J1:** Grupo de ratas tratadas con suero salino intraperitoneal. **F2 – J2:** Grupo de ratas tratadas con RESV + NAC. Las lesiones son parecidas en ambos grupos. **F1, F2:** Secciones sobre la espira media. Macrofotografías: **G1, G2:** OC en el que se conservan las CCE y CCI (flechas). **H1, H2:** Ligamento espiral. **I1, I2:** Ganglio espiral con conservación de las NGE. **E1, E2:** Estria vascular. Barras de escala: 150 μ m (F1, F2); 25 μ m, resto.

En el ensayo a tiempo largo (21 días tras la aplicación de la mezcla ototóxica), el estudio histológico de las muestras cocleares del oído derecho no mostró grandes diferencias entre el grupo tratado con RESV + NAC y el grupo tratado con suero salino, siendo la pérdida de CCE el hallazgo principal en ambos grupos, tanto a nivel de la espira basal como a nivel de la espira media. Estos cambios fueron más livianos que en el ensayo a tiempo corto. Sin embargo, observando los hallazgos funcionales, con pocas diferencias en los umbrales a los 21 días entre ambos grupos, se necesitaría una fase intermedia de estudio histológico entre los 3 y los 21 días postcirugía para correlacionar mejor los cambios histológicos con los funcionales y poder determinar la existencia de un efecto menguante progresivo en la protección de los antioxidantes desde el cese de su administración.

El oído izquierdo (control, oído no sometido a la cirugía para administrar la mezcla ototóxica) no mostró alteraciones histológicas ni en el grupo tratado con suero salino ni en el grupo tratado con RESV + NAC (*fig. 41*).

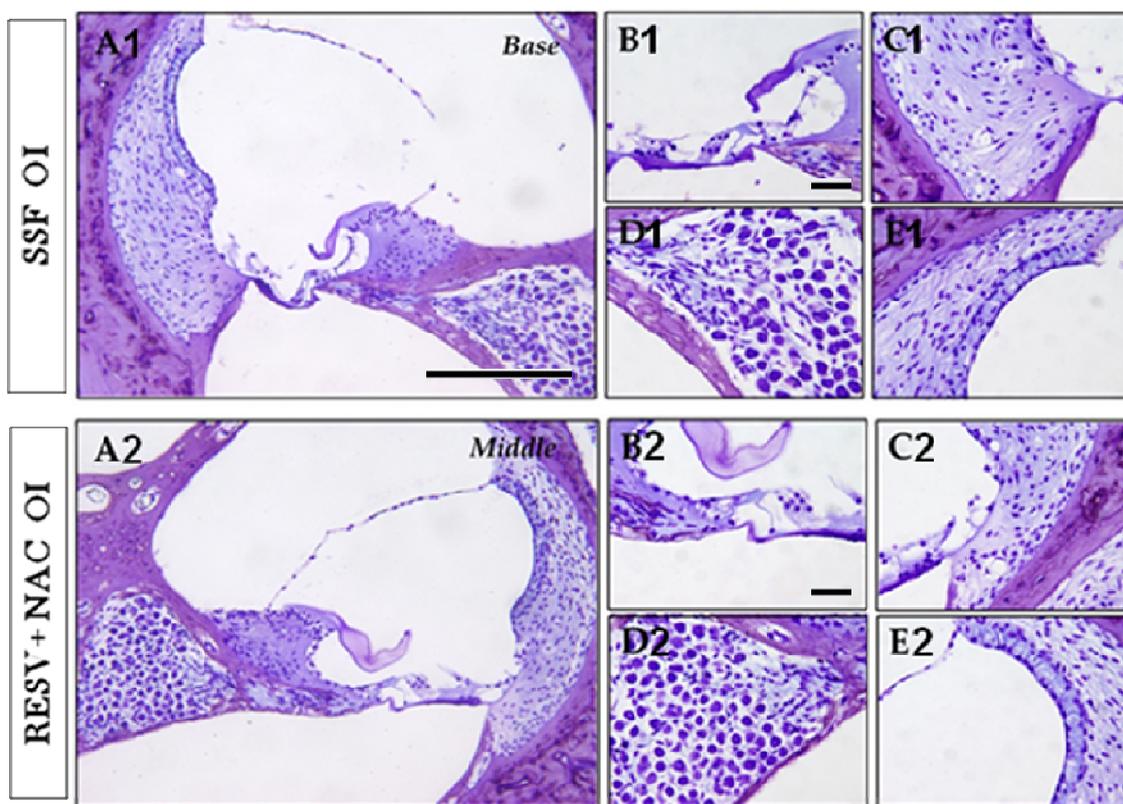


Figura 41. Morfología coclear tras tinción con cresil violeta. **A1 – E1:** Microfotografías representativas de secciones del OC sobre la base coclear del oído izquierdo (control, no sometido al tratamiento ototóxico) en el ensayo a tiempo corto (3 días tras la aplicación del ototóxico) dentro del grupo de ratas tratadas con suero salino intraperitoneal. **A2 – E2:** Microfotografías representativas de secciones del OC sobre la espira media coclear del oído izquierdo (control, no sometido al tratamiento ototóxico) dentro del grupo de ratas tratadas con RESV + NAC. Se conservan las células ciliadas, las NGE y el resto de estructuras cocleares tanto en el grupo de ratas tratadas con salino como en el grupo de ratas tratadas con RESV + NAC. **A1:** Sección sobre la espira basal. **A2:** Sección sobre la espira media. Macrofotografías: **B1, B2:** OC en el que se conservan las CCE, las CCI y se mantiene la arquitectura del túnel de Corti. **C1, C2:** Ligamento espiral. **D1, D2:** Ganglio espiral con conservación de las NGE. **E1, E2:** Estría vascular. Barras de escala: 150 μm (A1, A2); 25 μm , resto.

4.2.3 El tratamiento sistémico con RESV y NAC produce cambios en la expresión de citoquinas relacionadas con la inflamación

De todas las citoquinas estudiadas sólo se comprobó un incremento estadísticamente significativo en la expresión del gen que codifica para la *Il1 β* en el

oído derecho en comparación con el oído izquierdo (control). La diferencia entre ambos oídos se observó tanto en el grupo tratado con RESV + NAC como en el grupo tratado con suero salino ($p < 0,05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre el oído derecho del grupo tratado con RESV + NAC y el oído derecho del grupo tratado con salino (**fig. 42**). La IL1 β es una proteína pro-inflamatoria que actúa como señal en la cascada para la producción de ROS, aunque también podría estar implicada en la activación de las NADPH-oxidasas como la NOX4, que se expresa de forma predominante en tejidos del oído interno y supone una de las fuentes enzimáticas de ROS. El aumento de la expresión de IL1 β sólo en el oído derecho e independientemente del tratamiento con RESV + NAC o con suero salino podría reflejar la importante actividad inflamatoria asociada a la cirugía para administrar la mezcla ototóxica sobre la membrana de la VR, que sólo se llevó a cabo en este oído, y no en el izquierdo.

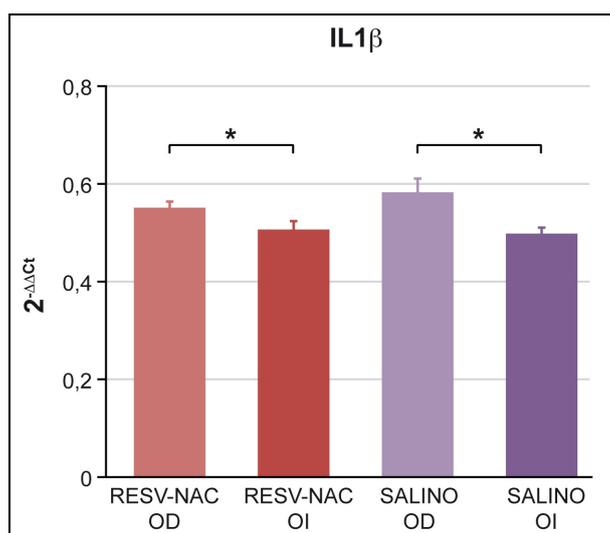


Figura 42. Expresión de interleuquina 1 β tanto en el oído derecho como en el oído izquierdo (control) de las ratas tratadas con salino y de las tratadas con RESV y NAC. Se aprecia un incremento estadísticamente significativo en la expresión de IL1 β en el oído derecho al compararla con la expresión en el oído izquierdo (control), tanto dentro del grupo de ratas tratadas con suero salino como dentro del grupo de ratas tratadas con RESV + NAC. No se aprecian diferencias entre el oído derecho del grupo tratado con salino y el oído derecho del grupo tratado con RESV + NAC. Los niveles de expresión de los genes de interés se analizaron mediante RT-qPCR en tiempo real con ARN proveniente de las cócleas de ambos oídos tanto en el grupo tratado con salino como en el tratado con RESV + NAC. Como gen de control endógeno se empleó la fosfolipoproteína ribosomal P0 (*Rplp0*). Se muestran los valores de media \pm ESM. El análisis de resultados se realizó mediante una T de Student y éstos fueron significativos cuando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$. OD: oído derecho. OI: oído izquierdo.

De la misma manera que con la IL1 β , con las otras interleuquinas estudiadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el oído derecho de las ratas tratadas con RESV + NAC y el oído derecho de las ratas tratadas con suero salino.

4.2.4 El tratamiento sistémico con RESV y NAC produce cambios en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante

Como ya se ha mencionado, para el estudio de la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo se empleó un PCR *array* específico para ratas (175). Este array contiene 84 pares de cebadores de genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa y antioxidante y 5 pares de cebadores de genes “*housekeeping*”, los cuales se emplean como referencia para comprobar un aumento o una disminución de la expresión en los otros genes. Los principales cambios en la expresión de estos genes se produjeron en el ensayo a tiempo corto (3 días postcirugía) con un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes *Sod1*, *Gpx1*, *Gpx4*, *Gpx5* y *Gpx7* y una disminución también estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la expresión del gen que codifica para la *Nox4*, una enzima NADPH-oxidasa que se expresa de forma predominante en tejidos del oído interno y supone una de las fuentes enzimáticas de ROS. Los cambios en la expresión de estos genes fueron significativos al comparar el oído derecho del grupo de ratas tratado con suero salino con el oído derecho del grupo tratado con RESV + NAC, lo que sugiere un efecto protector del tratamiento con antioxidantes.

En el ensayo a tiempo largo (21 días postcirugía) las modificaciones en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante fueron mucho menos evidentes. Se encontró una disminución estadísticamente significativa en el oído derecho de las ratas tratadas con RESV + NAC en la expresión de los genes que codifican para *Noxa1*, *Prdx6*, *Ucp3*, *Srxn1*, *Sod2*, *Vim* y *Hbz*. Sin embargo, como ya se ha mencionado, estos cambios fueron más sutiles que en el ensayo a tiempo largo, con valores más bajos de *fold change*. Estos datos concuerdan con los observados en el estudio funcional.

Las siguientes figuras representan gráficamente la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante tras el análisis de las muestras cocleares

en los distintos grupos, tanto en el ensayo a tiempo corto como en el ensayo a tiempo largo. Se realizaron 3 tipos de comparación en cada ensayo: por un lado se comparó la expresión del oído derecho con la del oído izquierdo en las ratas del grupo tratado con suero salino; por otro lado se comparó la expresión del oído derecho con la del oído izquierdo en las ratas del grupo tratado con RESV y NAC; y por último se comparó la expresión del oído derecho en las ratas tratadas con RESV y NAC con la expresión del oído derecho en las ratas tratadas con suero salino (*figs. 43 - 48*).

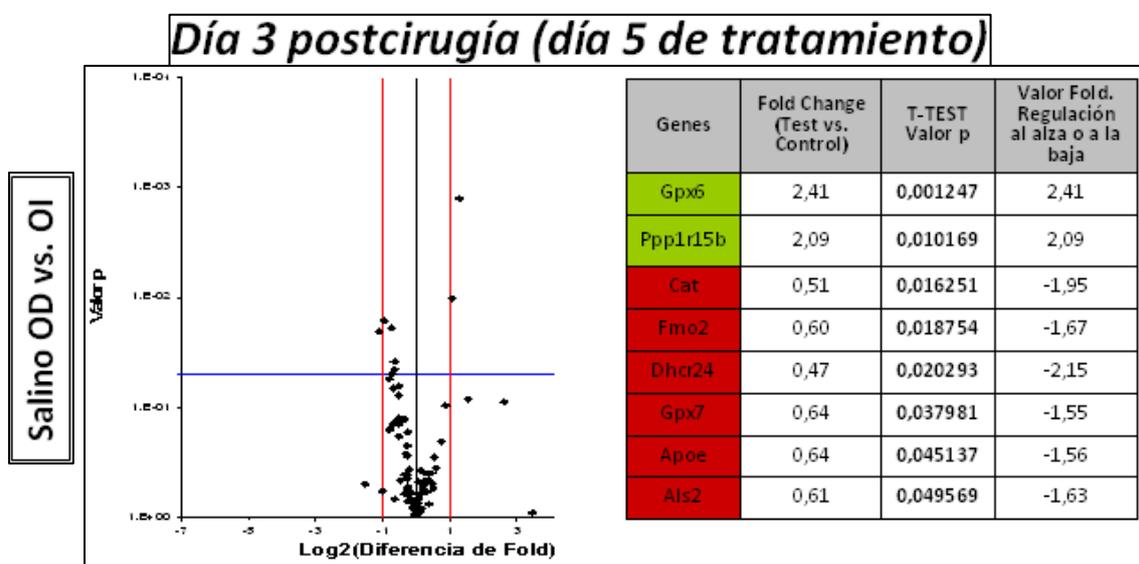


Figura 43. Comparación de la expresión génica del oído derecho con la del oído izquierdo en las muestras cocleares del grupo tratado con suero salino en el ensayo a tiempo corto (3 días postcirugía). Las gráficas Volcano representan el log2 del fold change (FC) en la expresión de cada gen entre las muestras frente a su valor p de la prueba t. Las líneas rojas indican un FC de 2. La línea azul indica el umbral de un valor p de 0,05 en la prueba t. Se representan los genes con una expresión de FC estadísticamente significativa en la muestra de ensayo comparada con la de la muestra control. Los valores de FC mayores de uno indican una sobreexpresión (representados en color verde), mientras que los valores inferiores a uno indican una infraexpresión (representados en rojo). Los valores de p se calculan en base a una prueba t de Student de los valores repetidos $2^{(-\Delta Ct)}$ para cada gen en el grupo control y en los grupos de ensayo. El FC es la expresión normalizada del gen ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) en la muestra de ensayo dividida por la expresión normalizada del gen ($2^{(-\Delta Ct)}$) en la muestra control. Se ha empleado como gen de control endógeno el gen *Actina-β*.
OD: oído derecho. OI: oído izquierdo

Día 3 postcirugía (día 5 de tratamiento)

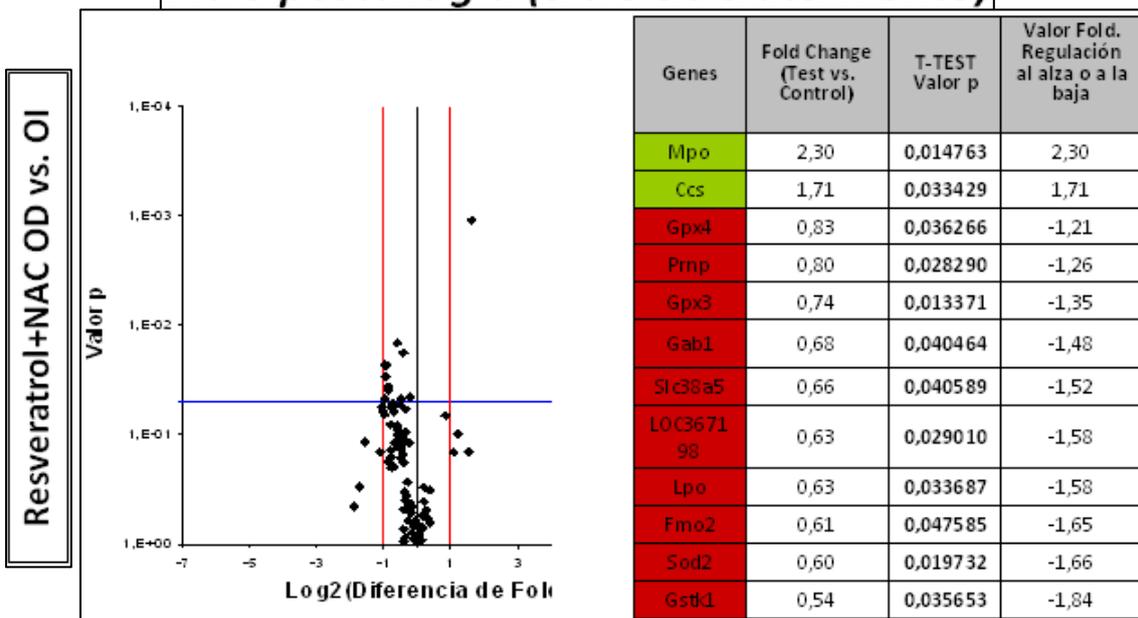


Figura 44. Comparación de la expresión génica del oído derecho con la del oído izquierdo en las muestras cocleares del grupo tratado con RESV + NAC en el ensayo a tiempo corto (3 días postcirugía). La metodología es la descrita en la figura 5.
OD: oído derecho. OI: oído izquierdo

Día 3 postcirugía (día 5 de tratamiento)

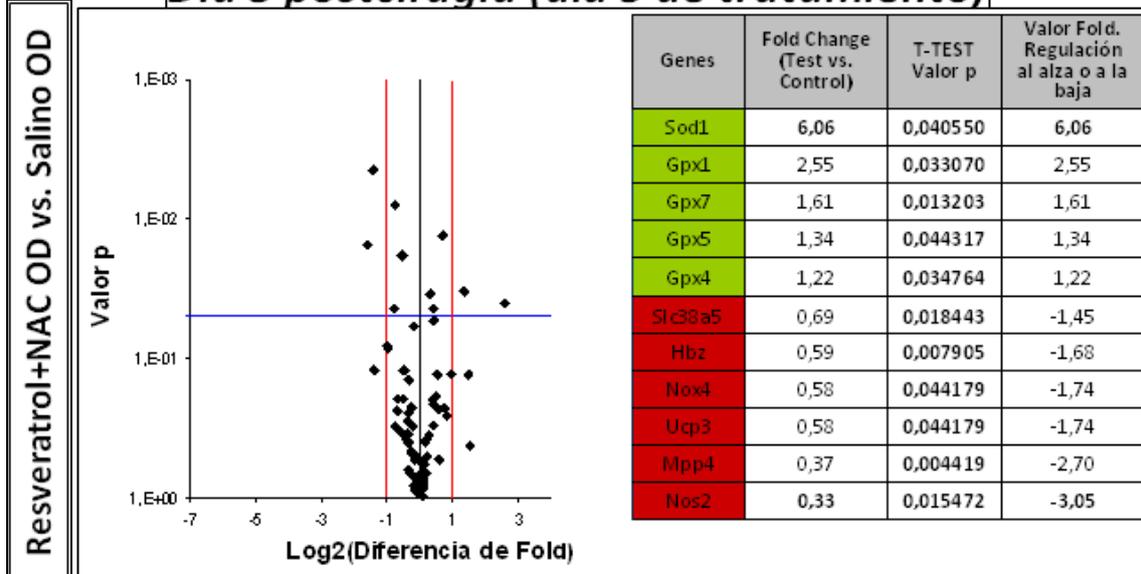


Figura 45. Comparación de la expresión génica en las muestras cocleares del oído derecho en el grupo tratado con RESV + NAC con la del grupo tratado con suero salino, también en el oído derecho, en el ensayo a tiempo corto (3 días postcirugía). La metodología es la descrita en la figura 5.
OD: oído derecho.

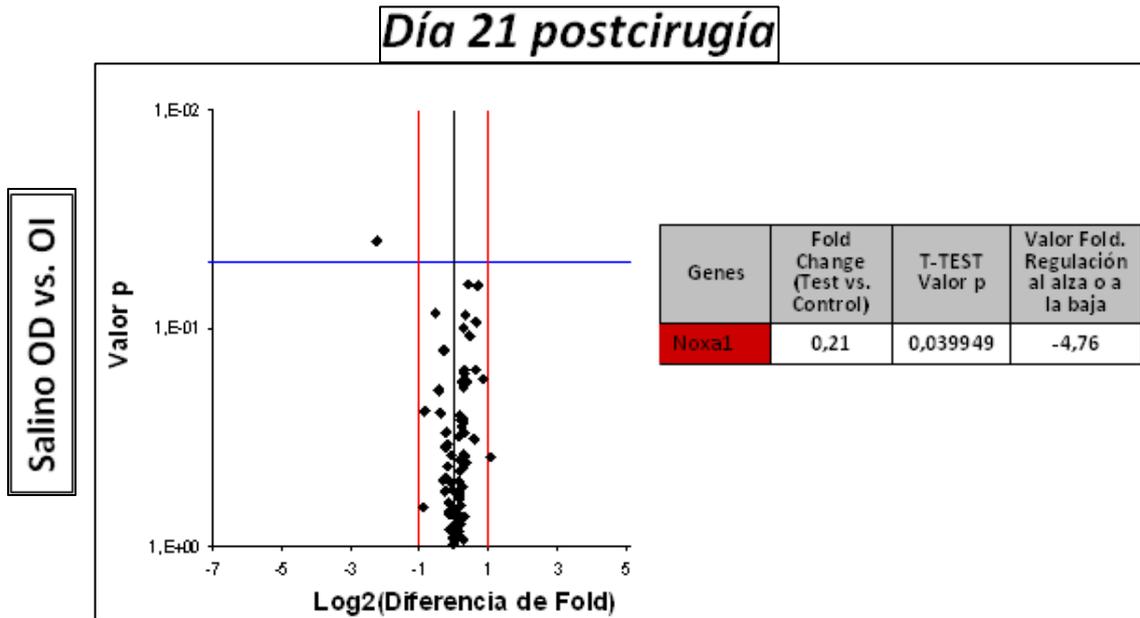


Figura 46. Comparación de la expresión génica del oído derecho con la del oído izquierdo en las muestras cocleares del grupo tratado con suero salino a los 21 días postcirugía. La metodología es la descrita en la figura 5.
 OD: oído derecho. OI: oído izquierdo

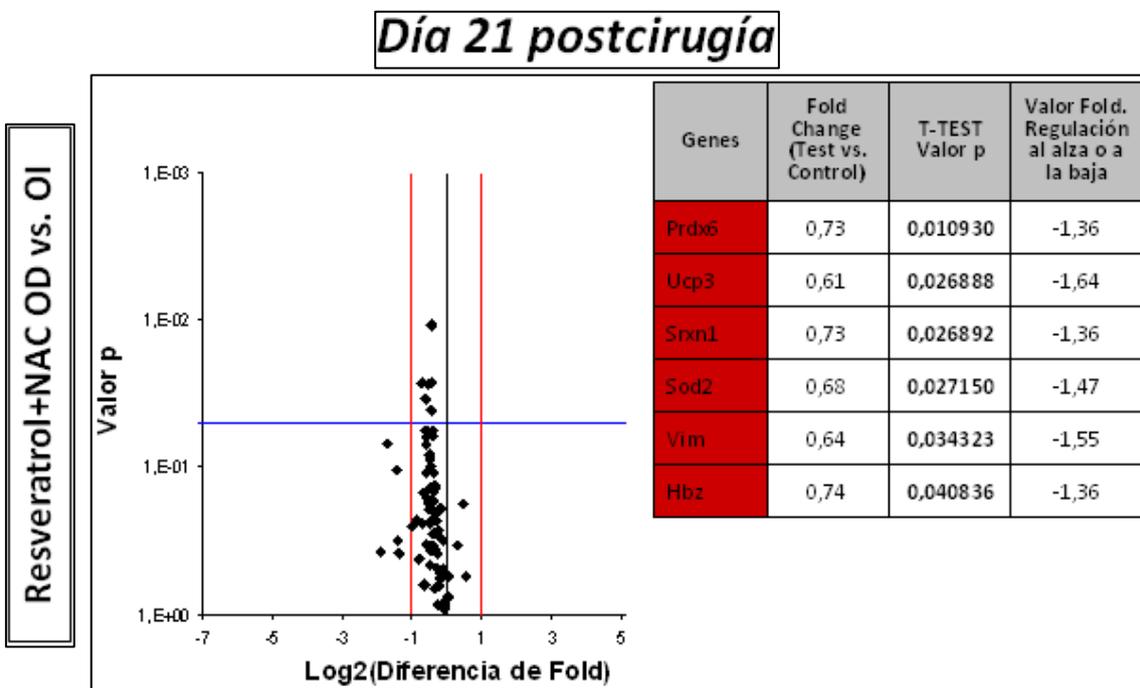


Figura 47. Comparación de la expresión génica del oído derecho con la del oído izquierdo en las muestras cocleares del grupo tratado con RESV + NAC a los 21 días postcirugía. La metodología es la descrita en la figura 5.
 OD: oído derecho. OI: oído izquierdo

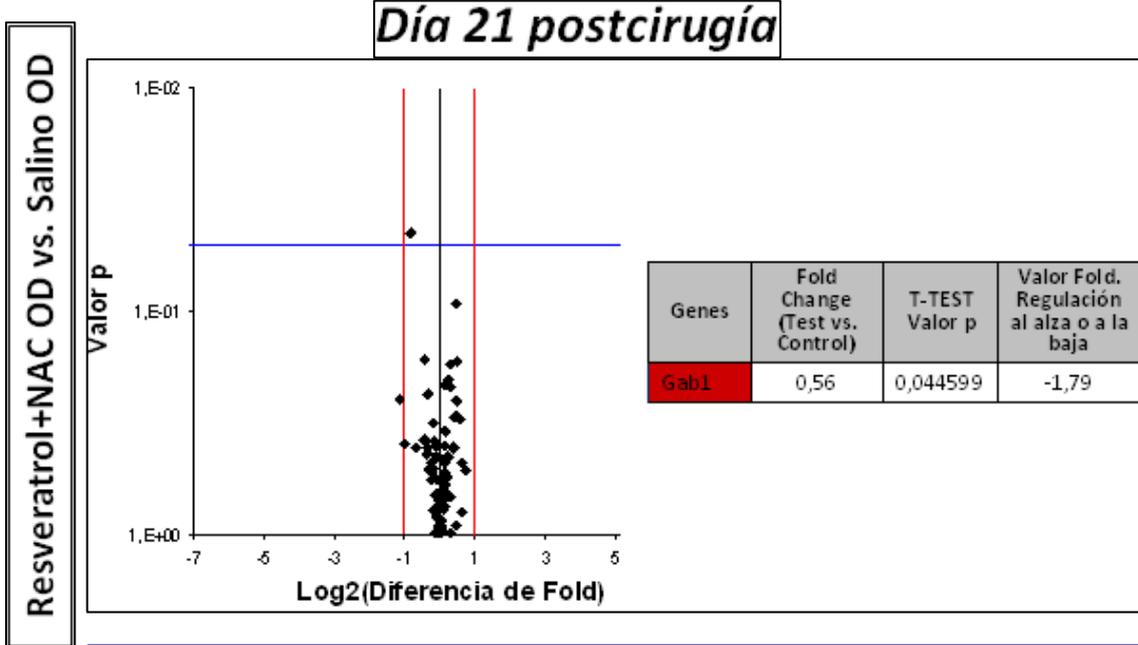


Figura 48. Comparación de la expresión génica en las muestras cocleares del oído derecho en el grupo tratado con RESV + NAC con la del grupo tratado con suero salino, también en el oído derecho, a los 21 días postcirugía. La metodología es la descrita en la figura 5. OD: oído derecho.

