



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Model experimental de toxicitat còcleo-vestibular per administració intratimpànica de cisplatí en la rata

Àngela Callejo Castillo

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Facultat de Medicina**

Departament de Ciències Fisiològiques II. Campus Bellvitge.  
Programa de doctorat en Medicina i Recerca Translacional

**Model experimental de toxicitat  
còcleo-vestibular per administració  
intratimpànica de cisplatí en la rata.**

Tesi doctoral presentada per  
**Àngela Callejo Castillo**

L'Hospitalet de Llobregat  
Gener de 2018







Tesi presentada per Àngela Callejo Castillo, llicenciada en Medicina, per optar al títol de doctora per la Universitat de Barcelona.

Programa de doctorat en Medicina i Recerca Translacional.

Departament. de Ciències Fisiològiques II.

Facultat de Medicina. Campus Bellvitge (UB)

Aquesta tesi **Model experimental de toxicitat còcleo-vestibular per administració intratimpànica de cisplatí en la rata** ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Ivan Domènech Juan i co-direcció del Prof. Dr. Jordi Llorens Baucells, a la Unitat de Fisiologia del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona (Campus de Bellvitge). Ambdós són membres pertanyents a la Línia de Recerca "*Estudi, aplicació i perfeccionament de models d'administració intratimpànica*" del Grup "*Bases cel.lulars i mol.leculars de trastorns sensorials*" liderat pel Prof. Dr. Jordi Llorens, de l'Àrea de "*Neurociències*" de l'Insitut IDIBELL.

El director de la tesi,

El co-director de la tesi,

La interessada,

**Dr. Ivan Domènech**

Cap Unitat Funcional  
ORL i Al.lèrgia  
H.Universitari Dexeus

**Dr. Jordi Llorens**

Professor Catedràtic.  
Dept. Ciències Fisiològiques II.  
Facultat de Medicina  
Universitat de Barcelona

**Àngela Callejo**



A en Joaquín, en Martí i la Clara





## AGRAÏMENTS

Fer un agraïment especial a l'**Ivan Domènech** per la seva confiança en brindar-me la meva primera oportunitat professional, des dels inicis d'aquesta tesi, i que espero que seguim compartint molt de temps més. Ell ha estat el meu mentor en els meus primers passos en l'àmbit de la otologia, pel que sempre em mereixerà un agraïment i afecte especials, siguin quin siguin els nostres camins professionals; perquè això ja està escrit, i res no ho pot canviar. Per creure en la importància que mereix la recerca en l'activitat professional de l'especialista en Otorinolaringologia, i així proporcionar els mitjans necessaris perquè es pugués dur a terme aquesta tesi.

Agraïr a en **Jordi Llorens** per obrir-nos les portes del seu laboratori, casa seva, i lliurar-nos la seva experiència, col.laboració i mitjans. Agraïda que m'hagi deixat treure el nas en món de la recerca bàsica i de la seva comprensió i flexibilitat per adaptar-se a les necessitats d'una tesi en Otorinolaringologia.

Als meus companys de laboratori: la **Sandra**, que em va ensenyar a fer la primera de moltes immunos, la **Carla**, en **Gerard**, en **Benja** pel suport tècnic en el confocal, la **Nines**, amb qui vam compartir pocs dies de laboratori, però milers de moments de la vida, i que sap que compta amb la meva incondicionalitat, i molt especialment a la **Lara**, treballadora incansable, rigurosa i perfeccionista, que sempre va estar disposada a ensenyar-me al laboratori o a l'estabulari, sempre amb un somriure, amiga finalment, amb qui hem arribat a compartir moments importants com el del naixament d'un fill o un casament.

Als meus companys otorrinos, i molt especialment a en **Rafa** i la **Paula** pel seu recolzament en hores baixes d'aquesta tesi i per moltes altres coses que no vénen al cas.

A en **Joan**, amb tot el meu orgull, mestre del meu optimisme, que m'ha ensenyat coses tan importants com que *els bons sempre guanyen*; que sempre és al meu costat.

A la **Montse**, que és el regal més gran que em farà mai el Joan, pel seus ànims, consells, ajuda immensa, per l'enorme generositat de dedicar el seu temps desinteressadament i posar-hi els cinc sentits com si fos la seva tesi.

Al **Joaquín**, que té la meva admiració i incondicionalitat més profunds, que es deixa la pell en tot el que fa, perfeccionista i exigent; amb qui tinc la sort de compartir tots els meus dies. Un agraïment immens pel recolzament, per la confiança, pel temps robat, perquè un dia es fés el propòsit que jo acabés aquesta tesi. I ell aconseguí tot el que es proposa. Gràcies!

Aquest últim es convertiria en un paràgraf interminable d'agraïments als meus pares, en **Justo** i l'**Elena**. Si hagués de trobar un de sol que fos representatiu de la seva aportació a aquesta tesi, voldria agrair-los haver-me transmès el do de l'entusiasme, aliat inestimable per a afrontar els nous projectes..com una tesi...o com la vida. Infinites gràcies!

# ÍNDEX



1. ABREVIATURES.....	15
2.JUSTIFICACIÓ .....	21
3. RESUM.....	25
4.INTRODUCCIÓ .....	29
4.1. Generalitats.....	31
4.2. Anatomia .....	31
4.2.1. Anatomia humana de l'orella interna .....	31
4.2.2. Anatomia comparada de l'orella de la rata amb l'orella humana .....	39
4.3. Fisiopatogènia: mecanismes d'ototoxicitat causada pel cisplatí .....	42
4.4. Histopatologia: lesions estructurals coclears causades per cisplatí.....	45
4.5. Clínica auditiva causada per l'exposició a cisplatí .....	45
4.5.1. Manifestacions clíniques secundàries a l'ototoxicitat causada per cisplatí .....	45
4.5.2. Alteracions funcionals auditives secundàries a l'ototoxicitat per cisplatí .....	48
4.6. Otoprotecció.....	51
4.6.1. Mecanismes d'otoprotecció farmacològica.....	51
4.6.2. Administració local de fàrmacs otoprotectors.....	53
4.7. Models de toxicitat coclear.....	54
4.8. Toxicitat vestibular per cisplatí.....	55
5.HIPÒTESI I OBJECTIUS .....	57
5.1. Hipòtesi.....	57
5.2. Objectius .....	57
5.2.1. Objectiu principal .....	57
5.2.2. Objectius secundaris .....	57
6.MATERIAL I MÈTODES.....	61
6.1. Compostos químics (Taula 1).....	63
6.2. Animals .....	67
6.3. Disseny de l'experiment ( <i>Fig. 10</i> ) .....	68
6.3.1. Avaluació de la tolerància sistèmica dels individus exposats al model.....	68
6.3.2. Avaluació de la tolerància local dels individus exposats al model .....	68
6.3.3. Exposició al cisplatí .....	69
6.3.4 Avaluació comportamental de la disfunció vestibular.....	70
6.3.5. Avaluació histològica de la toxicitat coclear .....	72
6.4. Anàlisi d'imatge.....	77
6.5. Anàlisi estadístic .....	77
7.RESULTATS .....	79
7.1. Avaluació de la toxicitat sistèmica causada pel cisplatí intratimpànic.....	81
7.2. Avaluació de la toxicitat local causada pel cisplatí intratimpànic.....	82

7.3. Avaluació comportamental de la disfunció vestibular causada pel cisplatí intratimpànic, i la seva relació dosi-resposta .....	83
7.4. Avaluació histològica de l'epitel·li coclear causada pel cisplatí intratimpànic, i la seva relació dosi-resposta .....	86
8.DISCUSSIÓ .....	91
8.1. Elecció i disseny del model .....	93
8.1.1. Model <i>in vivo</i> en rata .....	93
8.1.2. Model d'administració intratimpànica .....	94
8.2. Morbilitat sistèmica del model .....	97
8.3. Morbilitat local del model .....	98
8.4. Toxicitat vestibular del model .....	99
8.5. Toxicitat coclear del model .....	101
8.6. Limitacions .....	102
9.CONCLUSIONS .....	105
10.BIBLIOGRAFIA .....	109
11.ANNEXES .....	129

Article 1: "Dose-dependent cochlear and vestibular toxicity of trans-tympanic cisplatin in the rat."

Article 2: "Cisplatin-induced ototoxicity: effects, mechanisms and protection strategies."

Article 3: "Cocleotoxicidad por cisplatino en un modelo experimental."

# **1. ABREVIATURES**





**AAA:** *American Association of Audiology*

**ABR:** *auditory brainstem response*

**ACTH:** *adenocorticotropic hormone*

**ADN:** àcid desoxiribonuclèic

**ANOVA:** *analysis of variance*

**ATL:** audiometria tonal liminar

**BDNF:** *brain-derived nerve growth factor*

**CAI:** conducte auditiu intern

**CAP:** *compound action potential*

**CCE:** cèl.lules ciliades externes

**CCI:** cèl.lules ciliades internes

**CDDP:** cis-diamniodiclorplatí

**CCPA:** *chloro-N-cyclopentyl adenosine*

**CEEA:** comitè ètic d'experimentació animal

**CM:** *cochlear microphonic potential*

**CTR:** *copper transporter*

**Cu:** coure

**DMPO:** *dorsomedial periolivary nucleus*

**DPOAES:** *distorsion product otoacoustic emissions*

**EP:** *enocochlear potential*

**ERCC:** *excision repair cross-complementing*

**ERK:** *extracellular regulatroy kinase*

**Fe:** ferro

**Gd:** gadolini

**HEI-OC1:** *House Ear Institute-Organ Corti1*

**HFA:** *high-frequency audiometry*

**HF-ABR:** *high frequency- auditory brainstem response*

**HNE:** *hidrononenal*

**IL:** interleuquines

**iNOS:** *inducible nitric oxide synthase*

**IT:** intratimpànic

**KIM:** *kydney injury molecule*

**LCR:** líquid cefaloraquidi

**LSO:** *lateral superior olive region*

**MANOVA:** *multivariate analysis of variance*

**MNT:** *medial nucleus of trapezoïdal body*

**MOMP:** *mitochondrial outer membrane permeabilization*

**MSO:** *medial superior olive region*

**NAC:** N-acetil-cisteïna

**NF:** neurofilament

**NF:** neurofilament

**NF-H:** *heavy-neurofilament*

**NFkB:** *nuclear factor kB*

**NO:** *nitric oxide*

**NOX:** *nicotinamide oxidase*

**NT-3:** neurotrofina-3

**OAE:** *otoacoustic emissions*

**OCT:** *organic cation transporter*

**OD:** orella dreta

**OE:** orella esquerra

**OMA:** otits mitjana aguda

**PBS:** *phosphate buffered saline*

**pc:** parell cranial

**PEATC:** potencials evocats auditius de tronc cerebral

**PFD:** *paraformaldehyde despolimerase*

**Pt:** *platí*

**PM:** *pes mol.lecular*

**PTPC:** *permeability transition pore complex*

**PUFA:** *polyunsaturated fatty acids*

**RM-ANOVA:** *repeated mesures- analysis of variance*

**R-PIA:** *R-phenylisopropyl adenosine*

**ROS:** *reactive oxygen species*

**SNPs:** *Single nucleotide polymorphisms*

**TNF:** *tumor necrosis factor*

**UVL:** *unilateral vestibular lesion*

**VNTB:** *ventral nucleus of trapezoïdal body*

**XPA:** *Xeroderma pigmentosum A*

**XPC:** *Xeroderma pigmentosum C*



## **2.JUSTIFICACIÓ**



La comprensió del mecanisme d'ototoxicitat induïda pel cisplatí és clau per a la recerca en el sentit de reduir els seus efectes. Els estudis en models animals han permès establir les bases d'aquests coneixements, i és sobre els quals se sustenta la recerca en els mètodes otoprotectors, amb la finalitat de promoure la prevenció i tractament de la hipoacúsia secundària a fàrmacs ototòxics.

Amb aquest treball es pretén la descripció d'un model experimental que es preveu de fàcil reproductibilitat, pel que pensem que pot ser d'utilitat per a altres grups de recerca experimental en el camp de l'ototoxicitat (tant còcleo-com vestibulo-toxicitat) i cisplatí.

Aquest estudi proporciona dades útils per a un possible disseny de posteriors assajos clínics encaminats a pal·liar el principal efecte secundari d'un important agent antineoplàstic, pel que es troba emmarcat dins de l'àmbit de la recerca translacional.

Fins on tenim coneixement, aquesta és la primera vegada que es descriu un model dosi-resposta de toxicitat còcleo-vestibular causada per l'administració intratimpànica de cisplatí en la rata.

La formació acadèmica de la doctoranda (Llicenciada en Medicina i Cirurgia, Màster en Investigació en Ciències Clíniques) no contemplava els coneixements i habilitats necessaris per a la realització de recerca bàsica o fonamental. Havent realitzat el Curs de Formació de Personal Investigador Usuari d'Animals d'Experimentació (UB, juny 2010) i la formació necessària de tècniques de laboratori, ha estat capaç de realitzar en primera persona tots els procediments descrits en l'apartat de *Material i mètodes*.

Cal destacar que s'ha establert una col.laboració científica amb la companyia biofarmacèutica francesa Sensorion, amb seu a Montpellier i amb la Aix-Marseille Universtié, que compten amb una àmplia experiència en recerca experimental i clínica en el camp de l'orella interna.



Fins al moment actual, el nostre treball ha donat lloc a:

**3 publicacions** (per ordre cronològic de publicació):

1- Callejo À, Ortiz N, Domènech I. Cisplatin cochlear toxicity in an experimental model. Acta Otorrinolaringol Esp. 2014 May-Jun;65(3):217-8.

2- Callejo A, Sedó-Cabezón L, Domènech Juan I, Llorens J Cisplatin-induced ototoxicity: effects, mechanisms and protection strategies. Toxics 2015; 3(3): 268-93.

3- Callejo A, Durochat A, Bressieux S, Saleur A, Chabbert C, Domenech J, Llorens J, Gaboyard-Niay S. Dose-dependent cochlear and vestibular toxicity of trans-tympanic cisplatin in the rat. Neurotoxicology 2017; 60: 1-9.

**1 poster:**

Transtympanic model of cisplatin-induced ototoxicity: comparison of the cochlea and the vestibule. 52<sup>nd</sup> Congress of Inner Ear Biology. Roma (Itàlia), 12-15 setembre de 2015, presentat per la Dra. Gaboyard-Niay.

## **3. RESUM**



Els estudis *in vivo* són necessaris per a estudiar l'ototoxicitat i avaluar possibles tractaments otoprotectors. La rata i el ratolí són dues de les espècies més utilitzades per estudis pre-clínic de toxicologia i farmacologia, però l'administració sistèmica de cisplatí causa un índex de morbiditat molt alt en aquestes espècies.

Es va establir la hipòtesi que l'administració intratimpànica de cisplatí aportarà un model adequat per a l'estudi de la toxicitat tant coclear com vestibular en la rata. Sota aquesta premisa, es va administrar cisplatí a rates mascles de la soca Long Evans per via intratimpànica, en una orella a diferents dosis (50µl, 0,5 a 2mg/ml) segons el grup, mentre que la orella contralateral, injectada amb sèrum fisiològic, servia de control.

La toxicitat coclear es va demostrar mitjançant l'estudi histològic, mentre que la toxicitat vestibular es va demostrar mitjançant l'estudi funcional comportamental. En cap dels experiments es va registrar episodis de letalitat i l'únic signe de morbiditat registrat va ser una lleu pèrdua de pes corporal. El cisplatí va causar un toxicitat coclear dosi-dependent, demostrat mitjançant el recompte de cèl.lules ciliades a les espirals apical i mitja de les còclees, i la toxicitat vestibular mitjançant l'anàlisi comportamental.

Podem concloure que l'administració intratimpànica de cisplatí és un model fàcil, reproducible i segur per a l'estudi de la toxicitat còcleo-vestibular en la rata. Considerem que aquesta ruta d'exposició pot ser útil per a avaluar qüestions específiques sobre la ototoxicitat induïda per cisplatí i per a estudiar possibles tractaments otoprotectors.



## **4.INTRODUCCIÓ**



## **4.1. Generalitats**

El cisplatí (cis-diaminodiclorplatí II) (CDDP) és un agent quimioteràpic altament efectiu usat en el tractament de tumors sòlids, entre ells, d'ovari, de testes, de melsa, de pulmó no cèl.lular petita, i tumors sòlids de cap i coll<sup>1-3</sup>. El seu principal mecanisme d'acció antitumoral consisteix en la formació d'enllaços covalents entre l'àtom de platí (Pt) del cisplatí i l'àtom de nitrogen (N) en la posició N7 de les bases purines de l' àcid desoxiribonuclèic (ADN) cel.lular, generant enllaços creuats (*cross links*) intra- i inter-catenaris, fenomen que ha demostrat desesencadenar la mort cel.lular per processos d'apoptosi i necrosi, en estudis *in vitro*<sup>4</sup>. Els principals efectes secundaris descrits associats a l'ús de cisplatí són la nefrototoxicitat, neurotoxicitat perifèrica i ototoxicitat, i en menor mesura, toxicitat gastrointestinal i mielotoxicitat<sup>1,2</sup>. Mentre que per a la prevenció de la nefrototoxicitat estan àmpliament acceptats certs tractaments, no existeixen tractaments preventius aprovats per al maneig de la neurotoxicitat i ototoxicitat. Malgrat la indolència de l'ototoxicitat en comparació amb altres efectes secundaris, ha guanyat gran interès entre els professionals mèdics, donada l'alta proporció de pacients afectats, sent considerat l'efecte secundari dosi-limitant més freqüent<sup>1,3,5-7</sup>. Nombrosos estudis clínics i experimentals han provat d'aclarir els mecanismes d'ototoxicitat del cisplatí, descriure les implicacions clíniques que això comporta i aportar estratègies de prevenció.

## **4.2. Anatomia**

### **4.2.1. Anatomia humana de l'orella interna**

L'orella interna es troba situada a l'interior de la porció petrosa de l'os temporal, medial a la caixa timpànica. Per la complexitat de la seva forma i estructura, s'anomena laberint. Distingim un laberint ossi, constituït per una sèrie d'espais excavats a l'os i en comunicació els uns amb els altres, i un laberint membranós, format per unes estructures membranoses allotjades dins el laberint ossi. El laberint està ocupat per líquids o limfes. Les estructures del laberint membranós estan plenes d'endolimfa; entre el laberint ossi i el membranós es delimita un espai anomenat espai perilimfàtic, ocupat per la perilimfa<sup>8</sup>.



L'orella interna o laberint, es pot dividir en dues regions anatòmiques i funcionals

(1) el laberint anterior (còclea o cargol), on es produeix la transformació de l'ona sonora (energia mecànica) en impulsos nerviosos (energia elèctrica), i

(2) el laberint posterior (conductes semicirculars, utricle i sàcul), òrgan perifèric regulador del sentit de l'equilibri<sup>8</sup>.

#### 4.2.1.1. Laberint anterior o còclea

La còclea consta d'una complexa estructura òssia que conté en el seu interior una sèrie d'epitel·lis que conformen, en el seu conjunt, la còclea membranosa. El laberint membranós constitueix l'espai endolimfàtic, ocupat per endolimfa, líquid de tipus endocel·lular, secretat a l'*stria vascularis* (que més endavant es descriurà). Entre el laberint ossi i el laberint membranós es defineix l'espai perilimfàtic, ocupat per perilimfa: líquid de tipus extracel·lular, de composició similar a la del líquid cefaloraquídi (LCR), amb el que s'uneix en el fons del conducte auditiu intern; no obstant, sembla que l'origen del líquid perilimfàtic és endolaberíntic. La cortilimfa és un líquid de tipus extracel·lular, de composició iònica molt similar a la perilimfa, que es localitza dins del túnel de Corti (que es descriu més endavant)<sup>8</sup>.

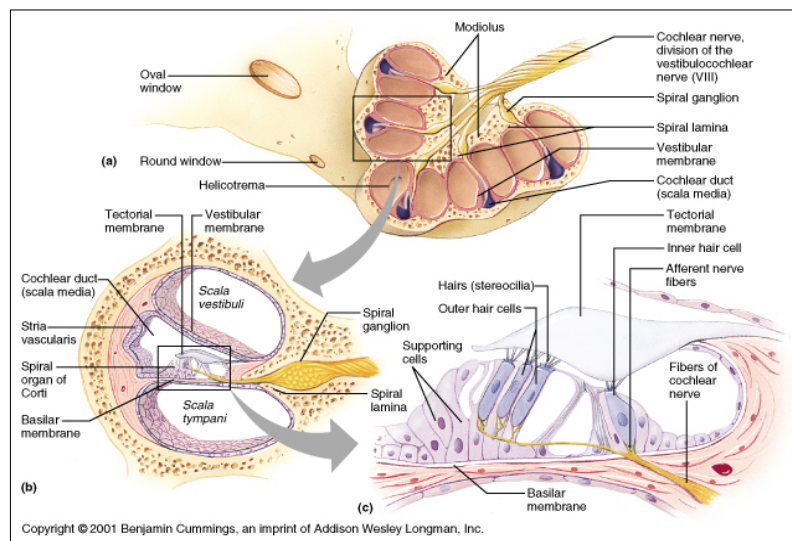
A la còclea òssia hi distingim 3 porcions (*Fig.1*):

(1) La columel·la de Braschet o modíol de Valsalva o eix del cargol, de morfologia cònica i que conforma la base interna sobre la qual s'organitza l'estructura de la còclea; la base cònca de la columela està perforada per petits orificis que formen una línia espiral doble i paral·lela a la làmina dels contorns. D'aquests orificis parteixen petits conductes que van a desembocar en un de més ampli excavat al llarg de tota la base d'inserció de la làmina espiral, anomenat conducte de Rosenthal, que conté el gangli nerviós auditiu.

(2) La làmina dels contorns o tub del cargol, que en l'espècie humana descriu 2,5 voltes d'espira des de la base al voltant de la columel·la.

(3) La làmina espiral, que es localitza dins de la làmina dels contorns, unida a la cara interna de la seva paret, de forma que divideix l'espai delimitat dins de la làmina dels contorns en dos compartiments (superior i inferior), que

s'anomenen pisos, rampes o escales vestibular (superior) i timpànica (inferior), respectivament<sup>8</sup>.



**Fig. 1.** Font: Copyright © 2001 Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman, Inc.

L'estructura membranosa (Fig.2) de la còclea es denomina conducció coclear o ductus cochlearis. Aquest, té forma de prisma triangular embolicat en espiral igual que la còclea òssia. Ocupa l'espai comprès entre el marge lliure de la làmina espiral i la làmina dels contorns, separant completament les dues rampes (vestibular i timpànica), de manera que delimita una tercera rampa o escala (mitja)<sup>8</sup>.

