

 XV edición  
Premio FIAPAS  
de Investigación en Deficiencias Auditivas  
Área de Sanidad

## “Evaluación de nuevas terapias para la prevención de la hipoacusia neurosensorial”

Teresa Rivera<sup>1,2,3</sup>, Silvia Murillo Cuesta<sup>2,3</sup>,  
Fernando García Alcántara<sup>1,2,3</sup>, Lourdes Rodríguez de la Rosa<sup>2,3</sup>,  
Lorena Sanz<sup>1,2,3</sup> e Isabel Varela Nieto<sup>2,3</sup>

## INTRODUCCIÓN

La hipoacusia o pérdida auditiva es un importante problema de salud pública debido a su elevada prevalencia e impacto en la calidad de vida. En los niños la hipoacusia repercute en la adquisición del lenguaje y en los adultos dificulta la integración social y se asocia con la progresión del deterioro cognitivo.

Existen numerosos factores ambientales que contribuyen a la hipoacusia, destacando el ruido y las sustancias ototóxicas. La hipoacusia por ruido constituye la pérdida auditiva más frecuente tras la presbiacusia y es una importante causa de bajas laborales. Su prevalencia está aumentando significativamente en la población joven por uso de dispositivos de audio. La ototoxicidad es un efecto secundario frecuente asociado a muchos fármacos de uso clínico como los antibióticos, antitumorales, antiinflamatorios o antipalúdicos. El estrés oxidativo y la inflamación son mecanismos patológicos clave en ambas formas de hipoacusia, produciendo daño de las células ciliadas y neuronas del oído interno, así como su muerte por apoptosis. El control de estas rutas mediante sustancias antioxidantes y antiinflamatorias constituye una potente estrategia terapéutica para mantener la homeostasis y evitar la muerte celular.

En la actualidad no existe un tratamiento curativo para la hipoacusia y sólo se dispone de dispositivos como audífonos o implantes cocleares. Resulta esencial la investigación de nuevas terapias preventivas, reparadoras y regeneradoras mediante aproximaciones farmacológicas, genéticas y con células madre y utilizando como herramienta los modelos animales de hipoacusia por ruido u ototóxicos, entre otros.

Presentamos aquí un trabajo de investigación realizado por el Servicio ORL del H.U. Príncipe de Asturias y el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" en el que se evalúan en modelos animales nuevas terapias farmacológicas para la prevención de la hipoacusia neurosensorial. Los objetivos del trabajo son:

- 1 - Estudiar la eficacia de la administración combinada de los antioxidantes, N-acetilcisteína y el resveratrol, para prevenir o atenuar el daño causado por la administración de los ototóxicos kanamicina y furosemida en rata.
- 2 - Estudiar la eficacia de la administración de inhibidores de TGF- $\beta$ , mediador de la respuesta inflamatoria, para prevenir o modular los cambios morfológicos y funcionales de la cóclea en un modelo de daño por exposición al ruido en ratón.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Evaluación de antioxidantes en un modelo de ototoxicidad en rata.

Se emplearon ratas Wistar, macho, de 8 semanas de edad y 250-300 g de peso, mantenidas con dieta estándar y acceso libre al agua, según recomendaciones de FELASA. Toda la experimentación animal se realizó con la aprobación del comité de bioética del CSIC.

Los animales fueron asignados aleatoriamente al grupo problema (n=25) o grupo control (n=19), que recibieron resveratrol (10 mg/kg/día) y N-acetilcisteína (400 mg/kg/día) o suero salino, respectivamente, vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos (*Figura 1*). El segundo día de tratamiento se realizó en todos los animales una bullostomía para depositar sobre la ventana redonda del oído derecho una esponja de gelatina (Gelfoam®) embebida en 75  $\mu$ l de una solución ototóxica (kanamicina 200 mg/ml (Fagron Ibérica, España) y furosemida 50 mg/ml (Fluka)), según procedimientos publicados<sup>1-3</sup>.

La función auditiva se evaluó mediante potenciales evocados auditivos (PEATC) antes del inicio del tratamiento (basal) así como a los 3, 14 y 21 días tras la administración local de ototóxicos, siguiendo protocolos del grupo<sup>4</sup>. La cirugía y los PEATC se realizaron bajo anestesia general inhalatoria con isoflurano y se administró la analgesia perioperatoria adecuada.