5. DISCUSIÓN

5.1 Validación y comparación del método de ototoxicidad local con el método de administración sistémica de KAN y FUR

La hipoacusia neurosensorial es una condición frecuente y de gran impacto en la calidad de vida de la población general. Como causas frecuentes se encuentran la edad avanzada, el ruido, determinados fármacos ototóxicos y los trastornos genéticos, todas ellas con un desenlace común, que no es más que el daño que producen sobre las células ciliadas del oído interno.

En las aves y otros vertebrados no mamíferos es posible la regeneración de células ciliadas tras estimulación de mitosis en células progenitoras, que llegan a diferenciarse para cambiar su fenotipo y convertirse en nuevas células ciliadas. Desafortunadamente esto no ocurre en los mamíferos, y se desconoce si la razón para ello es una depleción de progenitores de células ciliadas durante la embriogénesis o por el contrario, la ausencia de un estímulo apropiado durante la edad adulta. Sea cual sea el motivo, esto supone un reto en el tratamiento de los trastornos del oído interno y en la actualidad, pese a las numerosas líneas de investigación abiertas, no se dispone de ningún tratamiento curativo eficaz.

Los abordajes terapéuticos en vías de investigación pueden resumirse en los siguientes:

1) Agentes antiapoptóticos

El estudio de la muerte celular ha generado gran interés en las últimas dos décadas (180). De especial importancia es la apoptosis o muerte celular activa, que induce a la búsqueda de genes que codifiquen tanto sustancias determinantes en la cascada apoptótica como otras potencialmente inhibitoras de apoptosis. Uno de los receptores mejor estudiados que interviene en esta cascada es el receptor Fas, un receptor transmembrana inductor de muerte celular y presente en una gran variedad de tipos de células (181). Otros agentes muy estudiados son los inhibidores de caspasas, que actúan como ejecutores finales de la muerte celular en la cascada de la apoptosis. Existen trabajos que demuestran eludir la apoptosis de células ciliadas en el oído interno tras tratamiento con cisplatino (182). Otra sustancia muy estudiada dentro de este grupo es la survivina, una proteína de la familia Bcl-2 (183).

2) *Prevención de muerte celular*

Dentro de las sustancias investigadas para la prevención de pérdida de células ciliadas se encuentran en la literatura las siguientes:

- a) Factores neurotróficos: una vez se ligan a su receptor específico activan una cascada intracelular que conduce a una o más de sus funciones. Entre estas funciones se incluyen señales necesarias para el desarrollo, mantenimiento del estado de diferenciación, resistencia a daños exógenos y regeneración axonal. Entre los más conocidos encontramos el *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) y la neurotrofina-3 (NT-3) (31,184,185). Otro agente muy estudiado es el *human insulin-like growth factor 1* (IGF-1), siendo conocidas sus actividades neuroprotectoras que mantienen el metabolismo celular, activan el crecimiento, proliferación y diferenciación, y limitan la muerte celular (186,187).
- b) Agentes antioxidantes: las ROS juegan un papel importante en muchos tejidos en respuesta a una gran variedad de daños exógenos. Se ha encontrado un incremento de ROS en el oído interno tras exposición a ruido intenso y sustancias ototóxicas, lo que anima a pensar que algunos agentes antioxidantes puedan servir para proteger a las células ciliadas contra dichas lesiones.

3) *Reparación de células dañadas*

Aunque la reparación de células ciliadas puede ocurrir de forma espontánea, la magnitud de esta reparación es difícil de medir y sin embargo, urgen estudios que busquen terapias para aumentarla.

4) *Regeneración de células ciliadas*

Conceptualmente existen varios caminos para intentar la formación de nuevas células ciliadas en el OC:

- Aumentando las mitosis en células de soporte, consideradas como progenitoras de células ciliadas.
- Por conversión del fenotipo de células de soporte en células ciliadas (sin mitosis)

- A través del implante de células madre en el OC (188).

Hasta el momento ninguno de estos abordajes es posible en el OC de mamíferos adultos *in vivo*. Sin embargo, se están desarrollando rápidamente muchas líneas de investigación en este sentido, de las que las más importantes se centran en genes que regulan la proliferación de progenitores de células ciliadas y la diferenciación de células ciliadas y células de soporte. Entre estos genes se pueden citar los genes *Notch*, que parecen implicados en la regulación de las vías de señalización dentro del proceso de regeneración de células ciliadas del oído interno (189,190).

En el contexto de nuevos tratamientos potencialmente eficaces para la hipoacusia neurosensorial ha suscitado un gran interés en los últimos años la administración directa de sustancias en el oído interno, tanto en la investigación básica como en la clínica. La razón fundamental para ello es que, a pesar de emplear dosis más bajas, el medicamento que se aplica localmente puede alcanzar mayor concentración en el oído interno que la que se conseguiría con su administración sistémica, consiguiéndose así un mayor efecto terapéutico y evitando potenciales efectos secundarios. La idea de aplicar localmente el fármaco en el oído interno no es nueva. En la introducción de esta tesis ya se hace referencia a varias sustancias que desde hace décadas se están aplicando con diferentes objetivos en distintas situaciones en las que existe afectación del oído interno (3,18-30). Respecto a la ototoxicidad inducida por ruido y por fármacos, son numerosos los trabajos de experimentación animal que demuestran resultados prometedores con la administración local de sustancias a nivel del oído interno (31-39).

Pero a pesar de disponer cada vez de más sustancias candidatas para el tratamiento de la hipoacusia neurosensorial, los métodos técnicos para su administración y conducción hacia los órganos diana del oído interno precisan de un desarrollo muy superior al que se dispone en la actualidad.

Y no es difícil entender que para la diligencia de todas estas líneas de investigación son también muy importantes tanto modelos animales de daño coclear que sean reproducibles y fiables como el desarrollo de técnicas quirúrgicas que faciliten el acceso al oído interno, generalmente difícil en los animales habituales de experimentación. Los protocolos para producir daño coclear en animales de experimentación han encontrado limitaciones relativas a la toxicidad sistémica de los ototóxicos, a la necesidad de

múltiples inyecciones de fármaco para producir el daño y a la variabilidad en el tipo de lesiones dentro del oído interno.

En la primera parte de nuestro trabajo se describen los rasgos funcionales e histológicos de dos modelos complementarios de ototoxicidad en rata Wistar: 1) la administración sistémica de KAN y FUR y 2) la aplicación directa sobre la VR de un fragmento de gelfoam embebido con una solución concentrada de KAN y FUR.

5.1.1 Justificación del empleo de KAN y FUR

La mayoría de los estudios clínicos en los que se utiliza la administración directa de sustancias sobre la VR lo hacen con gentamicina, debido a su rápida disponibilidad farmacológica y a su efecto predominantemente vestibulotóxico sobre el cocleotóxico. Sin embargo, el principal objetivo de la primera parte de este trabajo era validar un modelo animal de daño coclear, y por tanto, se seleccionaron inicialmente dos sustancias con un efecto cocleotóxico predominante y bien conocido, como son la KAN y la FUR. Además, la propia combinación de estos dos ototóxicos podía incrementar el efecto cocleotóxico, por la bien conocida potenciación que la FUR y otros diuréticos de asa ejercen sobre los aminoglucósidos (191-193). Los mecanismos subyacentes a este efecto sinérgico en la toxicidad coclear no se han aclarado hasta la fecha. Algunos autores lo han relacionado con el daño anóxico que produce el diurético de asa a nivel del epitelio de la estría vascular, que transformaría un potencial endococlear normalmente positivo en otro negativo, lo que favorecería la entrada en la endolinfa de los aminoglucósidos, que presentan una carga positiva (97,194). Por otro lado, los diferentes aminoglucósidos y diuréticos de asa presentan diferencias tanto farmacológicas como en la sensibilidad a la ototoxicidad que inducen entre las distintas especies animales. Esta es por ejemplo la justificación que emplean Abbas y Rivolta (195) para no producir daño ototóxico en jerbos tras la combinación de KAN con bumetanida, y sí tras la combinación de KAN con FUR, cuando se conoce que la bumetanida empleada con fines de potenciar el efecto de los aminoglucósidos tiene un efecto mucho mayor que el de la FUR (196). Las diferencias en la ototoxicidad entre los distintos antibióticos aminoglucósidos pueden apreciarse también en el trabajo de

Murillo-Cuesta et al., que compara los efectos del tratamiento sistémico con cuatro aminoglucósidos diferentes en dos cepas de ratón (171).

A nivel coclear, los aminoglucósidos producen inicialmente el daño en las CCE del OC, comenzando por la región basal de la cóclea y extendiéndose posteriormente el daño hacia las regiones medias y apicales. Habitualmente, las CCI y las células de soporte se afectan en menor grado, lo que ha tratado de explicarse por diferencias en la expresión celular de determinados factores como el factor nuclear $\text{k}\beta$ (NF $\text{k}\beta$) y en los niveles de GSH (197).

La KAN pertenece al grupo de los aminoglucósidos, y se conocen bien sus efectos ototóxicos y nefrotóxicos en la práctica clínica. El mecanismo más destacado de ototoxicidad por aminoglucósidos está relacionado con las ROS y el daño que éstas producen a nivel del oído interno (198). De todos los aminoglucósidos, la KAN, utilizada sola o en combinación con diuréticos de asa, es la que mejor perfil bibliográfico presenta (36,106,194,197,199-203), y es por lo que se eligió para comenzar el diseño de nuestro trabajo.

La FUR pertenece al grupo de los diuréticos de asa, también con potencial ototóxico, aunque en este caso el daño es casi siempre reversible. La administración sistémica o intracoclear de FUR induce cambios rápidamente reversibles en las respuestas a determinados estímulos, incluidas las respuestas de receptores celulares, las del nervio auditivo (204) y las que producen cambios en la vibración de la membrana basilar (96). Se acepta que el mecanismo de acción de la FUR a nivel de la cóclea se produce en dos niveles principales, la estría vascular y las células ciliadas, aunque se cree que el efecto ototóxico predominante se debe a la interferencia con la función de la estría vascular, lo que provocaría una disminución del potencial endococlear. Con respecto a las CCE, parece ser que los diuréticos de asa pueden alterar directamente su motilidad intrínseca (205).

5.1.2 Administración sistémica de KAN y FUR

En nuestro experimento con ratas Wistar se demostró que una inyección única de KAN subcutánea (400 mg/kg) y FUR intravenosa (100 mg/kg) producía una sordera profunda asociada a un importante daño coclear, con destrucción de CCE e internas y disminución importante de la densidad de NGE. Estos resultados coinciden con los de otros trabajos que emplean cobayas, ratones suizos y ratones CBA / Caj, en los que la administración sistémica de estas dos sustancias de forma combinada produce también una hipoacusia profunda asociada a una degeneración bilateral y simétrica del epitelio sensorial de la cóclea, seguida de una degeneración de las neuronas cocleares (169,170,191-193,206,207).

La aplicación sistémica de KAN de forma aislada ha demostrado potencial ototóxico en varios modelos animales (106,201-203), sin embargo, a diferencia de nuestro modelo, en el que es necesaria una única dosis de KAN y FUR, en todos los otros se requieren generalmente regímenes de larga duración con elevadas dosis del fármaco que influyen de manera determinante en la toxicidad para el animal. Esto es más relevante en ratones adultos, en los que su conocida resistencia a los aminoglucósidos exige típicamente dosis muy altas cercanas a la dosis letal para generar ototoxicidad. Murillo-Cuesta et al. (171) publicaron recientemente un protocolo en ratones C57BL y 6JolaHsd basado en la administración intramuscular de 800 mg/kg/12h de KAN durante 15 días y lo compararon con otros regímenes de administración y con otros aminoglucósidos, demostrando un empeoramiento significativo de la función auditiva asociado a un importante daño coclear con una disminución de la toxicidad y de la mortalidad.

En nuestro trabajo, los umbrales ABR tras una dosis única de KAN y FUR en respuesta a tonos puros de 4 a 40 KHz mostraron un incremento estadísticamente significativo en todas las frecuencias con mayor afectación de las frecuencias agudas, lo que refleja un daño en todas las regiones de la cóclea, aunque algo mayor en las regiones basales. Esto coincide con el patrón más referido en la literatura de daño ototóxico por aminoglucósidos, con una afectación decreciente desde la base hasta el ápex (208). Se produjo además un incremento de la latencia de la onda I de aproximadamente 0,25 ms, y consecuentemente un incremento de las latencias en el

resto de las ondas, desde la II a la V, lo que podría reflejar tanto un mal funcionamiento de las células ciliadas como una actividad inadecuada en la vía neurológica auditiva. Sin embargo, las latencias interpico no se modificaron, lo que sugiere un daño restringido a la cóclea.

Los cambios histológicos en nuestro experimento se correlacionaron con los funcionales, produciéndose una afectación en todas las regiones de la cóclea, aunque algo mayor en las regiones basales.

Versnel et al. (169) observaron una pérdida mayor de CCE que de CCI a nivel de la espira basal tras la administración sistémica de KAN y FUR en cobayas, con una supervivencia creciente de las externas hacia las espiras más apicales. Hirose y Sato (192) observaron una pérdida completa de CCE en la espira basal y en la media tras la administración sistémica de KAN y FUR en ratones, mientras que en la espira apical la pérdida fue sólo del 60%. Respecto a las CCI, estos mismos autores comprobaron que se conservaban en todas las regiones de la cóclea salvo en la porción más proximal de la espira basal, donde se produjo una pérdida consistente de ellas. Los hallazgos de Hirose y Sato son superponibles a los de Janssen et al. (191) y a los de Xiong et al. (193), que emplean en ambos casos ratones como animales de experimentación. La mayor susceptibilidad de las CCE respecto a las CCI puede estar relacionada con varios mecanismos. Algunos trabajos la relacionan con la penetración del ototóxico en la célula a través de los canales de transducción, siendo estos canales de mayor tamaño en la CCE que en la interna y permitiendo por tanto una mayor entrada de fármaco en la primera (179). Con respecto a la mayor labilidad de las CCE en la espira basal que en las otras regiones cocleares, podría estar relacionada con varios mecanismos. Algunas publicaciones la justifican por una menor concentración de GSH a nivel de la región de CCE en la espira basal en comparación con la región apical, siendo más vulnerables a los radicales libres las CCE basales (178) (**fig. 49**).

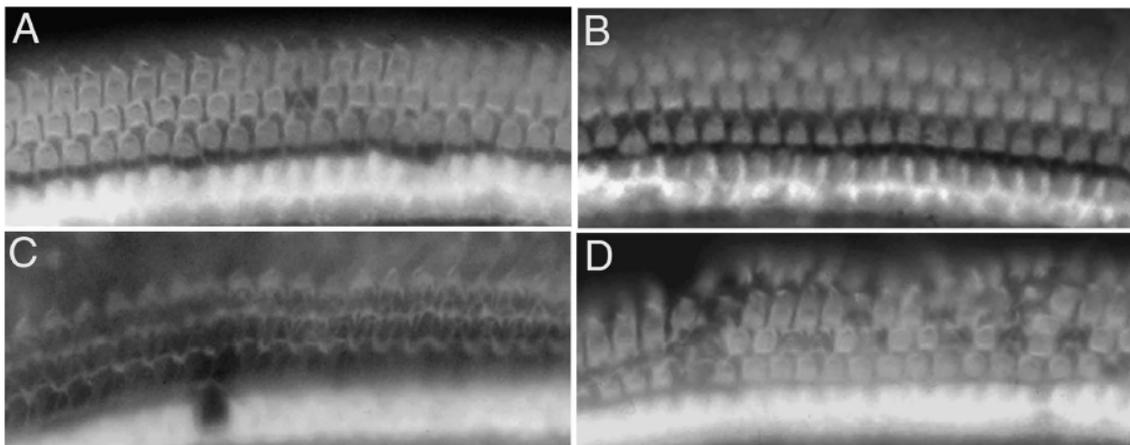


Figura 49. Ejemplo representativo de la mayor afectación de CCE en la espira basal que en la espira apical. En la parte superior se aprecia la conservación de las tres hileras de CCE y la hilera de CCI tanto en la escala basal (A) como en la escala apical (B) en ratones CBA tratados con suero salino. La parte inferior representa el OC de ratones CBA tratados con KAN (700mg/kg/día/2 dosis diarias/15 días) sistémica, apreciándose una pérdida casi completa de CCE en la escala basal (C), mientras se conservan gran parte de las mismas en la escala apical (D). Tomado de: *Wu WJ et al. Hear Res 2001;158:165-78.*

En nuestro modelo, como ya se ha mencionado, los cambios histológicos fueron también severos y más relevantes en la espira basal de la cóclea, donde se observó una pérdida completa tanto de CCE, comparable a los trabajos mencionados, como de CCI, siendo por tanto la pérdida de estas últimas más importante que en los otros trabajos publicados. La mayor pérdida de CCI en nuestro experimento podría explicarse por el uso de la rata como animal de experimentación, en comparación con los otros trabajos, que emplean el ratón, conociéndose bien que existe una mayor resistencia a la ototoxicidad inducida por aminoglucósidos en ratones adultos que en otros roedores (199,209,210). En las espiras media y apical los cambios fueron menos relevantes que en la espira basal, y variaban desde la pérdida parcial aislada de CCE a la pérdida de CCE e internas.

Los resultados de nuestro estudio histológico mostraron también un colapso completo del túnel de Corti y una disminución de la densidad neuronal a nivel del ganglio espiral, de forma más relevante en la espira basal de la cóclea. La degeneración de neuronas en el ganglio espiral ha sido extensamente investigada en la ototoxicidad inducida por aminoglucósidos (211-215) y generalmente todos los estudios resaltan la importancia del soporte trófico de las CCI para la supervivencia de estas neuronas. De

esta manera, se considera que la degeneración neuronal sería secundaria a la pérdida de CCI y de las terminaciones nerviosas aferentes, no existiendo prácticamente nunca esta degeneración neuronal en pequeños mamíferos en presencia de CCI. Esto se correlaciona con nuestros hallazgos, donde la disminución de NGE también se acompañaba de la pérdida completa de CCI. Abbas y Rivolta (195) han descrito, sin embargo, muy recientemente un modelo animal con jerbos de Mongolia en el que la pérdida de NGE es muy pequeña o inexistente incluso varios meses después de la degeneración de CCI tras administración sistémica de KAN y FUR, lo que contrasta con la rápida degeneración neuronal secundaria que se produce en ratas, ratones y otros pequeños mamíferos. Los autores proponen éste como un buen modelo animal de daño ototóxico para estudiar la pérdida de células y regeneración. En el otro sentido, encontramos publicaciones recientes que demuestran la degeneración de NGE sin que exista lesión en las CCI y que dan mucha importancia a las células de sostén en la supervivencia neuronal dentro del oído interno (216).

A pesar de representar un modelo de daño coclear reproducible y fiable, no se puede obviar en nuestro experimento la morbilidad asociada tanto a las elevadas dosis que se requieren de estas sustancias ototóxicas para su administración por vía sistémica como a la propia vía de administración. Sin embargo, a diferencia de otros modelos que emplean sólo un aminoglucósido con regímenes prolongados de administración (106,201-203), el que se presenta sólo se requiere una dosis sistémica para generar ototoxicidad, lo que lógicamente repercute de forma positiva en la toxicidad para el animal. Tampoco se puede obviar el daño bilateral que produce la administración sistémica de estos ototóxicos, a diferencia de la administración local, que lo produce únicamente en el oído implicado, dejando el contralateral como control intra-animal.

Otra circunstancia a debatir en este modelo es la posible reversibilidad del daño en las células ciliadas a medio plazo y la aceptación de cierta variabilidad en el daño funcional entre los distintos animales e incluso dentro del mismo animal. Por motivos tanto metodológicos como logísticos, nosotros analizamos la respuesta ABR una semana después de la administración sistémica de KAN y FUR. Sin embargo, no podemos describir los resultados en períodos más cercanos o alejados de la administración. Y existen trabajos como el de Nourski et al. (217) donde encontraron

que 12 horas tras la administración sistémica de KAN y ácido etacrínico, 4 de 6 cobayas presentaban un importante aumento del umbral mientras que las 2 restantes mostraban unos umbrales cercanos a la normalidad. Como ejemplo de la posible variabilidad intraindividual y posible reversibilidad del daño se puede mencionar el trabajo de Aran y Darrouzet (218), que demostraron la recuperación de una pérdida de 40 dB_{SPL} en la segunda semana tras tratamiento con KAN. Y aunque en este caso no se emplean aminoglucósidos ni diuréticos, otro ejemplo en referencia a lo anterior es el trabajo de Klis et al. (219), que encontraron una recuperación sustancial de la audición en períodos mayores de 3 semanas tras la finalización de un tratamiento prolongado con cisplatino. La explicación de esta recuperación tardía no está aún aclarada. Aran y Darrouzet (218) lo justifican por el aclaramiento coclear de KAN, cuyo mecanismo de acción se relaciona con una alteración de la estría vascular que perturba el potencial endococlear y por tanto la función de las células ciliadas. Al disminuir la concentración intracoclear de KAN, la recuperación del potencial endococlear mejoraría la función de las células sensoriales supervivientes, lo que podría explicar la recuperación del umbral.

Independientemente de la causa, esta recuperación tardía tiene implicaciones en los trabajos experimentales. Así, este modelo de ototoxicidad puede no ser útil cuando se requiera un daño severo con pérdida completa del epitelio sensorial de la cóclea, y más si entre los criterios de inclusión se considera sólo el cambio de umbral antes o a los 7 días del tratamiento ototóxico. En su lugar, deberían considerarse como criterios de inclusión las variaciones de umbral producidas al menos 2 semanas después de la administración o incluso el propio estudio histológico del OC que demuestre la pérdida completa de células ciliadas. Por último, y en particular en experimentos cuyo objetivo sea la reparación de algún daño en las células ciliadas, siempre debe tenerse en cuenta esta posibilidad de una recuperación espontánea y por tanto no relacionada con el tratamiento.

5.1.3 Administración local de KAN y FUR

Tras haber demostrado en la fase inicial un efecto cocleotóxico en ratas Wistar tras la administración sistémica de KAN y FUR, se procedió a explorar el potencial ototóxico de la administración local sobre la VR de un fragmento de gelfoam embebido

con una solución concentrada de una combinación de estas mismas sustancias. Y este modelo experimental de daño coclear en rata Wistar es el que, una vez validado, serviría para estudiar el efecto protector de la combinación de antioxidantes administrados por vía intraperitoneal.

5.1.3.1 Elección del animal de experimentación

Entre los animales de experimentación más frecuentemente empleados como modelos de daño coclear inducido por ototóxicos se encuentran roedores como la cobaya y la chinchilla (220,221). Un motivo para ello es el tamaño y las características anatómicas de estas especies, que hacen más fácil el acceso quirúrgico a la cóclea. En nuestro experimento se ha utilizado como modelo animal la rata Wistar, que a pesar de sus limitaciones para el abordaje comparadas con las de otras especies, presenta un genoma bien secuenciado y muestra importantes similitudes anatómicas y fisiológicas con los humanos. El conocimiento detallado de la anatomía del oído medio en el animal de experimentación es imprescindible para evitar daños colaterales ajenos a la sustancia estudiada, y en ratas, aunque escasas, existen algunas publicaciones al respecto (222,223) (*fig. 50*).