En descriure una morfologia de prisma triangular presenta 3 cares o parets:

(1) externa, que és un espessiment del periosti intern de la làmina dels contorns, anomenat *lligament espiral*.

(2) superior, que es relaciona amb la rampa vestibular (representant el terra de la mateixa), i que rep el nom de membrana vestibular o *membrana de Reissner*.

(3) inferior, que perllonga la làmina espiral, es relaciona amb la rampa timpànica (representant el sostre de la mateixa) i es denomina *membrana basilar*. Sobre aquesta làmina basilar, assenta l'*òrgan de Corti*<sup>8</sup>.

El lligament espiral (Fig.2) és un tracte de teixit connectiu situat sobre la cara interna del conducció coclear. A la seva part superior mostra una

eminència, la cresta vestibular, en què s'inserta la membrana de Reissner. A la seva part inferior protueix la cresta basilar en què s'inserta la membrana basilar. Per damunt d'aquesta cresta basilar trobem un engruiximent anomenat prominència espiral per on discorren grans nanses capil.lars. El lligament espiral està revestit, des de la prominència espiral fins a la cresta vestibular, per un epitel.li anomenat stria vascularis, constituït per 3 capes de cèl.lules i una rica vascularització, que li permet exercir un important paper metabòlico-funcional<sup>8</sup>.

La membrana de Reissner (Fig.2) és una finíssima membrana bicel.lular que separa en conducte coclear de la rampa vestibular. La seva funció és la de separar dos medis líquids, la perilimfa (a la rampa vestibular) de l'endolimfa (al conducte coclear), de característiques i situació iònica diferents. No obstant, degut a la seva fina estructura i la presència de porus, permet determinats intercanvis entre els dos espais<sup>8</sup>.

La membrana basilar (Fig.2) parteix de la làmina espiral com una prolongació i s'inserta a la cresta basilar del lligament espiral, separant el conducte coclear de la rampa timpànica. Augmenta en amplada durant el seu recorregut des de l'espira basal fins a l'àpex de la còclea, on té la seva màxima amplitud. Consta de 3 capes:

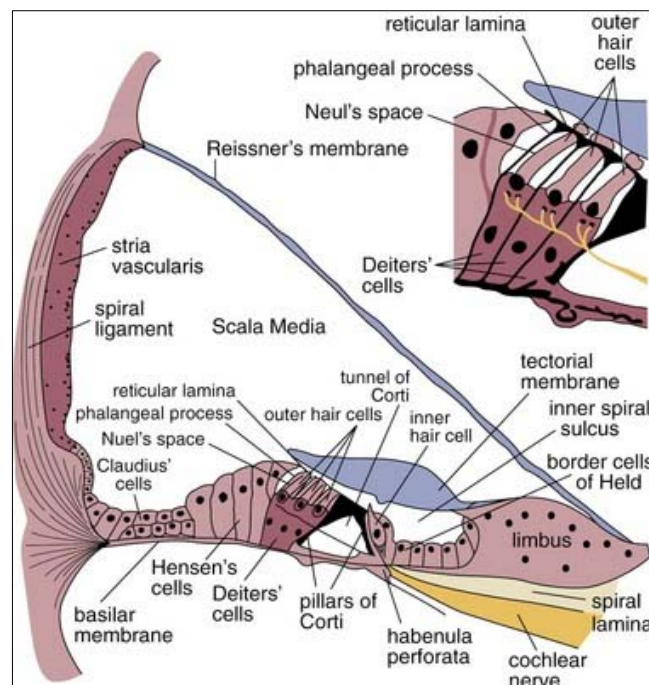
(1) una capa confrontant amb el conducte coclear que serveix de recolzament per als elements cel.lulars que donen sosteniment a l'òrgan de Corti, fent la funció de membrana basal;

(2) una capa mitja, constituïda per fibres elàstiques i col.làgenes anomenades *cordes de Hensen-Nüel*, que aporten consistència i elasticitat al conjunt; i

(3) una capa encarada a la rampa timpànica, constituïda per una fina sèrie de cèl.lules endotel.lials en contacte amb la perilimfa de la citada rampa.

L'òrgan de Corti (Fig.2) és un epitel.li especialitzat que s'ha desenvolupat sobre la cara superior o endolimfàtica de la membrana basilar. Sobre la membrana basilar se situen dues fileres de cèl.lules molt especialitzades anomenades *pilars de Corti* o *cèl.lules de pilar*; les internes es recolzen sobre les externes, de manera que entre la membrana basilar i els dos pilars es

defineix un conducte triangular, que s'extén tot al llarg del conducte coclear, anomenat *túnel de Corti*. Lateralment als pilars es disposen les *cèl.lules de sosteniment* o de *Deiters*; el seu pol basal es recolza sobre la membrana basilar mentre que el seu pol apical, en forma de copa, permet l'assentament de les *cèl.lules ciliades*, que rebran la intervació a través d'un canal perforat en aquestes *cèl.lules de sosteniment*. Lateralment a les *cèl.lules de Deiters* es disposen unes *cèl.lules cilíndriques*, les anomenades *cèl.lules de Hensen*, que disminueixen gradualment d'alçada transformant-se en *cèl.lules cúbiques*, llavors anomenades *cèl.lules de Claudius*, que es continuen insensiblement amb l'epitel·li del lligament espiral<sup>8</sup>.

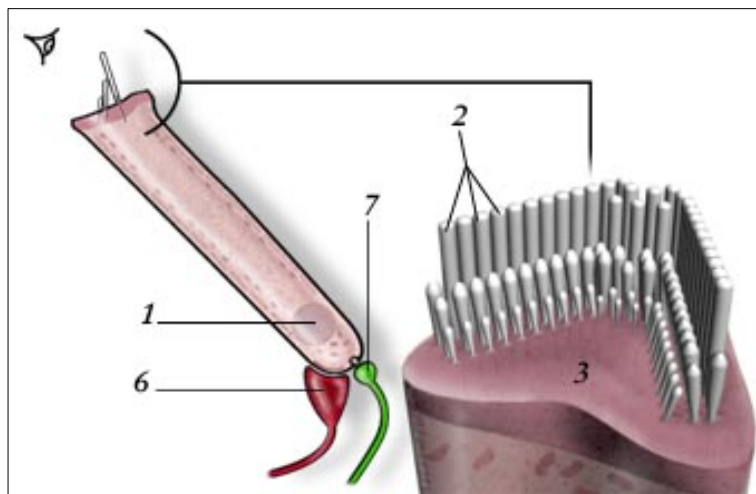


**Fig. 2.** Font: Runge-Samuelson C, Friedland DR. Chapter 128. "Anatomy of the auditory system" in <https://entokey.com>.

Les *cèl.lules nobles* de l'òrgan de Corti són les *cèl.lules neurosensorials*, *cèl.lules auditives* o *cèl.lules ciliades*, que se situen a ambdós costats del túnel de Corti. Lateralment al túnel de Corti trobem 3 fileres de *cèl.lules ciliades* denominades *cèl.lules ciliades externes (CCE)*, i medialment al túnel només 1 filera de *cèl.lules ciliades*, anomenades *internes (CCI)*. Sobre les *cèl.lules ciliades* (internes i externes) se situa una estructura fibril·lar composta per col·làgen, glicoproteïnes i glicosaminglicans anomenada *membrana tectòria*. Consta de dues porcions: una d'anclatge al limbe espiral i una altra lliure, que

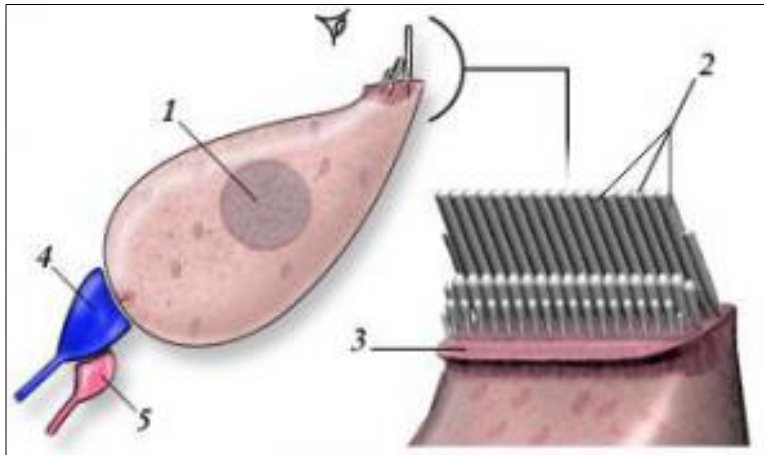
se situa sobre les cèl.lules ciliades. Per la seva cara que mira en direcció a l'òrgan de Corti presenta una sèrie d'orificis en forma de W en què s'ancoren els estereocilis de les CCE (en canvi, els cilis de les CCI es troben molt pròxims a la membrana tectòria però sense fer-hi contacte). La funció d'aquesta membrana, a més de fer de sostre al conjunt de l'òrgan de Corti, és la de fixació dels estereocilis de les CCE, i així aconseguir la seva inclinació quan es produeix el moviment del conjunt membrana basilar/òrgan de Corti; a més, actua com a reservori iònic de potassi<sup>8</sup>.

Les CCE (Fig.3) són cilíndriques i primes, en forma de didal. En el seu pol superior presenten de 100 a 200 estereocilis implantats en forma de W (implantats entre 5 i 7 fileres en humans; 3 en la rata), que com s'ha comentat anteriorment, s'ancoren a la membrana tectòria. Les cèl.lules sosteniment de Deiters les envolten en el seu 1/3 inferior, mentre que els 2/3 superiors estan banyats per un líquid denominat cortilimfa<sup>8</sup>.



**Fig. 3.** Font: [www.cochlea.eu](http://www.cochlea.eu), on (1) nucli; (2) estereocilis; (3) placa cuticular; (6) fibres eferents medials; (7) nervi auditiu.

Les CCI (Fig.4) presenten una morfologia ovoïdea amb un estretament a l'àpex, similar a una àmfora. En el pol apical presenten uns 60 estereocilis (implantats entre 5-7 fileres en humans; 3 en la rata). A diferència de les CCE, les cèl.lules de sosteniment de Deiters envolten pràcticament la totalitat de la seva superfície (excepte allà on s'implanten els cilis), i el seu contacte amb el líquid de cortilimfa és mínim<sup>8</sup>.

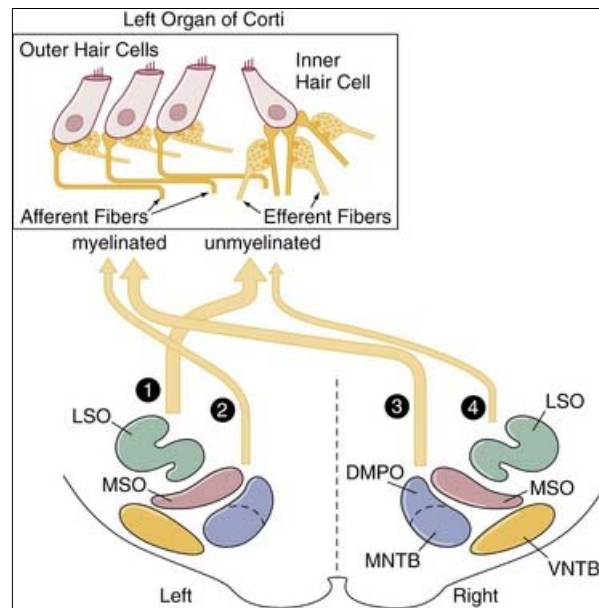


**Fig. 4.** Font: [www.cochlea.eu](http://www.cochlea.eu), on (1) nucli; (2) estereocilis; (3) placa cuticular; (4) nervi auditiu; (5) fibra eferent lateral.

L'extremitat superior de les CCE i CCI té un espessiment on s'ancoren els cilis, que rep el nom de *membrana cuticular*. Els cilis s'ancoren a la membrana cuticular mitjançant una arrel que té filaments de miosina. Són flexibles; encara que no tenen capacitat de moviment actiu, es deixen desplaçar de manera passiva. Els cilis estan units entre si per ponts de glicoproteïnes i, en ser desplaçats, s'obren els canals iònics situats a la seva zona més apical<sup>8</sup>.

L'extremitat inferior de la cèl·lula ciliada o extremitat sinàptica està en contacte amb les fibres nervioses que arriben des de les neurones bipolars. Cada CCI rep unes 20 fibres nervioses (axons de les neurones tipus I mielinitzades o ortoneurones -pel seu recorregut linial-), representant el 90-95% de les fibres del nervi coclear. Les fibres nervioses destinades a les CCE (axons de les neurones tipus II no mielinitzades o espironeuroes -pel seu recorregut espiral-) formen 3 plexes, un sota de cada filera de cèl·lules, i són les prolongacions d'aquests plexes les responsables de contactar amb les CCE; en general, cada fibra inerva entre 15-20 CCE. Els somes de les neurones que emeten aquests axons es localitzen al *gangli auditiu, espiral o de Corti*, que està ubicat en el conducte espiral de Rosenthal<sup>8</sup>.

Les fibres nervioses que procedeixen de les CCE i les CCI s'uneixen a la base de la columel·la en un tronc nerviós anomenat *nervi coclear*, que emergeix pel quadrant anteroinferior del fons del conducte auditiu intern (CAI) (Fig.5).



**Fig. 5.** Font: Runge-Samuelson C, Friedland DR. Chapter 128 "Anatomy of the auditory system" in <https://entokey.com>. On LSO=lateral superior olive region; MSO=medial superior olive region; DMPO=dorsomedial periolivary nucleus; VNTB=ventral nucleus of trapezoidal body; MNTB=medial nucleus of trapezoidal body.

El moviment de la perilimfa (ona viatgera) causa la vibració de la membrana basilar, i conseqüentment l'òrgan de Corti (que s'assenta sobre la mateixa) es veu desplaçat successivament amunt i avall. Amb aquests moviments, els cilis de les CCE, ancorats a la membrana tectòria, s'angulen, recuperant després la seva posició. Aquest moviment provoca una deformació de l'espai subtectòria, originant microcorrents d'endolimfa que ocasionen el moviment dels cilis de les CCI i la seva despolarització. Funcionalment, les CCE, amb la contracció dels seus cilis, aproximen la membrana tectòria a l'òrgan de Corti, però els elements receptors del so són les CCI, on s'origina l'activitat bioelèctrica que es transmet a la fibra nerviosa aferent que parteix d'aquesta cèl.lula i inicia el missatge neural que per la via coclear arriba fins al còrtex cerebral auditiu<sup>8</sup>.

#### 4.2.1.2. Laberint posterior o sistema vestibular

S'anomena laberint posterior a conjunt format pel vestíbul i els canals semicirculars, que conformen l'òrgan perifèric regulador del sentit de l'equilibri<sup>8</sup>.

El **vestíbul** ossi és una cavitat ovoide d'uns 4mm de diàmetre que allotja en el seu interior el vestíbul membranós, que està constituït per dos sacs o vessícules de parets membranoses plenes d'endolimfa: l'utricle i el sàcul<sup>8</sup>.

L'epitel·li que revesteix aquestes estructures consta d'unes zones diferenciades anomenades màcules acústiques. De la paret interna de l'utricle i el sàcul s'originen les fibres nervioses utriculars i saculars per emergir als quadrants posteriors del CAI, contribuint a la formació del nervi vestibular que, conjuntament amb el nervi coclear, constituirà el VIII parell cranial<sup>8</sup>

Els **conductes semicirculars** ossis són tres estructures cilíndriques arquejades, de 4mm de calibre, describint 2/3 de cercle (superior, posterior i horitzontal o lateral); dels seus extrems, un dels quals està dilatat, formant una ampolla, i l'altre extrem, que no presenta ampolla. El braç simple o no ampular dels dos conductes semicirculars verticals (superior i posterior), s'uneixen formant un braç comú anomenat *crus communis*, que desemboca al vestíbul. Els conductes semicirculars membranosos reproduïxen la forma dels ossis. L'epitel·li intern que revesteix l'ampolla dels conductes semicirculars membranosos està altament especialitzat en les anomenades crestes ampulars, que són els receptors sensorials fonamentals en el manteniment de l'equilibri. Així, les cèl·lules reconeixen la tracció i transmeten l'estímul al nervi vestibular, informant dels moviments rotatoris del cap<sup>8</sup>.

#### 4.2.2. Anatomia comparada de l'orella de la rata amb l'orella humana

L'anatomia de l'orella humana i de la rata presenten, en termes generals, una gran similitud, que permet usar aquests rosegadors en el disseny de models experimentals amb finalitats translacionals. No obstant, cal mencionar les diferències anatòmiques més rellevants.

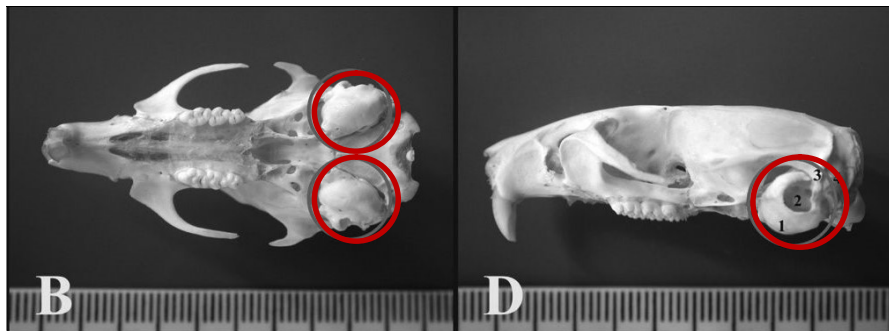
L'orella externa de la rata consta d'un pavelló auditiu mòbil, molt més gran que el de l'humà, constituït per teixit cartilaginós molt flexible.

L'orella mitjana de la rata conté les mateixes estructures anatòmiques que les de l'espècie humana, amb algunes diferències morfològiques que cal destacar:



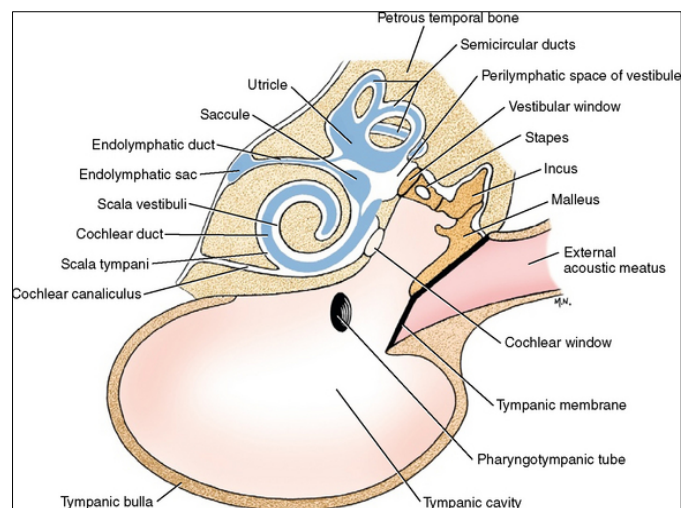
- Una gran cel.la òssia de contingut aeri postero-inferior respecte el conducte auditiu extern, anomenada *bulla*, substitueix la mastoide humana<sup>9</sup> (*Fig.6 i 7*);
- Consta d'una cadena ossicular composta per 3 ossets, molt similar a l'espècie humana, la mida dels quals és molt més reduït (aproximadament una quarta part en relació a la mida en humans) i la pràctica totalitat de la cadena ossicular s'allotja a l'epitimpà<sup>9</sup>;
- L'artèria estapedial, branca de l'artèria caròtida interna, passa entre les dues crures de l'estrep en el seu trajecte des de la porció cervical cap a la porció intracranial<sup>9</sup>;
- El nervi facial emergeix de l'os temporal més superficialment i anterior en la rata que en l'home<sup>9</sup>.
- A l'otoscòpia, el diàmetre anteroposterior del timpà de la rata medeix entre 2,2 i 2,4mm, en comparació als 9-10,2mm de diàmetre en l'espècie humana; la pars flàccida de la membrana timpànica ocupa una extensió proporcionalment molt més gran a la rata (25-29%) que en l'humà (3-6%); l'apòfisi curta del martell assenyala cap a la paret posterior del conducte auditiu extern, en contraposició a l'humà, en què assenyala cap a la paret anterior<sup>10</sup> (*Fig.8*).

A l'orella interna, la còclea descriu 2,5 voltes, com en l'espècie humana; els epitel.lis coclears i vestibulars presenten característiques estructurals molt similars als humans<sup>11</sup>.

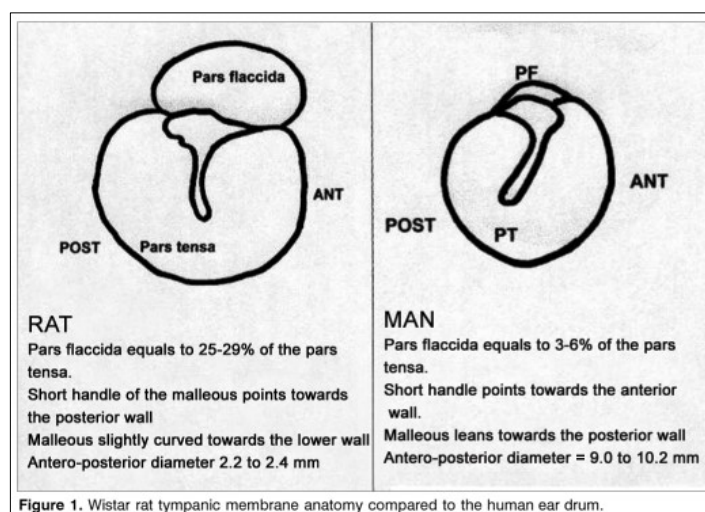


**Fig. 6.** Font: Albuquerque A; Rosseto M; de Oliveira J; Hyppolito M. Understanding the anatomy of ears from guinea pigs and rats and its use in basic otologic research. *Rev. Bras. Otorrinolaringol* Jan/Feb 2009; 75 (1).

On (1) bulla; (2) conducte auditiu extern; (3) escama; (4) osca sinusal posterior.



**Fig. 7.** Font: Evans HE, de Lahunta A. *Miller's anatomy* ed 4; St Louis 2013; Saunders/Elsevier.



**Fig. 8.** Font: Almeida L; Lavinsky L. "Tympanic membrane healing in myringotomies performed with argon laser or microknife: an experimental study in rats" *Rev. Bras. Otorrinolaringol* 2006; 72(6).