Se tomaron muestras de cóclea a los 3 y 21 días tras la administración local de los ototóxicos y se destinaron a análisis histológico y de expresión de genes. Para el estudio de la morfología y citoarquitectura coclear las muestras se fijaron con paraformaldehído, se descalcificaron con EDTA y se incluyeron en parafina, obteniendo secciones de un grosor de 5  $\mu$ m paralelas al modiolo y representativas del ápex, media y base de la cóclea, que se contrastaron con violeta de cresilo al 1 %<sup>5</sup>. Para el análisis transcriptómico las cócleas se extrajeron y conservaron en RNAlater® (ThermoFisher Scientific). Tras la homogeneización y extracción del ARN, se generó ADN complementario mediante transcripción inversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; ThermoFisher Scientific) y se hibridó con un PCR array específico (RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Rat Oxidative Stress; Qiagen)<sup>6</sup>.

### Evaluación de péptidos inhibidores de TGF- $\beta$ en un modelo de hipoacusia inducida por ruido en ratón.

Se emplearon ratones de 2 meses de edad de distintas estirpes (C57BL/6J01aHsd (C57), CBA/Ca01aHsd (CBA) y Hsd01a:MF1 (MF1), Harlan Interfauna Ibérica), mantenidos en condiciones similares a las descritas.

La exposición al ruido se realizó en una cámara diseñada, patentada y validada previamente por el grupo<sup>7,8</sup>. Se estableció el patrón de respuesta al ruido de las tres estirpes para descartar que los efectos observados en los ensayos de tratamiento no fueran debidos al fondo genético, observando un gradiente de sensibilidad C57>MF1>CBA.

El tratamiento con los inhibidores de TGF- $\beta$  se realizó siguiendo procedimientos publicados<sup>9</sup>. P17 es un péptido hidrófilo soluble<sup>10</sup> con una afinidad 100 % por TGF- $\beta$ 1<sup>11</sup> mientras que P144 es hidrófobo, reconoce la región extracelular del receptor tipo III del TGF- $\beta$  e impide su unión con el TGF- $\beta$ 1<sup>12</sup>. Los péptidos se administraron sistémicamente siguiendo diferentes posologías, antes de la exposición al ruido (pretratamiento) o inmediatamente después. Los animales del grupo control recibieron un tratamiento idéntico con el excipiente. También se evaluó la eficacia de los inhibidores tras una única administración local en el oído, siguiendo un procedimiento quirúrgico similar al descrito en rata.

La función auditiva y el estudio histológico se llevaron a cabo mediante los procedimientos de PEATC y evaluación de secciones de parafina mencionados previamente y publicados por el grupo durante la última década<sup>4,13,14</sup>. La valoración de los niveles de transcritos y de proteínas, así como su grado de activación, se realizó mediante retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real (RT-qPCR) y Western blotting respectivamente, siguiendo protocolos del grupo para extraer material genético y de proteínas de muestras de pequeño tamaño con alta eficiencia<sup>15,16</sup>.

El análisis estadístico de los datos de PEATC fue realizado con el software SPSS (IBM), aplicando un modelo mixto lineal para evaluar el efecto del tratamiento en parámetros auditivos (umbrales, latencias y amplitudes) a lo largo del ensayo. Posteriormente se analizaron las diferencias entre los grupos problema y control en cada uno de los momentos definidos en el ensayo, aplicando test no paramétricos o paramétricos según la normalidad de los datos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ . Los datos de expresión génica del *PCR array* se analizaron con el software específico (Quiagen). Tras la normalización de los datos se determinaron aquellos genes diferencialmente expresados entre los animales tratados con resveratrol y N-acetilcisteína y los tratados con salino, así como con la condición control sin ototóxico, en los dos tiempos en estudio (3 y 21 días tras la administración de ototóxico). En el caso de los datos de RT-qPCR y Western blotting se realizaron comparaciones de medias mediante test de Student.

## RESULTADOS

### El tratamiento sistémico con resveratrol y N-acetilcisteína atenúa la hipoacusia inducida por kanamicina y furosemida en rata.