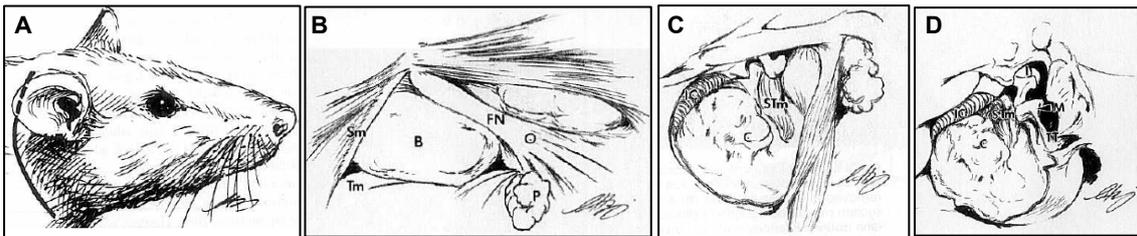


Figura 50. Representación esquemática del acceso al oído medio y de su anatomía en una rata Wistar. **A:** Incisión de abordaje retroauricular para el acceso al oído medio. **B:** Tras disecar los colgajos y exponer la musculatura cervical puede apreciarse el nervio facial (FN) que discurre por encima de la bulla timpánica (B) y anteriormente a la glándula parótida (P). **C:** Tras apertura de la bulla timpánica se expone el promontorio de la cóclea (C) y, en íntima relación con el mismo, la arteria carótida interna (IC), que en esta localización se denomina también arteria estapedial y discurre entre las dos cruras del estribo. Puede visualizarse también el tendón del músculo del estribo (STm). Los huesecillos timpánicos no se aprecian todavía por su localización superior y profunda a los tejidos blandos del conducto auditivo externo. **D:** Tras eliminar las partes blandas del conducto auditivo externo y la membrana timpánica puede apreciarse la cadena de huesecillos intacta. *Sm: músculo esternocleidomastoideo. Tm: músculo temporal. B: bulla timpánica. FN: nervio facial. C: cóclea. STm: músculo del estribo. IC: arteria carótida interna. M: martillo. I: incus. TT: tendón tensor del tímpano.* Tomado de: Judkins RF et al. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;117:438–47.

Como se ha mencionado, las similitudes anatómicas entre el oído de la rata y el oído humano son considerables. Sin embargo, existen también diferencias importantes. Así, la bulla timpánica se presenta en la rata como una gran cámara de aire abierta sin trabeculaciones óseas, que reemplaza las celdas aéreas mastoideas del humano. La pared lateral de la bulla está constituida por la membrana timpánica, que es más delgada y proporcionalmente de mayor tamaño cuando se compara con la humana. Los huesecillos son pequeños y están casi ocultos en el epitímpano, localizándose superior y profundamente a las partes blandas del conducto auditivo externo, lo que impide verlos en muchas ocasiones durante el abordaje quirúrgico. La cóclea se sitúa en la pared medial de la bulla y contiene sólo 1,5 espiras, comparadas con las 2,5 – 2,75 que presenta la humana. En contraste con la del hombre, la arteria estapedial, una rama de la arteria carótida interna, persiste en el oído medio de la rata, siendo generalmente un vaso anastomosante entre las arterias carótida externa e interna con múltiples variaciones en su recorrido. En la rata esta arteria suele penetrar en el oído medio a través de la fisura petrotimpánica, en la vertiente inferomedial de la bulla. Continúa por un semicanal en la pared medial de la cavidad timpánica cubierta por mucosa del oído medio, sobre el nicho de la VR y finalmente discurre de posterior a superior entre las dos cruras del estribo. Es importante tener en cuenta que la lesión de esta arteria durante la cirugía desencadena generalmente la muerte del animal.

5.1.3.2 Elección del abordaje quirúrgico

Teniendo en cuenta las consideraciones anatómicas referidas, un asunto importante era la forma de acceder a la bulla timpánica en la rata para exponer las estructuras que dan acceso al oído interno. El abordaje retroauricular es el más frecuentemente empleado en cobayas para este propósito (224,225). Este abordaje resulta muy difícil en la rata, debido a su menor tamaño y a la posición de la bulla timpánica, más profunda en este animal. Además, el abordaje retroauricular es un abordaje complejo, lento y asociado frecuentemente a lesiones del nervio facial, sobre todo en la rata, donde este nervio presenta una localización más superficial y anterorostral que en la cobaya y en el hombre. Es importante resaltar la gran repercusión que la lesión del nervio facial puede tener en la morbimortalidad del animal durante el período postoperatorio,

fundamentalmente por las dificultades que provoca en la alimentación y por las complicaciones oculares asociadas.

Por todo ello, para acceder a la ventana redonda y a la cóclea, en nuestro modelo se decidió emplear un abordaje quirúrgico ventral a través del cuello, adoptando como guías algunas publicaciones ya existentes sobre el mismo (165,166,226,227). Entre las ventajas de este abordaje destacan su escasa morbilidad y mortalidad, su seguridad, su rapidez y facilidad en la ejecución y la posibilidad de una visión directa del nicho de la VR, lo que difícilmente se consigue con el abordaje retroauricular. Una de las virtudes de esta visión directa es el control constante de la arteria estapedial, evitando por tanto su lesión durante la cirugía (*fig. 51*).

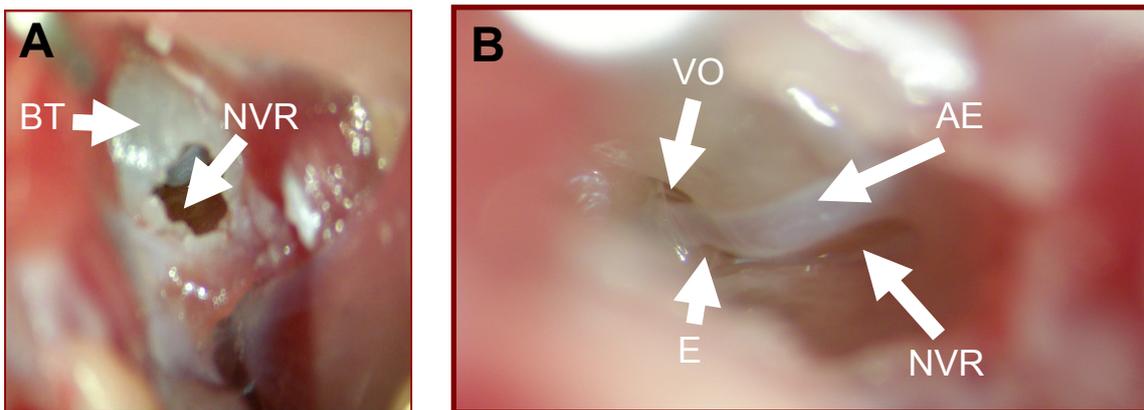


Figura 51. **A:** Tras realizar la apertura de la bulla timpánica (BT) se aprecia perfectamente el nicho de la VR (NVR) en estrecha relación con la arteria estapedial. **B:** Macrofotografía de la imagen anterior donde se aprecian claramente la ventana oval (VO), la arteria estapedial (AE) discurrendo entre las dos cruras del estribo (E) y el nicho de la ventana redonda.

El hecho de que los huesecillos se alberguen prácticamente en el epitímpano hace difícil su lesión durante el abordaje ventral, aunque por su pequeño tamaño (cuatro veces menor en la rata que en el hombre) estos huesecillos deben manipularse con extremo cuidado durante la cirugía. Todas estas ventajas no eluden algunas consideraciones a tener en cuenta con el abordaje ventral. Así, la disección en el cuello debe ser cuidadosa, evitando presiones excesivas o movimientos violentos del instrumental que puedan dañar vasos superficiales como la arteria facial anterior o vasos de mayor calibre como las arterias carótidas externa e interna, que están protegidas por

los músculos del cuello durante el abordaje. Por último, el uso de retractores durante la cirugía puede producir la compresión del nervio recurrente laríngeo, localizado posterolateralmente a la tráquea en la rata. La lesión unilateral de este nervio suele ser bien tolerada, y es la que en nuestro experimento podríamos producir, ya que realizamos el abordaje en un único lado del cuello. Sin embargo, en algunos casos puede provocar cambios cardiorrespiratorios que pueden desencadenar la muerte del animal, lo que no hemos experimentado en ningún caso.

5.1.3.3 Transferencia de los ototóxicos al oído interno

Una vez expuestas las estructuras que dan acceso al oído interno se debía decidir la forma de transferir los ototóxicos al espacio intracoclear. Dentro de los abordajes más referidos en la literatura para hacer llegar las sustancias al interior de la cóclea en modelos animales se encuentran la aplicación transtimpánica, la inyección directa a través de la membrana de la VR y la infusión intracoclear a través de una cocleostomía, con o sin el empleo de sistemas de infusión con minibombas osmóticas.

En el caso de la aplicación transtimpánica, la principal limitación es la incapacidad para predecir la cantidad de sustancia que va a alcanzar el oído interno, lo que está condicionado por diversas variables. La primera variable es la cantidad de sustancia que contacta con la membrana de la VR, la cual da entrada a la escala timpánica y representa el principal sitio de absorción y acceso al oído interno. Son menos importantes para este cometido la ventana oval, el ligamento anular y los vasos linfáticos (228). Desde hace tiempo existen publicaciones que apoyan este argumento, como la de Kimura et al. (229), quienes demostraron un menor daño tras administración local de ototóxicos cuando se obstruía parcialmente con grasa la membrana de la VR. La segunda variable es la duración del contacto de la sustancia con la membrana de la VR, lo que puede estar condicionado por la función de la trompa de Eustaquio y por la absorción a través de la mucosa del oído medio. Y la tercera variable es la tasa de absorción de la sustancia a través de la membrana de la VR, que a su vez puede verse afectada por otras circunstancias, dependientes tanto de la propia sustancia como de las características específicas de la membrana.

Los otros dos abordajes más conocidos para introducir sustancias dentro del oído interno son la inyección directa a través de la membrana de la VR y la infusión intracoclear a través de una cocleostomía, los cuales se han asociado a problemas relacionados con el trauma quirúrgico, la inflamación y el daño funcional auditivo (65,76).

Basándonos en estas premisas, en nuestro experimento se decidió como punto de partida emplear un vehículo que contuviera la mezcla de ototóxicos y que pudiera colocarse directamente sobre la membrana de la VR, promoviendo así una mayor concentración de sustancia a nivel de la ventana y una mayor duración del contacto con la membrana. El vehículo elegido fue el gelfoam, una esponja estéril de gelatina natural reabsorbible utilizada en la práctica clínica como hemostático local. Existen muchas publicaciones que han demostrado la eficacia de este vehículo para la transferencia de sustancias al oído interno (226,227,230). En algunas de ellas se describe un efecto ototóxico dosis-dependiente tras administrar la sustancia embebida con gelfoam sobre la VR y dicho efecto no parece depender del tiempo de exposición, aunque éste no es inferior a 5 días en la mayoría de los experimentos (226,230). Sheppard et al. (226) apreciaron una ausencia del efecto ototóxico cuando aplicaban gelfoam con gentamicina sobre la VR durante sólo 30 minutos. Estos autores han relacionado también el efecto con la proximidad del gelfoam a la VR. Los hallazgos histológicos relativos a cambios inflamatorios en el oído medio que encontraron Huang et al. (231) al comparar el gelfoam con el NasoPore[®], una espuma de poliuretano biodegradable sintético producido por un proceso de liofilización que también se emplea con fines hemostáticos, confirman para el primero un mayor grado de fibrosis, proliferación vascular, engrosamiento de la membrana timpánica y un mayor número de células inflamatorias. Estos autores no encontraron sin embargo cambios funcionales significativos ni con uno ni con el otro material cuando éstos se situaron sobre la VR. Hallazgos parecidos a los de Huang et al. en relación a los cambios inflamatorios en la mucosa del oído medio tras el empleo de gelfoam se encuentran en los trabajos de Hellstrom e al. (232), Doyle-Kelly (233), Liening et al. (234), Bahadir et al. (235) y Park et al. (236).

Como ya se ha descrito, en nuestro trabajo se demostró a través de estudio con ABR que este abordaje no alteraba la función auditiva ni se asociaba a complicaciones

quirúrgicas relevantes, hallazgos que se correlacionaron con el estudio histológico y que coinciden con los de otros experimentos que también emplean algún vehículo emplazado sobre la membrana de la VR (33,34,217,227,230,237).

Basándonos en estos precedentes, en nuestro experimento se empleó el gelfoam embebido con una solución altamente concentrada de KAN (200 mg/ml) y FUR (50 mg/ml) aplicado directamente sobre la membrana de la VR, no siendo la duración del contacto inferior a 7 días en ningún caso. El reciente experimento de Abbas y Rivolta (195) aplica sobre la VR el gelfoam embebido con una solución de KAN (500 mg/kg) y bumetanida (50 mg/kg) sin que se produzca daño a nivel de las células ciliadas ni elevación significativa del umbral ABR. A pesar de ello, estos autores no especifican la concentración de la solución de la mezcla ni el volumen embebido en el gelfoam. Y sin embargo, cuando utilizan con el gelfoam una mezcla de KAN (500 mg/kg) y FUR (100 mg/kg) demuestran tanto un incremento considerable del umbral ABR (40 – 50 dB_{SPL}) en todas las frecuencias como un importante daño celular a nivel coclear. Tampoco en este caso especifican la concentración de la solución ni el volumen empleado, pero se pueden intuir concentraciones elevadas de la solución si se compara la dosis inicial empleada en este experimento (500 mg/kg de KAN y 100 mg/kg de FUR) con la nuestra (20 mg/kg de KAN y 5 mg/kg de FUR). En nuestro caso, esta dosis inicial se calculó sobre el 5 – 10% de la dosis sistémica más empleada de estos fármacos en otras publicaciones, pero, teniendo en cuenta el pequeño volumen de la bulla timpánica en ratas, se preparó específicamente para este experimento una solución altamente concentrada de KAN (200 mg/ml) y FUR (50 mg/ml) que permitiera embeber el gelfoam en un pequeño volumen de esta solución (50µl).

5.1.3.4 Farmacocinética de los ototóxicos dentro del oído interno

Entre los aspectos criticables de nuestro modelo se encuentra el desconocimiento de la farmacocinética de los ototóxicos dentro del oído interno, siendo éste uno de los grandes retos en los modelos experimentales. Los procesos principalmente implicados en la farmacocinética de una sustancia dentro del oído interno son la tasa de transferencia a través de la membrana de la VR, la distribución de la sustancia por el espacio del oído interno (mediada fundamentalmente por difusión simple) y la

depuración de la sustancia desde el propio oído interno. Es fácil entender la dificultad que entraña el detallado entendimiento del conjunto de estos procesos en los estudios experimentales cuando se trabaja con distancias geométricas tan pequeñas y cuando el acceso quirúrgico al oído interno es difícil en muchas de las especies animales. Bien es verdad que, como ya se mencionó en la introducción de esta tesis, se están desarrollando nuevas técnicas de muestreo que se combinan con métodos cuantitativos para la interpretación de resultados (16,17) e incluso programas informáticos capaces de simular la distribución de sustancias dentro del oído interno (6). Todos estos avances están ayudando a establecer los principios básicos de la distribución de sustancias dentro del oído interno y sin embargo no eluden la dificultad para utilizar estos principios en estudios experimentales similares de aplicación clínica en seres humanos, lo que depende principalmente de dos factores: la importante diferencia en el volumen de perilinfa entre modelos animales y humanos, y el importante papel que juega la contaminación de líquido cefalorraquídeo en las muestras de perilinfa, ya que cuando éstas se extraen en los estudios experimentales, el volumen extraído se repone por líquido cefalorraquídeo que entra a través del acueducto coclear y por tanto contamina la perilinfa.

Por tanto, la cantidad de sustancia y su distribución dentro del oído interno reciben escasa consideración no sólo en nuestro trabajo, sino en la mayoría de los estudios experimentales publicados. Los resultados obtenidos en nuestro modelo sugieren un fácil y rápido acceso de los ototóxicos al interior de la cóclea, con un posible mayor efecto sobre las regiones de la espira basal y menor afectación de las zonas apicales, en las que las CCI y el túnel de Corti permanecen intactos en algunos animales. Esto podría explicar también la afectación funcional algo mayor en las frecuencias medias y altas que en las más bajas que refleja el audiograma y se podría justificar por la proximidad de la espira basal a la VR, lugar donde se aplicaron los ototóxicos. No obstante, también hay que tener en cuenta tanto la asunción en muchos experimentos de una mayor susceptibilidad de las CCE en la región basal (178,179) (**fig. 52**) como los llamados gradientes de concentración basal-apical, que dificultan el acceso de las sustancias a las regiones apicales de la cóclea impidiendo por tanto el efecto de estas sustancias sobre las células de estas regiones (51).

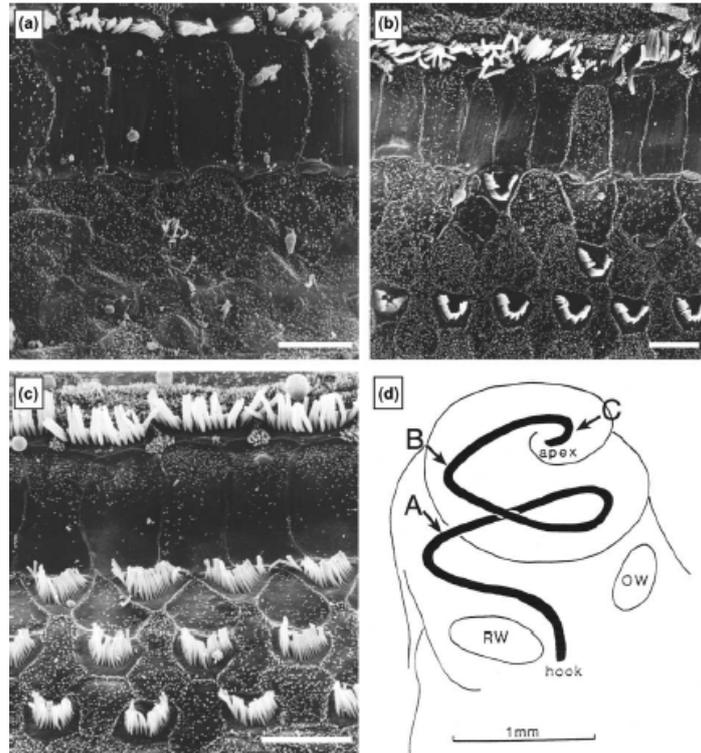


Figura 52. Ejemplo representativo del patrón de daño celular en el oído interno tras administración local de aminoglucósidos. Las figuras representan imágenes con microscopio electrónico del OC de un ratón tras aplicar sobre la VR gelfoam embebido con gentamicina, con una susceptibilidad decreciente de las CCE desde la base hasta el ápex. **a:** Ausencia casi completa de CCE con fusión de los estereocilios de algunas CCI. **b:** En la espira media se conservan algunas CCE. **c:** En el ápex se conservan tanto las CCE como las CCI. RW: ventana redonda. OW: ventana oval. Escala de barras en a, b, c = 5µm. Tomado de: Heydt JL et al. *Hear Res.* 2004;192(1-2):65-74.

Por lo tanto, todas estas son suposiciones derivadas de la combinación de datos histológicos con datos funcionales y sin embargo, la verdadera distribución de las sustancias ototóxicas en el interior de la cóclea no podemos conocerla con exactitud en este modelo.

A pesar de estas justificaciones, los esfuerzos por entender y conocer mejor la distribución de fármacos por el oído interno en los estudios de experimentación deben continuar, sobre todo por la gran repercusión que ello tendrá en agilizar y acelerar los avances que permitan enfrentarse a los numerosos desafíos que nos presentan los métodos técnicos de administración directa de sustancias en el oído interno. Uno de

estos desafíos, que parece también reflejarse en nuestro trabajo y que acaba de aludirse, consiste en la dificultad que tienen las sustancias para alcanzar las regiones apicales de la cóclea, condicionado principalmente porque éstas se distribuyen por los líquidos intracocleares a través de un mecanismo de difusión simple, adquiriendo por tanto los gradientes de concentración basal – apical una gran relevancia. Esto permite también entender la importancia del modelo animal que se emplee en los estudios, que va a determinar la longitud de las escalas de la cóclea y el volumen del oído interno, ambos de vital importancia en el transporte de una sustancia gobernado por difusión simple. A mayor longitud de las espiras y mayor volumen intracoclear, mayores serán los gradientes de concentración basal – apical. Así, la misma concentración de una determinada sustancia aplicada sobre la membrana de la ventana redonda alcanzará más fácilmente el apex coclear en un ratón que en un hombre.

5.1.3.5 Resultados funcionales y cambios histológicos

El primer paso para estudiar el modelo de administración local de los ototóxicos consistía en poder demostrar que ni el abordaje quirúrgico ni la colocación del gelfoam sobre la membrana de la VR perturbaban la audición, aunque fuese mínimamente.

Los umbrales ABR 1 semana tras la realización única de la bullostomía en la rata fueron similares a los umbrales basales, tanto en respuesta a estimulación con *clicks* como en respuesta a estimulación con tonos puros en el rango de 4 a 40 kHz. Tampoco se alteraron significativamente otros parámetros como las latencias pico o las latencias interpico, ni se registraron cambios importantes en la morfología del órgano de Corti o del ganglio espiral.

De forma similar, no se encontraron diferencias en estos parámetros entre las ratas control y aquéllas a las que se colocó únicamente el gelfoam sobre la membrana de la VR.

Estos hallazgos permitían atribuir los cambios funcionales, si éstos se produjesen, exclusivamente al efecto de la mezcla ototóxica, y no a la técnica quirúrgica.

Como ya se ha comentado anteriormente, entre las ventajas de este método sobre el modelo de administración sistémica se encuentra la restricción del daño exclusivamente

a un oído, dejando el oído contralateral como posible control intraanimal, lo que se pudo comprobar también con los resultados del ABR.

Y aunque, como también se ha descrito ya, no podemos conocer con este modelo la farmacocinética de los ototóxicos dentro del oído interno, los resultados obtenidos sugieren que la mezcla de KAN y FUR accede rápida y fácilmente al interior de la cóclea, ya que el incremento del umbral tras la aplicación del gelfoam embebido con los ototóxicos fue muy significativo, de aproximadamente 30 dB_{SPL}, siendo el umbral basal 32 ± 3 dB_{SPL} y el postquirúrgico 63 ± 12 dB_{SPL}. Este incremento se produjo además en todas las frecuencias del audiograma, aunque fue algo más evidente en las frecuencias medias y altas. Estos resultados reflejan un daño en todas las regiones de la cóclea, aunque algo mayor en las regiones basales, lo que sugiere una mayor afectación de las espiras basales de la cóclea que de las espiras medias y apicales. Esto también podría correlacionarse con los hallazgos histológicos que se encontraron en las zonas apicales de la cóclea, con una degeneración menos llamativa en algunos animales, los cuales presentaban una pérdida exclusiva de CCE, permaneciendo intactos las CCI y el túnel de Corti. Por el contrario, las espiras basales presentaban en todos los animales una degeneración severa con ausencia completa tanto de CCE como internas y colapso completo del túnel de Corti.

Nuestros resultados son superponibles a los de los escasos experimentos publicados que emplean igualmente el gelfoam con KAN y FUR, como el de Abbas y Rivolta (195), que demuestran un incremento del umbral ABR a las 2 semanas tras estimulación con *clicks* de 40 – 50 dB_{SPL}, del mismo modo que un incremento significativo en todas las frecuencias estudiadas (6 – 38 kHz) tras estimulación con tonos puros, aunque también en su caso algo mayor en frecuencias medias y altas. Huang et al. (231) reportan un incremento estadísticamente significativo en cobayas de 30 – 40 dB_{SPL} en 8, 16 y 24 kHz a los 3 meses de la aplicación sobre la VR del gelfoam embebido con KAN y FUR. Estos autores comprueban la ausencia de material reabsorbible en el oído medio tras sacrificar a los animales a los 3 meses de su aplicación sobre la membrana de la VR, lo que confirma la reabsorción completa de este material. Respecto a la pérdida de células ciliadas, comprueban también una pérdida completa tanto de CCE como de CCI en la espira basal. Esta pérdida va decreciendo a mayor distancia de la base y menor del

ápex, aunque, como en nuestro trabajo, siendo siempre mayor en este caso la pérdida de CCE que la de CCI.

En nuestro estudio histológico se comprobó también que los animales con menor pérdida de CCI (lo que únicamente se comprobó en las espiras media y apical de algunas ratas) presentaban menos afectación de la densidad neuronal en el ganglio espiral. Como ya se ha comentado en un apartado previo, la degeneración de las NGE tras administración de aminoglucósidos se ha estudiado ya ampliamente (211-215) y generalmente se acepta que se produce de forma secundaria a la pérdida de CCI y de fibras nerviosas aferentes, dado que casi nunca se ha observado la pérdida de NGE sin afectación de CCI. Por tanto, la correlación en nuestro trabajo entre la afectación de CCI y la densidad celular a nivel de ganglio espiral es congruente con lo descrito en la literatura. Se han descrito varios mecanismos que podrían influir en la degeneración de las NGE, como la ausencia de soporte neurotrófico, la disminución de la actividad neuronal y la excitotoxicidad por glutamato. El tiempo en el que se produce esta degeneración es también variable en las distintas publicaciones y depende no sólo de la especie animal, sino también del método de ototoxicidad y dosis empleadas de fármacos ototóxicos. Por ejemplo, en cobayas se encuentran períodos de entre 2 y 3 semanas hasta la degeneración neuronal tras inyección intracoclear de gentamicina (238). En la primera fase de nuestro experimento, las ratas se sacrificaron a las dos semanas desde el inicio.