### **4.3. Fisiopatogènia: mecanismes d'ototoxicitat causada pel cisplatí**

No es coneix el mecanisme molecular exacte que expliqui el potencial efecte citotòxic del CDDP a nivell citoplasmàtic, però es creu que n'estan implicats:

- (1) l'acumulació d'espècies reactives d'oxígen (*reactive oxygen species*, ROS) i d'òxid nítric (NO) que exerceix un efecte citotòxic directe propiciant l'obertura del *permeability transition pore complex (PTPC)*<sup>12</sup>,
- (2) la inducció de la senyal estimuladora de permeabilització de membrana externa mitocondrial (MOMP) i,
- (3) l'activació del *pool* citoplasmàtic de p53, capaç de promoure la via MOMP<sup>13</sup>

El transport del cisplatí i els seus metabòlits a través de la membrana cel.lular, des de la sang fins al citosol, es duu a terme per diversos transportadors de membrana. El transportador de coure tipus 1 de mamífers (*copper transporter 1*, CTR1) o transportador de soluts 31A1 (*solute carrier 31A1*, SLC31A1) és una proteïna de membrana que juga un paper significatiu en la captació intracel.lular de cisplatí<sup>14</sup>. El CTR1 duu a terme una funció fisiològica vital, permetent el proveïment intracel.lular de coure, que és un nutrient cel.lular essencial necessari en un ampli espectre de reaccions enzimàtiques. El substrat natural de CTR1 és l'ió coure monovalent (Cu<sup>+</sup>). Sembla ser que el cisplatí es comporta com un lligand competitiu del coure: s'uneix al mateix domini ric en metionina on s'uneix el coure, permetent la seva entrada dins la cèl.lula<sup>15</sup>. Els transportadors de cations orgànics (*organic cation transporters*, OCT), són proteïnes de membrana que interaccionen específicament amb el cisplatí; s'ha demostrat que el tipus OCT2 s'expressa en les cèl.lules ciliades de l'òrgan de Corti i a les cèl.lules de l'*stria vascularis* de la còclea en ratolins<sup>16</sup>.

El CDDP és químicament inert fins que almenys un dels seus dos grups clor en posició *cis* és substituït per una molècula d'aigua<sup>17</sup>. Aquesta reacció es produeix en una petita proporció a la sang, però majoritàriament al citoplasma, de forma espontània, degut a la seva relativa baixa concentració d'ions clorur (~2-10mM intracel.lular, en comparació amb ~120mM de l'espai

extracel.lular)<sup>18-20</sup>. Un cop dins la cèl.lula, el cis-diamino(aqua)clorplatí (II) (o complexe monohidrat de cisplatí) és capaç d'induir la mort cel.lular almenys per dues vies diferents: una dependent de p53 i caspases<sup>21-23</sup>, i una mediada per proteïnes quinases<sup>24</sup>. Els dos mecanismes de mort cel.lular per cisplatí han estat demostrats en estudis *in vivo* en rates<sup>25,26</sup>.

L'exposició a altes dosis de cisplatí inhibeix l'activitat de certs enzims antioxidants (superòxid dismutasa, catalasa, glutatió peroxidasa i glutatió reductasa) i estimula l'activitat d'altres, com el NOX-3 (isoforma d'oxidasa de nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat -NADPH-, altament expressada a la còclea), amb el consegüent increment en la peroxidació lipídica, que causa alts nivells d'espècies reactives d'oxigen<sup>27,28</sup> (ROS). Els radicals superòxids que se'n generen poden dur a terme quatre accions:

- (a)** interaccionar amb l'òxid nítric (NO) formant peroxinitrit, que interacciona amb les proteïnes, inactivant-les<sup>29</sup>;
- (b)** formar radicals lliures hidroxils que, després d'interaccionar amb àtoms de ferro (Fe), formen un compost que reacciona amb àcids grassos polinsaturats (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) de la bicapa lipídica, generant el reactiu aldehyd 4-hidroxinonenal (4-HNE)<sup>29</sup> que desencadena l'entrada de calci dins la cèl.lula, conduint-la a l'apoptosi<sup>27,30</sup>;
- (c)** inactivar els enzims antioxidants<sup>31</sup> i,
- (d)** desencadenar la migració citosòlica de Bax, amb la consegüent activació de la via de senyalització de l'apoptosi mitocondrial, que implica l'alliberació de citocrom c mitocondrial i l'activació de caspases 3 i 9<sup>22,23</sup>.

A més de l'apoptosi mediada per p53 i caspases, les cèl.lules exposades a cisplatí mostren una sobreexpressió de la quinasa reguladora extracel.lular (*extracellular regulatory kinase*, ERK) 1/2 i del factor nuclear kB (*nuclear factor kB*, NFkB), estimuladors de l'alliberació de citoquines proinflamàtòries, tals com el factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), interleuquines (IL)-1 $\beta$  i IL-6. Com a conseqüència, es desencadenen els processos de fragmentació nuclear, reordenament del citoesquelet d'actina i mort cel.lular<sup>24,26</sup>.

La còclea és un òrgan de gran complexitat, compost per gran varietat de tipus cel.lulars, amb diferent grau de susceptibilitat davant dels mecanismes citotòxics del cisplatí. Diversos estudis han descrit els mecanismes mitjançant els quals el cisplatí exerceix la seva toxicitat sobre els diferents tipus de cèl.lules o teixits de la còclea.

En els fibròcits tipus I de la paret lateral del lligament espiral de la còclea, el cisplatí activa els canals de potassi de gran conductància. Aquest increment de fluxe de potassi provoca una pèrdua de la pressió osmòtica intracel.lular i de la força iònica, interrompent el gradient electroquímic de l'endolimfa, on la concentració de potassi sol ser més elevada i la de calci més baixa, comparada amb la perilimfa que l'envolta<sup>32</sup>. Les alteracions en el balanç iònic activen vies pro-apoptòtiques, conduint finalment a la mort cel.lular<sup>33,34</sup>.

A l'estria vascular i lligament espiral de la còclea de ratolins tractats amb cisplatí per via sistèmica s'ha demostrat la inducció de NFkB i sintetasa d'òxid nítric induïble (iNOS), fet que suggereix que l'òxid nítric (NO) juga un paper essencial en l'ototoxicitat per cisplatí<sup>35</sup>. Estudis en rates tractades amb cisplatí han evidenciat l'activació de NFkB a l'òrgan de Corti, lligament espiral i estria vascularis<sup>26</sup>. El paper pro-apoptòtic de NFkB es va demostrar en la línia cel.lular auditiva HEI-OC1 (House Ear Institute- Organ of Corti1) mitjançant l'ús d'inhibidors de NFkB, que en conseqüència disminuïen l'activació de la caspasa 3, malgrat l'exposició de la línia cel.lular a cisplatí<sup>36</sup>. Estudis *in vitro* amb cèl.lules HEI-OC1 i *in vivo* en ratolins, també han demostrat l'efecte citotòxic de citoquines proinflamàtòries com TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6, en la ototoxicitat induïda per cisplatí<sup>37</sup>.

El cisplatí també pot actuar directament sobre l'ADN, unint-se concretament a la posició N7 de les bases purines, causant enllaços creuats i formació d'adductes<sup>38</sup>.

Malgrat tot l'exposat, la toxicitat per cisplatí també pot ser contrarrestada per una sèrie de sistemes defensius coclears endògens, entre els que s'inclouen: enzims antioxidants, receptors adenosina, molècula 1 de lesió renal (kidney injury molecule-1, KIM-1), proteïnes de xoc tèrmic (*heat shock proteins*), i

hemo-oxigenasa-1<sup>1</sup>(1). No obstant, els efectes protectors de les molècules citoprotectores contra l'acció del cisplatí són limitats, de manera que quan aquests es veuen superats, la mort cel.lular serà inevitable<sup>39</sup>.

#### **4.4. Histopatologia: lesions estructurals coclears causades per cisplatí**

Diversos estudis experimentals han descrit els danys estructurals causats pel cisplatí i els seus metabòlits en les cèl.lules coclears d'animals d'experimentació.

L'observació més freqüent és la degeneració apoptòtica de les cèl.lules ciliades de l'òrgan de Corti. Existeix una clara evidència de que la fragmentació de la doble cadena d'ADN i altres signes d'apoptosi s'inicien a la filera cel.lular més externa i progressen cap a la més interna. També s'ha descrit lesions en altres estructures, tals com dehiscència de les beines de mielina de les neurones tipus I del gangli espiral, i deplecció del nombre d'òrgànuls citoplasmàtics, edema, contracció i lisi cel.lular a l'estria vascular<sup>40-43</sup>.

Estudis topogràfics han demostrat l'existència d'un gradient de progressió lesional, de manera que el dany s'inicia sempre a la base de la còclea, on és més sever, i progressa cap a l'àpex<sup>1-3,6,44</sup>. Aquest fet explica que les freqüències auditives altes estiguin més afectades o que ho facin en un estadi més precoç que les freqüències baixes, en els estudis audiomètrics.

#### **4.5. Clínica auditiva causada per l'exposició a cisplatí**

##### **4.5.1. Manifestacions clíniques secundàries a l'ototoxicitat causada per cisplatí**

Les lesions ototòxiques induïdes pel cisplatí habitualment apareixen en estadis precoços (d'hores a dies després de l'exposició)<sup>45</sup>, causant una hipoacúsia neurosensorial bilateral, simètrica, progressiva, irreversible, dosi-dependent i acumulativa<sup>46</sup>. L'efecte citotòxic en humans s'inicia a partir de dosis de 60mg/m<sup>2</sup> per cicle<sup>47</sup>. En esquemes d'administració a dosis altes, en el rang de 150-220mg/m<sup>2</sup>/dosi, el 100% dels pacients estudiats van presentar pèrdua auditiva<sup>48,49</sup>. La majoria de pacients tractats amb cisplatí presenten, associada a la hipoacúsia, clínica de tinnitus<sup>50</sup>. Alguns estudis descriptius

recullen una elevació del llindar auditiu en l'audiometria tonal liminar (ATL) entre el 75-100% dels pacients tractats amb cisplatí amb esquemes de dosis estàndard<sup>51</sup>; entre els quals, la població pediàtrica presenta una especial susceptibilitat<sup>52-54</sup>.

La incidència d'ototoxicitat associada a cisplatí descrita en població infantil està compresa entre 22-70%<sup>53,55-57</sup>. S'ha descrit una major susceptibilitat dels nens petits a desenvolupar una hipoacússia secundària a cisplatí que en els adults<sup>56-58</sup>, amb la important repercussió a llarg termini que això suposa, especialment en nens que es troben en l'etapa pre- o peri-lingual del seu desenvolupament<sup>59</sup>, o bé que presenten altres dèficits associats, com pèrdua visual o disfunció cognitiva. Aquest grup de població no té les bases de coneixement lingüístic ni la maduresa neurològica necessària per a omplir els buits auditius, i per tant requereixen una millor audició que un adult per al reconeixement de la parla i la comprensió<sup>60</sup>. Ja que els sons en altes freqüències són crítics per a la intel·ligibilitat de la parla, s'ha demostrat que fins i tot una hipoacússia moderada en aquest rang de freqüències pot afectar el desenvolupament acadèmic i socio-emocional en nens en etapes pre- o peri-lingual<sup>61-63</sup>. Per tot l'exposat, la hipoacússia és considerada l'efecte secundari dosi-limitant més freqüent del cisplatí en la població infantil<sup>1,3,5-7</sup>.

S'ha descrit una gran variabilitat interindividual a la susceptibilitat d'ototoxicitat causada per cisplatí. No obstant, s'accepta que existeixen certs factors considerats de risc: altes dosis acumulades de cisplatí, edats extremes de la vida, fallada de la funció renal, hipoacússia pre-existent, exposició a contaminació acústica<sup>2,64</sup>, dèficits nutricionals (anèmia i hipoalbuminèmia)<sup>49</sup> i radioteràpia en un camp terapèutic que inclogui la còclea a dosis superiors a 48Gy (més freqüentment administrat en pacients afectes de carcinoma nasofaringi)<sup>64,65</sup>.

La pèrdua prevista en el llindar auditiu de pacients tractats amb radioteràpia i altes dosis de cisplatí (100 mg/m<sup>2</sup>/dosi) és de 10dB de mitjana<sup>66</sup>. En la població infantil en concret, es consideren factors de risc independents la dosi acumulada de cisplatí i el gènere masculí<sup>67</sup>. En l'estudi de cohorts de Yancey et al, en què 102 nens afectes de diferents processos neoplàsics van

ser tractats amb cisplatí, es suggeria que per a la mateixa dosi acumulada de cisplatí, els diferents esquemes de dosi per sessió podrien afectar el perfil de toxicitat. Els pacients que van rebre 5 dies de cisplatí a 20mg/m<sup>2</sup>/dosi (per al tractament de tumor de cèl.lules germinals) van presentar menor hipoacússia que aquells que rebien una sola dosi de 100 o 120 mg/m<sup>2</sup>/dosi (tractament de neuroblastoma i osteosarcoma). En el mateix estudi, el gènere masculí va resultar un factor de risc per a la pèrdua auditiva en comparació al gènere femení, fins i tot després d'estratificar segons els diferents tipus tumorals (evitant, doncs, que l'esquema de dosificació pogués resultar un factor de confusió)<sup>67</sup>. Coincidint amb aquests resultats, en un estudi experimental Huang et al<sup>68</sup> també van descriure diferències genètiques respecte la susceptibilitat al cisplatí segons el gènere, éssent els mascles més susceptibles que les femelles. Mesurant la meitat de la concentració màxima inhibidora (*half maximal inhibitory concentration*, IC<sub>50</sub>), com a indicador de l'efectivitat d'inhibició de la funció biològica de quatre agents quimioteràpics, les línies cel.lulars derivades de femelles varen demostrar menor sensibilitat als platins (entre ells el cisplatí) en comparació a les línies derivades de mascles.

A més, s'han descrit diversos trets genètics predisponents a l'ototoxicitat per cisplatí. Entre ells s'inclouen mutacions mitocondrials (halogrup J mitocondrial europeu, molt infreqüent, també associat a l'atròfia òptica hereditària de Leber)<sup>69</sup>; polimorfismes funcionals de l'enzim glutatió S-transferasa (elevació de quatre vegades més risc d'hipoacússia en pacients tractats amb cisplatí els individus amb al.lels 105Ile/105Ile-GSTP1 o 105Val/105Ile-GSTP1 que els individus amb al.lels 105Val/105Val-GSTP1)<sup>70</sup>; polimorfismes no-sinònims de nucleòtid únic (SNPs) del gen de la megalina (elevació del risc de susceptibilitat a hipoacússia secundària al cisplatí en pacients amb al.lels A per al gen de rs2075252)<sup>71</sup>; polimorfismes dels gens *excision repair cross-complementing*, ERCC1, ERCC2, ERCC4 i ERCC5) (major resposta antitumoral i per tant protecció, en individus homozigots per a l'al.lel T del gen ERCC2), XPA i XPC (major susceptibilitat en pacients amb genotip Lys939Gln XPC)<sup>72</sup>.



#### **4.5.2. Alteracions funcionals auditives secundàries a l'ototoxicitat per cisplatí**

Les lesions estructurals anteriorment mencionades es tradueixen en una alteració de la funció coclear, demostrat tant en humans com en animals d'experimentació.

##### **4.5.2.1. Alteracions funcionals audiològiques en recerca clínica en humans**

Les guies clíniques per a la monotorització de l'ototoxicitat, com la publicada per l'Associació Americana d'Audiologia (*American Association of Audiology, AAA*) ([www.audiology.org](http://www.audiology.org), Octubre 2009), recomanava l'ús dels següents mètodes audiològics per a l'avaluació basal, prèvia al tractament quimioteràpic: audiometria tonal liminar en el rang de freqüències conversacionals (ATL), audiometria d'altres freqüències (*high-frequency audiometry, HFA*), timpanometria, audiometria verbal i otoemissions acústiques (*otoacoustic emissions, OAEs*).

L'audiometria tonal liminar (ATL) en freqüències convencionals (0.25-8kHz), és el mètode de cribratge més extès i posa de manifest que el cisplatí inicialment afecta les freqüències auditives altes (per sobre de 4kHz)<sup>46</sup>, i posteriorment progressa cap a freqüències mitges (conversacionals, 500Hz-3kHz), quan la dosi acumulada és major de 400mg/m<sup>2</sup>. En pacients que reben tractaments a dosis altes de cisplatí (150-225mg/m<sup>2</sup>/dosi), els estudis audiomètrics de freqüències ultra-altes (9-20kHz) van demostrar pèrdua auditiva en el 100% dels casos<sup>48</sup>. Encara que totes les evidències indiquen que l'ototoxicitat per cisplatí és dosi-dependent i progressiva, l'estudi prospectiu amb major mesura mostral fins a la data actual que avalua dades audiomètriques de pacients tractats amb cisplatí, demostrava una tendència a assolir un *plateau*, amb una clara predominància en altes freqüències: per a freqüències per damunt de 8kHz la mitjana de pèrdua auditiva es trobava entorn 75-80dB, mentre que per freqüències per sota de 8kHz la pèrdua se situava entorn 45-60dB<sup>73</sup>. Com s'ha comentat anteriorment, les primeres alteracions funcionals a la via auditiva secundàries a toxicitat per cisplatí es tradueixen en un dèficit a freqüències superiors a 8kHz, que no poden ser

detectades mitjançant ATL convencional. Per aquest motiu, l'AAA recomana l'ús de tècniques capaces de detectar la lesió en estadis precoços (en què encara no hi ha repercussió sobre els llindars auditius de les freqüències conversacionals) per a la monitorització de l'ototoxicitat, com l'HFA o productes de distorsió d'otoemissions acústiques (*distorsion product otoacoustic emissions* o *DPOAEs*).

L'audiometria d'altres freqüències mesura els llindars de tons purs a freqüències superiors a 8kHz (9-20kHz), que pot detectar canvis en la funció auditiva abans que es faci clínicament patent, quan ja s'han alterat les freqüències conversacionals (per sota de 8kHz)<sup>74</sup>. Knight et al<sup>59</sup> van demostrar en un estudi clínic en població infantil en tractament quimioteràpic amb platins, que HFA detecta alteracions funcionals auditives en un estadi més precoç que l'ATL, i per tant es considera una estratègia adequada per a la monitorització de l'otoxocitat per cisplatí. Segons els resultats d'aquest estudi, les alteracions funcionals auditives es van posar de manifest més precoçment mitjançant HFAs que DPOAEs, encara que sense diferències estadísticament significatives. Donat que requereix la participació activa del pacient, una de les principals limitacions per a l'aplicació d'aquest mètode és la falta de fiabilitat en nens per sota dels 5 anys d'edat o que mostrin una falta d'atenció. Altres casos de limitació per a l'ús de HFA són aquells pacients que presentin una hipoacússia ja coneguda en el rang de freqüències conversacionals (habitualment població d'edat avançada), ja que és probable que presentin una hipoacússia també per a altes freqüències degut a una pèrdua de cèl.lules ciliades externes pre-existent al tractament amb cisplatí, i que falsejaria les dades d'una correcta monitorització de l'efecte ototoxic del quimioteràpic<sup>75</sup>. En aquests casos es recomana l'ús de tècniques que no requereixin la col.laboració del pacient.

El registre de DPOAEs és una tècnica sensible, cost-eficient i objectiva (que no requereix una resposta conductual), útil en el cribratge de la hipoacússia induïda per cisplatí, inclús en estadis pre-simptomàtics<sup>76</sup>. Una de les seves principals limitacions és que els resultats es poden veure afectats per processos patològics de l'orella mitjana, com la otitis mitjana<sup>52</sup>, més freqüent en pacients en tractament quimioteràpic, degut al seu estat d'immunosupressió,

així com en pacients en tractament radioteràpic de la regió de cap i coll. Per aquest motiu, i tal com s'ha comentat anteriorment, les guies de pràctica clínica recomanen usar un conjunt de proves, incloent ATL, HFA, audiometria verbal i timpanometria, a més de OAEs.

El registre de potencials auditius evocats de tronc cerebral (PEATC) (*auditory brainstem response* o *ABR*) és una altra tècnica objectiva i sensible, vàlida per a l'avaluació de pèrdua auditiva i la monitorització de l'ototoxicitat. S'ha avaluat la possibilitat d'obtenir llindars de PEATC a freqüències per damunt de les conversacionals, per tal de monitoritzar l'ototoxicitat<sup>77</sup>, no obstant, aquest mètode no s'ha extès en la pràctica clínica, i l'ús de proves PEATC d'alta freqüència (*HF-ABR*) encara roman en l'àmbit de la recerca<sup>78</sup>. L'ús de HF-ABR seria de més utilitat en aquelles poblacions que no puguin oferir respostes conductuals fiables, tals com nens petits en tractament quimioteràpic. No obstant, la necessitat de l'ús de sedació per a una correcta obtenció de PEATC fiables i la necessitat de repetir el procediment per a poder realitzar un seguiment en el temps, sovint contraindicat pel context general de salut en què es troba el pacient, han dut les guies clíniques a desaconsellar l'ús d'aquesta tècnica com a primera elecció per a la monitorització de l'ototoxicitat.

#### 4.5.2.2. Alteracions funcionals audiològiques en animals d'experimentació

Les lesions estructurals anteriorment mencionades es tradueixen en una alteració de la funció coclear, com s'ha demostrat en diversos estudis experimentals en conills d'índies, rates i jèrbus: reducció dels potencials endococlears (*endocochlear potential*, EP), elevació del llindar dels potencials d'acció compost (*compound action potential*, CAP) i potencials coclears microfònics (*cochlear microphonic potential*, CM), reducció dels productes de distorsió d'otoemissions acústiques (*distortion product otoacoustic emissions*, DPOAE), i elevació dels llindars de les respostes auditives evocades de tronc cerebral (*auditory evoked brainstem responses*, ABR). Per a totes les proves funcionals esmentades, s'observa una major pèrdua funcional en altes freqüències que en baixes freqüències<sup>1</sup>. Les dades funcionals són congruents amb l'evidència histològica de la particular susceptibilitat de les cèl·lules

ciliades externes enfront a l'acció del cisplatí, tant en humans com en animals d'experimentació.

Donat que el registre dels DPOAEs és una tècnica ràpida, no invasiva i sensible que permet avaluar l'efecte ototòxic del cisplatí, ha estat el mètode més àmpliament usat per a l'avaluació funcional en estudis experimentals<sup>79,80</sup>. No obstant, un estudi comparatiu de DPOAEs *versus* ABR en rates tractades amb cisplatí de forma sistèmica, va demostrar una major sensibilitat dels ABR per a la detecció de canvis funcionals atribuïbles a ototoxicitat<sup>81</sup>.