Los umbrales en respuesta a click a los 3 días de la administración de ototóxicos aumentaron significativamente respecto a los valores basales (tratado con salino  $p < 0,01$ ; tratado con resveratrol y N-acetilcisteína,  $p < 0,05$ ) y se mantuvieron elevados a los 14 y 21 días en ambos grupos. La pérdida auditiva fue menor en las ratas tratadas con resveratrol y N-acetilcisteína respecto a las tratadas con suero salino en todos los tiempos, con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) a los 3 días de la administración de ototóxicos, lo que sugiere que el efecto protector estaría ligado a la duración del tratamiento (*Figura 2A*).

De igual manera, la administración local de los ototóxicos incrementó en ambos grupos el umbral auditivo en respuesta a tonos puros, especialmente en las frecuencias más altas (*Figura 2B*). El grupo tratado con resveratrol y N-acetilcisteína presentó umbrales menores que los del tratado con suero salino a lo largo de todo el ensayo, con diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$  para 8 kHz y  $p < 0,01$  para el resto de frecuencias) al finalizar el tratamiento.

El estudio histológico corroboró que el tratamiento con antioxidantes mejora el estado celular tanto de las células sensoriales como de las neuronas del ganglio auditivo. El estudio del transcriptoma de los genes que intervienen en el balance de óxido-reducción confirmó que el tratamiento sistémico con resveratrol y N-acetilcisteína produce cambios positivos en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante, con una disminución de fuentes enzimáticas de especies reactivas de oxígeno e incremento de la expresión de enzimas antioxidantes (*Figura 2C*).

En resumen, el tratamiento con resveratrol y N-acetilcisteína mostró un efecto protector frente a la ototoxicidad por aminoglucósidos, que fue más relevante mientras se mantuvo la administración de los antioxidantes. Al suspender el tratamiento se produjo una reversión parcial del efecto protector y un ligero aumento de umbrales auditivos aunque siguieron siendo inferiores a los de los animales no tratados (García-Alcántara et al., enviado 2016)<sup>17</sup>.

### El tratamiento sistémico con inhibidores del TGF- $\beta$ previene el daño causado por la exposición al ruido.

Trabajos previos del grupo analizando la expresión de los elementos del sistema del TGF- $\beta$  mostraban que éste se encuentra fuertemente activado tras la exposición a ruido, lo que sugería que su inhibición podría tener un

efecto protector<sup>18</sup>. Además se examinó la seguridad de ambos inhibidores y se determinó un rango de dosis en la que no presentaron efectos de ototoxicidad secundarios.

Con esta base, estudiamos si el pretratamiento sistémico con los inhibidores disminuía el impacto de la exposición al ruido. Los resultados mostraron que los umbrales auditivos en los animales tratados durante quince días con los inhibidores y expuestos posteriormente a ruido eran menores que los tratados con suero salino a lo largo del ensayo, especialmente en la primera semana tras la exposición (*Figura 3*). El tratamiento sistémico continuado tras la exposición al ruido no tuvo sin embargo un efecto protector tan llamativo. Por otra parte, el tratamiento local con una única dosis de inhibidor administrada mediante bullostomía (procedimiento similar al descrito en rata), no tuvo efecto alguno, lo que sugiere que la efectividad depende de la presencia continuada del fármaco.

Los resultados histológicos correlacionaron plenamente con los funcionales, apreciándose una mayor protección celular en los animales que recibieron un pretratamiento continuado<sup>18</sup>. En el ámbito molecular, la administración de los péptidos inhibidores del TGF- $\beta$ , atenuó el estrés oxidativo y la inflamación asociados al daño por el ruido, disminuyendo la activación de la quinasa de estrés pro-inflamatorio p38 $\alpha$  y equilibrando los niveles de NOX4 y MnSOD2, implicadas en la generación y eliminación de radicales libres de oxígeno, respectivamente (*Figura 4*). Estos datos se asemejan a los observados en el modelo de ototoxicidad en rata y sugieren que el balance de óxido-reducción y concretamente la actividad de NOX4 es clave en la respuesta al daño auditivo.