En resumen, la aplicación sobre la VR de un fragmento de gelfoam embebido con una solución altamente concentrada de KAN y FUR produce una hipoacusia de moderada a severa con pérdida de CCE e internas de forma evidente en la espira basal y en algunos casos con menor pérdida de CCI en las espiras media y apical. Por el contrario, la administración sistémica de KAN y FUR produce una sordera profunda asociada a alteraciones severas histológicas a nivel coclear, con pérdida completa de las células ciliadas del OC, lo que podría suponer un escollo para estudios que pretendan demostrar el efecto de determinados fármacos en los fenómenos de reparación celular. La afectación más comedida con el modelo de administración local de los ototóxicos podría ofrecer más oportunidades para la reparación celular y por tanto proporcionar un escenario más favorable para el estudio de fármacos con potencial de recuperación funcional auditiva. Además, el daño tisular subtotal puede permitir, a diferencia del

daño total, obtener información molecular y celular procedente de los tejidos adyacentes a las áreas dañadas, información que en muchas ocasiones puede ser muy importante.

5.2 Determinación del potencial otoprotector de la administración intraperitoneal de RESV y NAC

Hasta la fecha, los resultados de muchos trabajos con modelos animales sugieren que el tratamiento con antioxidantes ofrece un abordaje potencialmente eficaz para disminuir la ototoxicidad inducida por los aminoglucósidos y otros fármacos ototóxicos (239-242). En la segunda fase de nuestro experimento se investigó el efecto protector de una combinación de dos antioxidantes, el RESV y la NAC, frente a la ototoxicidad inducida tras la administración directa en el oído interno de KAN y FUR en un modelo experimental con rata Wistar. Este modelo es el descrito en el apartado anterior y ya publicado por nuestro grupo, que emplea una solución concentrada de KAN y FUR embebida en un fragmento de gelfoam que se aplica directamente sobre la membrana de la VR de la rata (8). Como ya se ha mencionado, la mayoría de los estudios clínicos en los que se utiliza la administración directa de ototóxicos sobre la VR lo hacen con gentamicina (243-245) debido a su rápida disponibilidad farmacológica y a su efecto predominantemente vestibulotóxico sobre el cocleotóxico. Sin embargo, para esta fase del experimento seguía siendo necesario un modelo con un daño preponderante a nivel coclear, como el que producen la KAN y la FUR, con un efecto cocleotóxico predominante que, como ya se ha mencionado, se potencia tras la combinación de ambas sustancias.

5.2.1 Afectación del umbral auditivo tras la administración local de KAN y FUR

En esta fase del experimento, la aplicación sobre la VR de la solución concentrada de KAN y FUR produjo una elevación estadísticamente significativa de los umbrales ABR en respuesta tanto a los *clicks* como a los tonos puros de 8 a 40 kHz. Sin embargo, este incremento de los umbrales fue algo más moderado que el que se produjo en el primer experimento para validar este modelo de ototoxicidad en rata (8). Una explicación para ello podrían ser las diferencias en el procedimiento anestésico entre

ambos experimentos. Mientras en el primero se empleó para la anestesia la inyección intraperitoneal de ketamina, xilazina y buprenorfina, en el segundo se empleó un procedimiento mucho más controlado de anestesia inhalatoria con isoflurano. Una gran diferencia entre ambos procedimientos fue el tiempo entre la inducción anestésica y el despertar del animal, mucho mayor en el primero que en el segundo. Esta prolongación del tiempo anestésico podría fomentar el desarrollo de algunos de los mecanismos propuestos para la disfunción auditiva asociada a la anestesia general. Aunque estos mecanismos no son del todo conocidos, entre ellos se postula una alteración de la microvascularización del oído interno, tanto en la estría vascular como en los vasos del ligamento espiral, lo que podría provocar la lesión de las células ciliadas (246). Otros mecanismos posibles serían embolismos a distancia que afecten a vasos periféricos, como los que existen a nivel del oído interno, o variaciones en la presión del líquido cefalorraquídeo, que también podrían alterar la homeostasis endolinfática (247).

Existe sin embargo un argumento en contra de la mayor afectación del umbral ABR en el primer experimento comparado con el segundo, que es el empleo de isoflurano en este último. Varias publicaciones demuestran un incremento de los umbrales ABR en rata y ratón tras anestesia con isoflurano cuando se compara con la anestesia con ketamina/xilazina (248-250). Sin embargo, en alguna de ellas este incremento es mayor cuando la anestesia es más prolongada (248), lo que podría explicar la poca influencia del isoflurano en nuestro experimento.

Por último, la ketamina produce una estimulación cardíaca moderada, aumenta la presión arterial sanguínea y disminuye la frecuencia respiratoria. La xilazina produce una mayor depresión respiratoria y disminuye la frecuencia cardíaca (251). Si estos mecanismos condujeran a una reducción del aporte energético metabólico coclear podrían modificar el potencial endococlear y afectar a la transducción sonora a nivel de la cóclea. Schlenther et al. (252) demuestran la influencia de la ketamina-xilacina en las otoemisiones acústicas por productos de distorsión (DPOAE) en una especie de murciélagos, la *Carollia perspicillata*.

5.2.2 Combinación de dos antioxidantes: RESV y NAC

Como ya se ha mencionado, el estrés oxidativo parece jugar un papel importante en la ototoxicidad por aminoglucósidos y, hasta la fecha actual, se han investigado varias sustancias antioxidantes con potencial para prevenirla (240,241,253-258). La moderación en los resultados de los estudios que emplean un único antioxidante para prevenir la hipoacusia inducida por causas relacionadas con el estrés oxidativo se atribuye en gran parte a que dirigen su acción hacia una sola diana de la vía oxidativa, existiendo sin embargo diferentes tipos de ROS en diferentes compartimentos celulares que requerirían antioxidantes específicos en el lugar correcto y en el momento preciso para una neutralización química eficiente de las mismas. Por ello, la tendencia actual apunta a la combinación de varias sustancias antioxidantes que actúen sobre varias vías de la cadena oxidativa (143,259-262). El trabajo Heman-Ackah et al. (143) representa un ejemplo extremo en este sentido, ya que emplean una combinación de 6 sustancias antioxidantes (L-cisteína-GSH disulfuro, ribosa-cisteína, NW-nitro-L-arginina metil ester, vitamina B12, folato y ácido ascórbico) para actuar sobre 4 vías de la cadena oxidativa (delecciones del genoma mitocondrial, formación de ROS, producción de NO y actividad de GSH) demostrando una mejoría de los umbrales auditivos en un modelo animal de presbiacusia con ratones C57BL/6.

En nuestro experimento se ha empleado una combinación de 2 sustancias antioxidantes, el RESV y la NAC. El RESV es un antioxidante con un amplio espectro de dianas del que se han descrito múltiples efectos beneficiosos que incluyen la prevención del cáncer colorrectal y del cáncer de piel, la protección frente a enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neurológicas, así como una importante actividad antiinflamatoria. Estos efectos han sido atribuidos a la actuación del RESV sobre muy diversas vías, entre las cuales se describen la activación de la lisina deacetilasa Sirtuin 1 (SIRT1) (263), la activación de la vía del AMPc o la inhibición de las quinasas del grupo MAPK (264,265). Nwachukwu et al. (266) han demostrado recientemente la importancia del receptor estrogénico ER α en la actividad farmacológica del RESV, que se ligaría específicamente a este receptor modulando la respuesta inflamatoria sin estimular la proliferación celular y regulando el reclutamiento de una serie de correguladores en el locus de la Il-6. Cai et al. (267) publicaron la

capacidad del RESV para neutralizar ROS y Fan y cols. (268) para inhibir algunas enzimas oxidativas y otras antioxidantes.

Por lo tanto, queda mucho recorrido para definir bien el mecanismo de acción del RESV, y para el conocimiento exacto de todos sus efectos se requeriría la consideración tanto de muchas vías potenciales de señalización como de la propia diana tisular, ya que no parece ejercer las mismas funciones en todos los tejidos. Respecto a la prevención de daño en el oído interno, una de sus actividades más importantes parece ser la inhibición de las quinasas del grupo MAPK (156), aunque son muchas las otras vías enzimáticas en las que el RESV podría estar implicado. Sin embargo, los estudios al respecto son escasos y de hecho, el efecto otoprotector del RESV se ha investigado exclusivamente en 5 estudios (157,158,242,269,270), que evalúan fundamentalmente la prevención de ototoxicidad inducida por cisplatino (157,158,242,269). Bonabi et al. (270) demostraron también *in vitro* un efecto protector del RESV contra la ototoxicidad inducida por gentamicina en ratas Sprague-Dawley, con una clara disminución de la pérdida de células ciliadas con respecto al grupo que no recibió tratamiento con el antioxidante. Hay que considerar que estos autores emplearon ratas de 3 a 5 días de edad (ya que las células ciliadas maduras no pueden mantenerse en cultivo) y aunque la cóclea inmadura representa un modelo bien establecido para el estudio de la ototoxicidad por aminoglucósidos, se sabe también que las células ciliadas más inmaduras son más sensibles a la ototoxicidad que las células ciliadas adultas, lo que debe tenerse en cuenta al interpretar los resultados de este experimento.

Una de las incógnitas con el RESV es su dualidad funcional, pudiendo ejercer tanto una actividad antiapoptótica en la prevención de enfermedades cardiovasculares y de la hipoacusia inducida por ototóxicos (157,158) como una actividad proapoptótica induciendo la muerte de células tumorales malignas (150). De todas las publicaciones relativas al RESV se deduce que las relacionadas con la prevención del cáncer y por tanto con la actividad proapoptótica, emplean el RESV a elevadas concentraciones. Por el contrario, las que persiguen la actividad antiapoptótica utilizan concentraciones más bajas. Es por este motivo por el que en nuestro experimento se empleó una dosis de 10 mg/kg/día de RESV, más cercana a las empleadas en los estudios antiapoptóticos (157,158).

La NAC es un precursor de GSH que participa en su síntesis mediante el suministro de cisteína. Ha demostrado ser un eficaz depurador del radical hidroxilo, de peróxido de hidrógeno y de ácido hipocloroso (271). Originalmente se utilizó en clínica humana como un fármaco mucolítico, pero más tarde se ha convertido en el antídoto de elección para la intoxicación aguda por acetaminofeno (paracetamol) (272). Más recientemente, se ha empleado con éxito tanto en modelos experimentales como en clínica humana para la prevención de lesiones tóxicas e isquémicas sobre el corazón, el riñón, el hígado y el pulmón (273-276). Se presume que en todas estas situaciones la actividad de la NAC tiene que ver, al menos en parte, con sus propiedades antioxidantes. Y la teoría de los radicales libres en lo que respecta a la ototoxicidad por aminoglucósidos junto con el hecho de emplear KAN como uno de los ototóxicos en nuestro experimento fue lo que nos hizo elegir la NAC como uno de los dos antioxidantes al diseñar el trabajo. Además, son varios los estudios que han investigado su potencial en la prevención de ototoxicidad inducida por fármacos (257,277,278). En experimentos sobre trauma acústico, con una base fisiopatológica cimentada también en el estrés oxidativo, se ha comprobado que la NAC reduce la pérdida auditiva y la pérdida de células ciliadas cuando se administra antes o después de la exposición al ruido (279,280). Previamente se había publicado su capacidad para proteger *in vitro* contra la toxicidad por cisplatino a las CCE extraídas de cobayas (281).

En nuestro experimento se ha empleado una combinación específica de RESV y NAC. Esta combinación se ha utilizado ya para investigar sus efectos sobre células humanas cultivadas *in vitro* procedentes de situaciones clínicas como el cáncer (282), la anemia de Fanconi (283) y el envejecimiento cutáneo secundario al déficit de actividad estrogénica (284), pero hasta la fecha no se había empleado para estudiar su potencial protector contra la hipoacusia inducida por ototóxicos.

Son muchas sin embargo las lagunas que presenta el tratamiento combinado de antioxidantes con fines otoprotectores, y pese al interés que está generando en los últimos tiempos, se requiere mucha más investigación para dilucidar el momento óptimo para iniciar el tratamiento, la combinación ideal de antioxidantes y las dosis más adecuadas.

5.2.3 Curso del efecto protector

En nuestro experimento, el efector protector del RESV y la NAC se observó especialmente en las etapas iniciales (3 días postcirugía y 5 días de tratamiento con los antioxidantes), siendo menos evidente a los 14 y 21 días tras la administración local de KAN y FUR. Una de las posibles razones para esta pérdida de efecto temporal es la farmacocinética de ambos antioxidantes, poco favorable cuando se compara con sus beneficios clínicos potenciales. Así, tanto el RESV como la NAC presentan una vida media muy corta, de aproximadamente 8 – 14 minutos para el primero (263) y menos de 1 hora para la segunda (285). Además, el RESV es poco hidrosoluble, no se absorbe fácilmente al torrente sanguíneo y tiene una mala biodisponibilidad en seres humanos y en animales de experimentación (266,286), lo que hace difícil conseguir dosis suficientemente elevadas como para conseguir efectos beneficiosos. En nuestro experimento se ha empleado la administración intraperitoneal de los antioxidantes, lo que evita parcialmente el problema de la absorción intestinal de las sustancias.

Yumusakhuyly et al. (157) demuestran un claro efecto protector contra la ototoxicidad inducida por cisplatino en cobayas tras la administración durante 16 días de una dosis intraperitoneal de 10 mg/kg/día de RESV, con una disminución significativa de los umbrales tanto con *clicks* como con tonos de 4 y 8 kHz. Sin embargo, sólo miden el ABR basal y a las 72 horas de la administración del cisplatino, por lo que se necesitaría una mayor duración del estudio para conocer el curso del efecto protector del RESV. Simsek et al. (242) comprueban en ratas una disminución de la ototoxicidad inducida por cisplatino tras tratamiento con una sola dosis intraperitoneal de 100 mg/kg de RESV, según demuestran los resultados ABR relativos a los umbrales, a las latencias pico I y IV y a las latencias interpico I-IV. Estos autores no mencionan datos relacionados con la toxicidad del RESV y sin embargo emplean una dosis muy elevada comparada con la de otros trabajos. Además, y de la misma forma que en el trabajo de Yumusakhuyly (157), la última prueba de ABR la realizaron a las 72 h de finalizar el tratamiento, no haciendo posible conocer la duración del efecto protector del RESV. Y lo mismo ocurre con el trabajo de Olgun et al.(269), que realizan la administración oral de RESV durante 10 días, en el día 11 administran el cisplatino y miden el ABR sólo en situación basal y a los 14 días.

Los estudios con NAC relacionados con prevención del daño ototóxico no difieren mucho de los estudios con RESV. Del mismo modo que con este último, encontramos sobre todo publicaciones relativas a protección contra toxicidad por cisplatino y por aminoglucósidos en pacientes dializados (257,277). Tampoco permiten estos trabajos evaluar el curso a medio – largo plazo del efecto protector de la NAC. Un ejemplo es el trabajo de Mohan et al. (287), que demuestra en cobayas otoprotección frente a cisplatino tras administración de una sola dosis intraperitoneal de NAC (250 mg/kg), midiendo el ABR antes de y a los 3 días de la administración del cisplatino, momento en el que sacrificaban a los animales, lo que impide comprobar la duración del efecto protector.

Una estrategia para ampliar la duración del efecto protector de los antioxidantes podría ser la prolongación del tratamiento con los mismos. Otra posible estrategia sería aumentar la dosis de antioxidantes, aunque en este caso es difícil obtener conclusiones de los diferentes estudios publicados, y lo único que parece quedar claro es que se requiere encontrar un consenso para determinar la concentración mínima efectiva para conseguir resultados beneficiosos con la menor posibilidad de efectos adversos. Estos efectos adversos pueden llegar a ser muy severos y generalmente dosis-dependientes. Por ejemplo con RESV se describen alteraciones gastrointestinales, anemia, trombocitopenia, fallo renal e infecciones graves secundarias a pancitopenia (286).

Otra circunstancia que no podemos obviar es la posible reversibilidad espontánea del daño, existiendo publicaciones que demuestran la recuperación de una pérdida de 40 dB_{SPL} en la segunda semana tras tratamiento con KAN (218), u otras que encuentran una recuperación sustancial de la audición en períodos mayores de 3 semanas tras tratamiento con cisplatino (219). En nuestro trabajo, comparando el audiograma a los 3 días de administrar los ototóxicos con el audiograma a los 14 y 21 días, se comprobó que las ratas que no recibieron tratamiento con antioxidantes experimentaron también una recuperación de 5 – 10 dB_{SPL} a partir del 14 día tras la administración de la mezcla ototóxica en todas las frecuencias estudiadas. No se observaron sin embargo variaciones importantes a los 14 y 21 días en las ratas tratadas con RESV y NAC, y aunque, en parte probablemente debido a esta recuperación progresiva del umbral, las diferencias entre el grupo tratado con salino y el tratado con RESV fueron menores a los 14 y 21 días que a los 3 días, estas diferencias seguían siendo estadísticamente significativas

entre ambos grupos, con menor umbral en todas las frecuencias para las ratas tratadas con antioxidantes. La explicación de esta recuperación tardía espontánea no está aún aclarada. Respecto a la KAN, algunos autores la atribuyen al aclaramiento coclear de este aminoglucósido (218), ya que su mecanismo de acción se relaciona con la alteración de la estría vascular, lo que perturbaría el potencial endococlear y por tanto la función de las células ciliadas. Al disminuir la concentración intracoclear de KAN, la recuperación del potencial endococlear mejoraría la función de las células sensoriales supervivientes, lo que podría explicar la recuperación del umbral.

Independientemente de la causa, esta recuperación tardía podría tener implicaciones en los trabajos experimentales, en particular en experimentos cuyo objetivo sea inducir la regeneración de células ciliadas, en los que nunca debería obviarse la posibilidad de una recuperación espontánea y por tanto no relacionada con el tratamiento.

Aparte de la protección que sugiere la combinación de los antioxidantes empleados, no se puede obviar que en nuestro experimento se produjeron algunos efectos colaterales a la vía de administración de las sustancias antioxidantes, incluida la muerte de algún animal. Y es que, aunque la vía intraperitoneal es útil en pequeños roedores porque permite administrar volúmenes relativamente grandes de sustancias solubles, no está exenta de riesgos. Así, las sustancias irritantes pueden resultar fatales, produciendo dolor, fibrosis y adherencias; algunos disolventes acuosos pueden producir inflamación de los bordes de los lóbulos hepáticos; no se puede asegurar que la dosis se esté administrando en la cavidad en lugar del intestino, vejiga, músculo u otros órganos; y por último, pueden dañarse vasos sanguíneos importantes. Esto supone claramente un escollo para el diseño de protocolos en los que sean necesarios períodos prolongados de administración.

5.2.4 Tonotopía de la ototoxicidad y perfil del daño celular

En los resultados de nuestro experimento destaca una mayor afectación de las frecuencias altas, lo que sugiere un efecto predominante de los ototóxicos sobre la escala basal y más liviano sobre la apical, en la que las CCI y el túnel de Corti permanecen intactos en algunos animales. Esto podría explicarse por la mayor proximidad de la escala basal a la VR, donde se aplica directamente el gelfoam

embebido con la solución ototóxica. No obstante, ya se ha hecho alusión a la mayor susceptibilidad de las CCE en las regiones de la espira basal que en las de la espira apical (178,179). Otra explicación podría ser la dificultad que tendrían las sustancias ototóxicas para alcanzar las regiones apicales de la cóclea, condicionada principalmente por una distribución a través de los líquidos intracocleares mediante un mecanismo de difusión simple, adquiriendo por tanto los gradientes de concentración basal-apical una gran relevancia. Sin embargo, como ocurre en la mayoría de los trabajos, nuestro modelo de ototoxicidad carece de un estudio sobre la distribución de las sustancias dentro del oído interno, que es lo único que podría sustentar las suposiciones anteriores.

El mayor daño morfológico en nuestro experimento se produjo a nivel de las CCE, y fue menor en las CCI, las NGE y la estría vascular. Este hecho apoya la suposición anterior de un efecto predominante de los ototóxicos a nivel de la escala basal, donde, como se ha mencionado, se asume una mayor susceptibilidad de las CCE que de las CCI. Por otro lado, la escasa afectación de las NGE podría explicarse porque dicha afectación suele ir siempre asociada a la de las CCI, que presentaban también menor daño que las externas. Se observó también una discreta mayor afectación celular a los 21 que a los 3 días postcirugía, lo que podría correlacionarse con la vida media tan corta de los antioxidantes y la pérdida del efecto protector tras suspender su administración.

Sin embargo, no existieron diferencias histológicas importantes entre el grupo tratado con antioxidantes y el tratado con suero salino, ni a tiempo corto ni a tiempo largo. Esto podría deberse tanto a la escasa duración del tratamiento con antioxidantes como al momento en que se sacrificaron las ratas. En el ensayo a tiempo corto el sacrificio se producía a los 5 días de iniciar el tratamiento con antioxidantes, supuestamente el período de mayor protección, aunque también muy cercano al daño ototóxico (3 días después) y por tanto con poco margen temporal para observar reparación del tejido superviviente. Yumusakhuyllu et al. (157) comprueban tras tratamiento con cisplatino una afectación también más severa de las CCE en la escala basal y mucho más moderada en la escala apical. Sin embargo, estos autores sí observan diferencias entre los animales tratados con RESV y los que no recibieron tratamiento con este antioxidante, conservándose en los primeros la apariencia normal tanto de las CCE como de las internas en todas las regiones de la cóclea. Una de las posibles razones es que, a diferencia de nuestro experimento, en el que se realiza el tratamiento

con antioxidantes durante 5 días, en este último trabajo prolongan el tratamiento con RESV durante 18 días, administrando en los días 14 y 15 el cisplatino y realizando el sacrificio de los animales en el día 18, de igual modo que en nuestro experimento, 3 días después del daño ototóxico, lo que resta consistencia al argumento de la necesidad de más tiempo para observar los fenómenos de regeneración tisular. Un trabajo interesante es el de Olgun et al. (269), que cuestiona el beneficio del RESV en la prevención del daño ototóxico por cisplatino al comprobar incluso una potenciación de los efectos ototóxicos de este fármaco cuando se combina con dosis altas de RESV, tanto a nivel morfológico como a nivel funcional. Estos autores comprueban que a dosis de 10 mg/kg/día y 1 mg/Kg/día de RESV en las ratas tratadas con cisplatino y comparándolo con el grupo que sólo recibió tratamiento con cisplatino se producía tanto un empeoramiento de los umbrales ABR y de los DPOAE como una mayor pérdida de células ciliadas, todavía más acusados a dosis de 10 mg/kg/día. Con dosis de 0,1 mg/kg/día estos cambios fueron mucho menos severos, con escasas diferencias con respecto a los grupos control que no recibieron tratamiento con cisplatino. Sin embargo, es importante tener en cuenta en este experimento que la vía de administración del RESV fue la oral. En nuestro trabajo y en los otros relacionados con otoprotección del RESV, éste se administró por vía intraperitoneal. Tras administración oral, el RESV se metaboliza en dos etapas, la primera en el intestino delgado y la segunda en el hígado. Los metabolitos resultantes de este metabolismo son diferentes de los que se generan tras administración intraperitoneal, lo que podría tener implicaciones en el efecto otoprotector, que por lo tanto, podría variar en función de la vía de administración.

En nuestro ensayo a tiempo largo el sacrificio se realizaba a los 21 días desde el inicio del tratamiento y 16 después de haberlo suspendido, con mayor afectación celular que a los 5 días del tratamiento, lo que sugiere como ya se ha dicho una abolición del efecto protector de los antioxidantes tras su suspensión.

La metodología de otros experimentos relacionados con el potencial otoprotector de RESV o NAC impide, como ya se ha mencionado, la comparación con nuestros hallazgos histológicos a medio – largo plazo, ya que en todos ellos el sacrificio se realiza poco tiempo después de finalizar el tratamiento con los antioxidantes (157,242,269,287).

5.2.5 Expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias

En cuanto a las citoquinas pro- y anti-inflamatorias nuestros resultados sólo mostraron un incremento estadísticamente significativo en el ensayo a tiempo corto de la expresión de la IL1 β a nivel del oído derecho, el sometido al daño ototóxico, en comparación con el oído contralateral. Esta sobreexpresión se apreció tanto en el grupo tratado con RESV + NAC como en el grupo tratado con suero salino. La IL1 β es una proteína pro-inflamatoria que actúa como señal en la cascada para la producción de ROS, aunque también podría estar implicada en la activación de las NADPH-oxidasas como la NOX4, que se expresa de forma predominante en tejidos del oído interno y supone una de las fuentes enzimáticas de ROS. Ya se ha estudiado por ejemplo el papel de la NOX4 en la ototoxicidad por cisplatino (288). La inflamación asociada tanto a la cirugía para aplicar el ototóxico como a la propia acción de los ototóxicos podría justificar el incremento en la expresión de IL1 β que se observó en nuestro experimento. El que no existieran diferencias entre el oído derecho del grupo RESV + NAC y el del grupo salino podría explicarse por el momento en que se extrajeron las muestras (3 días postcirugía), en el que todavía sería posible un escenario donde la inflamación prevalezca sobre la defensa antiinflamatoria.