## **4.6. Otoprotecció**

### **4.6.1. Mecanismes d'otoprotecció farmacològica**

A la pràctica clínica, l'ototoxicitat és l'efecte secundari limitant de dosi més freqüent del cisplatí, requerint la seva suspensió i substitució per un agent quimioteràpic de segona elecció, habitualment el carboplatí, o acceptant la seqüela d'una hipoacúsia, en ocasions severa. Per tal de reduir l'ototoxicitat causada pel cisplatí, s'ha estudiat el potencial paper otoprotector de molts i diversos fàrmacs. L'otoprotector idoni hauria de reunir les següents característiques: (1) ser capaç d'oferir una otoprotecció fiable sense interferir en l'efecte antitumoral del cisplatí, (2) presentar els mínims efectes secundaris i (3) usar una via d'administració tècnicament senzilla. El fet que els mecanismes responsables de les accions antitumoral i ototòxica del cisplatí siguin pràcticament idèntics és el principal obstacle per a l'ús d'otoprotectors per via sistèmica. Amb l'objectiu de pal·liar aquesta gran limitació, s'ha desenvolupat estratègies d'otoprotecció mitjançant la seva administració local.

S'ha dedicat especial atenció als antioxidants, capaços de reduir els efectes de les espècies reactives d'oxigen i nitrogen<sup>7</sup>.

Existeixen tres possibles estratègies per a evitar la toxicitat causada per les espècies reactives d'oxigen i nitrogen: prevenir la interacció de ROS amb les proteïnes, lípids i ADN cel·lular mitjançant la formació de complexos amb el

cisplatí, metabòlicament inactius; prevenir la formació de ROS; i induir la producció d'antioxidants endògens<sup>82</sup>.

#### 4.6.1.1. Prevenció de l'acció de ROS

S'ha descrit dos mecanismes moleculars capaços d'inactivar l'acció de cisplatí administrat intratimpànicament:

- (1) la formació de complexos amb cisplatí, que resultin funcionalment inactius i,
- (2) la condensació contraió (ió que acompanya una espècie iònica mantenint la seva neutralitat elèctrica)<sup>83</sup>.

Algunes molècules amb propietats nucleofíliques, capaces de formar complexos moleculars inactius en reaccionar amb el cisplatí, són aquelles que contenen algun grup sulfur, seleni, àcid carboxílic o grup alcohol<sup>83</sup>. Les molècules més estudiades d'aquest grup són: amifostina, WR-1065, N-acetilcisteïna, D-metionina, sodi tiosulfat i erdosteïna<sup>83,84</sup>.

#### 4.6.1.2. Prevenció de la formació de ROS

Els glucocorticoides (prednisona, dexametasona i metilprednisolona) han estat estudiats pel seu potencial paper otoprotector contra el cisplatí, basat en l'experiència clínica en el seu ús per al tractament d'una àmplia varietat de causes d'hipoacússia neurosensorial: processos autoimmunes de l'orella interna, hidrops endolimfàtic, malaltia de Ménière, tinnitus, hipoacússia sobtada i hipoacússia ràpidament progressiva de causa idiopàtica<sup>85,86</sup>.

Altres molècules que actuen també a través d'aquest mecanisme són l'allopurinol i JWH-015.

#### 4.6.1.3. Inducció de la producció d'antioxidants endògens

Els fàrmacs que han demostrat tenir capacitat per a induir la producció d'antioxidants endògens que neutralitzin l'acció de ROS són: N-acetilcisteïna (NAC), salicilat, vitamina E, D i L-metionina, ebselè, agonsistes d'adenosina (R-fenilisopropil adenosina, *R-phenylisopropyl adenosine* o R-PIA; i 2-clor-N-ciclopentil adenosina, *2-chloro-N-cyclopentyl adenosine* o CCPA).

#### 4.6.1.4. Altres mecanismes

Ringer lactat ha demostrat la seva acció otoprotectora administrada intratimpànicament en xinxilles tractades amb cisplatí sistèmic<sup>87</sup>, encara que els seu mecanisme d'acció encara és desconegut<sup>7</sup>.

Les melanocortines són neuropèptids derivats de l'hormona adrenocorticotròpica (ACTH) amb propietats neuroprotectores com l'acceleració de la recuperació i inducció de la regeneració dels nervis perifèrics<sup>88</sup>. Concretament Org2766, un anàleg sintètic de ACTH (4-8), s'està estudiant com a possible agent otoprotector contra l'efecte del cisplatí, de moment sense resultats conclouents<sup>89</sup>.

Algunes neurotrofines, com la neurotrofina-3 (NT-3) i el factor de creixement nerviós derivat del cervell (brain-derived nerve growth factor o BDNF), han demostrat certa otoprotecció<sup>90</sup>.

Un extracte purificat de Ginkgo biloba també va demostrar efecte protector sobre les cèl.lules ciliades externes i prevenció de l'elevació dels llindars de ABR en rates tractades amb cisplatí<sup>91</sup>.

Pitfirina- $\alpha$ , un agent inhibidor de p53, va demostrar una acció citoprotectora sobre les cèl.lules ciliades externes in vitro, bloquejant l'acció de les caspases i la conseqüent apoptosi<sup>92</sup>.

#### **4.6.2. Administració local de fàrmacs otoprotectors**

L'ús de substàncies otoprotectors administrades per via sistèmica està limitat en la pràctica clínica pels seus efectes secundaris, i especialment per la reducció de l'efectivitat del tractament antitumoral<sup>3,6,86</sup>. Com a conseqüència, nombrosos estudis han investigat la possibilitat d'utilitzar una ruta local per a l'administració de fàrmacs otoprotectors. La via d'administració local permet assolir concentracions molt més altes del fàrmac a l'orella interna que a la resta de l'organisme, en comparació amb les vies oral o parenteral, de manera que s'aconsegueix evitar els efectes secundaris sistèmics i la disminució de l'eficàcia antitumoral<sup>3,6,85,93,94</sup>. Diversos models animals han demostrat el paper otoprotector de diferents fàrmacs administrats per via local<sup>87,95-97</sup>. En la majoria

de models animals, l'administració del fàrmac otoprotector es duu a terme mitjançant l'apertura de la bulla temporal per via retroauricular, en un procediment quirúrgic sota anestèsia general. Aquest abordatge permet la visió directa de les estructures anatòmiques i facilita que el fàrmac es pugui aplicar directament sobre la finestra rodona.

#### **4.7. Models de toxicitat coclear**

Per a poder desenvolupar estudis d'otoprotecció és imprescindible comptar amb models sòlids i fàcilment reproduïbles de toxicitat coclear. Un inconvenient important en aquesta àrea de recerca són les limitacions dels models animals per a l'estudi d'ototoxicitat per cisplatí. Donat els seus altres efectes secundaris, principalment la nefrotoxicitat, l'administració sistèmica de cisplatí en rosegadors comporta un alt índex de mortalitat<sup>98-100</sup>, que complica l'estudi de l'efecte ototòxic. Amb l'objectiu d'evitar els efectes secundaris sistèmics, alguns autors han dissenyat models d'administració local de cisplatí per a estudiar el seu efecte còcleo-tòxic, metodològicament molt similars als models d'administració local d'otoprotectors; la majoria descriuen procediments quirúrgics mitjançant l'abordatge retroauricular, amb dissecció i apertura de la *bulla* per a accedir a l'orella mitjana, processos que impliquen certa morbiditat i dificultat experimental<sup>95,97,101-103</sup>. Una tècnica menys emprada és la punció transtimpànica i instil·lació del fàrmac, omplint la totalitat del volum de l'orella mitjana, des d'on difondrà cap a l'orella interna<sup>102,104</sup>; encara que aquesta tècnica no permet la visualització directa de les estructures anatòmiques, és un procediment tècnicament molt més senzill i, sobretot, molt menys agressiu per a l'individu. Després de fer una cerca bibliogràfica exhaustiva, hem trobat que només l'estudi de He et al (2009)<sup>102</sup> usa la via intratimpànica per a l'administració del cisplatí com a model d'ototoxicitat; no obstant, la falta de valoració dosi-resposta suposa una falta de solidesa pel model descrit; a més, el fet de treballar amb ratolins dificulta la tècnica d'administració en comparació amb l'ús d'animals de major mesura, com la rata.

#### **4.8. Toxicitat vestibular per cisplatí**

A més dels efectes auditius, la majoria dels fàrmacs ototòxics també originen una disfunció vestibular. La susceptibilitat del sistema vestibular davant de la toxicitat causada pel cisplatí encara no ha estat ben establerta. Les dades clíniques són escasses i en ocasions controvertides: diversos estudis han descrit els efectes vestibulars del cisplatí<sup>105-109</sup>, encara que altres autors descriuen molt baixa incidència i intensitat de les manifestacions clíniques de patologia vestibular atribuïble a l'exposició a cisplatí<sup>110-112</sup>. En el camp de la recerca bàsica les dades també són escasses. Encara que hi ha estudis *in vitro* que descriuen que la sensibilitat de les cèl.lules ciliades vestibulars davant del cisplatí és equiparable a la de les cèl.lules ciliades externes coclears<sup>92,113,114</sup>, són molt pocs els estudis experimentals en animals els que han estudiat la vestibulotoxicitat com a conseqüència de l'exposició sistèmica al cisplatí, i els efectes descrits varen resultar escassos o nuls<sup>115-119</sup>. Estudis experimentals *in vivo* de toxicitat coclear també han descrit canvis comportamentals propis de disfunció vestibular en animals tractats amb administració local de cisplatí<sup>97,101</sup>, però cap d'ells no estudiava l'efecte vestibular específicament.





## **5. HIPÒTESI I OBJECTIUS**



## **5.1. Hipòtesi**

El model animal en la rata de toxicitat còcleo-vestibular mitjançant l'administració intratimpànica de cisplatí és un procediment eficaç i de molt baixa morbiditat, que permet descriure un patró dosi-resposta útil per a posteriors estudis de recerca.

## **5.2. Objectius**

### **5.2.1. Objectiu principal**

Descriure un model animal en la rata de toxicitat còcleo-vestibular per administració intratimpànica de cisplatí.

### **5.2.2. Objectius secundaris**

(1) demostrar mitjançant l'estudi histològic el caràcter tòxic del cisplatí sobre l'epitel·li sensitiu coclear, en administrar-se intratimpànicament en la rata.

(2) realitzar un estudi dosi-resposta de la toxicitat sobre l'epitel·li coclear després de l'administració intratimpànica de cisplatí en la rata.

(3) demostrar mitjançant l'estudi funcional el caràcter tòxic del cisplatí sobre l'epitel·li sensitiu vestibular, en administrar-se intratimpànicament en la rata.

(4) demostrar la baixa morbiditat a nivell sistèmic del model de toxicitat còcleo-vestibular per administració intratimpànica de cisplatí a la rata.

(5) demostrar la baixa morbiditat a nivell local del model de toxicitat còcleo-vestibular per administració intratimpànica del cisplatí a la rata.



## **6. MATERIAL I MÈTODES**



## **6.1. Compostos químics** (Taula 1)

**Cisplatí:** compost en pols (P4394, Sigma-Aldrich®)

Es van preparar solucions de cisplatí en sèrum salí a concentracions de 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 i 2.0mg/ml respectivament.

### **Immunomarcadors:**

#### Anticossos primaris

- Anticòs policlonal de conill anti-calbindina (CB-38a, Swant®)
- Anticòs policlonal de conill anti-miosina VIIa (25-6790, Proteus Biosciences®)
- Anticòs monoclonal anti-neurofilament 200 kD (clon N52, Sigma®)

#### Anticossos secundaris

- Alexa-Fluor 488 conjugat amb anticòs d'ase anti-conill (A21206, Molecular Probes®, Invitrogen™)
- Alexa-Fluor 647 conjugat amb anticòs d'ase anti-ratolí (A31571, Molecular Probes®, Invitrogen™)

Les *calbindines* són una família de proteïnes citoplasmàtiques d'unió al calci dependents de la vitamina D, dividides en diferents sub-famílies. Entre elles, trobem calbindina-D28k, que s'expressa en cèl.lules intestinals, renals i nervioses d'aus i mamífers<sup>120</sup>. En el nostre estudi, aquest marcatge ens permet identificar el citoplasma de les cèl.lules ciliades de l'orella interna.

Les *miosines* són proteïnes amb propietats mecànico-químiques, que actuen com a motors moleculars, unint-se a l'actina i utilitzant l'energia alliberada de la reacció enzimàtica de la conversió d'ATP en ADP + fosfat inorgànic (Pi), per a transformar-la en energia motora. Una superfamília de les miosines és l'anomenada de les miosines no-convencionals, la principal funció de les quals consisteix a la unió o enllaç de les membranes intracel.lulars i orgànuls al citoesquelet d'actina. La *miosina VIIA* és una proteïna codificada pel gen MYO7A, que s'expressa en nombrosos teixits de mamífers, entre ells, els epitel.lis de l'orella interna, i específicament per les cèl.lules ciliades<sup>121</sup>. En



aquest estudi, el marcatge de miosina ens permet identificar el citoesquelet de les cèl.lules ciliades de l'orella interna.

Els *filaments* són proteïnes de característiques estructurals que componen el citoesquelet de les cèl.lules d'animals vertebrats, que es classifiquen en 3 grups en funció del seu diàmetre (7, 10 i 25 nanòmetres de mitjana, respectivament). Els *neurofilaments (NF)* són filaments intermitjos (10nm de diàmetre) localitzats específicament a les neurones. Suposen el principal component del seu citoesquelet i aporten el suport necessari per a l'adequat creixement axonal (per exemple, incrementant el diàmetre axonal). S'han descrit 3 subtipus principals de neurofilaments, en funció del seu pes molecular (PM): el grup amb PM més pesat o més alt (*heavy* o *highest*) (*NF-H*) té un PM comprès entre 200-220kDa<sup>122</sup>, que es correspon amb el marcatge d'immunohistoquímica que hem realitzat a les nostres mostres, per a localitzar els axons sensorials de l'òrgan de Corti.

**Altres marcadors:**

Alexa-Fluor 555 conjugat amb faloïdina (Molecular Probes®, Invitrogen™, A31572) per al marcatge de l'actina.

La *fal.loïdina* és una toxina pertanyent al grup de *fal.lotoxines*, produïdes pel bolet *Amanita phalloides*. Es tracta d'un heptapèptid bicíclic que forma forts enllaços amb els filaments d'actina (F-actina). Les *actines* són una família de proteïnes que formen part dels components fonamentals del citoesquelet de les cèl.lules dels organismes eucariotes. L'actina es pot presentar en forma de monòmer lliure, de conformació globular (G-actina) o en forma de polímer lineal, de conformació microfilamentosa (F-actina)<sup>123</sup>. El marcatge de l'actina identifica els esterocilis de les cèl.lules ciliades externes en el nostre treball.

**Isofluorà:** isofluorà 100% solució per a vapor per a inhalació; anestèsic apte per a l'ús en èquids, gats, coloms, gossos, ocells, mamífers petits i rèptils, de laboratoris Abbott®.

**Meloxicam:** meloxicam 5mg/ml en solució injectable; analgèsic apte per a l'ús en gats i gossos, de laboratoris Boehringer Ingelheim®.

**Solució tampó fosfat salí (*phospate buffered saline* o **PBS**):** dilució de 100ml PBS x10 en 900ml d'aigua mil.liQ (18 megaomhs), i posterior mesura del pH (òptim: 7.2 +/- 0.2), amb ajustament en cas necessari (mitjançant NaOH si  $\text{pH} < 7.0$ ; HCl si  $\text{pH} > 7.4$ ).

**Paraformaldehid despolimeritzat (PFD):** sota la campana d'extracció de gasos, dilució de 166.6 g paraformaldehid (Sigma-Aldrich®, 158127) 96% en pols en 1.000ml de PBS x1, mitjançant un agitador a 90rpm i l'ús d'una peça magnètica, a temperatura de 70°C, fins que la solució perdés la coloració blanca i quedés transparent; posteriorment es va repartir en aliquotes de 50ml de PFD 16% que es van conservar congelades. Previ al seu ús, sota la campana d'extracció de gasos, es van preparar dilucions de 50ml PFD 16% en 150ml de PBSx1, mitjançant l'agitador a 90rpm amb l'ús d'una peça magnètica, a temperatura ambient. Les aliquotes de 50ml de PFD 4% resultants (caducitat de 3-4 dies conservades a la nevera) varen ser les utilitzades per a la fixació per immersió dels teixits dissecats.

**Solució crioprotectora:** 34.5% de glicerol ( $\geq 99.5\%$  (Sigma-Aldrich®, 49770), 30% d'etilenglicol ( $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich®, 293237), 20% de PBS i 15.5% d'aigua destil.lada mil.liQ, que cal guardar en el congelador a temperatura de -20°C. Previ a la immersió de les peces histològiques fixades en PFD 4% en la solució criopreservadora, es van realitzar 2 rentats de 20 minuts de durada cadascún en PBSx1.

**Medi per a la cobertura i muntatge del material histològic:** sota la campana d'extracció de gasos, barrejar mitjançant l'agitador i una peça magnètica, 4.8g Mowiol® (*polyvinyl alcohol* 4-88) (Sigma®, 81381) amb 12ml glicerol ( $\geq 99.5\%$  (Sigma-Aldrich®, 49770) durant 1h, protegit de la llum. A continuació, afegir 12ml d'aigua mil.liQ i agitar durant 2h. Transcorregut aquest temps, afegir 12ml Tris-HCl 0.2M (pH 8.5) i incubar en un bany en aigua a 50°C durant 3h, remenant ocasionalment fins que es dissolgui completament. Centrifugar a 5000g durant 15min per a clarificar la barreja. Per a la correcta conservació de

les al.liquotes cal mantenir-les a -20°C. Un cop descongelat, el producte es manté estable durant 2 setmanes a -4°C.

- Albúmina (Bovine Serum Albumin Fraction V, Roche, 10 735 086 001)
- Alexa 488 anti-IgGs de conill (Molecular Probes®, Invitrogen™, A21206)
- Alexa 555 -Faloïdina (Molecular Probes®, Invitrogen™, A31572)
- Alexa 647 anti-IgGs de ratolí (Molecular Probes®, Invitrogen™, A31571)
- Calbindina anticòs policlona de conill (CB-38a, Swant®)
- Cisplatí (Sigma-Aldrich®, P4394)
- Etilenglicol ≥99% (Sigma-Aldrich®, 293237)
- Glicerol ≥99.5% (Sigma-Aldrich®, 49770)
- Isofluorà 100% p/p (Abbot®)
- Meloxicam 5mg/ml (Boehringer Ingelheim®)
- Miosina VIIa anticòs policlona de conill (Proteus Biosciences®, 25-6790)
- Mowiol 4-88 (*polyvinyl alcohol* 4-88) (Sigma-Aldrich®, 81381)
- NF200 kD anticòs monoclonal clon N52 (Sigma®, N0142)
- Paraformaldèhid (Sigma-Aldrich®, 158127)
- Sèrum d'ase (Sigma®, D9663)
- Tritó™ X-100 (Sigma®, 93426)
- Tris HCl

**Taula 1.** *Compostos químics emprats, per ordre alfabètic.*

## **6.2. Animals**

Els experiments es van realitzar a les instal·lacions del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona. L'ús i el tractament dels animals es va fer d'acord amb la LLei 5/1995 i el Decret 214/1997 de la Generalitat de Catalunya, d'acord amb les normes del Consell Directiu de la UE 86/609/CEE, sota l'aprovació del Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal (CEEA) (número 415/12; investigador principal J. Llorens).

L'estudi es va realitzar en individus rates mascle Long Evans (225-249g de pes a la seva arribada a l'estabulari) subministrades pel laboratori Janvier (Le Genest St Isle, França) com a mínim una setmana abans de l'inici dels experiments, en un període de quarantena. Durant tot l'experiment les rates es van alimentar amb pinso 2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet (Harlan Laboratories) *ad libitum*, es van mantenir en un fotoperíode de 12h llum / 12h fosc (07:30-19:30h), a una temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  i una humitat relativa de  $50\pm 10\%$ . Els animals es van estabular en grups de 2-3 individus per gàbia Panlab S.L. tipus 1000 de polipropilè per rata (215x465x145h mm).

### 6.3. Disseny de l'experiment (Fig.9)

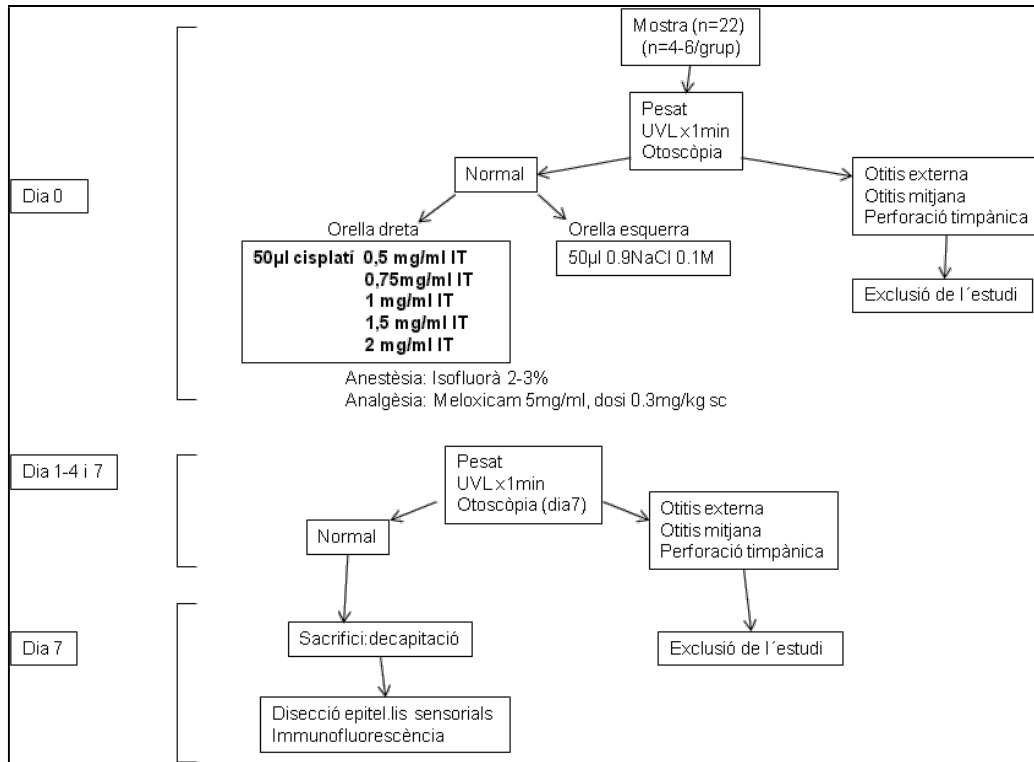


Fig. 9. Disseny de l'estudi.

#### 6.3.1. Avaluació de la tolerància sistèmica dels individus exposats al model

Es va avaluar el pes en els dies 0 (pre-test), 1, 2, 3, 4 i 7 després de l'administració intratimpànica.

#### 6.3.2. Avaluació de la tolerància local dels individus exposats al model

En el dia 0 (previ a la injecció intratimpànica) i en dia 7 des de la injecció intratimpànica (previ al sacrifici), en tots els individus es va realitzar una otomicroscòpia bilateral sota anestèsia general, per a excloure la presència de perforacions timpàniques o signes d'otitis mitjana aguda.