## DISCUSIÓN

La administración de los ototóxicos causó un incremento significativo de los umbrales auditivos en todas las frecuencias estudiadas, especialmente en las más altas, lo que refleja un daño predominante en la región basal de la cóclea y se correlaciona con los hallazgos histológicos. Esto podría deberse a su proximidad a la ventana redonda donde se aplicó la solución ototóxica, y a la dificultad de los ototóxicos para alcanzar la región apical de la cóclea por difusión simple. Además se ha descrito una mayor susceptibilidad de las células ciliadas externas de la base debido a una menor concentración de glutatión<sup>19,20</sup>, así como de las ciliadas externas frente a las internas en toda la cóclea por la presencia de canales de transducción más amplios que permitirían la entrada de una mayor cantidad de ototóxico<sup>21</sup>. También se observó una menor degeneración de las neuronas del ganglio auditivo en las ratas con menor pérdida de células cilia-

das internas, confirmando trabajos previos<sup>22,23</sup> y recalando la importancia del soporte trófico de las células ciliadas internas para la supervivencia de las neuronas del ganglio auditivo.

Respecto al papel de los antioxidantes en la prevención del daño ototóxico, existen muchos trabajos con modelos animales que confirman un efecto beneficioso<sup>24,25</sup>, especialmente cuando se combinan varias de estas sustancias. La tendencia actual apunta al tratamiento combinado de antioxidantes<sup>26</sup>, lo que permite activar diferentes dianas, en diferentes momentos y compartimentos celulares, ampliando su rango de acción y además, reducir la oxidación de los propios antioxidantes, alargando su vida media. En este trabajo se ha empleado resveratrol y N-acetilcisteína, ambas aprobadas para su uso humano y que se utilizan en formulaciones para uso sistémico tanto en la clínica como en complementos nutracéuticos. Esta combinación ha sido utilizada previamente en estudios in vitro con células humanas en el contexto del cáncer<sup>27</sup>, la anemia de Fanconi<sup>28</sup> y el envejecimiento cutáneo<sup>29</sup>, pero no se habían empleado con anterioridad en la hipoacusia inducida por ototóxicos.

La administración de resveratrol y N-acetilcisteína demostró un efecto otoprotector de forma predominante en las fases iniciales del estudio, lo que podría explicarse por su corta vida media (<30 minutos el resveratrol y <2 horas la N-acetilcisteína). Sin embargo, las comparaciones con otros trabajos son difíciles, ya que la mayoría de ellos valoran la respuesta auditiva pocos días después y no semanas después de terminar el tratamiento con antioxidantes<sup>30,31</sup>. Los animales tratados con suero salino presentan una ligera recuperación de los umbrales auditivos en la segunda semana tras la administración del ototóxico, lo que podría deberse a cierta reversibilidad del daño ototóxico<sup>32,33</sup>. Sin embargo nuestros resultados muestran claramente un efecto protector del resveratrol y N-acetilcisteína, con mejores umbrales auditivos a los de todo el ensayo. Las posibles estrategias para ampliar la duración del efecto protector de los antioxidantes pasarían por prolongar el tratamiento con los antioxidantes, administrarlos en vehículo de liberación sostenida o incrementar las dosis, teniendo siempre en cuenta la posible incidencia de efectos adversos<sup>34</sup>.

El modelo de ruido utilizado es muy reproducible, modulable, parcialmente reversible y está enfocado a dañar las frecuencias relevantes para el ratón, requiriendo tiempos de exposición cortos y disminuyendo así el estrés del animal. La caracterización funcional y molecular del modelo ha permitido definir diversas dianas terapéuticas y valorar el efecto de nuevas moléculas, tales como los inhibidores de TGF- $\beta$ . Nuestro trabajo indica que la inhibición de esta ruta protege del estrés oxidativo, nuevamente con la mediación de NOX4, del



estrés inflamatorio y del daño celular ocasionados por la exposición a ruido, favoreciendo el mantenimiento de la función auditiva. De nuevo la farmacocinética ha sido clave para encontrar resultados positivos, siendo necesaria la administración continua del inhibidor para apreciar sus acciones y obteniendo mejores resultados cuando el tratamiento se administra antes de la exposición a ruido.

Las moléculas diana de los inhibidores, quinasas de estrés y NADPH oxidasas habían sido previamente descritas como elementos en la respuesta al daño auditivo<sup>35-37</sup>. En su conjunto nuestros resultados indican que el uso de los inhibidores de TGF- $\beta$ , una diana nueva en este campo, tiene un elevado interés terapéutico en la protección del daño causado por ruido, y potencialmente en otros contextos de daño auditivo.