La mayoría de los trabajos que se encuentran en la literatura relativos a IL1 β y ototoxicidad demuestran un incremento de los niveles en la expresión de esta citoquina tras la exposición al agente ototóxico, con una disminución mayor o menor de dicha expresión cuando emplean algún tratamiento con potencial otoprotector, disminución en algunos casos estadísticamente no significativa. Sin embargo, casi todos estos trabajos se realizaron *in vitro*, administrando tanto el agente ototóxico como la/s sustancias con fines otoprotectores sobre explantes cocleares (288-291). Por el contrario, en este trabajo todos los tratamientos previos al estudio de la expresión de citoquinas se realizaron *in vivo*.

5.2.6 Expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante

Al comparar el oído derecho del grupo de ratas tratadas con RESV + NAC con el oído derecho del grupo tratado con suero salino se comprobó un incremento estadísticamente significativo en el primer grupo de la expresión de varios de genes relacionados con la defensa antioxidante, en concreto de los que codifican para las enzimas *Sod1*, *Gpx1*, *Gpx4*, *Gpx5* y *Gpx7*. A su vez, se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de algunos genes relacionados con el estrés oxidativo, fundamentalmente los que codifican para *Nox4*, *Slc38a5*, *Hbz*, *Ucp3*, *Mpp4* y *Nos2*.

La NOX4, como ya se ha mencionado, es una fuente de ROS que pertenece a la familia de las NADPH-oxidasas y se expresa predominantemente en los tejidos del oído interno, lo que puede justificar su menor expresión en el grupo de ratas tratadas con RESV + NAC. El resto de las proteínas infraexpresadas poseen funciones muy variadas, con muchos matices aún por aclarar que dificultan la correlación de dichas funciones con la disminución de su expresión en un escenario de protección contra el estrés oxidativo.

Por el contrario, los genes sobreexpresados en nuestro trabajo codifican enzimas con un papel más o menos conocido en la defensa antioxidante. La SOD1 es una enzima de la familia de las SOD, que están implicadas en los mecanismos que intervienen en la eliminación de ROS. La SOD1 interfiere con el O_2^- convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno y en O_2 y por tanto protegiendo a los tejidos contra las reacciones no controladas con las ROS. Hay publicaciones que demuestran un agravamiento del estrés oxidativo con efectos sobre el envejecimiento tisular en modelos animales con déficit de *Sod1* (292,293). La SOD1 se expresa de forma abundante en los tejidos cocleares como la estría vascular, el limbo espiral, las células del OC y las NGE, todos ellos tejidos donde las células contienen numerosas mitocondrias y son por tanto vulnerables al daño oxidativo de la respiración. Se puede deducir por consiguiente que la SOD1 puede ser importante para la supervivencia de las células del oído interno, aunque un exceso de esta enzima no ha demostrado mayor protección contra la pérdida auditiva relacionada con la edad (294). Existen además estudios con resultados contradictorios que restan

consistencia a las conclusiones con estas enzimas. Nos encontramos por ejemplo con trabajos como el de Kawamoto et al. (108), quienes tras inoculación intracocular en cobayas de vectores adenovíricos para la sobreexpresión de algunas enzimas antioxidantes y posterior administración de KAN y ácido etacrínico, demuestran una disminución significativa tanto de la pérdida auditiva como de la muerte de células ciliadas con la catalasa y con la SOD2, pero no con la SOD1. Por el contrario, otros trabajos como el de Sha et al. (106) sí evidencian una menor pérdida auditiva tras tratamiento con KAN cuando utilizan como modelo animal ratones transgénicos con sobreexpresión de *Sod1*, sugiriendo que la SOD1 es efectiva cuando se sobreexpresa de forma crónica o a un nivel superior al que proporciona el vector adenoviral.

Las GPX pertenecen a una familia de enzimas filogenéticamente relacionadas (295) que catalizan la reducción de H_2O_2 o de hidroperóxidos orgánicos a agua o a los alcoholes correspondientes respectivamente, empleando GSH como reductor. A las 4 primeras GPX conocidas se les atribuyó una función antioxidante en diferentes localizaciones y compartimentos celulares. La GPX1 a nivel citosólico y mitocondrial, la GPX2 en el epitelio intestinal, la GPX3 en el plasma y la GPX4 a nivel de las membranas celulares. Cada vez se conoce más sobre la participación de estas GPX en la defensa antioxidante, aunque quedan todavía muchos aspectos por aclarar. La función más conocida y aceptada de la GPX1 es su función antioxidante limitando la inflamación durante los procesos de estrés oxidativo, no pudiendo ser sustituida por ninguna otra GPX para este cometido (296). Sin embargo, algunos fenómenos inesperados observados con ratones transgénicos *Gpx1* (297,298) revelan que el papel de la GPX1 podría estar subestimado si se reduce a su función antioxidante. De hecho, esta enzima no es antiinflamatoria en todas las circunstancias y una excesiva expresión de la misma podría tener efectos perjudiciales en la diabetes y en determinadas neoplasias. Coling et al. (299) comprueban un incremento de actividad de la GPX1 y otras GPX en el ligamento espiral y en la estría vascular de ratas Fisher relacionado con la edad, lo que podría sugerir una compensación para la disminución de GSH y del estado redox que acompaña al envejecimiento. Kil t al. (300) estudiaron la localización celular de GPX1, GPX3 y GPX4 en ratas F-344 antes y después de la exposición a ruido y tras tratamiento oral con ebselene, una sustancia otoprotectora con actividad simuladora de glucoperoxidasas. Sus resultados indicaron que la GPX1 es la isoforma

más abundante en la cóclea con una importante expresión en las células del OC, en el ganglio espiral, en la estría vascular y en el ligamento espiral. Además, demostraron que el tratamiento con ebselene disminuía la pérdida de células ciliadas y el edema agudo de la estría vascular, lo que atribuyeron a dos mecanismos potenciales: por un lado la activación de GPX por el ebselene, y por otro lado su acción como inductor de la expresión de *Gpx1*, ya que, de forma interesante se observó un incremento en la expresión de esta enzima en los animales sometidos a ruido y tratamiento con ebselene en comparación con los sometidos exclusivamente a ruido.

La GPX4 se diferencia de las otras GPX por su capacidad de reducir además de H_2O_2 e hidroperóxidos de bajo peso molecular, hidroperóxidos en lípidos complejos tales como fosfolípidos, colesterol y colesterolester hidroperóxidos, incluso cuando se insertan en biomembranas o lipoproteínas. Los tioles proteicos también pueden ser sustratos como el GSH cuando la cantidad de éste está limitada. Por lo tanto, dependiendo de la disponibilidad de GSH, GPX4 puede actuar como una GPX o como una tiol peroxidasa. Se distinguen 3 isoformas de GPX4, la citosólica (cGPX4), la mitocondrial (mGPX4) y la nuclear espermática (snGPX4). Mientras la cGPX4 se expresa en prácticamente todas las células, la mGPX4 y la snGPX4 se expresan principalmente a nivel testicular con una cantidad marginal en el resto de los tejidos. Un ratón mutado para la *Gpx4* es el único animal nulo disponible de los genes *Gpx* y es letal embrionario, lo que sugiere que la cGPX4, además de ser una enzima antioxidante tendría otras funciones específicas esenciales para la vida.

La GPX5 se expresa predominantemente en las células epiteliales del epidídimo, donde podría regular la concentración de los hidroperóxidos, manteniendo así la concentración óptima de los mismos para la función de la snGPX4 (295). No se encuentran en la literatura estudios relacionados con GPX5 a nivel del oído interno.

Las funciones de la GPX7 no son todavía bien conocidas y tan sólo pueden especularse en base a las publicaciones existentes. Algunos trabajos apuntan a una función supresora de tumores (301,302). Otra interesante función con la que actualmente se especula es su posible implicación en el plegamiento de las proteínas, el cual requiere la formación de disulfuro en un proceso redox-dependiente que tiene lugar en el retículo endoplásmico. Para poder secretarse, las nuevas proteínas sintetizadas son

translocadas a un estado reducido desde el citosol al lumen del retículo endoplásmico, donde se oxidan y llegan a madurar por el intercambio de tiol-disulfuro. Durante la reorganización del disulfuro, los equivalentes reductores se transfieren desde los sustratos de proteínas oxidadas a los miembros de la familia de proteínas disulfuro isomerasa (PDI). A partir de entonces, las PDI reducidas se reoxidan por la flavoproteína ERO1, que transfiere los electrones al oxígeno, un proceso que resulta finalmente en la producción de una molécula de H_2O_2 por enlace disulfuro, lo que parece poco rentable y dañino (303). Se ha demostrado la capacidad *in vitro* de la GPX7 junto con otras moléculas de utilizar el H_2O_2 producido por ERO1 para reoxidar las PDI (304).

Como comentario final, hay que reseñar que en este trabajo los cambios descritos en la expresión de genes de defensa antioxidante se produjeron fundamentalmente a los 5 días de tratamiento con RESV y NAC (3 días postcirugía), siendo mucho menos evidentes a los 21 días de la cirugía. Estos hallazgos son congruentes con los resultados funcionales y los histológicos y, como ya se ha mencionado anteriormente, podrían explicarse entre otras razones por la farmacocinética de ambos antioxidantes.

6. CONCLUSIONES

1. La administración sistémica de una dosis única de kanamicina subcutánea (400 mg/kg) y furosemida intravenosa (100 mg/kg) produce en la rata Wistar una sordera profunda de carácter neurosensorial, demostrable mediante la realización de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral y asociada a daños histológicos severos en todas las espiras de la cóclea, pero de forma más relevante en la espira basal.
2. El abordaje cervical ventral para el acceso al oído medio en la rata Wistar:
 - a) Es fácil, rápido, reproducible y presenta escasa morbilidad y mortalidad.
 - b) Permite una clara visualización de la ventana redonda.
 - c) Es eficiente como método para la administración directa de sustancias en el oído interno sin compromiso de la función coclear.
3. La aplicación directa sobre la membrana de la ventana redonda de un fragmento de gelfoam embebido con una solución concentrada de kanamicina y furosemida produce en la rata Wistar una sordera moderada – severa de carácter neurosensorial, demostrable mediante la realización de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral y asociada a cambios histológicos severos en todas las espiras de la cóclea, aunque de forma menos relevante en las espiras media y apical.
4. Tanto el método de administración directa sobre la ventana redonda del gelfoam embebido con kanamicina y furosemida como el método de administración sistémica de ambos ototóxicos constituyen en la rata Wistar un modelo experimental válido para el estudio de la ototoxicidad por estos agentes. Sin embargo, el primer método produce una sordera más moderada que el segundo, lo que podría ser más útil en estudios que persigan objetivos de reparación celular. Además, a diferencia del método de administración sistémica, este método preserva el oído contralateral, lo que permitiría emplearle como control intraanimal.
5. La administración intraperitoneal de resveratrol y N-acetilcisteína disminuye en la rata Wistar la pérdida auditiva inducida tras la administración directa sobre la ventana redonda de gelfoam embebido con kanamicina y furosemida.

6. La administración intraperitoneal de resveratrol y N-acetilcisteína en las ratas Wistar sometidas a la ototoxicidad inducida por la administración local de kanamicina y furosemida incrementa la expresión de algunos genes relacionados con la defensa antioxidante, en concreto los genes que codifican para las enzimas *Sod1*, *Gpx1*, *Gpx4*, *Gpx5* y *Gpx7*, y disminuye la expresión del gen que codifica para la *Nox4*, una de las fuentes enzimáticas de ROS.
7. En este trabajo, el efecto protector del resveratrol y la N-acetilcisteína se produce de forma más relevante en las fases iniciales del experimento y es menos evidente al final del mismo, lo que sugiere una protección pasajera de los antioxidantes y/o la necesidad de prolongar el tratamiento con ellos.
8. En este estudio, el incremento en la expresión de la *Il1 β* se produce sólo en el oído sometido al procedimiento quirúrgico y es independiente del tratamiento con los antioxidantes, por lo que podría relacionarse con la inflamación asociada a la propia cirugía.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 2006;354(20):2151-2164.
- (2) Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991;630:16-31.
- (3) Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;102(1 Pt 2):1-16.
- (4) De Ceulaer G, Johnson S, Yperman M, Daemers K, Offeciers FE, O'Donoghue GM, et al. Long-term evaluation of the effect of intracochlear steroid deposition on electrode impedance in cochlear implant patients. *Otol Neurotol* 2003;24(5):769-774.
- (5) Schuknecht HF. Ablation therapy for the relief of Meniere's disease. *Laryngoscope* 1956;66(7):859-870.
- (6) Plontke SK, Salt AN. Simulation of application strategies for local drug delivery to the inner ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2006;68(6):386-392.
- (7) Plontke SK, Plinkert PK, Plinkert B, Koitschev A, Zenner HP, Lowenheim H. Transtympanic endoscopy for drug delivery to the inner ear using a new microendoscope. *Adv Otorhinolaryngol* 2002;59:149-155.
- (8) Murillo-Cuesta S, Garcia-Alcantara F, Vacas E, Sistiaga JA, Camarero G, Varela-Nieto I, et al. Direct drug application to the round window: a comparative study of ototoxicity in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141(5):584-590.
- (9) Gouveris H, Selivanova O, Mann W. Intratympanic dexamethasone with hyaluronic acid in the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss after failure of intravenous steroid and vasoactive therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005;262(2):131-134.
- (10) Silverstein H, Arruda J, Rosenberg SI, Deems D, Hester TO. Direct round window membrane application of gentamicin in the treatment of Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120(5):649-655.
- (11) Endo T, Nakagawa T, Kita T, Iguchi F, Kim TS, Tamura T, et al. Novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 2005;115(11):2016-2020.
- (12) Tamura T, Kita T, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, Ishihara T, et al. Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 2005;115(11):2000-2005.
- (13) Brown JN, Miller JM, Altschuler RA, Nuttall AL. Osmotic pump implant for chronic infusion of drugs into the inner ear. *Hear Res* 1993;70(2):167-172.
- (14) Thomsen J, Charabi S, Tos M. Preliminary results of a new delivery system for gentamicin to the inner ear in patients with Meniere's disease. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257(7):362-365.

- (15) Plontke SK, Zimmermann R, Zenner HP, Lowenheim H. Technical note on microcatheter implantation for local inner ear drug delivery: surgical technique and safety aspects. *Otol Neurotol* 2006;27(7):912-917.
- (16) Plontke SK, Wood AW, Salt AN. Analysis of gentamicin kinetics in fluids of the inner ear with round window administration. *Otol Neurotol* 2002;23(6):967-974.
- (17) Plontke SK, Mynatt R, Gill RM, Borgmann S, Salt AN. Concentration gradient along the scala tympani after local application of gentamicin to the round window membrane. *Laryngoscope* 2007;117(7):1191-1198.
- (18) Toth AA, Parnes LS. Intratympanic gentamicin therapy for Meniere's disease: preliminary comparison of two regimens. *J Otolaryngol* 1995;24(6):340-344.
- (19) Lange G, Maurer J, Mann W. Long-term results after interval therapy with intratympanic gentamicin for Meniere's disease. *Laryngoscope* 2004;114(1):102-105.
- (20) Carey J. Intratympanic gentamicin for the treatment of Meniere's disease and other forms of peripheral vertigo. *Otolaryngol Clin North Am* 2004;37(5):1075-1090.
- (21) Parnes LS, Sun AH, Freeman DJ. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope* 1999;109(7 Pt 2):1-17.
- (22) Chandrasekhar SS. Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss: clinical and laboratory evaluation. *Otol Neurotol* 2001;22(1):18-23.
- (23) Lefebvre PP, Staecker H. Steroid perfusion of the inner ear for sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol* 2002;122(7):698-702.
- (24) Ho HG, Lin HC, Shu MT, Yang CC, Tsai HT. Effectiveness of intratympanic dexamethasone injection in sudden-deafness patients as salvage treatment. *Laryngoscope* 2004;114(7):1184-1189.
- (25) Silverstein H, Isaacson JE, Olds MJ, Rowan PT, Rosenberg S. Dexamethasone inner ear perfusion for the treatment of Meniere's disease: a prospective, randomized, double-blind, crossover trial. *Am J Otol* 1998;19(2):196-201.
- (26) Sennaroglu L, Dini FM, Sennaroglu G, Gursel B, Ozkan S. Transtympanic dexamethasone application in Meniere's disease: an alternative treatment for intractable vertigo. *J Laryngol Otol* 1999;113(3):217-221.
- (27) Sakata E, Ito Y, Itoh A. Clinical Experiences of Steroid Targeting Therapy to Inner Ear for Control of Tinnitus. *Int Tinnitus J* 1997;3(2):117-121.
- (28) Shulman A, Goldstein B. Intratympanic drug therapy with steroids for tinnitus control: a preliminary report. *Int Tinnitus J* 2000;6(1):10-20.

- (29) Cesarani A, Capobianco S, Soi D, Giuliano DA, Alpini D. Intratympanic dexamethasone treatment for control of subjective idiopathic tinnitus: our clinical experience. *Int Tinnitus J* 2002;8(2):111-114.
- (30) Schwab B, Lenarz T, Heermann R. Use of the round window micro cath for inner ear therapy - results of a placebo-controlled, prospective study on chronic tinnitus. *Laryngorhinootologie* 2004;83(3):164-172.
- (31) Keithley EM, Ma CL, Ryan AF, Louis JC, Magal E. GDNF protects the cochlea against noise damage. *Neuroreport* 1998;9(10):2183-2187.
- (32) Shoji F, Miller AL, Mitchell A, Yamasoba T, Altschuler RA, Miller JM. Differential protective effects of neurotrophins in the attenuation of noise-induced hair cell loss. *Hear Res* 2000;146(1-2):134-142.
- (33) Li G, Frenz DA, Brahmblatt S, Feghali JG, Ruben RJ, Berggren D, et al. Round window membrane delivery of L-methionine provides protection from cisplatin ototoxicity without compromising chemotherapeutic efficacy. *Neurotoxicology* 2001;22(2):163-176.
- (34) Korver KD, Rybak LP, Whitworth C, Campbell KM. Round window application of D-methionine provides complete cisplatin otoprotection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;126(6):683-689.
- (35) Wang J, Dib M, Lenoir M, Vago P, Eybalin M, Hameg A, et al. Riluzole rescues cochlear sensory cells from acoustic trauma in the guinea-pig. *Neuroscience* 2002;111(3):635-648.
- (36) Wang J, Van De Water TR, Bonny C, de Ribaupierre F, Puel JL, Zine A. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. *J Neurosci* 2003 17;23(24):8596-8607.
- (37) Chen Z, Duan M, Lee H, Ruan R, Ulfendahl M. Pharmacokinetics of caroverine in the inner ear and its effects on cochlear function after systemic and local administrations in Guinea pigs. *Audiol Neurootol* 2003;8(1):49-56.
- (38) Hight NG, McFadden SL, Henderson D, Burkard RF, Nicotera T. Noise-induced hearing loss in chinchillas pre-treated with glutathione monoethylester and R-PIA. *Hear Res* 2003;179(1-2):21-32.
- (39) Takemura K, Komeda M, Yagi M, Himeno C, Izumikawa M, Doi T, et al. Direct inner ear infusion of dexamethasone attenuates noise-induced trauma in guinea pig. *Hear Res* 2004;196(1-2):58-68.
- (40) Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005;11(3):271-276.

- (41) Selivanova O, Maurer J, Ecke U, Mann WJ. The effects of Streptolysin-O and sodium hyaluronate on the permeability of the round window membrane in guinea pigs-an electrophysiologic study. *Laryngorhinootologie* 2003;82(4):235-239.
- (42) Salt AN, Kellner C, Hale S. Contamination of perilymph sampled from the basal cochlear turn with cerebrospinal fluid. *Hear Res* 2003;182(1-2):24-33.
- (43) Salt AN, Ma Y. Quantification of solute entry into cochlear perilymph through the round window membrane. *Hear Res* 2001;154(1-2):88-97.
- (44) Russell K H, Bradley J R. Transport in an Infinite Medium. En: Russell K H, Bradley J R, editors. *Intermediate Physics for Medicine and Biology* New York, NY: Springer; 2007. p. 81-109.
- (45) Rivera T, Sanz L, Camarero G, Varela-Nieto I. Drug delivery to the inner ear: strategies and their therapeutic implications for sensorineural hearing loss. *Curr Drug Deliv* 2012;9(3):231-242.
- (46) Saijo S, Kimura RS. Distribution of HRP in the inner ear after injection into the middle ear cavity. *Acta Otolaryngol* 1984;97(5-6):593-610.
- (47) McCall AA, Swan EE, Borenstein JT, Sewell WF, Kujawa SG, McKenna MJ. Drug delivery for treatment of inner ear disease: current state of knowledge. *Ear Hear* 2010;31(2):156-165.
- (48) Plontke S, Lowenheim H, Preyer S, Leins P, Dietz K, Koitschev A, et al. Outcomes research analysis of continuous intratympanic glucocorticoid delivery in patients with acute severe to profound hearing loss: basis for planning randomized controlled trials. *Acta Otolaryngol* 2005;125(8):830-839.
- (49) Silverstein H. Use of a new device, the MicroWick, to deliver medication to the inner ear. *Ear Nose Throat J* 1999;78(8):595-8, 600.
- (50) Arriaga MA, Goldman S. Hearing results of intratympanic steroid treatment of endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* 1998;108(11 Pt 1):1682-1685.
- (51) Salt AN, Plontke SK. Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics. *Drug Discov Today* 2005;10(19):1299-1306.
- (52) Hoffer ME, Balough B, Henderson J, DeCicco M, Wester D, O'Leary MJ, et al. Use of sustained release vehicles in the treatment of Meniere's disease. *Otolaryngol Clin North Am* 1997;30(6):1159-1166.
- (53) Hornyak GL. Nanotechnology in otolaryngology. *Otolaryngol Clin North Am* 2005;38(2):273-93, vi.
- (54) Kopke RD, Wassel RA, Mondalek F, Grady B, Chen K, Liu J, et al. Magnetic nanoparticles: inner ear targeted molecule delivery and middle ear implant. *Audiol Neurootol* 2006;11(2):123-133.

- (55) Ge X, Jackson RL, Liu J, Harper EA, Hoffer ME, Wassel RA, et al. Distribution of PLGA nanoparticles in chinchilla cochleae. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137(4):619-623.
- (56) Zou J, Saulnier P, Perrier T, Zhang Y, Manninen T, Toppila E, et al. Distribution of lipid nanocapsules in different cochlear cell populations after round window membrane permeation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;87(1):10-18.
- (57) Arias JL. Liposomes in drug delivery: a patent review (2007 - present). *Expert Opin Ther Pat* 2013;23(11):1399-1414.
- (58) Alzamil KS, Linthicum FH, Jr. Extraneous round window membranes and plugs: possible effect on intratympanic therapy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109(1):30-32.
- (59) Praetorius M, Limberger A, Muller M, Lehner R, Schick B, Zenner HP, et al. A novel microperfusion system for the long-term local supply of drugs to the inner ear: implantation and function in the rat model. *Audiol Neurootol* 2001;6(5):250-258.
- (60) Prieskorn DM, Miller JM. Technical report: chronic and acute intracochlear infusion in rodents. *Hear Res* 2000;140(1-2):212-215.
- (61) Lehner R, Brugger H, Maassen MM, Zenner HP. A totally implantable drug delivery system for local therapy of the middle and inner ear. *Ear Nose Throat J* 1997;76(8):567-570.
- (62) Kopke RD, Hoffer ME, Wester D, O'Leary MJ, Jackson RL. Targeted topical steroid therapy in sudden sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol* 2001;22(4):475-479.
- (63) Praetorius M, Baker K, Brough DE, Plinkert P, Staecker H. Pharmacodynamics of adenovector distribution within the inner ear tissues of the mouse. *Hear Res* 2007;227(1-2):53-58.
- (64) Oestreicher E, Arnold W, Ehrenberger K, Felix D. New approaches for inner ear therapy with glutamate antagonists. *Acta Otolaryngol* 1999;119(2):174-178.
- (65) Richardson RT, Noushi F, O'Leary S. Inner ear therapy for neural preservation. *Audiol Neurootol* 2006;11(6):343-356.
- (66) Johnson KR, Erway LC, Cook SA, Willott JF, Zheng QY. A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res* 1997;114(1-2):83-92.
- (67) Paasche G, Bockel F, Tasche C, Lesinski-Schiedat A, Lenarz T. Changes of postoperative impedances in cochlear implant patients: the short-term effects of modified electrode surfaces and intracochlear corticosteroids. *Otol Neurotol* 2006;27(5):639-647.
- (68) Borenstein JT. Intracochlear drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8(9):1161-1174.