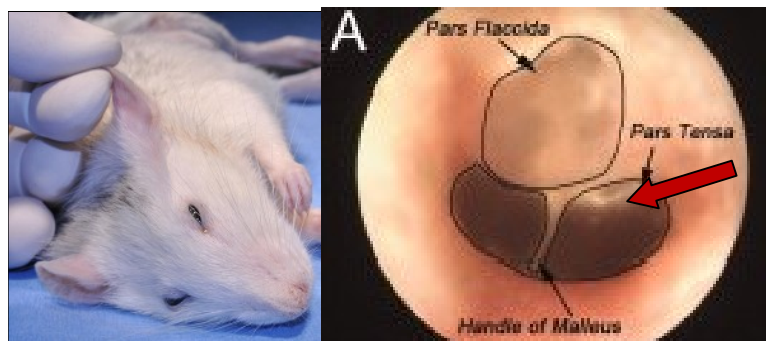
En el cas d'obtenir otoscòpies patològiques en qualsevol d'aquests dos punts de l'estudi, l'individu seria exclòs de l'estudi.

### 6.3.3. Exposició al cisplatí

Les rates es van anestesiari amb isofluorà al 2-3%, usant inicialment una càmera per a la inducció i posteriorment mantenint l'anestèsia gasosa durant tot el procediment, controlant per visió directa que l'individu presentés una freqüència respiratòria adequada (70-110/min, en repòs) ([www.humane-endpoints.info](http://www.humane-endpoints.info)) i en conseqüència regulant l'administració d'isofluorà i oxígen.

Amb l'individu ja anestesiari, es va administrar analgèsia en forma de solució de meloxicam 5mg/ml a dosi de 0.3mg/kg per via subcutània a la regió interescapular.

Col·locant l'individu en decúbit lateral, es rectificava el conducte auditiu extern mitjançant la tracció del pavelló auditiu, aconseguint la completa visualització de la membrana timpànica, a través d'un microscopi quirúrgic model 575005 de la casa Nikon. (Fig. 10)



**Fig. 10.** Font: Peter Luke Santa María *Histology of the healing tympanic membrane following perforations in rats. The Laryngoscope. Oct 2010.* La fletxa vermella assenyala la regió de la injecció intratimpànica (quadrant postero-superior).

Amb una agulla d'insulina (0.33x12.7mm) estèril es va realitzar una punció transtimpànica en el quadrant postero-superior de la membrana timpànica, injectant la solució pertinent (cisplatí o sèrum fisiològic) molt lentament, fins a visualitzar que la cavitat timpànica es trobava plena, la membrana timpànica lateralitzada i s'observava la sortida d'una gota de solució a través del punt de la punció.

En tots els individus es va administrar en primer lloc l'orella esquerra amb sèrum fisiològic, i posteriorment, a l'orella dreta un volum 50µl de cisplatí a

concentracions de 0.5, 0.75, 1, 1.5 i 2 mg/ml respectivament (n=4-6/grup), que suposen quantitats totals de 25 a 100µg de cisplatí per injecció. Els valors d'aquestes concentracions es van triar usant com a referència la concentració d'1mg/ml de cisplatí IT administrat en ratolins en l'estudi de He et al (2009)<sup>102</sup>. Així, per a cada individu teníem una orella tractada amb cisplatí (dreta) i una orella control injectada amb sèrum fisiològic (esquerra).

Immediatament després de cada injecció transtimpànica, l'individu es deixava en decúbit lateral del costat pertinent durant 10 minuts sota anestèsia general gasosa amb isofluorà. Un cop s'havien administrat les dues orelles, i es retirava l'exposició a l'isofluorà i s'observava a l'individu fins que es recuperava completament de l'anestèsia.

#### **6.3.4 Avaluació comportamental de la disfunció vestibular**

L'avaluació del comportament de la disfunció vestibular es va dur a terme en els dies 0 (pre-test), 1, 2, 3 4 i 7.

Col.locant a cada exemplar individualment dins d'un cub de vidre especialment dissenyat per a aquest propòsit (*Fig. 11*), es va observar el seu comportament durant un període d'1 minut, que va ser avaluat mitjançant la bateria de proves descrita per Vignaux et al<sup>124</sup> per a lesions vestibulars unilaterals (*unilateral vestibular lesions, UVL*).

L'escala d'avaluació de lesió vestibular unilateral (UVL) de Vignaux et al<sup>124</sup> inclou 5 proves vestibulars:

**(1) inclinació del cap (*head tilt*)**

- Normal: sense desviacions del cap.
- UVL: desviació postural del cap, cap al costat lesionat.

**(2) torsió del cos (*body twisting*)**

- Normal: absència de torsió, posició del cos centrada a la línia mitja.
- UVL: s'inicia amb una rotació del cap al voltant de l'eix longitudinal del cos, que progressa cap al gir tot el cos sobre el seu eix longitudinal en un sol sentit.

**(3) desviació de la marxa (*walking deviation*)**

- Normal: absència de desviació de la marxa, que és centrada.
- UVL: desviació de la marxa cap al costat afecte.

**(4) reflexe d'aixecament per la cua (*tail-hanging reflex*)**

- Normal: (alçant a l'individu per la cua, fins que perdi el contacte de les quatre extremitats del pla horitzontal) extensió de les extremitats anteriors per a millorar l'aterratge.
- UVL: rotació del cos sobre el seu propi eix.

**(5) rotació de la cua (*tail rotation*)**

- Normal: (agafant la rata pel cos sense que toqui el terra), sense moviment rotatori de la cua.
- UVL: rotació de la cua en relació al seu eix longitudinal.



Les alteracions del comportament vestibular es van puntuar d'acord amb una escala de 0 a 4, per a cadascuna de les categories, on:

- 0:** completament normal
- 1:** resposta dubtosa
- 2:** resposta patològica lleu
- 3:** resposta clarament patològica
- 4:** resposta patològica severa

El sumatori de la puntuació de les cinc categories representa el resultat de l'avaluació global de la disfunció vestibular unilateral de l'individu.



*Fig. 11. Cub de vidre de 40x40cm emprat per a l'avaluació comportamental de la rata.*

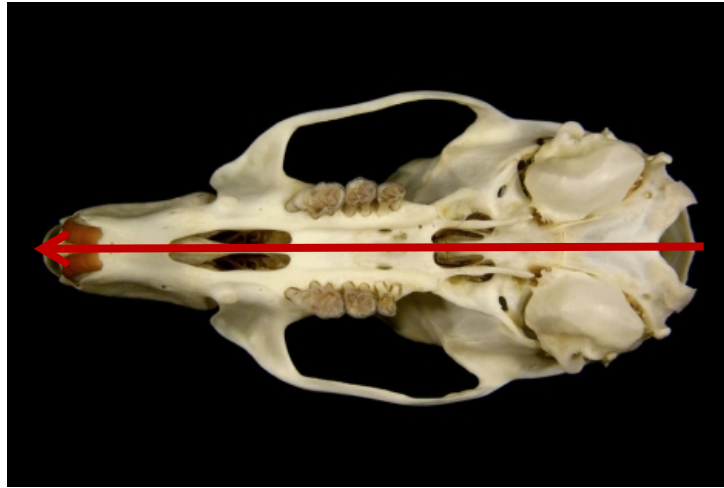
### **6.3.5. Avaluació histològica de la toxicitat coclear**

#### **6.3.5.1. Dissecció**

En 7è dia des de la injecció intratimpànica, els individus es van anestesiar de nou amb isofluorà al 2-3%. Seguidament (després de realitzar una microotoscòpia) el subjecte es va sacrificar per decapitació, i els ossos temporals van ser ràpidament disseccionats i submergits en una solució fixadora de teixits de PFD al 4% en PBS.

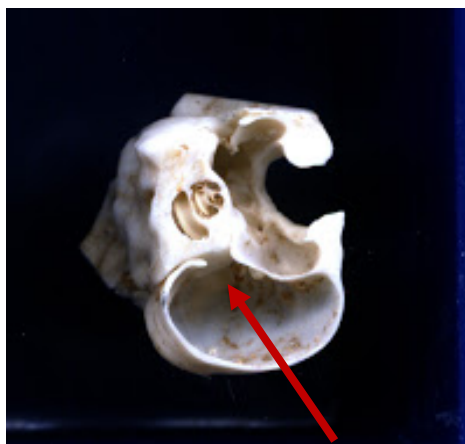
Per a l'obtenció dels ossos temporals es va retirar la pell del cap amb unes pinces amb dents i bisturí. Tallant el crani longitudinalment amb tenalles i

tisores, es va obrir longitudinalment per la línia mitja, separant els 2 hemicranis. Retirant les parts toves de la regió temporal, es localitzava la bulla, una cavitat òssia de morfologia ovoïdea, de fines parets òssies i contingut aeri (*Fig. 12*).



**Fig. 12.** Secció longitudinal de la *cara inferior del crani de la rata*. Font: *3bscientific.es*.

Mitjançant un abordatge lateral, s'obria la bulla, inicialment realitzant una petita fenestració amb la punta del bisturí, que posteriorment s'ampliava amb unes pinces d'Adson o bisturí triangular d'orella. Es localitzava la còclea a la part postero-superior de la bulla, que es distingeix per la seva estructura d'os compacte (*Fig. 13*).



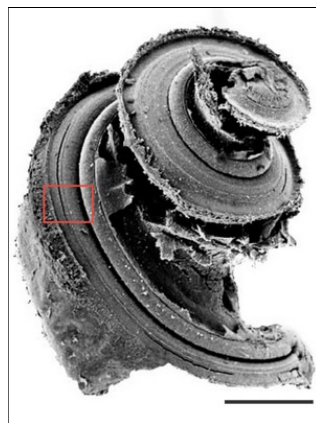
**Fig. 13.** Còclea rodejada d'os compacte, a l'interior de la bulla temporal de la rata. Abordatge lateral. Font: *baerveterinaria.blogspot.com.es*.

Abans de completar la dissecció dels epitel·lis coclears, es va realitzar una petita perforació a l'apex coclear, mitjançant la punta de la fulla del bisturí

(número 11 o 15) per permetre l'entrada de la solució fixadora a nivell de l'helicotrema, que inundés les rampes vestibular i coclear i entrés en contacte amb els epitel·lis el més aviat possible, mentre es completava la resta de la dissecció.

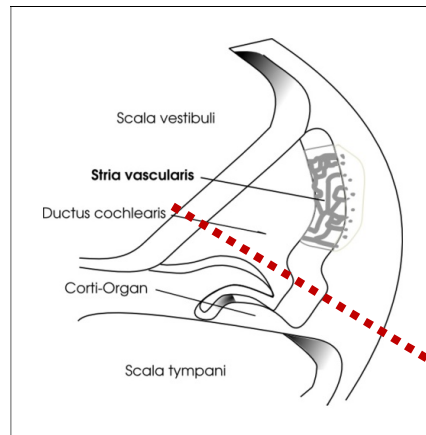
A continuació, es separava la còclea òssia de l'os circumdant amb tenalla fineta, intenant que no es trenqui la làmina dels contorns (*Fig. 14*).

Sota visió microscòpica en un model 575005 de la casa Nikon i fixant la base de la còclea amb una pinça sense dents es fracturava molt delicadament l'os de la làmina dels contorns o tub del cargol en tot el seu perímetre mitjançant l'ajuda d'una agulla o angle fi curt, exposant l'epitel·li coclear, que es recolza sobre la làmina dels contorns i el modíol, fins a aconseguir la dissecció el més acurada possible en una sola peça de tot l'epitel·li coclear disposat en 2.5 voltes d'espiral.



**Fig. 14.** Dissecció de còclea membranosa de rata en una sola peça anatòmica. Font: [www.cochlea.eu](http://www.cochlea.eu).

Per a finalitzar la dissecció, calia separar el lligament espiral amb l'*stria vascularis* de la membrana basilar, donat que la seva morfologia exerciria un efecte pantalla o sostre, que no permetria una correcta visualització dels elements cel·lulars (CCI i CCE) que assenten sobre la membrana basilar de l'òrgan de Corti (*Fig. 15*).



**Fig. 15.** Secció del lligament espiral amb l'èstria vascularis, per evitar l'efecte pantalla sobre els elements cel·lulars (CCE i CCI) que assenten sobre la membrana basilar de l'òrgan de Corti.

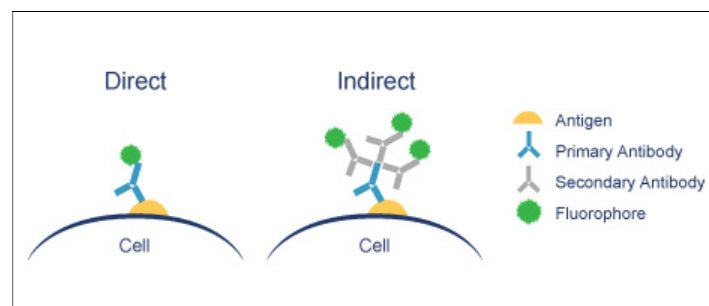
Font: <http://microanatomy.net>.

Un cop disseccionats, els teixits coclears van restar submergits en la mateixa solució fixadora durant 1 hora a temperatura ambient, i posteriorment conservats a  $-20^{\circ}\text{C}$  en solució criopreservadora fins al moment de ser processats per a la immunohistoquímica.

#### 6.3.5.2. Immunofluorescència

Es va dur a terme la immunohistoquímica dels epitel·lis sencers. Els teixits (còclees membranoses majoritàriament senceres, en una sola peça) van ser permeabilitzats i bloquejats durant 90 minuts en una solució al 4% de Tritó-X-100 i sèrum d'ase al 20% en PBS, en rotació lenta, a temperatura ambient. Seguidament, es van realitzar 5 rentats consecutius de 5 minuts cadascun, en solució PBS.

Els epitel·lis disseccionats van ser processats mitjançant una tècnica d'immunofluorescència indirecta (Fig. 16).



**Fig. 16.** Font: <http://www.abcam.com>.

Els anticossos primaris (anti-NF 200 monoclonal de ratolí, anti-calbindina policlonal de conill i anti-miosina VIIa policlonal de conill) es van incubar en una solució al 0.3% de Tritó-X-100 i sèrum d'ase a l'5% en PBS durant 48h a 4°C, en rotació lenta. Prèvia a la incubació dels anticossos secundaris, es van realitzar 5 rentats consecutius de 5 minuts cadascún, en solució PBS (*Taula 2*).

Els anticossos secundaris (Alexa-Fluor 647 conjugat amb anticòs d'ase anti-ratolí, Alexa-Fluor 488 conjugat amb anticòs d'ase anti-conill) i falotoxines (Alexa-Fluor 555 conjugat amb faloïdina) es van incubar en una solució al 0.3% de Tritó-X-100 i sèrum d'ase al 5% en PBS durant 12h a 4°C, protegit de la llum. A continuació, es van realitzar 5 rentats consecutius de 5 minuts cadascún, en solució PBS (*Taula 3 i 4*).

El muntatge de les mostres histològiques es va realitzar sobre làmines portaobjectes de vidre amb camps de reacció. La profunditat de cadascún d'aquests camps, permetia la cabuda d'una mostra histològica relativament gran (una còclea sencera per camp), evitant-ne la desestructuració en ser coberta pel cobreobjectes. Prèvia a la col·locació del cobreobjectes, el teixit era cobert amb medi Mowiol ®.

<b>ANTICOSSOS PRIMARIS</b>	<b>CONCENTRACIÓ</b>
Calbindina policlonal de conill	1/1.000
Miosina VIIa policlonal de conill	1/700
NF200 monoclonal clon N52	1/1.000

**Taula 2.** Anticossos primaris utilitzats.

<b>ANTICOSSOS SECUNDARIS</b>	<b>CONCENTRACIÓ</b>
Alexa-Fluor 488 conjugat amb anticòs d'ase anti-conill	1/500
Alexa-Fluor 647 conjugat amb anticòs d'ase anti-ratolí	1/500

**Taula 3.** Anticossos secundaris utilitzats.

ALTRES MARCADORS SECUNDARIS	CONCENTRACIÓ
Alexa-Fluor 555 conjugat amb faloïdina	1/1.000

**Taula 4.** Altres marcadors secundaris utilitzats.

#### **6.4. Anàlisi d'imatge**

Per a cada còclea es van definir 6 segments, a cada quart de volta de la còclea, iniciant des de l'àpex i prosseguint en direcció basal. En cadascun dels segments, s'identificaven 10 cèl·lules ciliades internes (CCI) consecutives, i es feia el recompte de cèl·lules ciliades externes (CCE) presents en les 3 fileres corresponents al mateix tram de 10 CCI prèviament definit, mitjançant inspecció simple sota visió microscòpica en un microscop de fluorescència Zeiss Jenalumar (objectiu x40) i un microscop confocal Leica TCS-SL.

El recompte de les 10 CCI consecutives garanteix la presència de l'epitel·li coclear íntegre, descartant la pèrdua d'epitel·li per lesió del mateix durant el procés de dissecció. Això és especialment rellevant per a l'anàlisi d'imatge en els segments coclears en què la toxicitat és molt extensa, i la presència de CCE és molt escassa o inclús nul·la.

Els recomptes cel·lulars es van realitzar sobre un nombre d'entre 4-6 individus per a cada dosi i segment coclear exposat a cisplatí, i sobre 20 còclees controls exposades a sèrum fisiològic, de les orelles contralaterals de cadascun dels mateixos animals.

#### **6.5. Anàlisi estadístic**

L'anàlisi estadístic es va dur a terme mitjançant IBM SPSS Statistics 20.2. Les dades relatives al pes corporal es varen analitzar mitjançant anàlisi de la variança amb mesures repetides (*multivariate analysis of variance* o *MANOVA*). Les dades del pes corporal també van ser analitzades mitjançant anàlisi de la variança (*analysis of variance* o *ANOVA*) dia a dia.

Les escales de comportament per a l'avaluació de la disfunció vestibular es varen analitzar mitjançant l'anàlisi de la variància amb mesures repetides (RM-ANOVA) per a estudis no paramètics de Friedman. La comparació entre grups segons dosi, dia a dia, es va realitzar amb una anàlisi de la variància Kruskal-Wallis, seguit d'un test de U Mann-Whitney per a comparacions per parelles seleccionades.

Les dades de les mostres coclears es van analitzar mitjançant l'anàlisi de la variància no paramètric de Kruskal-Wallis.

## **7. RESULTATS**

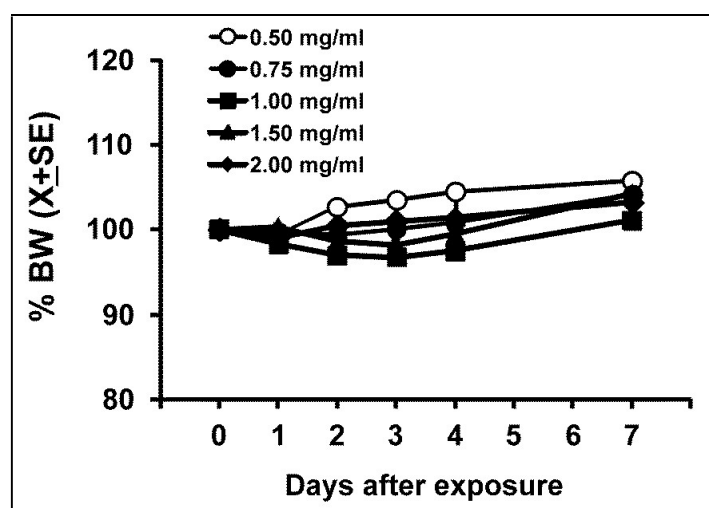




### **7.1. Avaluació de la toxicitat sistèmica causada pel cisplatí intratimpànic**

No es va registrar cap episodi de mortalitat entre les rates exposades a l'administració intratimpànica unilateral de cisplatí, i les mostres de toxicitat sistèmica van resultar molt lleus. A la dosi màxima de cisplatí IT (2mg/ml, 100µg en 50µl) es van observar signes de piloerecció i diarrea lleu en els 3 primers dies després de l'administració, que posteriorment es van resoldre de manera espontània. La figura 18 i taula 5 mostren les dades de pes corporal.

L'anàlisi MANOVA posa de manifest diferències significatives segons el dia de registre,  $F(4,14)=16.6$ ,  $p<0.001$ , però diferències no significatives segons la dosi de cisplatí,  $F(4,17)=1.79$ ,  $p=0.178$ , ni diferències significatives segons la dosi de cisplatí en relació al dia de registre,  $F(16,43)=1.6$ ,  $p=0.108$ . Això tradueix una absència de repercussió rellevant del tractament amb cisplatí IT sobre el pes corporal dels individus exposats. La màxima diferència entre les mitjanes de pes corporal inicial i post-tractament es va registrar en el 3r dia després de l'administració, en què el grup d'individus que havia rebut la dosi d'1mg/ml de cisplatí IT presentava una mitjana de pes del 96.7% de la mitjana del seu pes inicial. Les variacions de les mitjanes del pes al llarg dels dies no van resultar significatives ( $F's<1,3$ ,  $p's>0.3$ ), i els valors de les mitjanes de pes el 7è dia eren superiors als valors de les mitjanes de pes inicial en tots els grups de tractament (Fig.17).



**Fig 17:** Mediana de pes corporal al llarg dels temps (dies 0-7) en funció de la dosi de cisplatí IT exposat en % de pes en relació al dia 0 (pre-tractament). On %BW ( $X\pm SE$ ): pes corporal (mediana  $\pm$  desviació estàndard).

		<b>Pes (g) Dia 0</b>	<b>Pes (g) Dia 1</b>	<b>Pes (g) Dia 2</b>	<b>Pes (g) Dia 3</b>	<b>Pes (g) Dia 4</b>	<b>Pes (g) Dia 7</b>
<b>Control</b>	Mediana	297	294	292	292	293	301
	Mínim	237	232	234	237	241	252
	Màxim	416	406	403	399	400	409
<b>0.5mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	311	309	320	322	325	327
	Mínim	300	298	307	310	314	318
	Màxim	333	329	340	343	347	354
<b>0.75mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	300	302	303	301	303	312
	Mínim	292	289	287	292	288	302
	Màxim	323	319	315	323	331	340
<b>1 mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	293	286	277	275	278	294
	Mínim	270	269	26	266	267	280
	Màxim	302	302	304	305	307	308
<b>1.5 mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	259	260	259	25	259	270
	Mínim	242	247	234	237	241	252
	Màxim	274	271	268	267	270	285
<b>2 mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	316	315	319	319	319	322
	Mínim	237	232	238	244	246	253
	Màxim	416	406	403	399	400	409

**Taula 5:** Estadístics Descriptius de la variable **Pes (g)**; on el **Grup Control** correspon al conjunt de tots els individus en el dia 0 (pre-tractament).