## CONCLUSIONES

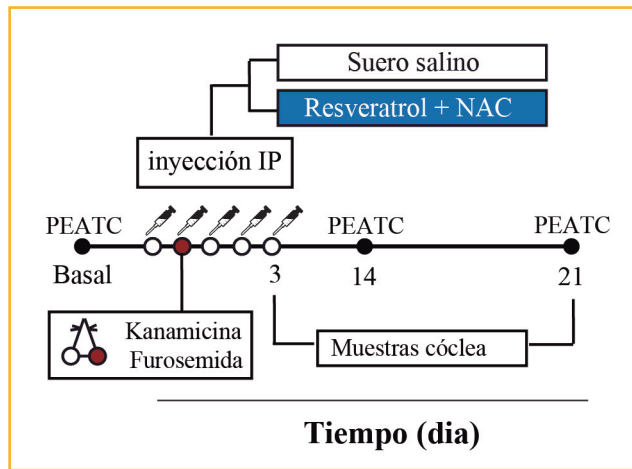
1. El tratamiento combinado con resveratrol y N-acetilcisteína disminuye tanto la pérdida auditiva como el daño celular inducidos por la administración de ototóxicos en la rata. El efecto protector es debido a su potencial antioxidante y disminuye tras la suspensión del tratamiento, aspecto a considerar en su potencial uso clínico.
2. Los péptidos inhibidores del TGF- $\beta$ , P17 y P144, previenen los cambios morfológicos y funcionales que sufre la cóclea del ratón por la exposición al ruido excesivo. NOX4 aparece entre las dianas de estos inhibidores en el proceso de protección del daño.