- (69) Assoc. Res. Otolaryngol., editor. Longitudinal Distribution of Drugs in Perilymph Assessed by Cochlear Action Potentials. Twenty-Eighth Annual MidWinter Research Meeting of the ARO; February 19-24; New Orleans, Luisiana, USA; 2005.
- (70) Richardson RT, Wise A, O'Leary S, Hardman J, Casley D, Clark G. Tracing neurotrophin-3 diffusion and uptake in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 2004;198(1-2):25-35.
- (71) Eshraghi AA, Adil E, He J, Graves R, Balkany TJ, Van De Water TR. Local dexamethasone therapy conserves hearing in an animal model of electrode insertion trauma-induced hearing loss. *Otol Neurotol* 2007;28(6):842-849.
- (72) Wang J, Ladrech S, Pujol R, Brabet P, Van De Water TR, Puel JL. Caspase inhibitors, but not c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss. *Cancer Res* 2004;64(24):9217-9224.
- (73) Schindler RA, Gladstone HB, Scott N, Hradek GT, Williams H, Shah SB. Enhanced preservation of the auditory nerve following cochlear perfusion with nerve growth factors. *Am J Otol* 1995;16(3):304-309.
- (74) Borkholder DA, Zhu X, Hyatt BT, Archilla AS, Livingston WJ, 3rd, Frisina RD. Murine intracochlear drug delivery: reducing concentration gradients within the cochlea. *Hear Res* 2010;268(1-2):2-11.
- (75) Incesulu A, Nadol JB, Jr. Correlation of acoustic threshold measures and spiral ganglion cell survival in severe to profound sensorineural hearing loss: implications for cochlear implantation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107(11 Pt 1):906-911.
- (76) Pettingill LN, Richardson RT, Wise AK, O'Leary SJ, Shepherd RK. Neurotrophic factors and neural prostheses: potential clinical applications based upon findings in the auditory system. *IEEE Trans Biomed Eng* 2007 Jun;54(6 Pt 1):1138-1148.
- (77) Hochmair I, Nopp P, Jolly C, Schmidt M, Schosser H, Garnham C, et al. MED-EL Cochlear implants: state of the art and a glimpse into the future. *Trends Amplif* 2006;10(4):201-219.
- (78) Chen Z, Kujawa SG, McKenna MJ, Fiering JO, Mescher MJ, Borenstein JT, et al. Inner ear drug delivery via a reciprocating perfusion system in the guinea pig. *J Control Release* 2005 Dec;110(1):1-19.
- (79) Fiering J, Mescher MJ, Leary Swan EE, Holmboe ME, Murphy BA, Chen Z, et al. Local drug delivery with a self-contained, programmable, microfluidic system. *Biomed Microdevices* 2009;11(3):571-578.
- (80) Sewell WF, Borenstein JT, Chen Z, Fiering J, Handzel O, Holmboe M, et al. Development of a microfluidics-based intracochlear drug delivery device. *Audiol Neurootol* 2009;14(6):411-422.

- (81) Pararas EE, Chen Z, Fiering J, Mescher MJ, Kim ES, McKenna MJ, et al. Kinetics of reciprocating drug delivery to the inner ear. *J Control Release* 2011;152(2):270-277.
- (82) Palomar Garcia V, Abdulghani Martinez F, Bodet Agusti E, Andreu Mencia L, Palomar Asenjo V. Drug-induced ototoxicity: current status. *Acta Otolaryngol* 2001;121(5):569-572.
- (83) Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Int J Otolaryngol* 2011;2011:937861.
- (84) Hashino E, Shero M. Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res* 1995;704(1):135-140.
- (85) Marcotti W, van Netten SM, Kros CJ. The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *J Physiol* 2005;567(Pt 2):505-521.
- (86) Hu DN, Qui WQ, Wu BT, Fang LZ, Zhou F, Gu YP, et al. Genetic aspects of antibiotic induced deafness: mitochondrial inheritance. *J Med Genet* 1991;28(2):79-83.
- (87) Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet* 2004;74(1):139-152.
- (88) Ricci AJ, Kennedy HJ, Crawford AC, Fettiplace R. The transduction channel filter in auditory hair cells. *J Neurosci* 2005 Aug 24;25(34):7831-7839.
- (89) Sha SH, Schacht J. Stimulation of free radical formation by aminoglycoside antibiotics. *Hear Res* 1999;128(1-2):112-118.
- (90) Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep* 2009;14(3):102-108.
- (91) Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003;39(11):615-647.
- (92) Beermann B, Dalen E, Lindstrom B, Rosen A. On the fate of furosemide in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1975;9(1):51-61.
- (93) Arnold W, Nadol JB, Jr, Weidauer H. Ultrastructural histopathology in a case of human ototoxicity due to loop diuretics. *Acta Otolaryngol* 1981;91(5-6):399-414.
- (94) Rybak LP. Pathophysiology of furosemide ototoxicity. *J Otolaryngol* 1982;11(2):127-133.
- (95) Liu JX, Zhou XN, Yuan YG. Effects of furosemide on intracochlear oxygen tension in the guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996;253(6):367-370.

- (96) Ruggero MA, Rich NC. Furosemide alters organ of corti mechanics: evidence for feedback of outer hair cells upon the basilar membrane. *J Neurosci* 1991;11(4):1057-1067.
- (97) Liu H, Ding DL, Jiang HY, Wu XW, Salvi R, Sun H. Ototoxic destruction by co-administration of kanamycin and ethacrynic acid in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011;12(10):853-861.
- (98) Bosher SK. Ethacrynic acid ototoxicity as a general model in cochlear pathology. *Adv Otorhinolaryngol* 1977;22:81-89.
- (99) Gallagher KL, Jones JK. Furosemide-induced ototoxicity. *Ann Intern Med* 1979;91(5):744-745.
- (100) Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119(6):598-620.
- (101) Huang Q, Tang J. Age-related hearing loss or presbycusis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010;267(8):1179-1191.
- (102) Sha SH, Chen FQ, Schacht J. Activation of cell death pathways in the inner ear of the aging CBA/J mouse. *Hear Res* 2009;254(1-2):92-99.
- (103) Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 2004;279(44):46065-46072.
- (104) Poirrier AL, Pincemail J, Van Den Ackerveken P, Lefebvre PP, Malgrange B. Oxidative stress in the cochlea: an update. *Curr Med Chem* 2010;17(30):3591-3604.
- (105) Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M, Lothe RA, Fossa SD. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione S-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J Clin Oncol* 2007;25(6):708-714.
- (106) Sha SH, Zajic G, Epstein CJ, Schacht J. Overexpression of copper/zinc-superoxide dismutase protects from kanamycin-induced hearing loss. *Audiol Neurootol* 2001;6(3):117-123.
- (107) Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Flood DG, Reaume AG, Hoffman EK, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol* 1999;4(5):237-246.
- (108) Kawamoto K, Sha SH, Minoda R, Izumikawa M, Kuriyama H, Schacht J, et al. Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity. *Mol Ther* 2004;9(2):173-181.

- (109) Seidman MD, Shivapuja BG, Quirk WS. The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase on noise-induced cochlear damage. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;109(6):1052-1056.
- (110) Whitworth CA, Ramkumar V, Jones B, Tsukasaki N, Rybak LP. Protection against cisplatin ototoxicity by adenosine agonists. *Biochem Pharmacol* 2004;67(9):1801-1807.
- (111) Fang J, Zhong L, Zhao R, Holmgren A. Ebselen: a thioredoxin reductase-dependent catalyst for alpha-tocopherol quinone reduction. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207(2 Suppl):103-109.
- (112) Watanabe KI, Hess A, Bloch W, Michel O. Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anticancer Drugs* 2000;11(5):401-406.
- (113) Ohinata Y, Miller JM, Schacht J. Protection from noise-induced lipid peroxidation and hair cell loss in the cochlea. *Brain Res* 2003;966(2):265-273.
- (114) Mostafa BE, Tawfik S, Hefnawi NG, Hassan MA, Ismail FA. The role of deferoxamine in the prevention of gentamicin ototoxicity: a histological and audiological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 2007;127(3):234-239.
- (115) Song BB, Anderson DJ, Schacht J. Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282(1):369-377.
- (116) Lautermann J, Song B, McLaren J, Schacht J. Diet is a risk factor in cisplatin ototoxicity. *Hear Res* 1995;88(1-2):47-53.
- (117) Lautermann J, Crann SA, McLaren J, Schacht J. Glutathione-dependent antioxidant systems in the mammalian inner ear: effects of aging, ototoxic drugs and noise. *Hear Res* 1997;114(1-2):75-82.
- (118) Campbell KC, Meech RP, Klemens JJ, Gerberi MT, Dyrstad SS, Larsen DL, et al. Prevention of noise- and drug-induced hearing loss with D-methionine. *Hear Res* 2007;226(1-2):92-103.
- (119) Bock GR, Yates GK, Miller JJ, Moorjani P. Effects of N-acetylcysteine on kanamycin ototoxicity in the guinea pig. *Hear Res* 1983;9(3):255-262.
- (120) Choe WT, Chinosornvatana N, Chang KW. Prevention of cisplatin ototoxicity using transtympanic N-acetylcysteine and lactate. *Otol Neurotol* 2004;25(6):910-915.
- (121) Thomas Dickey D, Muldoon LL, Kraemer DF, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced ototoxicity by N-acetylcysteine in a rat model. *Hear Res* 2004;193(1-2):25-30.

- (122) Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314(3):1052-1058.
- (123) Duan M, Qiu J, Laurell G, Olofsson A, Counter SA, Borg E. Dose and time-dependent protection of the antioxidant N-L-acetylcysteine against impulse noise trauma. *Hear Res* 2004;192(1-2):1-9.
- (124) Fetoni AR, Ralli M, Sergi B, Parrilla C, Troiani D, Paludetti G. Protective effects of N-acetylcysteine on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2009;29(2):70-75.
- (125) Wu HP, Hsu CJ, Cheng TJ, Guo YL. N-acetylcysteine attenuates noise-induced permanent hearing loss in diabetic rats. *Hear Res* 2010;267(1-2):71-77.
- (126) Conlon BJ, Aran JM, Erre JP, Smith DW. Attenuation of aminoglycoside-induced cochlear damage with the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Hear Res* 1999;128(1-2):40-44.
- (127) Sha SH, Schacht J. Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation in vitro and ototoxicity in vivo: D-methionine is a potential protectant. *Hear Res* 2000;142(1-2):34-40.
- (128) Feldman L, Efrati S, Eviatar E, Abramsohn R, Yarovoy I, Gersch E, et al. Gentamicin-induced ototoxicity in hemodialysis patients is ameliorated by N-acetylcysteine. *Kidney Int* 2007;72(3):359-363.
- (129) Fetoni AR, Sergi B, Ferraresi A, Paludetti G, Troiani D. alpha-Tocopherol protective effects on gentamicin ototoxicity: an experimental study. *Int J Audiol* 2004;43(3):166-171.
- (130) Kalkanis JG, Whitworth C, Rybak LP. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 2004;114(3):538-542.
- (131) Chen Y, Huang WG, Zha DJ, Qiu JH, Wang JL, Sha SH, et al. Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity: from the laboratory to the clinic. *Hear Res* 2007;226(1-2):178-182.
- (132) Long M, Smouha EE, Qiu D, Li F, Johnson F, Luft B. Flavanoid of *Drynaria fortunei* protects against gentamicin ototoxicity. *Phytother Res* 2004;18(8):609-614.
- (133) Finkler AD, Silveira AF, Munaro G, Zanrosso CD. Otoprotection in guinea pigs exposed to pesticides and ginkgo biloba. *Braz J Otorhinolaryngol* 2012;78(3):122-128.
- (134) Le Prell CG, Hughes LF, Miller JM. Free radical scavengers vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma. *Free Radic Biol Med* 2007;42(9):1454-1463.

- (135) Staffa P, Cambi J, Mezzedimi C, Passali D, Bellussi L. Activity of coenzyme Q 10 (Q-Ter multicomposite) on recovery time in noise-induced hearing loss. *Noise Health* 2014;16(72):265-269.
- (136) Sha SH, Qiu JH, Schacht J. Aspirin to prevent gentamicin-induced hearing loss. *N Engl J Med* 2006;354(17):1856-1857.
- (137) Doolittle ND, Muldoon LL, Brummett RE, Tyson RM, Lacy C, Bubalo JS, et al. Delayed sodium thiosulfate as an otoprotectant against carboplatin-induced hearing loss in patients with malignant brain tumors. *Clin Cancer Res* 2001;7(3):493-500.
- (138) Ylikoski J, Xing-Qun L, Virkkala J, Pirvola U. Blockade of c-Jun N-terminal kinase pathway attenuates gentamicin-induced cochlear and vestibular hair cell death. *Hear Res* 2002;166(1-2):33-43.
- (139) Pirvola U, Xing-Qun L, Virkkala J, Saarma M, Murakata C, Camoratto AM, et al. Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurosci* 2000;20(1):43-50.
- (140) Wei X, Zhao L, Liu J, Dodel RC, Farlow MR, Du Y. Minocycline prevents gentamicin-induced ototoxicity by inhibiting p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. *Neuroscience* 2005;131(2):513-521.
- (141) Corbacella E, Lanzoni I, Ding D, Previati M, Salvi R. Minocycline attenuates gentamicin induced hair cell loss in neonatal cochlear cultures. *Hear Res* 2004;197(1-2):11-18.
- (142) Tabuchi K, Oikawa K, Hoshino T, Nishimura B, Hayashi K, Yanagawa T, et al. Cochlear protection from acoustic injury by inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase and sequestosome 1 stress protein. *Neuroscience* 2010;166(2):665-670.
- (143) Heman-Ackah SE, Juhn SK, Huang TC, Wiedmann TS. A combination antioxidant therapy prevents age-related hearing loss in C57BL/6 mice. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;143(3):429-434.
- (144) Lin CY, Wu JL, Shih TS, Tsai PJ, Sun YM, Ma MC, et al. N-Acetyl-cysteine against noise-induced temporary threshold shift in male workers. *Hear Res* 2010;269(1-2):42-47.
- (145) Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Ho CT, Zhou Z, Rosen RT. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J Agric Food Chem* 2000;48(2):253-256.
- (146) Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv* 2006;6(1):36-47.
- (147) Mukherjee S, Dudley JI, Das DK. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response* 2010;8(4):478-500.

- (148) Yen GC, Duh PD, Lin CW. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res* 2003;37(5):509-514.
- (149) Olas B, Wachowicz B, Szewczuk J, Saluk-Juszczak J, Kaca W. The effect of resveratrol on the platelet secretory process induced by endotoxin and thrombin. *Microbios* 2001;105(410):7-13.
- (150) Trincheri NF, Nicotra G, Follo C, Castino R, Isidoro C. Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis* 2007;28(5):922-931.
- (151) Kundu JK, Shin YK, Kim SH, Surh YJ. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kappaB in mouse skin by blocking IkappaB kinase activity. *Carcinogenesis* 2006;27(7):1465-1474.
- (152) Candelario-Jalil E, de Oliveira AC, Graf S, Bhatia HS, Hull M, Munoz E, et al. Resveratrol potently reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J Neuroinflammation* 2007;4:25.
- (153) Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK, Agrewala JN. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin Exp Immunol* 2007;147(1):155-163.
- (154) Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem* 2005;280(45):37377-37382.
- (155) Karlsson J, Emgard M, Brundin P, Burkitt MJ. Trans-Resveratrol Protects Embryonic Mesencephalic Cells from Tert-Butyl Hydroperoxide: Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping Evidence for a Radical Scavenging Mechanism. *J Neurochem* 2000;75(1):141-150.
- (156) El-Mowafy AM, White RE. Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Lett* 1999;451(1):63-67.
- (157) Yumusakhuylyu AC, Yazici M, Sari M, Binnetoglu A, Kosemihal E, Akdas F, et al. Protective role of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012;76(3):404-408.
- (158) Erdem T, Bayindir T, Filiz A, Iraz M, Selimoglu E. The effect of resveratrol on the prevention of cisplatin ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;269(10):2185-2188.
- (159) Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J* 1997;38(1):41-48.
- (160) Carbone L. Pain management standards in the eighth edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012;51(3):322-328.

- (161) Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim* 2011;45(1):1-13.
- (162) ESPAÑA. Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE, 25 de octubre 2005;núm. 252:pp. 34367-34391.
- (163) ESPAÑA. Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. BOE, 8 de noviembre 2007;núm. 268:pp. 45914-45920.
- (164) Cediél R, Riquelme R, Contreras J, Diaz A, Varela-Nieto I. Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *Eur J Neurosci* 2006;23(2):587-590.
- (165) Pinilla M, Ramirez-Camacho R, Jorge E, Trinidad A, Vergara J. Ventral approach to the rat middle ear for otologic research. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124(5):515-517.
- (166) Qiu J, Olivius P, Tong B, Borg E, Duan M. Ventral approach to rat inner ear preserves cochlear function. *Acta Otolaryngol* 2007;127(3):240-243.
- (167) Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, et al. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim* 2001;35(1):1-41.
- (168) West BA, Brummett RE, Himes DL. Interaction of kanamycin and ethacrynic acid. Severe cochlear damage in guinea pigs. *Arch Otolaryngol* 1973;98(1):32-37.
- (169) Versnel H, Agterberg MJ, de Groot JC, Smoorenburg GF, Klis SF. Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res* 2007;231(1-2):1-12.
- (170) Oesterle EC, Campbell S, Taylor RR, Forge A, Hume CR. Sox2 and JAGGED1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008;9(1):65-89.
- (171) Murillo-Cuesta S, Contreras J, Cediél R, Varela-Nieto I. Comparison of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice. *Lab Anim* 2010;44(2):124-131.
- (172) Parham K, Sun XM, Kim DO. Noninvasive assessment of auditory function in mice: auditory brainstem response and distortion product otoacoustic emissions. En:

Willott JF, editor. Handbook of mouse auditory research : from behavior to molecular biology Boca Raton, FL: CRC Press; 2001. p. 37-58.

(173) Cobo P, Murillo-Cuesta S, Cediell R, Moreno A, Lorenzo-Garcia P, Varela-Nieto I. Design of a reverberant chamber for noise exposure experiments with small animals. *Appl Acoust* 2009;70(8):1034-1040.

(174) Camarero G, Avendano C, Fernandez-Moreno C, Villar A, Contreras J, de Pablo F, et al. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci* 2001;21(19):7630-7641.

(175) Tanaka C, Coling DE, Manohar S, Chen GD, Hu BH, Salvi R, et al. Expression pattern of oxidative stress and antioxidant defense-related genes in the aging Fischer 344/NHsd rat cochlea. *Neurobiol Aging* 2012;33(8):1842.e1-1842.14.

(176) Laurell G, Teixeira M, Sterkers O, Bagger-Sjoberg D, Eksborg S, Lidman O, et al. Local administration of antioxidants to the inner ear. Kinetics and distribution(1). *Hear Res* 2002;173(1-2):198-209.

(177) Zimmer WM, Rosin DF, Saunders JC. Middle-ear development. VI: Structural maturation of the rat conducting apparatus. *Anat Rec* 1994;239(4):475-484.

(178) Mazurek B, Winter E, Fuchs J, Haupt H, Gross J. Susceptibility of the hair cells of the newborn rat cochlea to hypoxia and ischemia. *Hear Res* 2003;182(1-2):2-8.

(179) Staecker H, Zheng QY, Van De Water TR. Oxidative stress in aging in the C57B16/J mouse cochlea. *Acta Otolaryngol* 2001;121(6):666-672.

(180) Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997;88(3):347-354.

(181) Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994;263(5154):1759-1762.

(182) Liu W, Staecker H, Stupak H, Malgrange B, Lefebvre P, Van De Water TR. Caspase inhibitors prevent cisplatin-induced apoptosis of auditory sensory cells. *Neuroreport* 1998;9(11):2609-2614.

(183) Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2008;8(1):61-70.

(184) Fritzsche B, Farinas I, Reichardt LF. Lack of neurotrophin 3 causes losses of both classes of spiral ganglion neurons in the cochlea in a region-specific fashion. *J Neurosci* 1997;17(16):6213-6225.

(185) Gao WQ. Therapeutic potential of neurotrophins for treatment of hearing loss. *Mol Neurobiol* 1998;17(1-3):17-31.

- (186) Varela-Nieto I, Murillo-Cuesta S, Rodriguez-de la Rosa L, Lassatetta L, Contreras J. IGF-I deficiency and hearing loss: molecular clues and clinical implications. *Pediatr Endocrinol Rev* 2013;10(4):460-472.
- (187) Murillo-Cuesta S, Rodriguez-de la Rosa L, Cediell R, Lassaletta L, Varela-Nieto I. The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci* 2011;4:11.
- (188) Holley MC. The auditory system, hearing loss and potential targets for drug development. *Drug Discov Today* 2005;10(19):1269-1282.
- (189) Romero-Carvajal A, Navajas Acedo J, Jiang L, Kozlovskaja-Gumbriene A, Alexander R, Li H, et al. Regeneration of Sensory Hair Cells Requires Localized Interactions between the Notch and Wnt Pathways. *Dev Cell* 2015;34(3):267-282.
- (190) Li W, Wu J, Yang J, Sun S, Chai R, Chen ZY, et al. Notch inhibition induces mitotically generated hair cells in mammalian cochleae via activating the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(1):166-171.
- (191) Jansen TT, Bremer HG, Topsakal V, Hendriksen FG, Klis SF, Grolman W. Deafness induction in mice. *Otol Neurotol* 2013;34(8):1496-1502.
- (192) Hirose K, Sato E. Comparative analysis of combination kanamycin-furosemide versus kanamycin alone in the mouse cochlea. *Hear Res* 2011;272(1-2):108-116.
- (193) Xiong H, Chu HQ, Huang XW, Cui YH, Zhou LQ, Chen J, et al. [Rapid cochlea lesion induced by co-administration of kanamycin and furosemide in mouse] [resumen]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2010;45(3):222-228.
- (194) Taylor RR, Nevill G, Forge A. Rapid hair cell loss: a mouse model for cochlear lesions. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008;9(1):44-64.
- (195) Abbas L, Rivolta MN. Aminoglycoside ototoxicity and hair cell ablation in the adult gerbil: A simple model to study hair cell loss and regeneration. *Hear Res* 2015;325:12-26.
- (196) Brummett RE, Bendrick T, Himes D. Comparative ototoxicity of bumetanide and furosemide when used in combination with kanamycin. *J Clin Pharmacol* 1981;21(11-12 Pt 2):628-636.
- (197) Jiang H, Sha SH, Schacht J. NF-kappaB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity. *J Neurosci Res* 2005;79(5):644-651.
- (198) Wu WJ, Sha SH, Schacht J. Recent advances in understanding aminoglycoside ototoxicity and its prevention. *Audiol Neurootol* 2002;7(3):171-174.
- (199) Wu WJ, Sha SH, McLaren JD, Kawamoto K, Raphael Y, Schacht J. Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hear Res* 2001;158(1-2):165-178.

- (200) Liu YH, Ke XM, Qin Y, Gu ZP, Xiao SF. Adeno-associated virus-mediated Bcl-xL prevents aminoglycoside-induced hearing loss in mice. *Chin Med J (Engl)* 2007;120(14):1236-1240.
- (201) Kitahara T, Li HS, Balaban CD. Changes in transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) mRNA expression in the mouse inner ear ganglia after kanamycin challenge. *Hear Res* 2005;201(1-2):132-144.
- (202) Kitahara T, Li-Korotky HS, Balaban CD. Regulation of mitochondrial uncoupling proteins in mouse inner ear ganglion cells in response to systemic kanamycin challenge. *Neuroscience* 2005;135(2):639-653.
- (203) Shimizu Y, Hakuba N, Hyodo J, Taniguchi M, Gyo K. Kanamycin ototoxicity in glutamate transporter knockout mice. *Neurosci Lett* 2005;380(3):243-246.
- (204) Evans EF, Klinke R. The effects of intracochlear and systemic furosemide on the properties of single cochlear nerve fibres in the cat. *J Physiol* 1982;331:409-427.
- (205) Santos-Sacchi J, Wu M, Kakehata S. Furosemide alters nonlinear capacitance in isolated outer hair cells. *Hear Res* 2001;159(1-2):69-73.
- (206) Ylikoski J. Correlative studies on the cochlear pathology and hearing loss in guinea-pigs after intoxication with ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol Suppl* 1974;326:1-62.
- (207) Fernandes VT, Lin VY. Development of an ototoxicity model in the adult CBA/CAJ mouse and determination of a golden window of corticosteroid intervention for otoprotection. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;43:12-0216-43-12.
- (208) Guthrie OW. Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology* 2008;249(2-3):91-96.
- (209) Henry KR, Chole RA, McGinn MD, Frush DP. Increased ototoxicity in both young and old mice. *Arch Otolaryngol* 1981;107(2):92-95.
- (210) Poirrier AL, Van den Ackerveken P, Kim TS, Vandenbosch R, Nguyen L, Lefebvre PP, et al. Ototoxic drugs: difference in sensitivity between mice and guinea pigs. *Toxicol Lett* 2010;193(1):41-49.
- (211) Ylikoski J, Wersall J, Bjorkroth B. Degeneration of neural elements in the cochlea of the guinea-pig after damage to the organ of Corti by ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol Suppl* 1974;326:23-41.
- (212) Webster M, Webster DB. Spiral ganglion neuron loss following organ of Corti loss: a quantitative study. *Brain Res* 1981;212(1):17-30.
- (213) Xu SA, Shepherd RK, Chen Y, Clark GM. Profound hearing loss in the cat following the single co-administration of kanamycin and ethacrynic acid. *Hear Res* 1993;70(2):205-215.

