

RESEÑA ANALÍTICA

Efectos de antibióticos aminoglicósidos en cultivos organotípicos del órgano de Corti

Sandra Rodríguez Salgueiro, Daymara Mercerón Martínez,* Rosa María Coro Antich, Yahima Harvey Pedroso, Tania Valdés Prieto, Carlos Toledo Sánchez*** y Enma Reyes Sánchez.*****

Laboratorio de Microscopia Electrónica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, *Departamento de Neurociencias Experimental, Centro de Neurociencias de Cuba. **Laboratorio de Anatomía Patológica, Instituto de Neurología y Neurocirugía. ***Laboratorio Central de Criminalística, MININT, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 9 de octubre de 2008.

Aceptado: 2 de diciembre de 2008.

Palabras clave: células ciliadas, cultivos organotípicos del órgano de Corti, aminoglicósidos, morfología.
Key words: hair cells, organotypical cultures of the organ of Corti, aminoglycosides, morphology.

RESUMEN. Las drogas terapéuticas ototóxicas son una de las principales causas de daño en el sistema auditivo. La pérdida de la audición se produce como resultado del daño irreversible de las células ciliadas cocleares. Estas células en mamíferos no tienen la capacidad de regenerarse, por lo que su pérdida lleva a una sordera permanente. En la búsqueda de vías terapéuticas para tratar esta afección, se utilizan modelos de sordera *in vivo* e *in vitro*. Uno de los más empleados actualmente es el de daño inducido por aminoglicósidos a cultivos organotípicos de cócleas de ratas o ratones neonatos. En estos estudios se ha encontrado afectación de las células ciliadas y de soporte que constituyen el órgano de Corti. El objetivo de este trabajo fue hacer una revisión de los cambios morfológicos inducidos por antibióticos aminoglicósidos en cultivos organotípicos del órgano de Corti con un especial énfasis en los métodos que se emplean en esos estudios. Los aminoglicósidos más usados en los cultivos organotípicos son neomicina y gentamicina. En este trabajo se presenta por primera vez la degeneración de las células cocleares *in vitro* por kanamicina. Inicialmente se produce degeneración de los penachos de estereocilios de las células ciliadas y se forman vesículas patológicas en la superficie apical de esas células. La exposición prolongada induce la muerte de las células ciliadas y la formación de una cicatriz falangeal por las prolongaciones citoplasmáticas de las células de soporte subyacentes. La similitud de los cambios inducidos por ototoxicidad *in vitro* e *in vivo* permite emplear los cultivos organotípicos del órgano de Corti en la validación de terapias potencialmente otoprotectoras.

ABSTRACT. Ototoxic therapeutic drugs are among the major causes of auditory damage. Hearing loss is produced as a result of irreversible injury of cochlear hair cells. These cells lack regenerative capacity in mammals, so their loss induces permanent deafness. *In vitro* and *in vivo* models of deafness are used to research therapeutic alternatives to treat hearing losses. Nowadays, one of the most widespread models is the aminoglycoside-induced damage in organotypical cultures of neonatal cochleae. In these studies, damage of the organ of Corti hair and supporting cells has been revealed. The aim of this work was to revise the morphological changes induced by aminoglycoside antibiotics on organotypical cultures of the organ of Corti with special emphasis on the methods employed. Neomycin and gentamicin are the most employed aminoglycosides in organotypical cultures. In this work kanamycin-induced generation of cochlear cells *in vitro* was showed at the first time. After the first hours of exposition, hair cells undergo degenerative changes such as pathological vesicle formation and disruption of their stereocilia bundles. Severe damage due to prolonged exposure induces hair cell death and the neighbour supporting cells form a phalangeal scar. Provided the similarities between ototoxicity induced changes *in vivo* and *in vitro*, organotypical cultures of the organ of Corti might be employed to validate potentially otoprotective therapies.