## **7.2. Avaluació de la toxicitat local causada pel cisplatí intratimpànic**

Totes les otoscòpies realitzades tant el dia 0, abans de l'administració transtimpànica, com el dia 7, abans del sacrifici, varen resultar normals, posant de manifest membranes timpàniques sanes, sense evidència de perforacions o signes d'otitis mitjana aguda, tant en les orelles tractades com en les controls.

### **7.3. Avaluació comportamental de la disfunció vestibular causada pel cisplatí intratimpànic, i la seva relació dosi-resposta**

La injecció transtimpànica de cisplatí causa una disfunció vestibular dosi-dependent, demostrada segons paràmetres recollits en la bateria de proves comportamentals que avalua respostes posturals, espontànies i reflexes, especialment dissenyada per a l'avaluació de la lesió vestibular unilateral en rates.

Els individus que rebien dosis més elevades (50µl de 1.0, 1.5 o 2.0mg/ml de cisplatí IT) de cisplatí IT en l'orella dreta, van mostrar signes evidents de disfunció vestibular unilateral, ipsilateral a l'orella tractada, de caràcter progressiu entre els dies 1-3 després de ser administrats, i amb tendència a la recuperació parcial fins al dia 7 post-tractament. Els individus administrats amb dosis més baixes de cisplatí IT, varen mostrar efectes molt discrets (0.75mg/ml) o nuls (0.5mg/ml) en l'escala d'avaluació de disfunció vestibular (*Fig. 18*) (*Taula 6*).

L'anàlisi de la varianza amb mesures repetides (RM-ANOVA) per a estudis no paramètics de Friedman va demostrar alteracions en la funció vestibular amb resultats estadísticament significatius a dosis de 0.75mg/ml ( $\chi^2_{(5)}=11.08$ ,  $P=0.05$ ), 1.0mg/ml ( $\chi^2_{(5)}=16.89$ ,  $P=0.005$ ), i 1.5 mg/ml ( $\chi^2_{(5)}=15.62$ ,  $P=0.008$ ). L'anàlisi comparatiu entre grups de dosis, mostrava diferències estadísticament significatives en els dies 1 ( $P=0.031$ ), 2 ( $P=0.012$ ) i 3 ( $P=0.025$ ), però no en els dies 4 i 7 ( $P=0.055$  en ambdós grups).

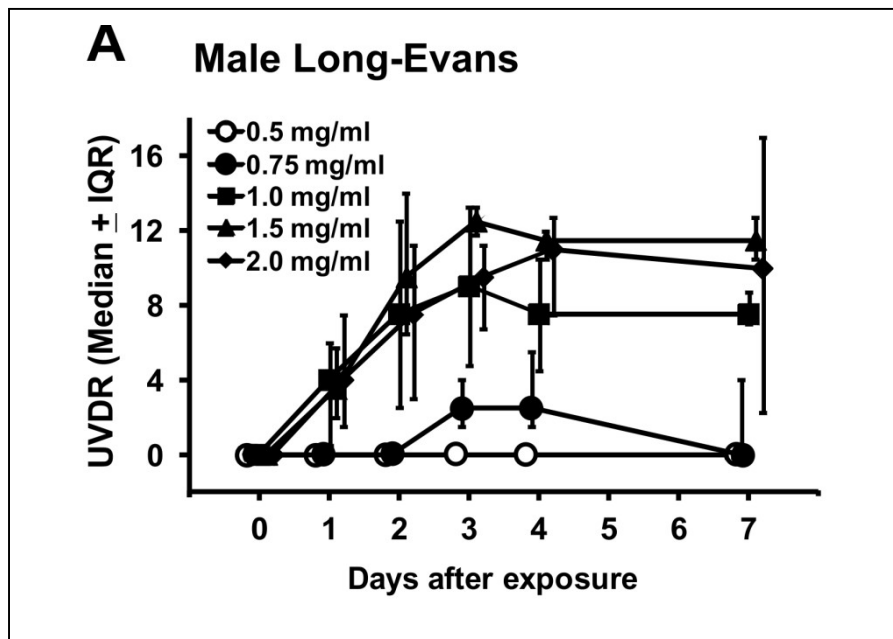


Fig 18: Mediana de puntuació de l'escala UVL en funció de la dosi de cisplatí IT.

No existeix una taula de resultats estadístics descriptius de l'avaluació de la UVL en els dies 1-7 d'un grup control perquè el disseny de l'estudi no ho permet. En cada individu, l'orella dreta es tractava i l'orella esquerra servia de control; donat que l'escala d'UVL mesura la resposta global de l'individu i no permet avaluar cadascún dels sistemes vestibulars per separat, no és vàlid com a grup control en els dies 1-7.

El grup control es correspon amb el conjunt d'avaluacions de UVL dels diferents grups, en el dia 0 (pre-tractament). En tots i cadascún dels individus dels diferents grups, el resultat de UVL va obtenir una puntuació igual a 0 (UVL=0).

		UVL Dia 0	UVL Dia 1	UVL Dia 2	UVL Dia 3	UVL Dia 4	UVL Dia 7
<b>0.5mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	0	0	0	0	0	0
	Mínim	0	0	0	0	0	0
	Màxim	0	0	0	0	0	0
<b>0.75mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	0	0	0	2.5	2.5	0
	Mínim	0	0	0	0	0	0
	Màxim	0	0	0	7	13	16
<b>1 mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	0	4	7.5	9	7.5	7.5
	Mínim	0	0	0	0	0	0
	Màxim	0	10	14	16	11	10
<b>1.5 mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	0	3.5	9.5	12.5	11.5	1.5
	Mínim	0	2	5	11	9	9
	Màxim	0	8	20	14	12	15
<b>2 mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	0	4	7.5	9.5	1	10
	Mínim	0	0	0	0	0	0
	Màxim	0	12	12	15	15	17

**Taula 6:** Estadístics Descriptius de la variable **UVL** (*Unilateral Vestibular Lesion*); on el **Grup Control** no es pot registrar donada la naturalesa comportamental global de la variable, que no permet avaluar cadascun dels vestíbuls individualment.

#### **7.4. Avaluació histològica de l'epitel·li coclear causada pel cisplatí intratimpànic, i la seva relació dosi-resposta**

En el 7è dia post-tractament es van obtenir les mostres histològiques de totes les còclees (casos i controls). Les còclees exposades a cisplatí varen demostrar una lesió franca de les CCE, amb una resposta dosi-dependent. Les còclees control, van resultar indemnes, sense pèrdua de CCE ni CCI.

Per al recompte cel·lular, es varen prendre mostres representatives de cada ¼ de volta de còclea des de l'extrem més apical, fins a un nombre de 6 mostres, que cobreix una extensió aproximada de 1.5 voltes de còclea des del seu extrem apical.

En els segments estudiats de les còclees exposades a cisplatí no es va evidenciar pèrdua de CCI. Per als mateixos segments, es va observar una pèrdua de CCE de grau variable en funció de dos factors: (a) la dosi de cisplatí i (b) la distància de l'àpex coclear (*Fig. 19 i 20*).

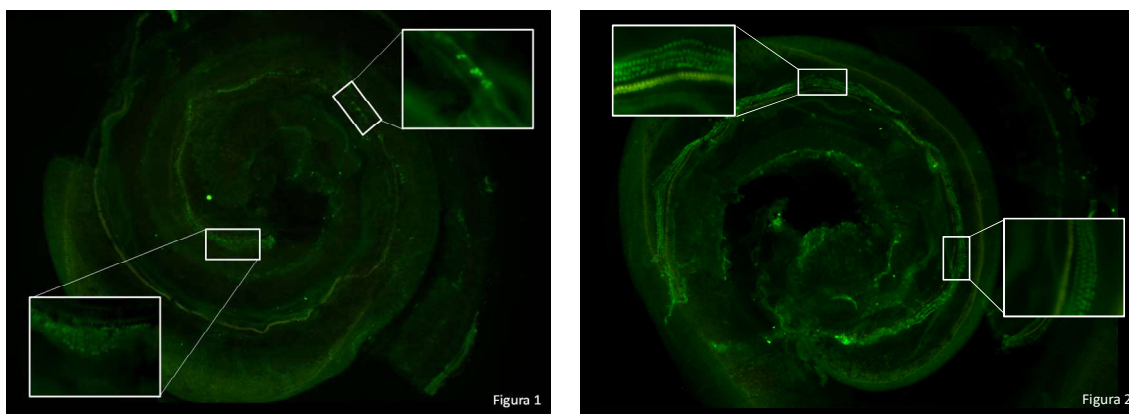
La quantificació del nombre de CCE en cada segment i per a cada dosi, va posar de manifest que els individus exposats a dosis de 1, 1.5 o 2.0mg/ml respectivament, presentaven patrons similars de lesió en extensió i severitat, en què només la meitat de volta més apical de la còclea (segments 1 i 2) preservava una mitjana de nombre de CCE considerable, mentre que en la meitat inferior de la volta apical (segments 3 i 4) i meitat superior de la volta mitja (segments 5 i 6) de la còclea, la lesió de CCE havia estat molt extensa.

Els individus que reberen 0.75mg/ml de cisplatí IT van presentar un patró de lesió de CCE més gradual entre el segon quart de la volta apical (segment 2) (mitjana de 25 CCE per segment de 10 CCI) i el segon quart de la volta mitja (segment 6) de la còclea (mitjana de 2 CCE per segment de 10 CCI).

Les rates que van rebre la menor dosi de cisplatí (0.5mg/ml) varen ser les que van demostrar menor grau de lesió en relació als altres grups. No obstant, comparat amb el grup control (mitjana de 30 CCE per segment de 10 CCI), es constata una pèrdua evident de CCE en el segon quart de la volta mitja

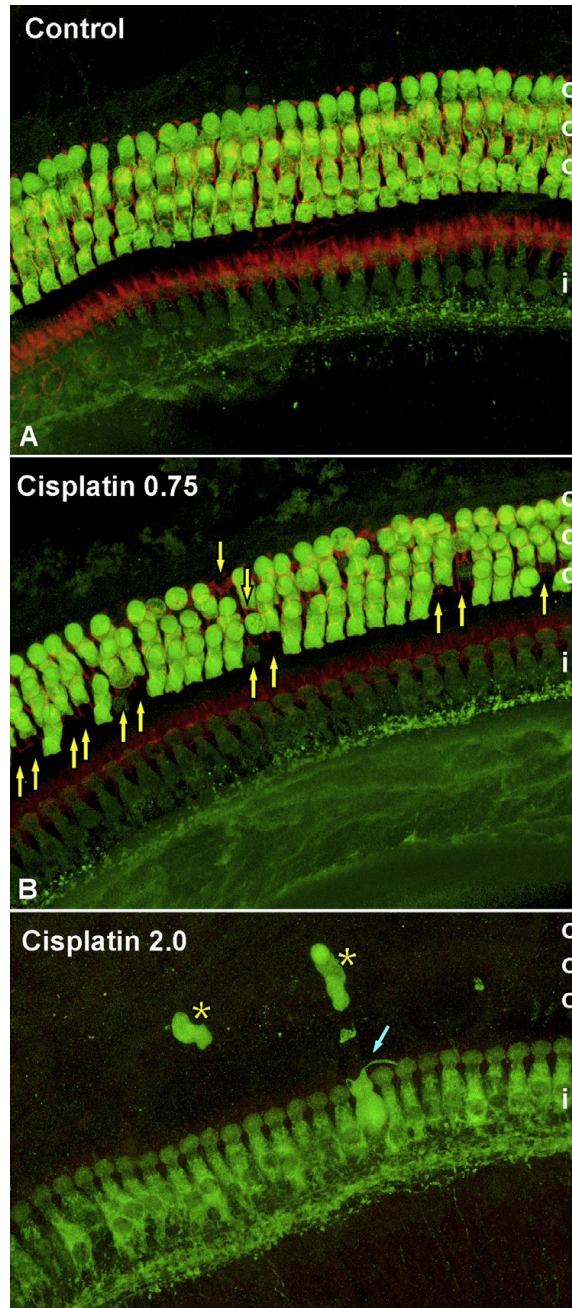
(segment 6) de la còclea (mitjana de 22.5 CCE per segment de 10 CCI) (Fig.21) (Taula 7).

L'anàlisi de la variància no paramètric de Kruskal-Wallis va demostrar diferències estadísticament significatives en el nombre de CCE dels diferents segments coclears. Els resultats estadístics recollits, en ordre descendent des del segment apical varen resultar els següents: (1)  $\chi^2_{(5)}=14.69$ ,  $P=0.012$ ; (2)  $\chi^2_{(5)}=26.50$ ,  $P<0.001$ ; (3)  $\chi^2_{(5)}=27.53$ ,  $P<0.001$ ; (4)  $\chi^2_{(5)}=33.04$ ,  $P<0.001$ ; (5)  $\chi^2_{(5)}=30.61$ ,  $P<0.001$ ; (6)  $\chi^2_{(5)}=32.28$ ,  $P<0.001$ .

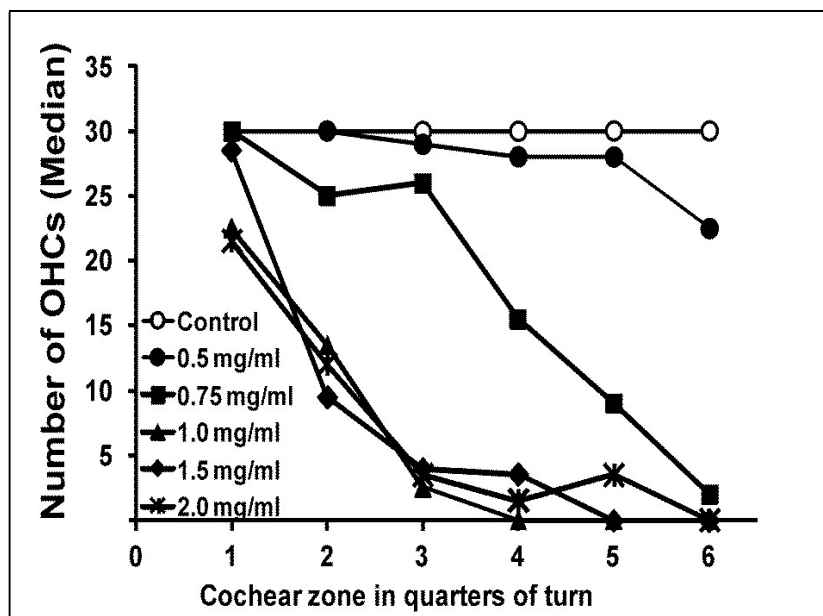


**Fig. 19.** Figura 1: còclea d'orella injectada amb 1,5 mg/ml cisplatí IT; Figura 2: còclea d'orella control, injectada amb sèrum fisiològic IT.





**Fig. 20.** Exemplificació del recompte de CCE presents per cada tram de 10 CCI consecutives en: A: segment coclear d'orella control (injecció IT de sèrum fisiològic); B: segment coclear d'orella tractada amb una dosi de cisplatí 0,75mg/ml IT; C: segment coclear d'orella tractada amb una dosi de cisplatí 2,0 mg/ml IT.



**Fig. 21:** Mediana de número de CCE/segment coclear en funció de la dosi de cisplatí IT; on **0mg/ml és el grup control**, que correspon al conjunt de totes les orelles esquerres (tractades amb sèrum fisiològic IT) dels mateixos individus que han rebut diferents dosis de cispatí IT.

		n° CCE tram 1	n° CCE tram2	n° CCE tram 3	n° CCE tram 4	n° CCE tram 5	n° CCE tram 6
<b>Control SF IT OE</b>	Mediana	30	30	30	30	30	30
	Mínim	27	27	27	26	27	19
	Màxim	30	30	30	30	30	30
<b>0.5mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	30	30	29	28	28	22.5
	Mínim	21	30	28	21	14	5
	Màxim	30	30	30	29	30	29
<b>0.75mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	30	25	26	15.5	9	2
	Mínim	20	16	9	2	0	0
	Màxim	30	30	30	28	19	7
<b>1 mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	22.5	13.5	2.5	0	0	0
	Mínim	8	4	0	0	0	0
	Màxim	29	28	21	20	27	1
<b>1.5 mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	28.5	9.5	4	3.5	0	0
	Mínim	26	6	4	0	0	0
	Màxim	30	24	11	8	1	0
<b>2mg/ml cis IT OD</b>	Mediana	21.5	12	3.5	1.5	3.5	0
	Mínim	12	8	0	0	0	0
	Màxim	30	28	29	12	6	1

**Taula 7:** Estadístics Descriptius de n° de CEE per a Dosi= 0 mg/ml Cisplatí IT a OE; on el Grup Control correspon al conjunt de totes les orelles esquerres de cadascún dels individus, que totes elles van ser tractades amb suero fisiològic intratimpànic.

Selecciónant un **tram de 10 CCI** consecutives, es realitza el recompte cel.lular en les 3 fileres de CCE corresponents. Els diferents segments o trams es seleccionen de cada quart de volta coclear, localitzant el "tram 1" a l'extrem apical i progressant en sentit basal, cada quart de volta, fins al "tram 6".

## **8. DISCUSSIÓ**



## **8.1. Elecció i disseny del model**

### **8.1.1. Model *in vivo* en rata**

Els model ideal d'ototoxicitat en animals hauria de ser capaç d'assimilarse al màxim a les circumstàncies d'ototoxicitat en els humans, facilitant la comprensió dels mecanismes moleculars i cel.lulars causants de la lesió, per a posteriorment poder incidir sobre aquests mecanismes.

Els avantatges que ofereixen els models *in vivo* en comparació amb els *in vitro* són la semblança biològica amb els humans, la possibilitat de realitzar mesures funcionals i la translacionalitat, que reforça la justificació d'estudis en un humans<sup>125</sup>. Per altra banda, els principals inconvenients són el cost econòmic, que requereixen una inversió de temps considerable, i la falta de reproduïbilitat dels processos patològics en humans en algunes ocasions<sup>125</sup>.

Pel que fa, en concret, als models *in vivo* d'ototoxicitat, l'animal que més s'ha utilitzat fins ara és el conill d'índies, ja que l'anatomia de la seva orella mitjana i interna presenta una mida relativament gran, que facilita el treball de dissecció, i els seus epitel.lis són sensibles als fàrmacs ototòxics; no obstant, el seu temps de gestació és llarg en comparació amb altres animals d'experimentació, i resulten relativament cars<sup>125</sup>. Les rates i ratolins tenen un temps de gestació curt i resulten econòmicament més assequibles, a més de ser espècies en què s'ha identificat més marcadors moleculars i de la qual es coneix el genoma; com a desavantatge, són més resistents als danys de la orella interna per fàrmacs ototòxics i la dissecció dels epitel.lis de la seva orella interna pot veure's dificultada pel petita mida anatòmica, especialment en ratolins<sup>125</sup>. En el treball d'Albuquerque<sup>11</sup>, en què compara les característiques anatòmiques de l'orella mitjana de conill d'índies i rates, i n'avalua l'aplicabilitat en la recerca bàsica, conclou que el conill d'índies representa l'espècie d'elecció, amb argument fonamental el del major mida de les seves estructures anatòmiques. No obstant, també descriu certes característiques que, en el cas concret del nostre model, afavoreixen l'ús de la rata: malgrat que la mida de la membrana timpànica del conill d'índies és major que el de la rata, el diàmetre del conducte auditiu extern d'aquesta última és major, fet que proporciona una

millor exposició per a la correcta administració transtimpànica; la còclea de la rata descriu 2,5 voltes, igual que en l'espècie humana, mentre que en el conill d'índies en descriu 3,5; els epitel·lis del sàcul i l'utricle es dissequen més fàcilment en la rata que en el conill d'índies<sup>11</sup>.

Per tot l'exposat, donada l'àmplia experiència en treball experimental en rates en el laboratori on s'ha realitzat aquest estudi, i els avançatges que vam trobar en termes d'accessibilitat, cost econòmic, i relativament escasses dificultats tècniques per a la dissecció dels epitel·lis de l'orella interna, es va decidir dissenyar i realitzar l'estudi sobre aquesta espècie.

### 8.1.2. Model d'administració intratimpànica

En aquest estudi s'ha avaluat l'efecte ototòxic de l'exposició transtimpànica a cisplatí en un model en la rata. L'ototoxicitat causada per cisplatí ha estat àmpliament descrita i demostrada<sup>5</sup>, pel que resultaria de gran interès obtenir una estratègia de tractament profilàctic per a pal·liar aquest efecte secundari, sense detriment de la seva acció antineoplàstica. Per al desenvolupament d'aquests fàrmacs otoprotectors, els estudis *in silico*, moleculars i *in vitro*, han de ser avaluats mitjançant estudis en animals que validin i demostrin la seva eficàcia citoprotectora *in vivo*. La principal limitació d'aquests estudis es deriva de la toxicitat sistèmica del cisplatí. L'accessibilitat de l'anatomia de l'orella ha permès l'administració local de fàrmacs citotòxics, evitant altes tasses de mortalitat en els animals d'experimentació. Encara que diversos estudis previs al nostre descriuen l'efecte ototòxic del cisplatí aplicat localment<sup>95,97,101-103</sup>, cap d'ells no ha estudiat els efectes de l'administració transtimpànica del cisplatí sobre la còclea i el vestíbul en la rata.

Diversos models murins han descrit l'efecte tòxic que exerceix el cisplatí sobre l'epitel·li coclear en ser administrat sobre la finestra rodona, mitjançant un abordatge quirúrgic retroauricular amb apertura de la bulla i exposició de l'orella mitjana<sup>101-103</sup>, l'eficàcia dels quals s'explica segons les següents hipòtesis de farmacodinàmica. L'orella interna consta d'una barrera hemato-perilímfica similar a la barrera hemato-encefàlica, formada per unions estretes (*tight-junctions*) als capil·lars, que limita la difusió de les mol·lècules des del

torrent sanguini cap a l'orella interna<sup>126</sup>. D'aquesta manera, els tractaments amb un potencial efecte sobre l'orella interna administrats per via sistèmica haurien de travessar aquesta barrera o filtre per arribar al seu teixit diana, mentre que els fàrmacs administrats intratimpànicament (per punció transtimpànica o bé amb tractament tòpic a través d'un drenatge transtimpànic o a través d'una perforació espontània de la membrana timpànica) podrien difondre amb molta més facilitat fins a la perilimfa a través de les finestres de l'orella mitjana amb l'orella interna, que manca d'aquesta barrera<sup>127</sup>. Els fàrmacs administrats intratimpànicament suposadament assoleixen l'orella interna (rampa timpànica) a través de la membrana de la finestra rodona. L'estructura d'aquesta membrana està composta per 3 capes semi-permeables: la superfície més externa (exposada a l'orella mitjana) està coberta per un epitel·li de cèl·lules cuboidals unides per unions estretes (*tight junctions*); la superfície exposada a l'orella interna està coberta per cèl·lules mesotel·lials en disposició discontinua; entre les dues trobem una xarxa de fibres de col·làgen, elàstiques, fibròcits, fibroblasts, fibres nervioses i vasos. Malgrat la presència de les unions intercel·lulars a la capa més externa, les mol·lècules de fins a 1 micròmetre de diàmetre poden travessar fàcilment la membrana i accedir a l'orella interna, bé a través dels espais intercel·lulars, o bé transcel·lularment mitjançant un procés de pinocitosi<sup>85</sup>. Estructuralment, la finestra rodona humana és molt similar a la dels animals usats en els estudis experimentals; la única diferència substancial és el seu gruix: 60-70 micres en humans, en comparació amb les 10-14 micres dels rosegadors (rata, xinxilla). Així, des del punt de vista funcional, la principal diferència és el temps requerit per la mol·lècula per a atravesar la capa fibrosa<sup>94,127</sup>: membranes més primes ofereixen major permeabilitat<sup>128</sup>. La comunicació entre la rampa timpànica, l'òrgan de Corti i el gangli espiral, permet l'exposició de les cèl·lules ciliades a les substàncies administrades IT<sup>128</sup>.