- (214) Dodson HC. Loss and survival of spiral ganglion neurons in the guinea pig after intracochlear perfusion with aminoglycosides. *J Neurocytol* 1997;26(8):541-556.
- (215) Leake PA, Rebscher SJ. Anatomical considerations and long-term effects of electrical stimulation. En: Zeng F, Popper AN, Fay RR, editors. *Cochlear Implants: Auditory Prostheses and Electric Hearing* New York, NY: Springer; 2004. p. 101-148.
- (216) Zilberstein Y, Liberman MC, Corfas G. Inner hair cells are not required for survival of spiral ganglion neurons in the adult cochlea. *J Neurosci* 2012;32(2):405-410.
- (217) Nourski KV, Miller CA, Hu N, Abbas PJ. Co-administration of kanamycin and ethacrynic acid as a deafening method for acute animal experiments. *Hear Res* 2004;187(1-2):131-133.
- (218) Aran JM, Darrouzet J. Observation of click-evoked compound VIII nerve responses before, during, and over seven months after kanamycin treatment in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 1975;79(1-2):24-32.
- (219) Klis SF, O'Leary SJ, Hamers FP, De Groot JC, Smoorenburg GF. Reversible cisplatin ototoxicity in the albino guinea pig. *Neuroreport* 2000;11(3):623-626.
- (220) Suzuki M, Ushio M, Yamasoba T. Time course of apoptotic cell death in guinea pig cochlea following intratympanic gentamicin application. *Acta Otolaryngol* 2008;128(7):724-731.
- (221) Hoffer ME, Allen K, Kopke RD, Weisskopf P, Gottshall K, Wester D. Transtympanic versus sustained-release administration of gentamicin: kinetics, morphology, and function. *Laryngoscope* 2001;111(8):1343-1357.
- (222) Hellstrom SO. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;119(5):556-558.
- (223) Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;117(5):438-447.
- (224) Kim M, Do KH, Kim KS. Isosorbide concentration in perilymph of the Guinea pig after oral administration versus that after round window perfusion. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2014;7(4):281-285.
- (225) Takeda T, Takeda S, Kakigi A, Okada T, Nishioka R, Taguchi D. A comparison of dehydration effects of V2-antagonist (OPC-31260) on the inner ear between systemic and round window applications. *Hear Res* 2006;218(1-2):89-97.
- (226) Sheppard WM, Wanamaker HH, Pack A, Yamamoto S, Slepecky N. Direct round window application of gentamicin with varying delivery vehicles: a comparison of ototoxicity. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131(6):890-896.
- (227) Jero J, Tseng CJ, Mhatre AN, Lalwani AK. A surgical approach appropriate for targeted cochlear gene therapy in the mouse. *Hear Res* 2001;151(1-2):106-114.

- (228) Goycoolea MV. The round window membrane under normal and pathological conditions. *Acta Otolaryngol Suppl* 1992;493:43-55.
- (229) Kimura RS, Iverson NA, Southard RE. Selective lesions of the vestibular labyrinth. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988;97(6 Pt 1):577-584.
- (230) Husmann KR, Morgan AS, Girod DA, Durham D. Round window administration of gentamicin: a new method for the study of ototoxicity of cochlear hair cells. *Hear Res* 1998;125(1-2):109-119.
- (231) Huang G, Chen X, Jiang H. Effects of NasoPore packing in the middle ear cavity of the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;145(1):131-136.
- (232) Hellstrom S, Salen B, Stenfors LE. Absorbable gelatin sponge (Gelfoam) in otosurgery: one cause of undesirable postoperative results? *Acta Otolaryngol* 1983;96(3-4):269-275.
- (233) Doyle-Kelly W. Behaviour of absorbable gelatine sponge in the animal middle ear. *J Laryngol Otol* 1961;75:152-166.
- (234) Liening DA, Lundy L, Silberberg B, Finstuen K. A comparison of the biocompatibility of three absorbable hemostatic agents in the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;116(4):454-457.
- (235) Bahadir O, Aydin S, Caylan R. The effect on the middle-ear cavity of an absorbable gelatine sponge alone and with corticosteroids. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(1):19-23.
- (236) Park AH, Jackson A, Hunter L, McGill L, Simonsen SE, Alder SC, et al. Cross-linked hydrogels for middle ear packing. *Otol Neurotol* 2006;27(8):1170-1175.
- (237) Chen Z, Ulfendahl M, Ruan R, Tan L, Duan M. Protection of auditory function against noise trauma with local caroverine administration in guinea pigs. *Hear Res* 2004;197(1-2):131-136.
- (238) Dodson HC, Mohuiddin A. Response of spiral ganglion neurones to cochlear hair cell destruction in the guinea pig. *J Neurocytol* 2000;29(7):525-537.
- (239) Maniu A, Perde-Schrepler M, Cosgarea M. Protective effect of L-N-acetylcysteine against gentamycin ototoxicity in the organ cultures of the rat cochlea. *Rom J Morphol Embryol* 2011;52(1):159-164.
- (240) Ye LF, Tao ZZ, Hua QQ, Xiao BK, Zhou XH, Li J, et al. Protective effect of melatonin against gentamicin ototoxicity. *J Laryngol Otol* 2009;123(6):598-602.
- (241) Ojano-Dirain CP, Antonelli PJ. Prevention of gentamicin-induced apoptosis with the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone. *Laryngoscope* 2012;122(11):2543-2548.

- (242) Simsek G, Tokgoz SA, Vuralkan E, Caliskan M, Besalti O, Akin I. Protective effects of resveratrol on cisplatin-dependent inner-ear damage in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013;270(6):1789-1793.
- (243) Bas E, Van De Water TR, Gupta C, Dinh J, Vu L, Martinez-Soriano F, et al. Efficacy of three drugs for protecting against gentamicin-induced hair cell and hearing losses. *Br J Pharmacol* 2012;166(6):1888-1904.
- (244) Luo J, Xu L. Distribution of gentamicin in inner ear after local administration via a chitosan glycerophosphate hydrogel delivery system. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2012;121(3):208-216.
- (245) Wagner N, Caye-Thomasen P, Laurell G, Bagger-Sjoberg D, Thomsen J. Cochlear hair cell loss in single-dose versus continuous round window administration of gentamicin. *Acta Otolaryngol* 2005;125(4):340-345.
- (246) Umemura K, Kohno Y, Matsuno H, Uematsu T, Nakashima M. A new model for photochemically induced thrombosis in the inner ear microcirculation and the use of hearing loss as a measure for microcirculatory disorders. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1990;248(2):105-108.
- (247) Sprung J, Bourke DL, Contreras MG, Warner ME, Findlay J. Perioperative hearing impairment. *Anesthesiology* 2003;98(1):241-257.
- (248) Cederholm JM, Froud KE, Wong AC, Ko M, Ryan AF, Housley GD. Differential actions of isoflurane and ketamine-based anaesthetics on cochlear function in the mouse. *Hear Res* 2012;292(1-2):71-79.
- (249) Ruebhausen MR, Brozoski TJ, Bauer CA. A comparison of the effects of isoflurane and ketamine anesthesia on auditory brainstem response (ABR) thresholds in rats. *Hear Res* 2012;287(1-2):25-29.
- (250) Alvarado JC, Fuentes-Santamaria V, Jareno-Flores T, Blanco JL, Juiz JM. Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: a study in Wistar rats. *Neurosci Res* 2012;73(4):302-311.
- (251) Sanford TD, Colby ED. Effect of xylazine and ketamine on blood pressure, heart rate and respiratory rate in rabbits. *Lab Anim Sci* 1980;30(3):519-523.
- (252) Schlenther D, Voss C, Kossel M. Influence of ketamine-xylazine anaesthesia on cubic and quadratic high-frequency distortion-product otoacoustic emissions. *J Assoc Res Otolaryngol* 2014;15(5):695-705.
- (253) Choi J, Chang J, Jun HJ, Im GJ, Chae SW, Lee SH, et al. Protective role of edaravone against neomycin-induced ototoxicity in zebrafish. *J Appl Toxicol* 2014;34(5):554-561.
- (254) Ojano-Dirain CP, Antonelli PJ, Le Prell CG. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ reduces gentamicin-induced ototoxicity. *Otol Neurotol* 2014;35(3):533-539.

- (255) Kahya V, Ozucer B, Dogan R, Meric A, Yuksel M, Gedikli O, et al. Pomegranate extract: a potential protector against aminoglycoside ototoxicity. *J Laryngol Otol* 2014;128(1):43-48.
- (256) Fetoni AR, Eramo SL, Rolesi R, Troiani D, Paludetti G. Antioxidant treatment with coenzyme Q-ter in prevention of gentamycin ototoxicity in an animal model. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2012;32(2):103-110.
- (257) Feldman L, Sherman RA, Weissgarten J. N-acetylcysteine use for amelioration of aminoglycoside-induced ototoxicity in dialysis patients. *Semin Dial* 2012;25(5):491-494.
- (258) Yang TH, Young YH, Liu SH. EGb 761 (*Ginkgo biloba*) protects cochlear hair cells against ototoxicity induced by gentamicin via reducing reactive oxygen species and nitric oxide-related apoptosis. *J Nutr Biochem* 2011;22(9):886-894.
- (259) Le Prell CG, Ojano-Dirain C, Rudnick EW, Nelson MA, DeRemer SJ, Prieskorn DM, et al. Assessment of nutrient supplement to reduce gentamicin-induced ototoxicity. *J Assoc Res Otolaryngol* 2014;15(3):375-393.
- (260) Bao J, Hungerford M, Luxmore R, Ding D, Qiu Z, Lei D, et al. Prophylactic and therapeutic functions of drug combinations against noise-induced hearing loss. *Hear Res* 2013;304:33-40.
- (261) Gilles A, Ihtijarevic B, Wouters K, Van de Heyning P. Using prophylactic antioxidants to prevent noise-induced hearing damage in young adults: a protocol for a double-blind, randomized controlled trial. *Trials* 2014;15:110-6215-15-110.
- (262) Clifford RE, Coleman JK, Balough BJ, Liu J, Kopke RD, Jackson RL. Low-dose D-methionine and N-acetyl-L-cysteine for protection from permanent noise-induced hearing loss in chinchillas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;145(6):999-1006.
- (263) Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(6):493-506.
- (264) Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* 2012;148(3):421-433.
- (265) Tennen RI, Michishita-Kioi E, Chua KF. Finding a target for resveratrol. *Cell* 2012;148(3):387-389.
- (266) Nwachukwu JC, Srinivasan S, Bruno NE, Parent AA, Hughes TS, Pollock JA, et al. Resveratrol modulates the inflammatory response via an estrogen receptor-signal integration network. *Elife* 2014;3:e02057.
- (267) Cai YJ, Fang JG, Ma LP, Yang L, Liu ZL. Inhibition of free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. *Biochim Biophys Acta* 2003;1637(1):31-38.

- (268) Fan X, Mattheis J. Inhibition of oxidative and antioxidative enzymes by trans-resveratrol. *J Food Sci* 2001;66(2):200-203.
- (269) Olgun Y, Kirkim G, Kolatan E, Kiray M, Bagriyanik A, Olgun A, et al. Friend or foe? Effect of oral resveratrol on cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 2014;124(3):760-766.
- (270) Bonabi S, Caelers A, Monge A, Huber A, Bodmer D. Resveratrol protects auditory hair cells from gentamicin toxicity. *Ear Nose Throat J* 2008;87(10):570-573.
- (271) Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989;6(6):593-597.
- (272) Prescott LF, Illingworth RN, Critchley JA, Stewart MJ, Adam RD, Proudfoot AT. Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br Med J* 1979;2(6198):1097-1100.
- (273) Mazzon E, Britti D, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2001;424(1):75-83.
- (274) Arstall MA, Yang J, Stafford I, Betts WH, Horowitz JD. N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects. *Circulation* 1995;92(10):2855-2862.
- (275) Weinbroum AA, Rudick V, Ben-Abraham R, Karchevski E. N-acetyl-L-cysteine for preventing lung reperfusion injury after liver ischemia-reperfusion: a possible dual protective mechanism in a dose-response study. *Transplantation* 2000;69(5):853-859.
- (276) Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 2000;343(3):180-184.
- (277) Tokgoz B, Ucar C, Kocyigit I, Somdas M, Unal A, Vural A, et al. Protective effect of N-acetylcysteine from drug-induced ototoxicity in uraemic patients with CAPD peritonitis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(12):4073-4078.
- (278) Okur E, Kilinc M, Yildirim I, Kilic MA, Tolun FI. Effect of N-acetylcysteine on carboplatin-induced ototoxicity and nitric oxide levels in a rat model. *Laryngoscope* 2007;117(12):2183-2186.
- (279) Kopke RD, Jackson RL, Coleman JK, Liu J, Bielefeld EC, Balough BJ. NAC for noise: from the bench top to the clinic. *Hear Res* 2007;226(1-2):114-125.
- (280) Coleman JK, Kopke RD, Liu J, Ge X, Harper EA, Jones GE, et al. Pharmacological rescue of noise induced hearing loss using N-acetylcysteine and acetyl-L-carnitine. *Hear Res* 2007;226(1-2):104-113.

- (281) Feghali JG, Liu W, Van De Water TR. L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *Laryngoscope* 2001;111(7):1147-1155.
- (282) Zahid M, Saeed M, Beseler C, Rogan EG, Cavalieri EL. Resveratrol and N-acetylcysteine block the cancer-initiating step in MCF-10F cells. *Free Radic Biol Med* 2011;50(1):78-85.
- (283) Columbaro M, Ravera S, Capanni C, Panfoli I, Cuccarolo P, Stroppiana G, et al. Treatment of FANCA cells with resveratrol and N-acetylcysteine: a comparative study. *PLoS One* 2014;9(7):e104857.
- (284) Giardina S, Michelotti A, Zavattini G, Finzi S, Ghisalberti C, Marzatico F. Efficacy study in vitro: assessment of the properties of resveratrol and resveratrol + N-acetyl-cysteine on proliferation and inhibition of collagen activity. *Minerva Ginecol* 2010;62(3):195-201.
- (285) Buur JL, Diniz PP, Roderick KV, KuKanich B, Tegzes JH. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine after oral and intravenous administration to healthy cats. *Am J Vet Res* 2013;74(2):290-293.
- (286) Popat R, Plesner T, Davies F, Cook G, Cook M, Elliott P, et al. A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and or refractory multiple myeloma. *Br J Haematol* 2013;160(5):714-717.
- (287) Mohan S, Smyth BJ, Namin A, Phillips G, Gratton MA. Targeted amelioration of cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;151(5):836-839.
- (288) Kim HJ, Lee JH, Kim SJ, Oh GS, Moon HD, Kwon KB, et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J Neurosci* 2010;30(11):3933-3946.
- (289) Wood JW, Bas E, Gupta C, Selman Y, Eshraghi A, Telischi FF, et al. Otoprotective properties of mannitol against gentamicin induced hair cell loss. *Otol Neurotol* 2014;35(5):e187-94.
- (290) Kim J, Cho HJ, Sagong B, Kim SJ, Lee JT, So HS, et al. Alpha-lipoic acid protects against cisplatin-induced ototoxicity via the regulation of MAPKs and proinflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;449(2):183-189.
- (291) Kim SJ, Um JY, Kim SH, Hong SH. Protective effect of rosmarinic acid is through regulation of inflammatory cytokine in cadmium-induced ototoxicity. *Am J Chin Med* 2013;41(2):391-404.
- (292) Uchiyama S, Shimizu T, Shirasawa T. CuZn-SOD deficiency causes ApoB degradation and induces hepatic lipid accumulation by impaired lipoprotein secretion in mice. *J Biol Chem* 2006;281(42):31713-31719.

- (293) Muller FL, Song W, Liu Y, Chaudhuri A, Pieke-Dahl S, Strong R, et al. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* 2006;40(11):1993-2004.
- (294) Keithley EM, Canto C, Zheng QY, Wang X, Fischel-Ghodsian N, Johnson KR. Cu/Zn superoxide dismutase and age-related hearing loss. *Hear Res* 2005;209(1-2):76-85.
- (295) Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3289-3303.
- (296) Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF, Jr, Lei XG. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr* 1998;128(7):1070-1076.
- (297) Zhu JH, Lei XG. Lipopolysaccharide-induced hepatic oxidative injury is not potentiated by knockout of GPX1 and SOD1 in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;404(1):559-563.
- (298) Lubos E, Mahoney CE, Leopold JA, Zhang YY, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 modulates lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression in endothelial cells by altering CD14 expression. *FASEB J* 2010;24(7):2525-2532.
- (299) Coling D, Chen S, Chi LH, Jamesdaniel S, Henderson D. Age-related changes in antioxidant enzymes related to hydrogen peroxide metabolism in rat inner ear. *Neurosci Lett* 2009;464(1):22-25.
- (300) Kil J, Pierce C, Tran H, Gu R, Lynch ED. Ebselen treatment reduces noise induced hearing loss via the mimicry and induction of glutathione peroxidase. *Hear Res* 2007;226(1-2):44-51.
- (301) Utomo A, Jiang X, Furuta S, Yun J, Levin DS, Wang YC, et al. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279(42):43522-43529.
- (302) Peng DF, Razvi M, Chen H, Washington K, Roessner A, Schneider-Stock R, et al. DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma. *Gut* 2009;58(1):5-15.
- (303) Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM. Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Science* 2009;324(5932):1284-1287.
- (304) Nguyen VD, Saaranen MJ, Karala AR, Lappi AK, Wang L, Raykhel IB, et al. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *J Mol Biol* 2011;406(3):503-515.

8. ANEXO

ORIGINAL RESEARCH—OTOLOGY AND NEUROTOLOGY

Direct drug application to the round window: A comparative study of ototoxicity in rats

Silvia Murillo-Cuesta, PhD,* Fernando García-Alcántara, MD,* Elena Vacas, Jon Alexander Sistiaga, MD, Guadalupe Camarero, PhD, Isabel Varela-Nieto, PhD, and Teresa Rivera, MD, PhD, Madrid, Spain

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To assess the validity of inducing ototoxicity in rats by applying a sponge soaked in kanamycin and furosemide on the round window.

STUDY DESIGN: Basic, randomized, nonblind experimental study.

SETTING: Animal models of cochlear damage and reliable methods of local drug delivery are fundamental to study hearing loss and to design new therapies.

SUBJECTS AND METHODS: Four experimental groups of six Wistar rats with different methods of drug administration were used: (1) injection of subcutaneous kanamycin (400 mg/kg) and intravenous furosemide (100 mg/kg); (2) local application of a sponge soaked in saline close to the round window; (3) animals for which the sponge was soaked in a solution containing kanamycin (200 mg/mL) and furosemide (50 mg/mL); and (4) sham-operated rats. The tympanic bulla was exposed using a ventral approach, and a bullostomy was performed to visualize the round window membrane. Cochlear function was assessed by measuring the auditory brainstem response, and hearing thresholds in response to click and tone burst stimuli were determined as peak and interpeak latencies. At the end of the study, cochlear histology was analyzed.

RESULTS: Systemic administration of kanamycin and furosemide induced profound hearing loss and severe hair cell damage. Local delivery of these ototoxic drugs caused comparable damage but avoided the systemic side effects of the drug. Sham-operated and saline control animals did not experience functional alterations.

CONCLUSION: Situating a sponge soaked in kanamycin and furosemide on the round window membrane through the ventral approach is a reliable method to provoke local ototoxicity in rats.

© 2009 American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery Foundation. All rights reserved.

Sensorineural hearing loss is a common condition that seriously adversely affects quality of life. Age, noise, ototoxic drugs, and genetic defects are common causes of deafness, ultimately produced by damage to sensory hair

cells, which do not regenerate in mammals. No curative treatments are available for hearing loss, and several therapies are currently under research, including growth factors; anti-apoptotic, anti-inflammatory or antioxidant drugs, aimed at promoting cell survival and preventing permanent cell damage; and stem cells to renew damaged hair cells.¹

Reproducible and reliable animal models of local cochlear damage are needed to evaluate the effectiveness of new therapies, as well as to develop surgical techniques for local cochlear drug delivery. Systemic administration of high doses of ototoxic substances, mainly aminoglycosides, damages both ears and is limited by its adverse effects and by the potentially misleading actions of the drugs on other organs. By contrast, local administration minimizes secondary effects and allows cochlear damage to be induced in a single ear, leaving the contralateral ear as an intra-animal control.

Although not well characterized in genetic terms, rodents such as guinea pigs and chinchillas have been the preferred models to study local aminoglycoside-induced hearing loss, mainly because their size and anatomical characteristics facilitate cochlear surgery.^{2,3} By contrast, the rat genome has been sequenced and it presents important anatomical and physiological similarities to humans.⁴ The classical retroauricular surgical technique described in guinea pigs is difficult to perform in rats because of their smaller size and deeper position of the tympanic bulla, increasing the risk of cochlear damage during surgery.^{5,6} Therefore, the ventral approach is likely to be a more conservative surgical procedure in this species.^{7,8} However, transtympanic administration of ototoxic drugs without delivery systems does not ensure that reproducible doses reach the round window, and usually multiple injections are required to induce measurable damage.⁹ The use of vehicles such as gelatin or fibrin sponges placed on the round window should provide more reproducible patterns of damage.¹⁰

Here we present an experimental model of local ototoxicity in rats through the ventral approach to the tympanic bulla and direct application of kanamycin and furosemide to

Received April 24, 2009; revised July 2, 2009; accepted July 28, 2009.

*These authors contributed equally to this work.

the round window using a gelatin sponge as the vehicle. This surgical method was compared with systemic injection of the same drugs. Hearing function was assessed by measuring auditory-evoked potentials; cochlear histology was also performed to evaluate inner ear damage.

MATERIALS AND METHODS

Animal Handling and Experimental Design

The study was carried out on male Wistar rats (8 weeks old, 250-300 g) distributed in four experimental groups. In the first group, six rats were systemically injected with kanamycin and furosemide and three others were injected with saline. Group 2 included six sham-operated control rats (2a), six rats in which a saline-soaked gelatin sponge was placed on the round window membrane (2b), and six in which a sponge soaked in the ototoxic drugs was placed on the round window membrane (2c). The animals were sacrificed at the end of the study and the cochlear histology analyzed. The animals were controlled according to recommendations of the Federation of Laboratory Animal Science Associations on health monitoring, animal care, and the administration of substances. All experiments complied with local and European legislation regarding animal use and experimentation, and they were approved by the CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) Animal Care and Use Committee.

Surgical Procedure

The rats in group 2 were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (Imalgene, Merial, Spain; 100 mg/kg), xylazine (Rompun 2%, Bayer, Spain; 10 mg/kg), and buprenorphine (Buprex, Shering-Plough, Spain; 0.01 mg/kg). After loss of the withdrawal reflex, rats were placed on a heated pad, their neck-hair was shaved, and the skin was cleaned with antiseptic. The surgical procedure to expose the round window was adapted from previous reports,^{7,8} and was performed on the right ear using a magnifying glass

(Leitz Wild M715, Switzerland), leaving the left ear as an intra-animal control. A longitudinal incision was made from the mandibular angle to the tip of the sternum. The subcutaneous flap was raised and a surgical field with the masseter muscle, sternocleidomastoid muscle, and submandibular gland was visualized. The submandibular gland was retracted medially and the digastric muscle exposed, sectioning and elevating the posterior insertion of this muscle to reveal the bony tympanic bulla, the main trunk of the facial nerve, and the hypoglossal nerve (Fig 1A). A bullosotomy was performed at the posterolateral aspect using a small hook, and the opening was widened with otologic microforceps. At this point, the round window and the stapedial artery became clearly visible (Fig 1B) and the soaked sponge could be placed on the round window. The bullosotomy was closed with dental cement, the soft tissues were put back in place, and the skin was sutured with silk.

Drug Administration

Systemic ototoxicity was provoked by injection of kanamycin (400 mg/kg body weight [BW]) in subcutaneous tissue and furosemide (100 mg/kg BW) into the caudal vein. This procedure was first described in the guinea pig using ethacrynic acid¹¹ or furosemide¹² as the loop diuretic, and it was later adapted to mice, producing the loss of almost all cochlear cells.¹³ For local ototoxicity, a highly concentrated solution of kanamycin (200 mg/mL, Fagron Ibérica, Spain) and furosemide (50 mg/mL, Fluka) was prepared in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) by gently heating and stirring, adding 1 N NaOH until the solution reached pH 8.5. This procedure enabled higher concentrations of ototoxic drugs to be obtained than that commercially available. Gelatin sponge was soaked in 50 μ L of this solution (ie, 10 mg kanamycin and 2.5 mg furosemide) and located close to the round window.

Evaluation of Auditory Function

Auditory function was evaluated by recording auditory brainstem responses (ABR) with a TDT evoked potential workstation (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL), as

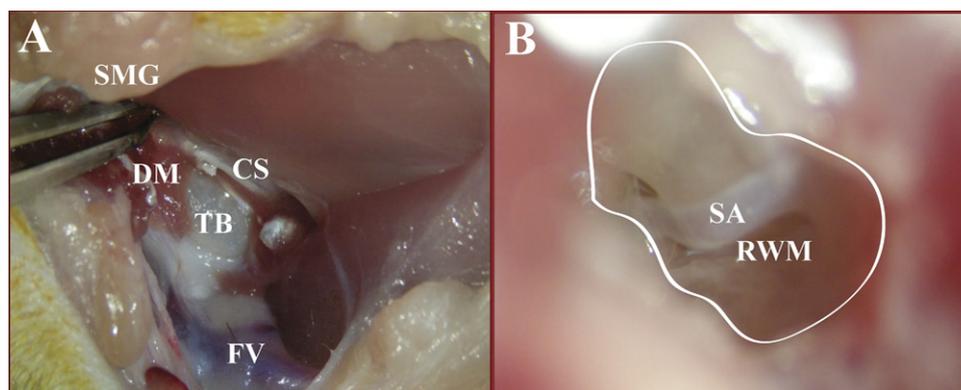


Figure 1 Surgical procedure. (A) Submandibular gland (SMG), digastric muscle (DM), tympanic bulla (TB), carotid sheath (CS), and facial vein (FV) exposed. (B) Round window niche (white line) visualized after bullosotomy: the stapedial artery (SA) runs over the round window membrane (RWM).