## REFERENCIAS

- 1 Qiu, J., Olivius, P., Tong, B., Borg, E. & Duan, M. Ventral approach to rat inner ear preserves cochlear function. *Acta Otolaryngol.* 127 (3), 240-243, (2007).
- 2 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.* 124 (5), 515-517, (2001).
- 3 Murillo-Cuesta, S. et al. Direct drug application to the round window: a comparative study of ototoxicity in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 141 (5), 584-590, (2009).
- 4 Cediell, 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.* 23 (2), 587-590, (2006).
- 5 Camarero, G. et al. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci.* 21 (19), 7630-7641 (2001).
- 6 Tanaka, C. et al. Expression pattern of oxidative stress and antioxidant defense-related genes in the aging Fischer 344/NHsd rat cochlea. *Neurobiol Aging.* 33 (8), 1842 e1841-1814, (2012).
- 7 Sanz, L. et al. Swept-sine noise-induced damage as a hearing loss model for preclinical assays. *Front Aging Neurosci.* 7, (2015).
- 8 Cobo, P. et al. Design of a reverberant chamber for noise exposure experiments with small animals. *Applied Acoustics.* 70 1034-1040 (2009).
- 9 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.* 9 (3), 231-242 (2012).
- 10 Dotor, J. et al. Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine.* 39 (2), 106-115, (2007).
- 11 Gil-Guerrero, L. et al. In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1. *J Immunol.* 181 (1), 126-135 (2008).
- 12 Ezquerro, I. J. et al. A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine.* 22 (1-2), 12-20 (2003).
- 13 Riquelme, R. et al. A comparative study of age-related hearing loss in wild type and insulin-like growth factor I deficient mice. *Front Neuroanat.* 4 27, (2010).
- 14 Murillo-Cuesta, S. et al. Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function. *Mol Med.* 18 260-269, (2012).
- 15 Rodriguez-de la Rosa, L. et al. Comparative gene expression study of the vestibular organ of the Igf1 deficient mouse using whole-transcript arrays. *Hear Res.* 330 (Pt A), 62-77, (2015).
- 16 Sanchez-Calderon, H. et al. RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS One.* 5 (1), e8699, (2010).
- 17 García-Alcantara F, M.-C. S., Pulido S, Martínez-Vega R, Milo M, Varela-Nieto I, Rivera T. The expression of oxidative stress response genes is modulated by a combination of resveratrol and N-acetylcysteine to ameliorate ototoxicity in an experimental rat model. (enviado). (2016).
- 18 Murillo-Cuesta, S. et al. Transforming growth factor beta1 inhibition protects from noise-induced hearing loss. *Front Aging Neurosci.* 7 32, (2015).
- 19 Versnel, H., Agterberg, M. J., de Groot, J. C., Smoorenburg, G. F. & Klis, S. F. Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res.* 231 (1-2), 1-12, (2007).
- 20 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.* 182 (1-2), 2-8, (2003).
- 21 Staecker, A., Zheng, Q. Y. & Van De Water, T. R. Oxidative stress in aging in the C57B16/J mouse cochlea. *Acta Otolaryngol.* 121 (6), 666-672 (2001).
- 22 Dodson, H. C. Loss and survival of spiral ganglion neurons in the guinea pig after intracochlear perfusion with aminoglycosides. *J Neurocytol.* 26 (8), 541-556 (1997).
- 23 Webster, M. & Webster, D. B. Spiral ganglion neuron loss following organ of Corti loss: a quantitative study. *Brain Res.* 212 (1), 17-30 (1981).
- 24 Maniu, A., Perde-Schrepler, M. & Cosgarea, M. Protective effect of L-N-acetylcysteine against gentamicin ototoxicity in the organ cultures of the rat cochlea. *Rom J Morphol Embryol.* 52 (1), 159-164, (2011).
- 25 Ojano-Dirain, C. P. & Antonelli, P. J. Prevention of gentamicin-induced apoptosis with the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone. *Laryngoscope.* 122 (11), 2543-2548, (2012).
- 26 Heman-Ackah, S. E., Juhn, S. K., Huang, T. C. & Wiedmann, T. S. A combination antioxidant therapy prevents age-related hearing loss in C57BL/6 mice. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 143 (3), 429-434, (2010).
- 27 Zahid, M., Saeed, M., Beseler, C., Rogan, E. G. & Cavalieri, E. L. Resveratrol and N-acetylcysteine block the cancer-initiating step in MCF-10F cells. *Free Radic Biol Med.* 50 (1), 78-85, (2011).
- 28 Columbaro, M. et al. Treatment of FANCA cells with resveratrol and N-acetylcysteine: a comparative study. *PLoS One.* 9 (7), e104857, (2014).
- 29 Giardina, S. et al. [Efficacy study in vitro: assessment of the properties of resveratrol and resveratrol + N-acetylcysteine on proliferation and inhibition of collagen activity]. *Minerva Ginecol.* 62 (3), 195-201, (2010).
- 30 Simsek, G. et al. Protective effects of resveratrol on cisplatin-dependent inner-ear damage in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 270 (6), 1789-1793, (2013).
- 31 Yumusakhuylu, A. C. et al. Protective role of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 76 (3), 404-408, (2012).
- 32 Aran, J. M. & 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.* 79 (1-2), 24-32 (1975).
- 33 Klis, S. F., O'Leary, S. J., Hamers, F. P., De Groot, J. C. & Smoorenburg, G. F. Reversible cisplatin ototoxicity in the albino guinea pig. *Neuroreport.* 11 (3), 623-626 (2000).
- 34 Popat, R. et al. A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Br J Haematol.* 160 (5), 714-717, (2013).
- 35 Fetoni, A. R. et al. Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense. *J Neurosci.* 33 (9), 4011-4023, (2013).
- 36 Fortunato, G. et al. Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss. *Clin Chem.* 50 (11), 2012-2018, (2004).
- 37 Kim, H. J. et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J Neurosci.* 30 (11), 3933-3946, (2010).