Alguns indicis posen en dubte la ruta que segueixen les substàncies administrades per via IT fins assolir l'orella interna. Estudis experimentals recents qüestionen la teoria àmpliament acceptada segons la qual la porta d'entrada des de l'orella mitjana fins a l'orella interna és la finestra rodona, i postulen que l'estructura que permet aquesta comunicació és en realitat la



finestra oval. Dos models murins de la distribució de gadolini (Gd) a l'orella interna després de l'administració del mateix en diferents estructures de l'orella mitjana van demostrar que la finestra oval és una ruta d'entrada a l'orella interna molt més efectiva que la finestra rodona, concretament a través del lligamet anular de la unió estapedi-vestibular<sup>129,130</sup>. Es varen obtenir conclusions similars en un estudi en animals en què s'avaluava lesió histològica i funcional després de l'administració local d'un ototòxic (gentamicina) en diverses localitzacions de l'orella mitjana. Els resultats van demostrar una lesió molt més severa (tant coclear com vestibular) quan la gentamicina s'administrava sobre la finestra oval que quan s'administrava sobre la finestra rodona<sup>131</sup>.

Les propietats fisico-químiques dels fàrmacs administrats intratimpànicament també determinen la seva capacitat de penetració fins a l'orella interna. El seu pes molecular, càrrega elèctrica i lipofília juguen un important paper. Models, tant *in vitro* com *in vivo*, han demostrat que les substàncies amb un baix pes molecular travessen la finestra rodona amb molta més facilitat que aquelles amb un alt pes molecular<sup>132</sup>. Per a la mateixa molècula, la variabilitat del resultat del tractament IT s'atribueix a diferències interindividuals, tals com: la presència de adhesions mucoses o falses membranes davant de la finestra rodona que poden exercir un efecte pantalla; variacions en la permeabilitat de la finestra rodona; i l'existència de gradients en la concentració del fàrmac en diferents punts de l'orella interna<sup>86,128</sup>.

Sota aquestes premisses, per a dissenyar el nostre model, hem argumentat que d'administració intratimpànica evitaria les dificultats causades per la toxicitat sistèmica alhora que permetria avaluar l'ototoxicitat causada pel cisplatí en els epitelis de l'orella interna intacta (no sotmesa a intrusions mecàniques). En omplir l'orella mitjana, el fàrmac assoliria el lligament anular de la finestra oval, des d'on penetraria a l'orella interna, amb resultats més efectius que aquells models en què el fàrmac s'administrava exclusivament sobre la finestra rodona, previ abrodatge quirúrgic mitjançant l'obertura de la bulla. Aquesta via d'administració, aporta dos avantatges des del punt de vista fisiotoxicològic: d'una banda la d'evitar el paper que juga sobre la toxicitat la vascularització de l'orella interna i la barrera hemato-perilímfica, i per l'altra

preservar al màxim les condicions fisiològiques de l'orella interna, tals com la presència del compartiment endolimfàtic, les inervacions aferents i eferents, i l'estimulació fisiològica sostinguda de l'epitel·li sensorial. Pel que fa a la permeabilitat del fàrmac, en l'evidència de les lesions histològiques sobre les còclees, ha quedat palès que la naturalesa catiònica de la mol·lècula de cisplatí afavoreix la penetració de la membrana de la finestra rodona, tal com s'havia descrit en treballs previs<sup>128</sup>.

## **8.2. Morbilitat sistèmica del model**

### **L'administració de cisplatí transtimpànic causa una toxicitat sistèmica lleu.**

La pèrdua de pes és, entre d'altres, un important indicador de discomfort i afectació de l'estat general de l'individu; paràmetre de mesura àmpliament usat en l'avaluació dels animals d'experimentació. En aquest treball s'ha valorat el grau d'afectació sistèmica en relació als canvis ponderals registrats en els individus tractats<sup>133</sup>.

Les dades obtingudes indiquen que l'administració unilateral de cisplatí transtimpànic causa escassos efectes secundaris sistèmics, al marge de l'ototoxicitat patent. Tots els grups van demostrar pèrdues del pes corporal inferiors al 6%, amb una ràpida recuperació del mateix durant la primera setmana post-tractament. Aquesta escassa toxicitat sistèmica suposa una gran millora respecte als efectes secundaris descrits en els models d'administració sistèmica de cisplatí, en què s'associen altes tasses de mortalitat i/o de pèrdua severa de pes corporal<sup>102,134,135</sup>. Concluïm, per tant, que l'exposició transtimpànica a cisplatí proporciona un model per a l'estudi de l'ototoxicitat conseqüent, de baixa morobilitat en la rata.

### **8.3. Morbilitat local del model**

#### La tècnica d'injecció transtimpànica sota visió microscòpica en la rata no s'associa a lesions de la membrana timpànica

En la majoria d'estudis experimentals previs d'administració local de cisplatí, la via emprada d'elecció era l'abordatge quirúrgic retroauricular amb apertura de la bulla per a exposar l'orella mitjana, procediment no exempt de certa complexitat i morbilitat; en contraposició, la injecció transtimpànica que proposem en el nostre model, és una tècnica fàcil, ràpida i reproduïble, amb una corba d'aprenentatge ràpida i curta.

Respecte la morbilitat associada als procediments transtimpànics cal mencionar el risc d'ocasionar una perforació timpànica permanent o una otitis mitjana aguda (OMA). No obstant, en el nostre treball no vam observar cap cas d'OMA ni perforacions timpàniques residuals a l'otoscòpia realitzada al 7è dia post-tractament, a ambdues orelles de tots els individus; aquestes observacions favorables, coincideixen amb les descrites per altres autors<sup>136</sup>(136). Aquestes dades favorables en models en la rata contrasten amb les altes tasses de perforació timpànica i danys de l'orella mitjana recollits en l'estudi de He et al<sup>102</sup> en ratolins, diferències que poden ser atribuïdes a la dificultat que suposa l'execució de la tècnica d'administració IT en estructures anatòmiques tan petites com són les orelles dels ratolins.

L'anatomia de l'orella mitjana de la rata, en què la major part de la cadena ossicular se situa a l'epitimpà<sup>9</sup>, permet realitzar la tècnica de punció i injecció transtimpànica sobre el quadrant postero-superior del timpà, per tal d'administrar el fàrmac el més aprop possible del lligament estapedial (punt de màxima permeabilitat cap a l'orella interna segons estudis de farmacodinàmica<sup>130,131</sup>, amb un baix risc lesió de la cadena ossicular; així, el model que describim, en el cas concret de la rata, representa una tècnica segura amb un baix risc de morbilitat local.

#### **8.4. Toxicitat vestibular del model**

##### L'administració de cisplatí transtimpànic causa una alteració de la funció vestibular dosi-dependent

També s'ha constatat una hipofunció vestibular dosi-dependent, de caràcter nula o lleu per a dosis de 0.5-0.75mg/ml, i de caràcter sever per a dosis compreses entre 1.0- 2.0 mg/ml. Aquesta pèrdua de funció vestibular es va demostrar mitjançant una sèrie de proves comportamentals validades en estudis previs com a mètodes específics i fiables per a avaluar disfunció vestibular en models animals<sup>124,137-142</sup>. L'esmentada lesió vestibular ha estat demostrada mitjançant l'anàlisi histològic *in vivo*<sup>143</sup>.

La solidesa de l'efecte vestibular descrit en el nostre model, recau en la demostració que l'administració transtimpànica de cisplatí és capaç d'assolir altes concentracions a l'orella interna. En el treball que hem publicat conjuntament amb els companys dels laboratoris de l'empresa Sensorion (Dra. Gaboyard) i de Aix-Marseille Université (Dr. Chabbert)<sup>143</sup>, es descriu un experiment en què es comparen les concentracions de cisplatí a l'orella interna, i en plasma en 2 moments diferents (30 i 90 minuts post-administració, respectivament) segons dues vies d'administració del quimioteràpic: una dosi única (10ml/kg en 5 minuts) de cisplatí endovenós (ev) a través de la vena de la cua o una sola dosi de 50µl de cisplatí a dosi de 2.0mg/ml per via IT. Els resultats demostren que en els animals exposats a cisplatí per via sistèmica, les concentracions de cisplatí en el plasma decauen entre els minuts 30 i 90, mentre que les concentracions del quimioteràpic a la orella interna es mantenen estables; per altra banda, en aquells individus exposats a cisplatí mitjançant injecció intratimpànica, les concentracions de cisplatí a l'orella interna en el minut 90, eren un ordre de magnitud major que les concentracions del quimioteràpic a l'orella interna dels individus exposats per via ev, tant en els registres als 30 com als 90 minuts. En comparació, les concentracions de cisplatí obtingudes a l'orella interna després de l'administració per via sistèmica (ev) fóren considerablement inferiors. Les dades d'aquest experiment permeten concloure que el cisplatí resulta una substància tòxica per a les cèl.lules ciliades vestibulars quan s'assoleixen concentracions suficients i

efectives a l'orella interna, però que amb molt alta probabilitat, una dosi única endovenosa no sigui capaç d'assolir aquestes concentracions a l'orella interna. Sota aquest criteri, atribuïm la falta de toxicitat vestibular del cisplatí descrita en diversos models animals<sup>116,118,119</sup> a que molt probablement es devien usar pautes de dosificació que no permetien assolir els llindars de concentració mínima necessària de cisplatí a l'orella interna, necessària per a causar el seu efecte tòxic. En el nostre estudi, es descriuen alteracions funcionals vestibulars a partir de 0.75mg/ml, dosi a partir de la qual es descriu, també, una pèrdua de cèl.lules ciliades externes que s'extén des de l'espira basal fins a l'espira mitja. En un estudi similar en xinxilles, s'ha descrit una lesió histològica coclear significativa després de l'exposició a dosi de 0.25mg/ml de cisplatí intratimpànic<sup>101</sup>. Caldria fer més estudis per a descriure més detalladament la relació i comparació entre la toxicitat coclear i vestibular del cisplatí segons aquest model d'exposició.

En els estudis clínics, la hipoacússia s'ha descrit com un dels principals efectes secundaris en pacients oncològics sotmesos a tractament amb cisplatí, tant adults com infantils<sup>46,144</sup>. En canvi, la toxicitat vestibular, que va ser descrita molt precoçment<sup>105,106</sup>, molt escassament ha estat descrita com a un efecte secundari directe i rellevant del tractament per cisplatí<sup>58,107-109,145</sup>, o inclús, en diversos estudis, s'ha negat l'efecte vestibular del cisplatí<sup>110-112</sup>. No obstant, estudis clínics recents posen de rellevància la clínica vestibular en pacients oncològics tractats amb cisplatí, com un augment del risc de caigudes associat a pèrdua de l'equilibri en adults<sup>145</sup> o l'inestabilitat persistent en nens<sup>58</sup>.

### **8.5. Toxicitat coclear del model**

#### **L'administració de cisplatí transtimpànic causa una pèrdua de CCE coclears dosi-dependent**

El cisplatí transtimpànic va causar una toxicitat coclear i vestibular dosi-dependent. A la còclea vam observar una pèrdua completa o quasi completa de CCE des de la meitat de la volta apical cap avall, i una pèrdua severa de CCE a la meitat més apical de la còclea en individus que havien rebut dosis compreses entre 1.0 i 2.0mg/ml de cisplatí. La pèrdua de CCE s'iniciava en regions més basals de la còclea per a aquells individus tractats amb dosis menors de cisplatí (0.75 i 0.5mg/ml), amb una millor preservació de l'apex coclear. Encara que no vam poder realitzar proves funcionals que avaluéssin l'audició a freqüències altes de l'espectre auditiu ni es va poder quantificar de manera sistemàtica la cel.lularitat dels segments basals de la còclea de totes les mostres, els recomptes que es van poder realitzar de les àrees basals de les còclees d'algunes de les nostres mostres mostraven resultats congruents amb el model, àmpliament acceptat i descrit a la literatura, de gradient de citotoxicitat creixent des de l'apex fins a la base. Aquest fenomen s'explica degut a l'existència d'un gradient decreixent de concentració de les substàncies administrades IT, des de la base fins a l'apex de la còclea, demostrat en diversos estudis experimentals<sup>86,94,127,128</sup>. Per tant, és probable que concentracions per sota de 0.5mg/ml, no avaluades en el nostre treball, causéssin lesions de les CCE a la base de la còclea en aquest model d'administració trastimpànica a la rata. En estudis previs publicats, s'ha constatat toxicitat coclear significativa en individus sotmesos a exposició local de cisplatí a les següents dosis: (1) 1 mg/ml (transtimpànic en ratolí; He et al., 2009)<sup>102</sup>; (2) 0.25 mg/ml (aplicació sobre la finestra rodona en xinxa; Janning et al., 1998)<sup>101</sup>; (3) 0.66 mg/ml (aplicació sobre la finestra rodona en xinxa; Whitworth et al. 2004)<sup>95</sup>; i (4) 0.125, 0.25 i 0.50 mg/ml (aplicació sobre la finestra rodona en conill d'índies; Xia et al. 2012)<sup>103</sup>.

En el model descrit, es proposa com a òptima la dosi de 50µl a una concentració 0.75mg/ml de cisplatí IT per a l'obtenció d'una lesió suficientment

extensa per a assegurar l'acció ototòxica, però alhora prou lleu com per a garantir la persistència de CCE.

## **8.6. Limitacions**

Considerem que hauria estat d'alt interès aportar dades objectives que evidencien la disfunció coclear. Treballs previs en animals d'experimentació exposats a cisplatí<sup>1</sup>(1) han descrit una alteració en els resultats de PEATC i/o OEA, però no tenim constància d'un estudi que correlacioni l'extensió de la lesió histològica amb la severitat de l'alteració funcional en un model dosi-resposta. La manca d'accés a l'instrumental adequat per a la seva avaluació en la rata (PEATC, OEA) es justifiquen essencialment per qüestions de finançament i logística. El recull d'aquesta informació en estudis posteriors podria aportar robustesa al model.

De la mateixa manera, reconeixem la falta de dades objectives sobre la lesió histològica dels epitel·lis vestibulars, donat l'alt grau de dificultat tècnica que representa la dissecció del sistema coclear i vestibular concomitant en el mateix individu, principalment pel seu petit tamany i fragilitat de les estructures. S'ha estat treballant sobre aquesta qüestió en col·laboració amb altres grups de recerca, que finalment ha donat lloc a una publicació<sup>143</sup>.

Malgrat que la via d'administració del tòxic en el nostre model (IT) no es correspon amb la via d'administració del fàrmac en els humans (endovenosa) fet que no permet una translació directa entre el model animal i l'humà, però sí pot resultar de gran utilitat com a model experimental per a progressar en l'àmbit de la recerca de l'ototoxicitat per cisplatí, així com per a l'estudi de potencials tractaments otoprotectors.

Com a consideracions finals, i malgrat les limitacions esmentades, el model de toxicitat per administració transtimpànica de cisplatí en rata que es descriu en aquest treball de tesi ha demostrat tenir molt baixa morbiditat sistèmica i nul·la morbiditat local; evitar biaixos de subjectivitat en la resposta al fàrmac, ja que cada individu pot ser utilitzat com el seu propi control; emprar una via d'exposició favorable, donat que l'administració del fàrmac és ràpida, simple i reproduïble i s'eviten lesions mecàniques de l'orella interna, que

faciliten l'anàlisi histològica; a més, ha demostrat ser un model eficaç de toxicitat tant coclear com vestibular dosi-dependent i per tant potencialment, pot ser de gran utilitat per a avaluar l'efectivitat de tractaments profilàctics dirigits a reduir l'ototoxicitat causada pel cisplatí, tant a nivell coclear com vestibular.





## **9. CONCLUSIONS**



Es descriu un model de toxicitat còcleo-vestibular en la rata mitjançant l'administració intratimpànica de cisplatí del que es pot concloure que,

**(1)** el model descrit permet demostrar histològicament el caràcter tòxic del quimioteràpic sobre l'epitel.li sensitiu coclear.

**(2)** el model que es presenta permet descriure el patró dosi-resposta de la toxicitat exercida pel cisplatí sobre l'epitel.li coclear.

**(3)** en el model descrit, es proposa com a òptima la dosi de 50µl a una concentració 0.75mg/ml de cisplatí IT per a l'obtenció d'una lesió suficientment extensa per a assegurar l'acció ototòxica, però alhora prou lleu com per a garantir la persistència de CCE.

**(4)** el model descrit és capaç d'evidenciar el caràcter tòxic del quimioteràpic sobre l'epitel.li sensitiu vestibular mitjançant proves funcionals.

**(5)** aquest model presenta un molt baix índex de morbiditat sistèmica i cap episodi de mortalitat associat.

**(6)** el model descrit no associa morbiditat a nivell local



## **10. BIBLIOGRAFIA**



1. Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 2007;226(1–2):157–67.
2. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med*. 2009;219(3):177–86.
3. Hill GW, Morest DK, Parham K. Cisplatin-Induced Ototoxicity. *Otol Neurotol*. 2008;29(7):1005–11.
4. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):307–20.
5. Rybak LP. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;15(5):364–9.
6. Daldal A, Odabasi O, Serbetcioglu B. The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2007;137(5):747–52.
7. van den Berg JH, Beijnen JH, Balm a JM, Schellens JHM. Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. *Cancer Treat Rev*. 2006;32(5):390–7.
8. Gil-Carcedo LM, Vallejo LÁ, Gil-Carcedo E. Anatomía del oído. In: *Otología*. 2004. p. 13–39.
9. Judkins R. Surgical anatomy of the rat middle ear. *OtolaryngolHead Neck Surg*. 1997;117:438–47.
10. Castagno LA, Lavinsky L. Tympanic membrane healing in myringotomies performed with argon laser or microknife: An experimental study in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72(6):794–9.
11. Albuquerque A, Rossato M, de Oliveira JA, Hyppolito MÁ. Understanding the anatomy of ears from guinea pigs and rats and its use in basic



- otologic research. *Brazilian J Otorhinolaryngol.* 2009;75(1):43–9.
12. Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene.* 2006;25(34):4744–56.
  13. Vaseva A V., Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. P53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell.* 2012;149(7):1536–48.
  14. Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R, et al. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 2004;66(4):817–23.
  15. Öhrvik H, Thiele DJ. The role of Ctr1 and Ctr2 in mammalian copper homeostasis and platinum-based chemotherapy. *J Trace Elem Med Biol.* 2014;1–5.
  16. Ciarimboli G, Schlatter E. Regulation of organic cation transport. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2005;449:423–41.
  17. El-Khateeb M, Appleton TG, Gahan LR, Charles BG, Berners-Price SJ, Bolton AM. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. *J Inorg Biochem.* 1999;77:13–21.
  18. Eastman, A. Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem Biol Interact.* 1987;61(3):241–8.
  19. Jones M., Basinger M., Beaty JA, Jolscher M. The relative nephrotoxicity of cisplatin, cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(guanosine)<sub>2</sub>, and the hydrolysis product of cisplatin in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991;29:29–32.
  20. Ekborn A, Lindberg A, Laurell G, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. *Cancer Chemother Pharmacol.*

- 2003;51:36–42.
21. Huang Z, Timerbaev AR, Keppler BK, Hirokawa T. Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis techniques. *J Chromatogr A*. 2006;1106(1–2):75–9.
  22. Watanabe K, Inai S, Jinnouchi K, Baba S, Yagi T. Expression of caspase-activated deoxyribonuclease (CAD) and caspase 3 (CPP32) in the cochlea of cisplatin (CDDP)-treated guinea pigs. *Auris Nasus Larynx*. 2003;30(3):219–25.
  23. Wang J, Ladrech S, Pujol R, Brabet P, Van De Water TR, Puel J-L. Caspase inhibitors, but not c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss. *Cancer Res*. 2004;64(24):9217–24.
  24. Previati M, Lanzoni I, Astolfi L. Cisplatin cytotoxicity in organ of corti - derived immortalized cells. *J Cell*. 2007;101(5):1185–97.
  25. Mukherjea D, Whitworth C a., Nandish S, Dunaway G a., Rybak LP, Ramkumar V. Expression of the kidney injury molecule 1 in the rat cochlea and induction by cisplatin. *Neuroscience*. 2006;139(2):733–40.
  26. So H, Kim H, Lee JH, Park C, Kim Y, Kim E, et al. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF- $\kappa$ B. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol*. 2007;8(3):338–55.
  27. Clerici WJ, DiMartino DL, Prasad MR. Direct effects of reactive oxygen species on cochlear outer hair cell shape in vitro. *Hear Res*. 1995;84(1–2):30–40.
  28. García-Berrocal JR, Nevado J, Ramírez-Camacho R, Sanz R, González-García J a, Sánchez-Rodríguez C, et al. The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *Br J Pharmacol*. 2007;152(7):1012–20.

29. Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, Endo T, Shiga A, Iguchi F, et al. Role of reactive radicals in degeneration of the auditory system of mice following cisplatin treatment. *Acta Otolaryngol.* 2004;124(10):1131–5.
30. Ikeda K, Sunose H, Takasaka T. Effects of free radicals on the intracellular calcium concentration in the isolated outer hair cell of the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol.* 1993;113(2):137–41.
31. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion a, Lambert D, Michiels C, Raes M, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 1990;51(3):283–97.
32. Liang F, Schulte B a, Qu C, Hu W, Shen Z. Inhibition of the calcium- and voltage-dependent big conductance potassium channel ameliorates cisplatin-induced apoptosis in spiral ligament fibrocytes of the cochlea. *Neuroscience.* 2005;135(1):263–71.
33. Hughes FM, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski J a. Intracellular K<sup>+</sup> suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(48):30567–76.
34. Bortner CD, Cidlowski JA. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 1998;56(12):1549–59.
35. Watanabe K-I, Inai S, Jinnouchi K, Bada S, Hess A, Michel O, et al. Nuclear-factor kappa B (NF-kappa B)-inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) pathway damages the stria vascularis in cisplatin-treated mice. *Anticancer Res.* 2002;22(6C):4081–5.
36. Chung W-H, Boo SH, Chung MK, Lee H-S, Cho Y-S, Hong SH. Proapoptotic effects of NF-kappaB on cisplatin-induced cell death in auditory cell line. *Acta Otolaryngol.* 2008;128(10):1063–70.
37. So H, Kim H, Kim Y, Kim E, Pae HO, Chung HT, et al. Evidence that cisplatin-induced auditory damage is attenuated by downregulation of pro-inflammatory cytokines via Nrf2/HO-1. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol.*

- 2008;9(3):290–306.
38. Dabholkar M, Christian M, Reed E. Cancer. *Cancer Chemother Biol Response Modif.* 1994;15:87–98.
  39. Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, et al. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol.* 1997;18(5):559–71.
  40. Cardinaal RM, de Groot JC, Huizing EH, Veldman JE, Smoorenburg GF. Cisplatin-induced ototoxicity: morphological evidence of spontaneous outer hair cell recovery in albino guinea pigs? *Hear Res.* 2000;144(1–2):147–56.
  41. Ruijven M van MWM Van, Groot JCMJ De, Smoorenburg GGF, van Ruijven MWM, de Groot JCMJ. Time sequence of degeneration pattern in the guinea pig cochlea during cisplatin administration.: A quantitative histological study. *Hear Res.* 2004;197(1–2):44–54.
  42. Hinojosa R, Riggs LC, Strauss M, Matz GJ. Temporal bone histopathology of cisplatin ototoxicity. *Am J Otol.* 1995;16(6):731–40.
  43. Smoorenburg GF, De Groot JC, Hamers FP, Klis SF. Protection and spontaneous recovery from cisplatin-induced hearing loss. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;884:192–210.
  44. de Groot JC, Hamers FP, Gispen WH, Smoorenburg GF. Co-administration of the neurotrophic ACTH4-9 analogue, ORG 2766, may reduce the cochleotoxic effects of cisplatin. *Hear Res.* 1997;106:9–19.
  45. Buhner C, Weinel P, Sauter S, Reiter A, Riehm H, Laszig R. Acute onset deafness in a 4-year-old girl after a single infusion of cis-platinum. *Pediatr HematolOncol.* 1990;7(2):145–8.
  46. Bokemeyer C, Berger CC, Hartmann JT, Kollmannsberger C, Schmoll HJ, Kuczyk MA, et al. Analysis of risk factors for cisplatin-induced ototoxicity

- in patients with testicular cancer. *Br J Cancer*. 1998;77(8):1355–62.
47. Rademaker-Lakhai JM, Crul M, Zuur L, Baas P, Beijnen JH, Simis YJW, et al. Relationship between cisplatin administration and the development of ototoxicity. *J Clin Oncol*. 2006;24(6):918–24.
  48. Kopelman J, Budnick a S, Sessions RB, Kramer MB, Wong GY. Ototoxicity of high-dose cisplatin by bolus administration in patients with advanced cancers and normal hearing. *The Laryngoscope*. 1988. p. 858–64.
  49. Waters GS, Ahmad M, Katsarkas a, Stanimir G, McKay J. Ototoxicity due to cis-diamminedichloroplatinum in the treatment of ovarian cancer: influence of dosage and schedule of administration. *Ear Hear*. 1991;12(2):91–102.
  50. Reddel RR, Kefford RF, Grant JM, Coates AS, Fox RM, Tattersall MH. Ototoxicity in patients receiving cisplatin: importance of dose and method of drug administration. *Cancer Treat Rep*. 1982;66(0361–5960 (Print)):19–23.
  51. McKeage MJ. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. *Drug Saf*. 1995;13(4):228–44.
  52. Allen GC, Tiu C, Koike K, Ritchey AK, Kurs-Lasky M, Wax MK. Transient-evoked otoacoustic emissions in children after cisplatin chemotherapy. *OtolaryngolHead Neck Surg*. 1998;118(5):584–8.
  53. Coradini PP, Cigana L, Selistre SG a, Rosito LS, Brunetto AL. Ototoxicity from cisplatin therapy in childhood cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007;29(6):355–60.
  54. Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: The influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer*. 2004;40(16):2445–51.
  55. Bertolini P, Lassalle M, Mercier G, Raquin MA, Izzi G, Corradini N, et al.

- Platinum compound-related ototoxicity in children: long-term follow-up reveals continuous worsening of hearing loss. *J Pediatr Hematol Off J Am Soc Pediatr Hematol*. 2004;26(10):649–55.
56. Kushner BH, Budnick A, Kramer K, Modak S, Cheung N-K V. Ototoxicity from high-dose use of platinum compounds in patients with neuroblastoma. *Cancer*. 2006;107(2):417–22.
57. Knight KRG, Kraemer DF, Neuwelt E a. Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: Underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8588–96.
58. Gurney JG, Tersak JM, Ness KK, Landier W, Matthay KK, Schmidt M Lou. Hearing loss, quality of life, and academic problems in long-term neuroblastoma survivors: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatrics*. 2007;120(5):e1229-36.
59. Knight KR, Kraemer DP, Winter C, Neuwelt E a. Early changes in auditory function as a result of platinum chemotherapy: Use of extended high-frequency audiometry and evoked distortion product otoacoustic emissions. *J Clin Oncol*. 2007;25(10):1190–5.
60. Boothroyd A. Developmental factors in speech recognition. *Int J Audiol*. 1970;9:30–8.
61. Davis JM, Elfenbein J, Schum R, Bentler R a. Effects of mild and moderate hearing impairments on language, educational, and psychosocial behavior of children. *J Speech Hear Disord*. 1986;51(1):53–62.
62. Bess FH, Dodd-Murphy J, Parker R a. Children with minimal sensorineural hearing loss: prevalence, educational performance, and functional status. *Ear Hear*. 1998;19(5):339–54.
63. Horwitz AR, Dubno JR, Ahlstrom JB. Recognition of low-pass-filtered consonants in noise with normal and impaired high-frequency hearing. *J*

- Acoust Soc Am. 2002;111(1):409–16.
64. Huang E, Teh BS, Strother DR, Davis QG, Chiu JK, Lu HH, et al. Intensity-modulated radiation therapy for pediatric medulloblastoma: Early report on the reduction of ototoxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;52(3):599–605.
  65. Chen WC, Jackson A, Budnick AS, Pfister DG, Kraus DH, Hunt M a., et al. Sensorineural hearing loss in combined modality treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2006;106(January):820–9.
  66. Hitchcock YJ, Tward JD, Szabo A, Bentz BG, Shrieve DC. Relative contributions of radiation and cisplatin-based chemotherapy to sensorineural hearing loss in head-and-neck cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;73(3):779–88.
  67. Yancey A, Harris MS, Egbelakin A, Gilbert J, Pisoni DB, Renbarger J. Risk factors for cisplatin-associated ototoxicity in pediatric oncology patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(1):144–8.
  68. Huang RS, Kistner EO, Bleibel WK, Shukla SJ, Dolan ME. Effect of population and gender on chemotherapeutic agent-induced cytotoxicity. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(1):31–6.
  69. Peters U, Preisler-Adams S, Lanvers-Kaminsky C, Jurgens H, Lamprecht-Dinnesen A. Sequence variations of mitochondrial DNA and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Res*. 2003;23(2B):1249–55.
  70. Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M, Lothe R a, 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):708–14.
  71. Riedemann L, Lanvers C, Deuster D, Peters U, Boos J, Jürgens H, et al. Megalin genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Pharmacogenomics J*. 2008;8(1):23–8.

72. Caronia D, Patiño-García a, Milne RL, Zalacain-Díez M, Pita G, Alonso MR, et al. Common variations in ERCC2 are associated with response to cisplatin chemotherapy and clinical outcome in osteosarcoma patients. *Pharmacogenomics J.* 2009;9(5):347–53.
73. Zuur CL, Simis YJW, Lansdaal PEM, Rasch CRN, Tange R a, Balm a JM, et al. Audiometric patterns in ototoxicity of intra-arterial Cisplatin chemoradiation in patients with locally advanced head and neck cancer. *Audiol Neurootol.* 2006;11(5):318–30.
74. Fausti S a, Larson VD, Noffsinger D, Wilson RH, Phillips DS, Fowler CG. High-frequency audiometric monitoring strategies for early detection of ototoxicity. *Ear Hear.* 1994;15(3):232–9.
75. Osterhammel D. High frequency audiometry. Clinical aspects. *ScandAudiol.* 1980;9(4):249–56.
76. Biro K, Noszek L, Prekopp P, Nagyivanyi K, Geczi L, Gaudi I, et al. Characteristics and risk factors of cisplatin-induced ototoxicity in testicular cancer patients detected by distortion product otoacoustic emission. *Oncology.* 2006;70(3):177–84.
77. Fausti SA, Frey RH, Henry JA, Olson DJ, Schaffer HI. Early detection of ototoxicity using high-frequency, tone-burst-evoked auditory brainstem responses. *J Am Acad Audiol.* 1992;3(6):397–404.
78. Fausti SA, Helt WJ, Phillips DS, Gordon JS, Bratt GW, Sugiura KM, et al. Early detection of ototoxicity using 1/6th-octave steps. *J Am Acad Audiol.* 2003;14(8):444–50.
79. Ress BD, Sridhar KS, Balkany TJ, Waxman GM, Stagner B., Lonsbury-Martin B. Effects of cis-platinum chemotherapy on otoacoustic emissions: the development of an objective screening protocol. *OtolaryngolHead Neck Surg.* 1999;121:693–701.
80. Hatzopoulos S, Di Stefano M, Campbell KC, Falgione D, Ricci D, Rosignoli M, et al. Cisplatin ototoxicity in the Sprague Dawley rat



- evaluated by distortion product otoacoustic emissions. *Audiology*. 2001;40(5):253–64.
81. Freitas MR de, Silva VC da, Brito GA de C, Carvalho Junior JV de, Gomes Junior RM, Ribeiro R de A. Distortion-product otoacoustic emissions and auditory brainstem responses sensitivity assessment in cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Brazilian J Otorhinolaryngol*. 2009;75(4):476–84.
  82. Rybak LP, Kelly T. Ototoxicity: bioprotective mechanisms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;11(5):328–33.
  83. Treskes M, Nijtmans .G., Fichtinger-Schepman AM, van der Vijgh WJ. Effects of the modulating agent WR2721 and its main metabolites on the formation and stability of cisplatin-DNA adducts in vitro in comparison to thee effects of thiosulfate and diethyldithiocarbamate. *Biochem Pharmacol*. 1992;43:1013–9.
  84. Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt E a. 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):1052–8.
  85. Sun J, Liu Y, Kong W, Jiang P, Jiang W. In vitro permeability of round window membrane to transforming dexamethasone with delivery vehicles- a dosage estimation. *Chinese Med Journal*. 2007;120(2002):2284–9.
  86. Parnes LS, Sun a H, Freeman DJ. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope*. 1999;109(7 Pt 2):1–17.
  87. Choe W-T, Chinosornvatana N, Chang KW. Prevention of cisplatin ototoxicity using transtympanic N-acetylcysteine and lactate. *Otol Neurotol*. 2004;25(6):910–5.
  88. van der Hoop RG, Vecht CJ, van der Burg ME, Elderson A, Boogerd W, Heimans JJ, et al. Prevention of cisplatin neurotoxicity with an ACTH(4-9)

- analogue in patients with ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 1990.
89. Hamers FP, Wijnbenga J, Wolters FL, Klis SF, Sluyter S, Smoorenburg GF. Cisplatin ototoxicity involves organ of Corti, stria vascularis and spiral ganglion: modulation by alphaMSH and ORG 2766. *Audiol Neurootol*. 2003;8(6):305–15.
  90. Bowers WJ, Chen X, Guo H, Frisina DR, Federoff HJ, Frisina RD. Neurotrophin-3 transduction attenuates cisplatin spiral ganglion neuron ototoxicity in the cochlea. *Mol Ther*. 2002;6(1):12–8.
  91. Huang X, Whitworth C a, Rybak LP. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Otol Neurotol*. 2007;28(EGb 761):828–33.
  92. Zhang M, Liu W, Ding D, Salvi R. Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience*. 2003;120(1):191–205.
  93. Hamid M, Trune D. Issues, indications, and controversies regarding intratympanic steroid perfusion. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;16(5):434–40.
  94. Light JP, Silverstein H. Transtympanic perfusion: indications and limitations. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;12(5):378–83.
  95. Whitworth CA, Ramkumar V, Jones B, Tsukasaki N, Rybak LP. Protection against cisplatin ototoxicity by adenosine agonists. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(9):1801–7.
  96. Wimmer C, Mees K, Stumpf P, Welsch U, Reichel O, Suckfüll M, et al. Round window application of D-methionine, sodium thiosulfate, brain-derived neurotrophic factor, and fibroblast growth factor-2 in cisplatin-induced ototoxicity. *Otol Neurotol*. 2004;25(1):33–40.
  97. Korver KDD, Rybak LPP, Whitworth C, Campbell KM. Round window

- application of D-methionine provides complete cisplatin otoprotection. *Otolaryngol.* 2002;126(6):2002.
98. Chan DK, Lieberman DM, Musatov S, Goldfein JA, Selesnick SH, Kaplitt MG. Protection against cisplatin-induced ototoxicity by adeno-associated virus-mediated delivery of the X-linked inhibitor of apoptosis protein is not dependent on caspase inhibition. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc [and] Eur Acad Otol Neurotol.* 2007;28(3):417–25.
  99. Minami SB, Sha SH, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res.* 2004;198(1–2):137–43.
  100. Wang J, Lloyd Faulconbridge R V, Fetoni A, Guitton MJ, Pujol R, Puel JL. Local application of sodium thiosulfate prevents cisplatin-induced hearing loss in the guinea pig. *Neuropharmacology.* 2003;45(3):380–93.
  101. Janning MH, Whitworth C a, Rybak LP. Experimental model of cisplatin ototoxicity in chinchillas. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;119(6):574–80.
  102. He J, Yin S, Wang J, Ding D, Jiang H. Effectiveness of different approaches for establishing cisplatin-induced cochlear lesions in mice. *Acta Otolaryngol.* 2009;129(12):1359–67.
  103. Xia L, Chen Z, Yin S. Ototoxicity of cisplatin administered to guinea pigs via the round window membrane. *J Toxicol Sci.* 2012;37(4):823–30.
  104. Hoffmann KK, Silverstein H. Inner ear perfusion: indications and applications. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;11:334–9.
  105. Schaefer SD, Wright CG, Post JD, Frenkel EP. Cis-platinum vestibular toxicity. *Cancer.* 1981;47(5):857–9.
  106. Wright CG, Schaefer SD. Inner ear histopathology in patients treated with cis-platinum. *Laryngoscope.* 1982;92(12):1408–13.
  107. Kobayashi H, Ohashi N, Watanabe Y, Mizukoshi K. Clinical features of cisplatin vestibulotoxicity and hearing loss. *ORL; journal for oto-rhino-*

- laryngology and its related specialties. 1987. p. 67–72.
108. Kitsigianis GA, O'Leary DP, Davis LL. Active head-movement analysis of cisplatin-induced vestibulotoxicity. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1988;98(1):82–7.
  109. Prim MP, de Diego JI, de Sarria MJ, Gavilan J. [Vestibular and oculomotor changes in subjects treated with cisplatin]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2001;52(5):367–70.
  110. Strauss M, Towfighi J, Lord S, Lipton A, Harvey HA, Brown B. Cisplatin ototoxicity: clinical experience and temporal bone histopathology. *Laryngoscope.* 1983;93(12):1554–9.
  111. Myers SF, Blakley BW, Schwan S. Is cis-platinum vestibulotoxic? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;108:322–8.
  112. Madasu R, Ruckenstein MJ, Leake F, Steere E, Robbins KT. Ototoxic effects of supradose cisplatin with sodium thiosulfate neutralization in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123(9):978–81.
  113. Cunningham LL, Brandon CS. Heat shock inhibits both aminoglycoside- and cisplatin-induced sensory hair cell death. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol.* 2006;7:299–307.
  114. Schmitt NC, Rubel EW, Nathanson NM. Cisplatin-induced hair cell death requires STAT1 and is attenuated by epigallocatechin gallate. *J Neurosci.* 2009;29(12):3843–51.
  115. Schweitzer VG, Rarey KE, Dolan DF, Abrams GE SC. Vestibular morphological analysis of the effects of cisplatin vs.platinum analogs, CBDCA (JM-8) and CHIP (JM-9). *Laryngoscope.* 1986;96(9):959–74.
  116. Caston J DL. Comparative vestibular toxicity of dibekacin, habekacin and cisplatin. *Acta Otolaryngol.* 1987;104(3–4):315–21.
  117. Nakayama M, Riggs LC, Matz GJ. Quantitative study of vestibulotoxicity

- induced by gentamicin or cisplatin in the guinea pig. *Laryngoscope* [Internet]. 1996;106(2 Pt 1):162–7.
118. Laurell G, Bagger-Sjoberg D. Dose-dependent inner ear changes after i.v. administration of cisplatin. *J Otolaryngol*. 1991;20(3):158–67.
  119. Sergi B, Ferraresi A, Troiani D, Paludetti G, Fetoni AR. Cisplatin ototoxicity in the guinea pig: Vestibular and cochlear damage. In: *Hearing Research*. 2003. p. 56–64.
  120. Kojetin DJ, Venters R a, Kordys DR, Thompson RJ, Kumar R, Cavanagh J. Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca<sup>2+</sup>-loaded calbindin-D(28K). *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(7):641–7.
  121. Hasson T, Skowron JF, Gilbert DJ, Avraham KB, Perry WL, Bement WM, et al. Mapping of unconventional myosins in mouse and human. *Genomics*. 1996;36:431–9.
  122. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. 2002. 191-234 p.
  123. BARDEN JA, MIKI M, HAMBLY BD, G. DOS REMEDIOS C. Localization of the phalloidin and nucleotide binding sites on actin. *Eur J Biochem*. 1987;162(3):583–8.
  124. Vignaux G, Chabbert C, Gaboyard-Niay S, Travo C, Machado ML, Denise P, et al. Evaluation of the chemical model of vestibular lesions induced by arsenite in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;258(1):61–71.
  125. Yorgason JG, Luxford W, Kalinec F. In vitro and in vivo models of drug ototoxicity: studying the mechanisms of a clinical problem. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2011;7(12):1521–34.
  126. Jahnke K. [Permeability barriers of the inner ear. Fine structure and function]. *Fortschr Med* [Internet]. 1980;98(9):330–6.
  127. Plontke SK, Biegner T, Kammerer B, Delabar U, Salt AN. Dexamethasone concentration gradients along scala tympani after

- application to the round window membrane. *Otol Neurotol*. 2008;29(3):401–6.
128. Goycoolea M V, Lundman L. Round window membrane. Structure function and permeability: a review. *Microsc Res Tech*. 1997;36(3):201–11.
  129. King EB, Salt a N, Eastwood HT, O’Leary SJ. Direct entry of gadolinium into the vestibule following intratympanic applications in Guinea pigs and the influence of cochlear implantation. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2011;12(6):741–51.
  130. Zou J, Pyykkö I. Enhanced oval window and blocked round window passages for middle-inner ear transportation of gadolinium in guinea pigs with a perforated round window membrane. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015;272(2):303-9.
  131. King EB, Salt a N, Kel GE, Eastwood HT, O’Leary SJ. Gentamicin administration on the stapes footplate causes greater hearing loss and vestibulotoxicity than round window administration in guinea pigs. *Hear Res [Internet]*. 2013;304:159–66.
  132. Laurell G, Teixeira M, Sterkers O, Bagger-Sjöbäck 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.
  133. Morton D, Griffiths P. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*. 1985;116(16):431–6.
  134. Madias NE, Harrington JT. Platinum nephrotoxicity. *The American Journal of Medicine*. 1978. p. 307–14.
  135. Ding D, Allman BL, Salvi R. Review: Ototoxic Characteristics of Platinum Antitumor Drugs. *Anatomical Record*. 2012. p. 1851–67.
  136. Mukherjea D, Jajoo S, Sheehan K, Kaur T, Sheth S, Bunch J, et al. NOX3

- NADPH oxidase couples transient receptor potential vanilloid 1 to signal transducer and activator of transcription 1-mediated inflammation and hearing loss. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(6):999–1010.
137. Llorens J, Demêmes D, Sans A. The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993;123(2):199–210.
  138. Boadas-Vaello P, Riera J, Llorens J. Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles. *Toxicol Sci*. 2005;88(2):456–66.
  139. Brugeaud A, Travo C, Demêmes D, Lenoir M, Llorens J, Puel J-L, et al. Control of hair cell excitability by vestibular primary sensory neurons. *J Neurosci*. 2007;27(13):3503–11.
  140. Saldaña-Ruiz S, Boadas-Vaello P, Sedó-Cabezón L, Llorens J. Reduced systemic toxicity and preserved vestibular toxicity following co-treatment with nitriles and CYP2E1 inhibitors: A mouse model for hair cell loss. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol*. 2013;14(5):661–71.
  141. Dyhrfeld-Johnsen J, Gaboyard-Niay S, Broussy A, Saleur A, Brugeaud A, Chabbert C. Ondansetron reduces lasting vestibular deficits in a model of severe peripheral excitotoxic injury. *J Vestib Res Equilib Orientat*. 2013;23(3):177–86.
  142. Gaboyard-Niay S, Travo C, Saleur A, Broussy A, Brugeaud A, Chabbert C. Correlation between afferent rearrangements and behavioral deficits after local excitotoxic insult in the mammalian vestibule: an animal model of vertigo symptoms? *Dis Model Mech*. 2016;dmm.024521.
  143. Callejo A, Durochat A, Bressieux S, Saleur A, Chabbert C, Domènech Juan I, et al. Dose-dependent cochlear and vestibular toxicity of trans-tympanic cisplatin in the rat. *Neurotoxicology*. 2017;60:1–9.
  144. Grewal S, Merchant T, Reymond R, McInerney M, Hodge C, Shearer P.

Auditory late effects of childhood cancer therapy: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatrics*. 2010;125(4):e938-50.

145. Tofthagen C, Overcash J, Kip K. Falls in persons with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Support Care Cancer*. 2012;2





## **11.ANNEXES**



## **Annexe 1**

## **Annexe 2**

## **Annexe 3**