Table 1
Click ABR thresholds

Experimental group	ABR threshold (mean \pm SD, dB SPL)	
	Baseline	Postprocedure
1 (n = 6)	33 \pm 4	83 \pm 12* (n = 3)
2a (n = 6)	31 \pm 2	31 \pm 2
2b (n = 6)	32 \pm 3	34 \pm 4
2c (n = 6)	32 \pm 3	63 \pm 12*

Rats treated with ototoxic drugs show threshold shifts after procedure, whereas control groups maintain baseline values.

ABR, auditory brainstem response.

* $P < 0.01$.

reported previously.¹⁴ Briefly, rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine and xylazine, and they were placed on a heated water-bed (Gaymar, NY) in a sound-proof cage. Three electrodes were positioned subcutaneously in standard positions.¹⁴ Two different sound stimuli—click (0.1 ms) and tone burst (5 ms duration, 2.5 ms rise and decay with no plateau)—were generated with TDT SigGenRP software and delivered with an open field tweeter at a rate of 30 and 50 stimuli per second, respectively. ABR were recorded after 1000 repetitions of each stimulus in 5- to 10-dB increments from 90 to 20 dB SPL. The auditory thresholds, the peak latencies (PL) of I to V, and the interpeak latencies (IPL) were determined after click stimulation. Audiograms were obtained from ABR thresholds for tone burst stimuli (4, 8, 16, 28, and 40 kHz), thus providing information about the condition of the organ of Corti in different regions from base to apex. Hearing function was evaluated at the beginning of the study and one week after surgery. Rats with an initial threshold above 35 dB SPL were excluded.

Histopathology

The cochleas were removed two weeks after surgery, as described previously.¹⁴ Briefly, the rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbiturate (Vetoquinol, Spain) and then transcardially perfused with four percent paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) in pH 7.5 0.1 M PBS. After extracting the temporal bones, the cochlea was dissected out and placed in fresh fixative for 12 hours. The cochleas were then washed with PBS, decalcified in a chemical bone decalcifier (Eurobio, Paris, France), and paraffin embedded. Sections (5 μ m) were obtained parallel to the modiolus with an RM2155 Leica microtome and stained with hematoxylin–eosin. The cochlear morphology and cytoarchitecture were studied on a Zeiss Diaplan microscope coupled to a Leitz digital camera (Leitz DFC300 FXC).

Statistics

Nonparametric tests (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney *U* test) were performed using SPSS 15.0 software (SPSS,

Chicago, IL). The data are presented as the mean \pm SD, and the results were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Systemic Treatment with Kanamycin and Furosemide Causes Profound Deafness and Large-Scale Hair Cell Loss

At the beginning of the study, there were no significant differences in any of the ABR parameters analyzed among the four experimental groups; hearing threshold in response to click stimulus was \sim 30 dB SPL (31 \pm 3 dB SPL).

A single injection of subcutaneous kanamycin and intravenous furosemide induced a significant severe hearing loss in all the animals of group 1 ($P < 0.01$). Half the animals (3/6) experienced a mean threshold shift of \sim 50 dB SPL (48 \pm 12 dB SPL) one week after injection. No evoked responses were detected in the other three rats that received a systemic injection, even at maximal stimulation (a hearing threshold $>$ 90 dB SPL) (Table 1), and thus, these animals were not used for click threshold and peak latency determination. The ABR thresholds in response to 4- to 40-kHz tone burst stimuli were also significantly shifted after systemic injections when compared with the baseline values ($P < 0.01$, n = 3) (Fig 2). In addition, the peak I latency (PL I) increased by approximately 0.25 ms after systemic injection when compared with baseline measurements ($P < 0.05$, n = 3). This delay spread along the auditory pathway, but it did not significantly affect the IPLs I-II and II-IV, suggesting that the damage was restricted to the cochlea rather than affecting the central auditory pathway (Table 2). A parallel group of three rats systemically injected with saline had no differences in the parameters studied at any time point (data not shown).

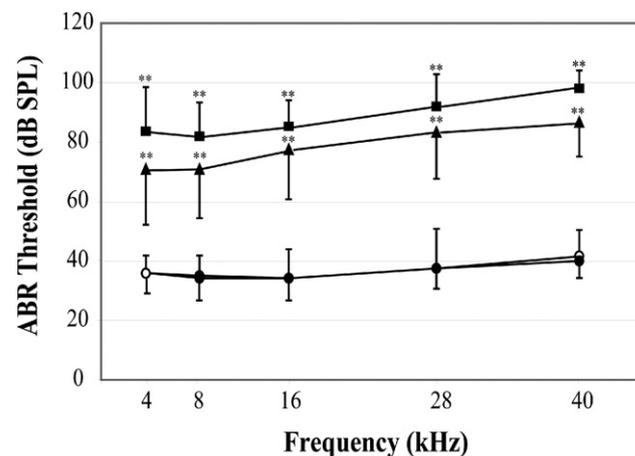


Figure 2 Audiogram postsurgery. Basal thresholds increased with systemic (square) and local (triangle) treatment, but not sham (open circle) and saline controls (filled circle). ** $P < 0.01$. ABR, auditory brainstem response.

Table 2
Peak and interpeak latencies

Group	Moment	PL I	PL II	PL III	PL IV	PL V	IPL I-II	IPL II-IV
1 (n = 6)	Baseline	1.24 ± 0.05	2.20 ± 0.08	2.98 ± 0.25	3.75 ± 0.13	4.79 ± 0.35	0.96 ± 0.08	1.55 ± 0.10
	Postprocedure (n = 3)	1.51 ± 0.25*	2.32 ± 0.29	3.25 ± 0.61	4.20 ± 0.40*	5.32 ± 0.45	0.90 ± 0.06	1.57 ± 0.19
2a (n = 6)	Baseline	1.25 ± 0.02	2.25 ± 0.05	2.94 ± 0.18	3.77 ± 0.07	4.70 ± 0.22	0.99 ± 0.06	1.52 ± 0.07
	Postprocedure	1.25 ± 0.04	2.21 ± 0.07	2.84 ± 0.08	3.72 ± 0.22	4.57 ± 0.20	0.97 ± 0.05	1.50 ± 0.17
2b (n = 6)	Baseline	1.29 ± 0.03	2.30 ± 0.04	2.99 ± 0.03	3.83 ± 0.06	4.75 ± 0.25	1.01 ± 0.06	1.53 ± 0.07
	Postprocedure	1.29 ± 0.05	2.30 ± 0.08	3.00 ± 0.17	3.88 ± 0.07	4.89 ± 0.13	1.01 ± 0.06	1.58 ± 0.03
2c (n = 6)	Baseline	1.29 ± 0.03	2.25 ± 0.08	2.91 ± 0.08	3.80 ± 0.07	4.77 ± 0.22	0.96 ± 0.09	1.55 ± 0.03
	Postprocedure	1.46 ± 0.22*	2.52 ± 0.20†	3.33 ± 0.22	4.08 ± 0.29	5.12 ± 0.46	1.06 ± 0.09	1.56 ± 0.12

Values are ms (mean ± SD).

Ototoxic treatment increases PL I compared with baseline values without affecting the IPLs.

IPL, interpeak latency; PL, peak latency.

* $P < 0.05$, † $P < 0.01$.

As expected, the morphological analysis demonstrated an almost complete loss of hair cells in the organ of Corti, with signs of a flat epithelium (see Fig 3A, from a rat treated locally with saline, and Fig 3B, from a rat treated systemically with kanamycin and furosemide). There was also an appreciable loss of neurons in the spiral ganglion all along the cochlear turns (data not shown).

High mortality rates were observed with this protocol, especially when the intravenous injection was performed with the animal under general anesthesia.

Ventral Bullostomy Does Not Affect Hearing

Hearing function was not significantly affected by the surgical procedure described. In the sham-operated group, mean ABR thresholds one week after surgery were similar to that at the baseline, in response to click stimulus (31 ± 2 dB SPL, $n = 6$) (Table 1) and pure tones in the 4- to 40-kHz range (Fig 2). Likewise, other parameters were not significantly altered, including the PLs and IPLs (Table 2), as well as the morphology of the organ of Corti and spiral ganglion (data not shown).

Similarly, the ABR parameters in rats in which a saline-soaked sponge was placed on the round window did not differ from those of the controls, indicating that the presence of the delivery vehicle did not significantly affect hearing thresholds or latencies (Tables 1 and 2). Indeed, no significant differences were noted between the basal audiograms in response to frequencies from 4 to 40 kHz and those obtained after bullostomy (Fig 2). Accordingly, the surgical procedure did not produce obvious alterations in cochlear cytoarchitecture or appreciable hair cell or neuron loss in the spiral ganglion (Figs 3A and D).

Local Administration of Kanamycin and Furosemide Causes Hearing Loss and Hair Cell Damage

Similar effects to those achieved with systemic injection were obtained with lower doses of locally administered

ototoxic drugs. Based on existing pharmacological data regarding the inner ear,^{15,16} it was estimated that five percent to 10 percent of the systemic dose of kanamycin and furosemide would induce similar cochlear damage (ie, 20 and 5 mg/kg BW, respectively). Considering the small volume of the tympanic bulla in rats^{17,18} and the mean body weight of these animals, the gelatin sponge was soaked in 50 μ L of a highly concentrated solution of kanamycin (200 mg/mL) and furosemide (50 mg/mL) in PBS-NaOH (pH 8.5). This solution was specifically prepared for this purpose as it was not available commercially.

A significant threshold shift of ~ 30 dB SPL ($P < 0.01$, $n = 6$, group 2c, baseline 32 ± 3 and postsurgery 63 ± 12 dB SPL) was caused when bullostomy was followed by the application of a concentrated solution of kanamycin and furosemide to the round window (Table 1). Similarly, local ototoxic treatment caused a significant threshold shift at all the frequencies studied ($P < 0.01$, $n = 6$), which was particularly evident in the evoked response to middle- and high-frequency stimuli (16 to 40 kHz) (Fig 2).

Further multiple statistical comparisons of the mean hearing thresholds indicated that one week after surgery there were significant differences in the threshold values of rats that received the ototoxic drugs locally when compared with either the sham-operated (group 2a) or sham-operated plus saline treatment (group 2b) animals ($P < 0.01$, $n = 6$). When compared with systemic injection, local administration of kanamycin and furosemide induced a significantly lower threshold shift ($P < 0.01$, $n = 6$). By contrast, ABR thresholds in response to tone burst stimuli did not differ significantly between systemic and locally treated rats at the frequencies analyzed. Thus, local administration of ototoxic drugs produced less severe but consistent cochlear damage than that caused by the systemic injection.

Local ototoxic drug administration increased all the PLs and IPLs (Table 2). There were statistically significant differences for PL I ($P < 0.05$, $n = 6$) and PL II ($P < 0.01$, $n = 6$) but not IPL I-II and IPL II-IV before and after the

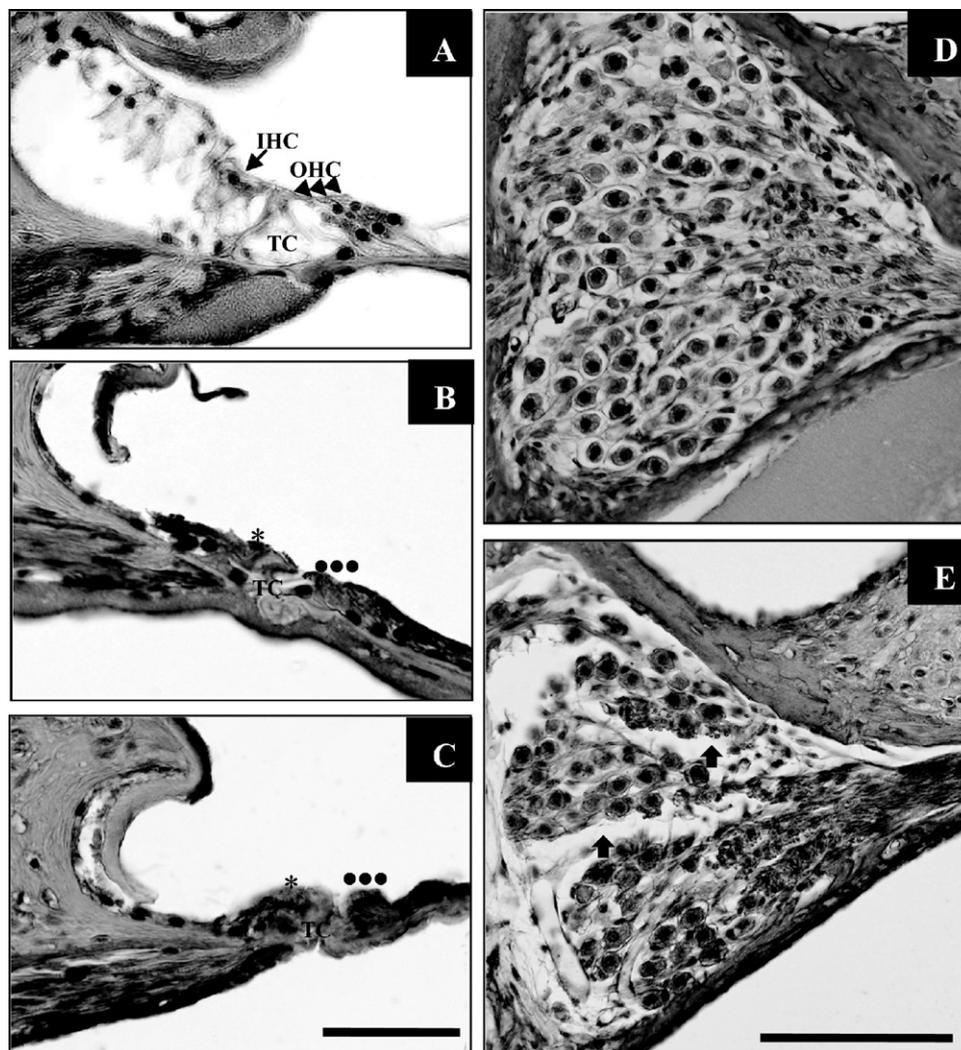


Figure 3 Hair cell and spiral ganglion neuron loss in basal cochlear turns after ototoxic exposure. (A) Control group. *Arrows* indicate inner hair cells (IHC), and *arrowheads* indicate outer hair cells (OHC). TC, tunnel of Corti. (B) Systemic ototoxic treatment. Severe degeneration or absence of IHC (*) and OHC (●●●). Complete collapse of the TC. (C) Local ototoxic treatment. Similar lesions to systemically injected rats. (D) Control group. Spiral ganglion with normal neuronal packing density. (E) Local ototoxic treatment. Decreased neuronal packing density with enlarged intercellular or noncellular spaces (*black arrows*). Scale bar: A-C = 50 μm , D, E = 100 μm .

procedure, indicating that the damage was caused mostly in the peripheral auditory pathway.

The number and disposition of the inner hair cells (IHC) and outer hair cells (OHC) of rats in group 2b was typical of the organ of Corti (Fig 3A), and the neuron-packing density at the spiral ganglion was normal (Fig 3D) and similar to that in sham-operated rats (not shown). By contrast, the basal turn was severely degenerated in cochlear sections from group 2c rats with no IHC and OHC, and there was a complete collapse of the tunnel of Corti (Fig 3C) similar to that observed in group 1 animals (Fig 3B). Damage to the middle and apical turns varied among individuals and ranged from the loss of OHC to the complete loss of hair cells (data not shown). There was also a decrease in the neuronal packing density in the spiral ganglion of rats from group 2c, with enlarged intercellular spaces (Fig 3E).

DISCUSSION

Damage of otic hair cells by ototoxic drugs has been studied in different animal models with the aim of understanding the molecular mechanisms underlying hearing and deafness, and to develop tools for the future study of new therapeutic agents. Here we describe the functional and morphological traits of two complementary rat models of ototoxicity: systemic injection and local application to the round window of the ototoxic drugs kanamycin and furosemide. A ventral surgical approach was performed to gain access to the rat round window, following and adapting previously published procedures.^{7,8,10,19} We confirmed that this surgical approach preserves auditory function, as assessed by ABR evaluation, and cochlear morphology, and that it is associated with low rates of morbidity and mortality.

Most clinical studies involving direct round window administration have been performed with gentamicin, due to its ready pharmacological availability and vestibulotoxic rather than cochleotoxic effects. However, the aim of this study was to develop an animal model of cochlear damage, and therefore, two substances with clear cochleotoxic effects were selected. In combination with the loop diuretic furosemide, the aminoglycoside kanamycin produces bilateral and symmetrical degeneration of the cochlear sensory epithelia, followed by degeneration of cochlear neurons in guinea pigs and Swiss and CBA/Caj mice.^{12,13,20} Here we showed that a single injection of subcutaneous kanamycin (400 mg/kg BW) and intravenous furosemide (100 mg/kg BW) also caused severe hearing loss and cochlear damage in Wistar rats. However, systemic administration of ototoxic drugs at high doses is usually associated with increased mortality rates and secondary effects.

Once the cochleotoxic effect of systemic administration of this combination of drugs to rats was confirmed, the effects of local administration were explored. Intracochlear administration of drugs to animal models has typically been addressed by using two alternative delivery methods: direct injection through the round window membrane or cochleosotomy and intracochlear infusion. Because both procedures have been associated with surgical trauma, inflammation, and hearing loss, the development of a less invasive delivery method was recommended, such as the ventral technique described here. This surgical approach was complemented with the use of a gelatin sponge, an efficient system for local drug administration that presents many advantages over systemic or transtympanic administration.¹⁰ This technique favors the direct and sustained contact of the ototoxic substance with the round window membrane and it maintains the ototoxic drugs in the tympanic bulla, avoiding the loss of solution through the eustachian tube. Another advantage of this procedure over systemic administration is that cochlear damage is restricted to one ear, preserving the contralateral inner ear as an intra-animal control. Although we do not yet know the pharmacokinetics of the ototoxic drug-delivery system described, the data obtained suggest that the drugs are readily and rapidly accessible to the cochlea and that they may more directly affect the basal turns close to the round window. Apical turns are also usually damaged, but in some animals, IHCs and the tunnel of Corti remained intact, in accordance with the weaker effect at low frequencies in the audiograms.

In summary, systemic administration of kanamycin and furosemide produced a profound hypoacusia, coupled with large-scale cochlear damage and severe cellular defects. Therefore, this method provides a paradigm for cellular replacement studies. Alternatively, application of a kanamycin- and furosemide-soaked sponge directly on the round window produced moderate to severe hearing loss and hair cell damage, evident in the basal and medial turns of the cochlea. In addition, this method did not produce systemic toxicity and it preserved the contralateral ear as an intra-

animal control. This protocol represents a paradigm closer to that observed in clinical practice and, as such, it could be useful to study the mechanisms underlying cell death and cell repair, as well as the benefits of growth factor or gene therapy.¹

ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciate the technical assistance of Marina Cabrerizo and Marcos Vigil and the critical comments and support of Julio Contreras, Rafael Cediél, Raquel Martínez, Patricia Lorenzo, Lourdes Rodríguez, and the Non-Invasive Hearing Evaluation Service (<http://www.iib.uam.es/servicios/nine/intro.es.html>).

AUTHOR INFORMATION

From the Instituto de Investigaciones Biomédicas ‘Alberto Sols’, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain (Dr Murillo-Cuesta, Ms Vacas, Drs Camarero and Varela-Nieto); CIBERER (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras) ISC III, Unit 761, Madrid, Spain (Drs Murillo-Cuesta, García-Alcántara, Camarero, Varela-Nieto, and Rivera); and the Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain (Drs García-Alcántara, Sistiaga, and Rivera).

Corresponding author: Teresa Rivera, MD, PhD, Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Carretera de Alcalá-Meco s/n, Alcalá de Henares, 28805 Madrid, Spain.

E-mail address: teresa.rivera@uah.es.

This article was presented at the 2008 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO, Chicago, IL, September 21-24, 2008.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Silvia Murillo-Cuesta, study design, audiological evaluation, data collection, writer; **Fernando García-Alcántara**, study design, surgical procedure, data collection, writer; **Elena Vacas**, assistant to surgical procedure; **Jon Alexander Sistiaga**, surgical procedure; **Guadalupe Camarero**, histological evaluation; **Isabel Varela-Nieto**, project development, study design, data collection, writer; **Teresa Rivera**, project development, study design, data collection, writer.

DISCLOSURES

Competing interests: **Silvia Murillo-Cuesta** held a postdoctoral contract from Fundacion Mutua Madrileña.

Sponsorships: This work was supported by grants from CIBER-Rare Diseases, MICINN (SAF2008-00470), DIGNA Biotech and Fundacion Mutua Madrileña (FMM2007-20070504).

REFERENCES

1. Holley MC. The auditory system, hearing loss and potential targets for drug development. *Drug Discov Today* 2005;10:1269–82.

2. Suzuki M, Ushio M, Yamasoba T. Time course of apoptotic cell death in guinea pig cochlea following intratympanic gentamicin application. *Acta Otolaryngol* 2008;128:724–31.
3. Hoffer ME, Allen K, Kopke RD, et al. Transtympanic versus sustained-release administration of gentamicin: kinetics, morphology, and function. *Laryngoscope* 2001;111:1343–57.
4. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, et al. Genome sequence of the brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004;428:493–521.
5. Sehitoglu MA, Uneri C, Celikoyar MM, et al. Surgical anatomy of the guinea pig middle ear. *Ear Nose Throat J* 1990;69:91–7.
6. Hellstrom SO. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;119:556–8.
7. Pinilla M, Ramirez-Camacho R, Jorge E, et al. Ventral approach to the rat middle ear for otologic research. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124:515–7.
8. Qiu J, Olivius P, Tong B, et al. Ventral approach to rat inner ear preserves cochlear function. *Acta Otolaryngol* 2007;127:240–3.
9. Wanamaker HH, Gruenwald L, Damm KJ, et al. Dose-related vestibular and cochlear effects of transtympanic gentamicin. *Am J Otol* 1998;19:170–9.
10. Sheppard WM, Wanamaker HH, Pack A, et al. Direct round window application of gentamicin with varying delivery vehicles: a comparison of ototoxicity. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:890–6.
11. West BA, Brummett RE, Himes DL. Interaction of kanamycin and ethacrynic acid. Severe cochlear damage in guinea pigs. *Arch Otolaryngol* 1973;98:32–7.
12. Versnel H, Agterberg MJ, de Groot JC, et al. Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res* 2007;231:1–12.
13. Oesterle EC, Campbell S, Taylor RR, et al. Sox2 and JAGGED1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008;9:65–89.
14. Cediel R, Riquelme R, Contreras J, et al. Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *Eur J Neurosci* 2006;23:587–90.
15. Camarero G, Avendaño C, Fernández-Moreno C, et al. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1 deficient mice. *J Neurosci* 2001;21:7630–41.
16. Laurell G, Teixeira M, Sterkers O, et al. Local administration of antioxidants to the inner ear. Kinetics and distribution. *Hear Res* 2002;173:198–209.
17. Salt AN, Ma Y. Quantification of solute entry into cochlear perilymph through the round window membrane. *Hear Res* 2001;154:88–97.
18. Zimmer WM, Rosin DF, Saunders JC. Middle-ear development. VI: structural maturation of the rat conducting apparatus. *Anat Rec* 1994;239:475–84.
19. Jero J, Tseng CJ, Mhatre AN, et al. A surgical approach appropriate for targeted cochlear gene therapy in the mouse. *Hear Res* 2001;151:106–14.
20. Ylikoski J. Correlative studies on the cochlear pathology and hearing loss in guinea-pigs after intoxication with ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol Suppl* 1974;326:1–62.

MANUSCRITO EN PREPARACIÓN PARA LA REVISTA

Journal of Translational Medicine

García-Alcántara F, Murillo-Cuesta S, Martínez-Vega R, Varela-Nieto I, Rivera T.

Protective effect of resveratrol and N-acetylcysteine on kanamycin-furosemide induced ototoxicity in rats.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Rivera T, García-Alcántara F, Sistiaga J, Murillo S, Vacas E, Contreras J, Varela-Nieto I. ***Direct round window drug application and ototoxicity in rats.*** Annual Meeting of American Academy of Otolaryngology. 21-24 Septiembre 2008, Chicago (USA).
- Cediell R, García-Alcántara F, Vacas E, Murillo-Cuesta S, Contreras J, Rivera T, Varela-Nieto I. ***Ototoxic effect of a direct round window application of kanamycine and furosemide in rats.*** 45th Inner Ear Biology Workshop. 21-24 Septiembre 2008, Ferrara (Italia).
- García-Alcántara F, Rivera T, Sistiaga JA, Murillo-Cuesta S, Contreras J, Cediell R, Vacas E, Varela-Nieto I. ***A method for ototoxicity in rats: Direct drug application to the round window.*** Hearing and Deafness Ciberer Workshop. 13-15 Mayo 2009, Valencia (España).
- García-Alcántara F, Murillo-Cuesta S, Martinez Vega R, Contreras J, Sanz L, Varela-Nieto I, Rivera T. ***Systemic treatment with resveratrol and N-acetylcysteine prevents from local ototoxicity from kanamycin and furosemide in rats.*** 50th Inner Ear Biology Workshop. 10-13 Septiembre 2013, Alcalá de Henares, Madrid (España).
- García-Alcántara F, Murillo-Cuesta S, Martinez Vega R, Varela-Nieto I, Rivera T. ***Protective effect of resveratrol and N-acetylcysteine against kanamycin and furosemide – induced ototoxicity and expression of oxidative stress genes in rats.*** 3rd Congress of European ORL-HNS. 3-7 Junio 2015, Praga (República Checa)