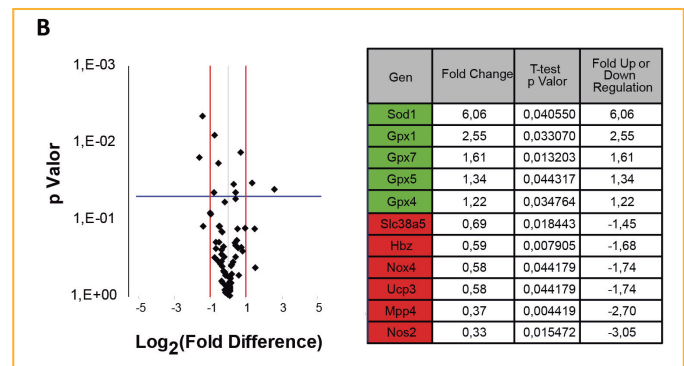
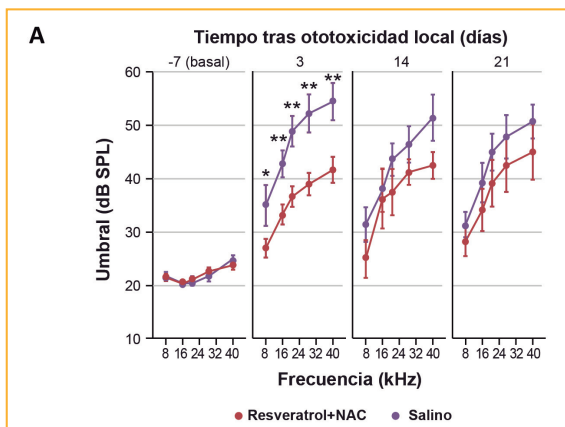
## FIGURAS

Figura 1.



**Esquema del experimento.** Los animales recibieron sistémicamente Resveratrol+N-acetilcisteína NAC o suero salino durante 5 días consecutivos. El segundo día todos los animales recibieron una mezcla ototóxica de kanamicina y furosemida en el oído derecho, quedando los oídos izquierdos como controles sin ototóxico. La función auditiva fue evaluada mediante PEATC al inicio del ensayo (basal) y a los 3, 14 y 21 días de la administración de ototóxicos. Se tomaron muestras de cóclea a los 3 y 21 días tras la administración de ototóxicos para estudios histológicos y moleculares.

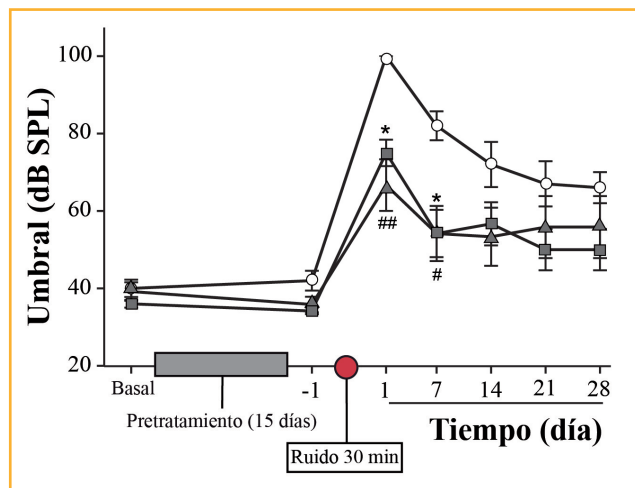
Figura 2.



**A) Evolución de los umbrales auditivos.** Comparación de los umbrales en respuesta a estímulos sonoros (tono puro) de ratas tratadas con resveratrol+NAC frente al grupo control que recibió suero salino a lo largo del ensayo. Los umbrales aumentan significativamente en ambos grupos tras la administración de ototóxicos, especialmente en las frecuencias altas, pero este incremento es menor en las ratas tratadas con resveratrol+NAC que en las que recibieron suero salino, con diferencias estadísticamente significativas al finalizar el tratamiento. Los umbrales se presentan como media ± EEM (en dB SPL) y las diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

**B) Cambios en la expresión génica coclear.** Expresión génica comparada a los 3 días de la administración de ototóxico local, en ratas tratadas con resveratrol+NAC frente a las que recibieron suero salino. El "Volcano plot" representa la diferencia de expresión de cada gen (fold difference) entre el grupo tratado con resveratrol+NAC y el no tratado (control con salino), así como el p-valor en la prueba t (línea azul,  $p < 0.05$ ). En la tabla se listan los genes cuya expresión está aumentada (en verde) o disminuida (en rojo) de manera estadísticamente significativa en los tratados. La expresión génica se ha calculado mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y los p-valores mediante la prueba t de Student. Como gen endógeno se ha empleado el gen de la  $\beta$ -actina.