INTRODUCCION

La pérdida de la audición se produce como resultado del daño irreversible de las células ciliadas (CC) cocleares, que puede deberse a agentes terapéuticos, tales como antibióticos aminoglicósidos y antineoplásicos, ruidos intensos, infecciones o envejecimiento.¹

Las drogas terapéuticas ototóxicas están entre las principales causas de daño en el sistema auditivo.² Los

antibióticos aminoglicósidos, ampliamente utilizados por su efectividad en el tratamiento de infecciones bacterianas, causan daño severo en el oído interno, al inducir la muerte de las CC cocleares.^{3,4}

En la búsqueda de vías terapéuticas para resolver la sordera, se hace necesario comprender los cambios inducidos por ototoxicidad en cócleas de animales de experimentación. Para esto, se emplean modelos *in vivo* e *in vitro*.

Correspondencia:

M.C. Sandra Rodríguez Salgueiro

Laboratorio de Microscopia Electrónica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Playa, Código Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: sandra.rodriguez@cnic.edu.cu

Uno de los modelos de ototoxicidad *in vitro* más empleados en la última década para caracterizar el daño ototóxico inducido por agentes terapéuticos o para validar la posible actividad otoprotectora de determinadas sustancias, es el cultivo organotípico del órgano de Corti (OC) de cócleas de mamíferos neonatos.⁵

Los modelos de ototoxicidad *in vitro* comparten algunas características con los modelos *in vivo*: las CC son más sensibles en la vuelta basal que en las vueltas media y apical; las CC externas (CCE) son más sensibles que las internas (CCI); se afectan tanto las CC como las células de soporte.^{6,7} Sin embargo, los aminoglicósidos por lo general producen mayor ototoxicidad *in vitro* que *in vivo*, posiblemente debido a que los estudios *in vitro* se realizan con animales neonatos y se plantea que las CC neonatales son más sensibles a los aminoglicósidos que las adultas.⁸ Además, en los modelos *in vitro* el acceso de los aminoglicósidos a las CC es directo.

Los modelos *in vivo* tienen algunas desventajas con respecto a los modelos *in vitro*, como son: la necesidad de dosis de aminoglicósidos y tiempos de tratamiento mayores y el empleo de fármacos diuréticos que potencien la acción de los aminoglicósidos, para que el efecto ototóxico sea evidente.⁹

El objetivo de este trabajo fue hacer una revisión de los cambios morfológicos inducidos por antibióticos aminoglicósidos en cultivos organotípicos del órgano de Corti con un especial énfasis en los métodos que se emplean en esos estudios.

MODELOS DE DAÑO POR AMINOGLICÓSIDOS EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DEL ÓRGANO DE CORTI

Los cultivos organotípicos del OC se obtienen a partir de cócleas de ratas y ratones neonatos, siendo los ratones más sensibles al daño por aminoglicósidos.¹⁰ Se pueden preparar cultivos organotípicos a partir de explantes del OC completo (Fig. 1) o de regiones del OC (apical, media y basal). Como las CC de la región correspondiente a la vuelta apical coclear son menos sensibles a los aminoglicósidos que las de la vuelta basal, en la mayoría de los estudios los explantes se dividen y se separa la región apical de las restantes, desechándola en muchos casos. Los explantes se pueden cultivar adheridos a una superficie o en flotación en el medio de cultivo (Tabla 1).

Los aminoglicósidos se administran cuando los explantes llevan 24 h de cultivo y los tiempos de exposición que más se emplean son 24 y 48 h. Los aminoglicósidos más usados en modelos de este tipo son neomicina y gentamicina, y en menor grado, kanamicina (Tabla 1).

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LOS CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DEL ÓRGANO DE CORTI

Los cultivos organotípicos se analizan por varios métodos de Microscopía Óptica: de Alta Resolución (MOAR), Nomarski, de Fluorescencia (MF) y Confocal (MC). También se estudian por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y de Barrido (MEB). La preparación de los cultivos para la observación microscópica se lleva a cabo por diferentes técnicas (Tabla 2).

CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR AMINOGLICÓSIDOS EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DEL ÓRGANO DE CORTI

Morfología de cultivos controles

Los cultivos cocleares consisten en un núcleo central de tejido modiolar mesenquimatoso inmaduro cerca del cual descansa el ganglio espiral y un reborde externo formado por crestas epiteliales mayores y menores. La

cresta epitelial mayor está compuesta por un epitelio pseudoestratificado sobre el cual se encuentra la membrana tectoria inmadura; la cresta epitelial menor está formada por una hilera de CCI, las células pilares, de tres a cuatro filas de CCE, cada una situada sobre una célula de Dieter, y las células inmaduras de Hensen situadas periféricamente. Ninguno de los espacios que caracterizan al OC maduro (espacio de Nuel y túnel de Corti) están presentes en el OC inmaduro, llamado órgano de Kolliker en este estadio del desarrollo. Las CCE y las CCI están inervadas por las fibras aferentes de las neuronas del ganglio espiral. La membrana tectoria cubre parcialmente muchas de las CCI en estos cultivos (especialmente, los cultivos de la vuelta basal), pero no cubre las CCE (Fig. 2).²¹

Las CCE están accesibles y visibles en todos los cultivos debido a la pérdida de la membrana tectoria durante los estadios tempranos del cultivo. Las CCI se distinguen más fácilmente en cultivos de la vuelta apical, donde el desarrollo de la membrana tectoria está menos avanzado, y en los cultivos de mayor tiempo donde los explantes se han desarrollado. Todas las CCE tienen en su superficie apical penachos de estereocilios organizados en forma de V, un kinocilio localizado en el centro del penacho y pequeñas microvellosidades rodeando los estereocilios. Las microvellosidades de las células de soporte vecinas de las CC son largas y abundantes en este estadio de desarrollo (Fig. 3). Las CCI presentan penachos de estereocilios rectos. También es posible observar fibras

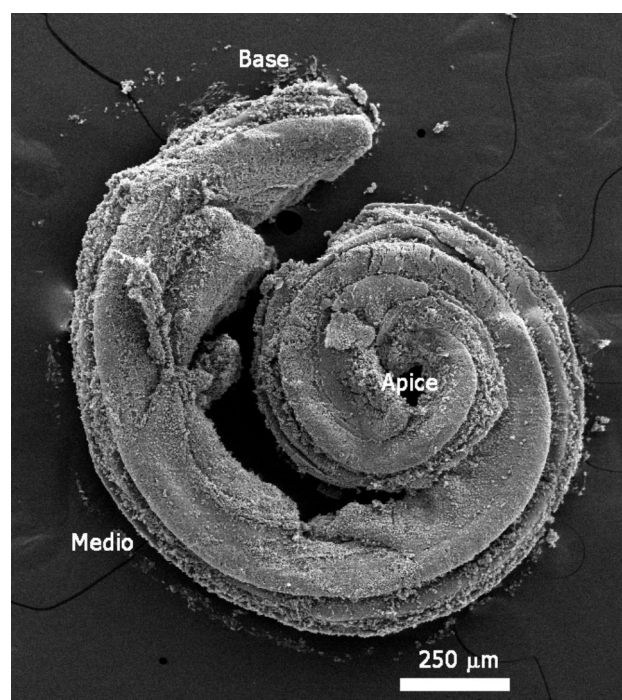


Fig. 1. Vista panorámica de cultivo organotípico del órgano de Corti completo de rata neonata control, por Microscopía Electrónica de Barrido. Se señalan las regiones del órgano de Corti que se corresponden con las vueltas cocleares.

aferentes de gran calibre inervando las bases de las CCI y tractos de fibras aferentes corriendo espiralmente entre las células de Dieter.⁹

Morfología de cultivos tratados con aminoglicósidos

Efectos de la neomicina. La neomicina a bajas dosis ($\leq 0,05$ mmol/L) incrementa irreversiblemente la rigidez del penacho de estereocilios e inhibe reversiblemente la

Tabla 1. Modelos de daño por aminoglicósidos en cultivos organotípicos del órgano de Corti.