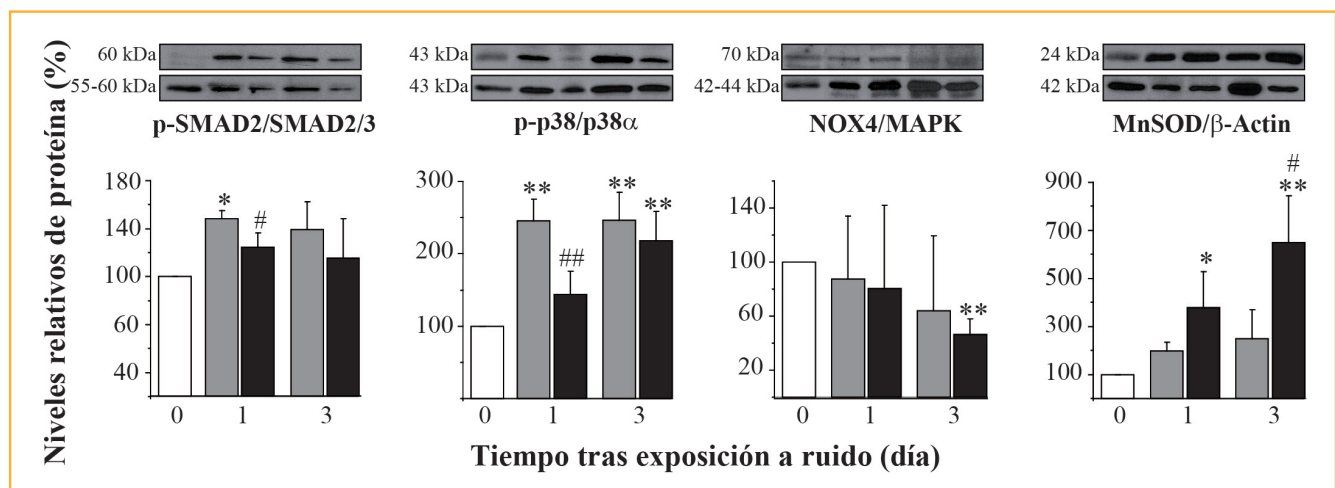
Figura 3.



**Evolución de los umbrales auditivos tras pretratamiento con los inhibidores de TGF- $\beta$ 1 y exposición a ruido.**

Comparación de los umbrales en respuesta a click (media  $\pm$  EEM, dB SPL) en ratones MF1 (n=6 por grupo) tratados con los inhibidores de TGF- $\beta$ 1 P17 (triángulos) o P144 (cuadrado) a 2,5 mg/kg/24h/15 días, o con salino (círculo) y expuestos a ruido de 100 dB SPL durante 12 h. Los animales tratados con inhibidores de TGF- $\beta$ 1 presentaron umbrales inferiores tras la exposición a ruido, con diferencias estadísticamente significativas (P17, \*  $p \leq 0,05$ ; P144, #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ) respecto al grupo no tratado que recibió sólo salino, entre 1 y 7 días tras la exposición. Adaptada de Murillo-Cuesta et al., 2015<sup>18</sup>.

Figura 4.



**Niveles de proteínas de mediación de estrés oxidativo e inflamación medidos tras exposición a ruido y tratamiento con inhibidores de TGF- $\beta$ 1.** Curso temporal de la relación proteína activada/proteína inactiva de referencia (p-p38/p38 $\alpha$ , p-SMAD2/SMAD2/3, NOX-4/MAPK y MnSOD/ $\beta$ -actina) determinada en cócleas de ratones CBA (n = 3/ensayo) expuestos a ruido (110 dB SPL, 30 min) y tratados con el inhibidor de TGF- $\beta$ 1 P144 a 10 mg/kg/24 h/15 días (columnas negras) o con suero salino (columnas grises), así como en animales no expuestos a ruido (columnas blancas). La exposición al ruido aumentó de forma significativa la actividad de p-p38 y p-SMAD2 y los niveles de MnSOD en comparación con los ratones no expuestos (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ). El tratamiento disminuyó significativamente los niveles de las quinasas pro-inflamatorias p-p38 $\alpha$  y p-SMAD2, y aumentó el de la enzima detoxificadora MnSOD en comparación con el grupo que recibió sólo salino (# $p \leq 0,05$ ; ## $p \leq 0,01$ ). Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE. Adaptada de Murillo-Cuesta et al., 2015<sup>18</sup>.



# FIAPAS

CONFEDERACIÓN  
ESPAÑOLA  
DE FAMILIAS  
DE PERSONAS SORDAS