Animal	Edad (días de nacido)	Región órgano de Corti	Método de cultivo	Tratamiento con aminoglicósido	Referencia
Rata	1 a 5	Medial y basal.	Adheridos.	24 a 48 h con neomicina.	Zine A. and Ribaupierre F., 1998. ¹ Low W. <i>et al.</i> , 1996. ¹¹ Romand R. and Chardin S., 1999. ¹² Lowenheim H. <i>et al.</i> , 1999. ¹³ Pirvola U. <i>et al.</i> , 2000. ¹⁴
		Medial.	Adheridos.	24 a 48 h con gentamicina.	Corbacella E. <i>et al.</i> , 2004. ¹⁵ Sano H. <i>et al.</i> , 2007. ¹⁶
		Sin dividir.	Adheridos.	24 a 48 h con gentamicina.	Monge A. <i>et al.</i> , 2006. ¹⁷
		Sin dividir.	Libres en flotación.	24 a 48 h con gentamicina.	Lowenheim H. <i>et al.</i> , 1999. ¹²
		Sin dividir.	Libres en flotación.	24 a 48 h con kanamicina.	Rodríguez S. <i>et al.</i> , 2009. ²⁵
		Basal.	Libres en flotación.	48 h con gentamicina.	Battaglia A. <i>et al.</i> , 2003. ¹⁸
Ratón	1 a 3	Medial.	Adheridos.	24 h con gentamicina.	Ding D. <i>et al.</i> , 2002. ¹⁹ McFadden S.L. <i>et al.</i> , 2003. ²⁰
		Apical y basal.	Adheridos.	1 h con neomicina, gentamicina o amikacina.	Kotecha B. and Richardson G.P., 1994. ²¹
		Media y basal.	Adheridos.	24 a 48 h con neomicina.	Wang J. <i>et al.</i> , 2003. ²²

mecanotransducción sin causar ningún daño morfológico a las CC.^{11,14} En los explantes expuestos a 0,1 mmol/L de neomicina por 6, 12, 24 y 48 h, las CC se marcaron de manera positiva con TUNEL, lo que indica la muerte por apoptosis de estas células. En estas condiciones, las CC positivas a TUNEL se encontraron dentro del epitelio y las CC localizadas fuera de este mostraron fragmentación nuclear.¹⁴ A elevadas concentraciones ($\geq 0,2$ mmol/L) y a solo 1 h de exposición, la neomicina induce la formación de numerosas vacuolas ocupadas con figuras de mielina en la superficie apical de las CC, dilatación del retículo endoplásmico y formación de espirales en la membrana intracelular.²¹

La dosis de 1 mmol/L de neomicina es la más usada. Por Microscopia Óptica de Nomarski se ha observado disrupción de la superficie de las CC a partir de los 40 min, sin daño en los cuerpos celulares.²⁰ Con exposición prolongada a 24 h, se observa destrucción de todas las CC y expansión de las células de soporte mediante MF, MOAR y MEB.¹¹

Por MO, MF y MC se observa que después de 48 h con neomicina 1 mmol/L hay una completa destrucción de las CCI y CCE, en ensayos con faloidina, inmunomarcaje con miosina VIIa y TUNEL.^{11,22} Sin embargo, en un estudio por MOAR, muchas de las CC basales murieron, y se observaron cambios morfológicos tempranos en las CC: muerte celular con núcleos hiper cromáticos y de forma irregular y cuerpos celulares encogidos, en comparación con la apariencia normal de las CC en el segmento apical. En el segmento basal, todos los núcleos de las CCE estaban picnóticos. Los núcleos de las CCI no estaban picnóticos y los cuerpos celulares estaban redondeados.¹³

También a 48 h de exposición a neomicina, por MF se distinguen dos regiones principales en los explantes:

- Una región cicatricial, con pocas CC, de las cuales solo algunas presentan estereocilios. El epitelio sen-

sorial es reemplazado por uno cicatricial debido a expansiones de las prolongaciones citoplasmáticas de las células de soporte subyacentes. Esta región está principalmente restringida a la vuelta basal del OC.

- La segunda región se denomina región de resistencia, donde las CC son aún visibles y muestran una mayor o menor organización espacial regular que se asemeja al epitelio sensorial normal, con muchas hileras de CCE. Esta región se divide en un área extrema basal donde solamente hay CCE y un área extrema apical donde se observan ambos tipos de CC.

Se aprecia una región de transición entre estas dos regiones, formada por una o dos hileras de CC. Desde el punto de vista morfológico, algunas de estas células presentan el mismo rasgo patológico que las observadas en la región cicatricial.¹²

Efectos de la gentamicina. La dosis mínima en que se emplea el antibiótico gentamicina es 0,035 mmol/L, por un período de 48 h. Mediante MF y MC se ha observado la pérdida del 50 % de las CCE en cultivos provenientes de la vuelta basal de explantes.¹⁸ Al aumentar la dosis de gentamicina a 0,1 mmol/L se ha observado daño en algunas CCE a las 24 h de exposición.¹⁹ Con dosis mayores (0,5 y 1 mmol/L) se ha observado la pérdida de CCE y la afectación de las CC a las 24 h.^{15,19,20} Los cultivos expuestos a gentamicina 2 mmol/L por 24 h presentan daño en las CCE de las vueltas medial y basal de la cóclea, siendo las CCI menos sensibles a la ototoxicidad (CCI: 19 % de pérdida y CCE: 84 % de pérdida), según se ha observado mediante MF con la técnica de faloidina.²⁴ A la dosis de gentamicina 3 mmol/L, la pérdida de CC es total.¹⁹

Efectos de la kanamicina. En experimentos realizados por el grupo de trabajo de los autores, se encontró

Tabla 2. Métodos microscópicos para el análisis de cultivos organotípicos del órgano de Corti.

Método microscópico	Técnica preparatoria	Objetivo	Referencia
Microscopia Óptica de Nomarski.	Ninguna.	Verificar viabilidad y calidad de los cultivos previo a los tratamientos. Describir morfología de las CC tratadas.	Kotecha B. and Richardson G.P., 1994. ²⁰ Richardson G.P. and Russell I. J., 1991. ¹⁰
Microscopia Óptica de alta resolución.	Inclusión en resina.	-Describir morfología de las CC. -Validar cuantificación.	Low W. <i>et al.</i> , 1996. ¹¹ Lowenheim H. <i>et al.</i> , 1999. ¹² Pirvola U. <i>et al.</i> , 2000. ¹⁴
	Inclusión en parafina y marcaje con TUNEL.	Visualizar núcleos fragmentados (en apoptosis).	Pirvola U. <i>et al.</i> , 2000. ¹⁴ Wang J. <i>et al.</i> , 2003. ²²
Microscopia de Fluorescencia.	Preparación de superficie y marcaje con faloidina-TRITC o faloidina-rodamina.	Cuantificar las CC (Tiñe haces de estereocilios y anillo circunferencial de actina que rodea la placa cuticular de CCI y CCE viables).	Low W. <i>et al.</i> , 1996. ¹¹ Zine A. and Ribaupierre F., 1998. ¹ Romand R. and Chardin S., 1999. ¹² Lowenheim H. <i>et al.</i> , 1999. ¹³ Ding D. <i>et al.</i> , 2002. ¹⁹ Battaglia A. <i>et al.</i> , 2003. ¹⁸ Mc Fadden S. <i>et al.</i> , 2003. ²⁰ Corbacella E. <i>et al.</i> , 2004. ¹⁵ Nicotera T. M. <i>et al.</i> , 2004. ²³ Wei X. <i>et al.</i> , 2005. ²⁴ Monge A. <i>et al.</i> , 2006. ¹⁷
Microscopia Confocal.	Preparación de superficie y marcaje con calceína AM y EthD-1.	Distinguir CC vivas de CC muertas. Calceína AM-marca células vivas. EthD-1-marca células muertas.	Lowenheim H. <i>et al.</i> , 1999. ¹³
	Preparación de superficie y marcaje con faloidina-rodamina, faloidina-TRITC o faloidina-FITC.	Cuantificar las CC viables.	Low W. <i>et al.</i> , 1996. ¹¹ Ding D. <i>et al.</i> , 2002. ¹⁹ Wang J. <i>et al.</i> , 2003. ²² Battaglia A. <i>et al.</i> , 2003. ¹⁸
	Inclusión en resina y marcaje con miosina VII.	Cuantificar las CC viables.	Wang J. <i>et al.</i> , 2003. ²¹
	TUNEL	Detectar núcleos fragmentados (en apoptosis).	Wang J. <i>et al.</i> , 2003. ²¹
Microscopia Electrónica de Barrido.	Secado por punto critico.	Describir morfología superficial de CC y células de soporte.	Richardson G.P. and Russell I. J., 1991. ¹⁰ Kotecha B. and Richardson G.P., 1994. ²¹ Zine A. <i>et al.</i> , 1998. ¹ Lowenheim H. <i>et al.</i> , 1999. ¹³ Daudet N. <i>et al.</i> , 2002. ⁶ Rodríguez S. <i>et al.</i> , 2009. ²⁵
Microscopia Electrónica de Transmisión.	Inclusión en resina y cortes ultrafinos.	Describir la ultraestructura de CC.	Richardson G.P. and Russell I. J., 1991. ¹⁰ Kotecha B. and Richardson G.P., 1994. ²¹ Daudet N. <i>et al.</i> , 2002. ⁶

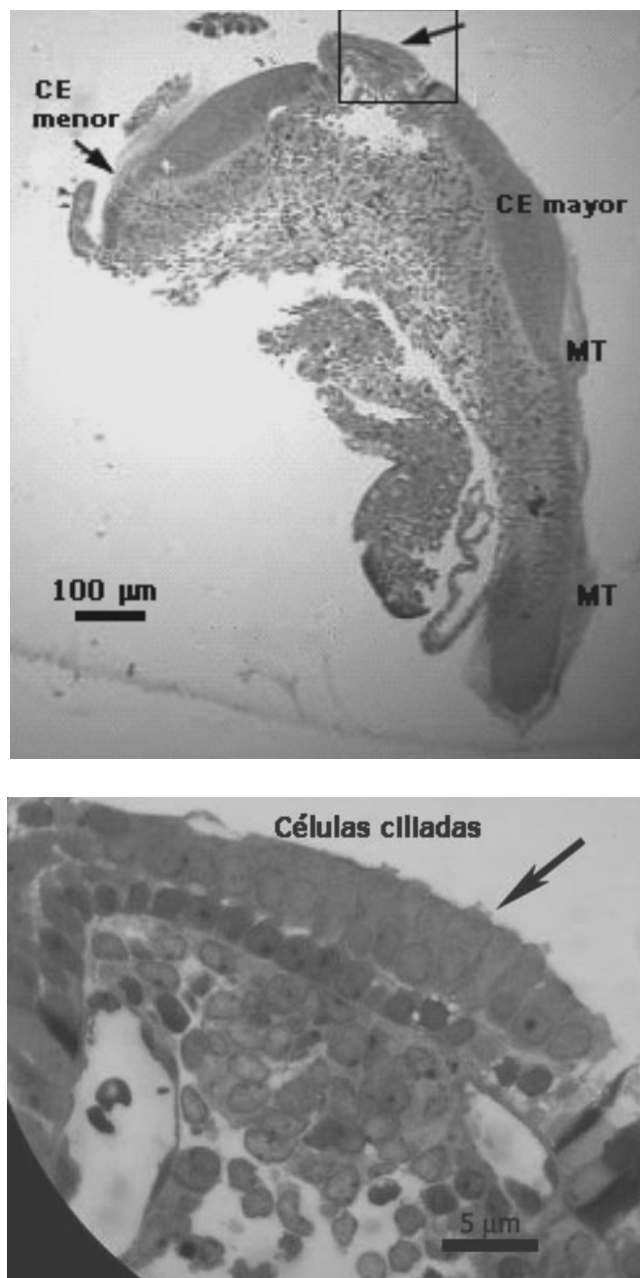


Fig. 2. Corte semifino de cultivo organotípico del órgano de Corti de rata neonata control, por Microscopia Óptica de Alta Resolución. Superior: Cresta epitelial (CE), membrana tectoria (MT). Rectángulo: región ampliada en figura inferior. Estereocilios de las células ciliadas (saetas).

que la exposición de cultivos organotípicos de la vuelta medial de cócleas de ratas neonatas a kanamicina 6 mmol/L, durante 24 h, induce pérdida de CC y daño en las CC remanentes (desorganización y pérdida de estereocilios). En las células de soporte se observó disminución del número y del tamaño de las microvellosidades con respecto al control. La afectación resultó mayor cuando los cultivos fueron expuestos a kanamicina 3 mmol/L, durante 48 h (Fig. 4).²⁵

No se han encontrado referencias del empleo del antibiótico aminoglicósido kanamicina en cultivos organotípicos del OC como modelo de ototoxicidad *in vitro*, a pesar de su amplio uso en estudios *in vivo*.²⁶ Se requieren dosis mayores de kanamicina que de neomicina o gentamicina para inducir daño a las células cocleas *in vitro*.

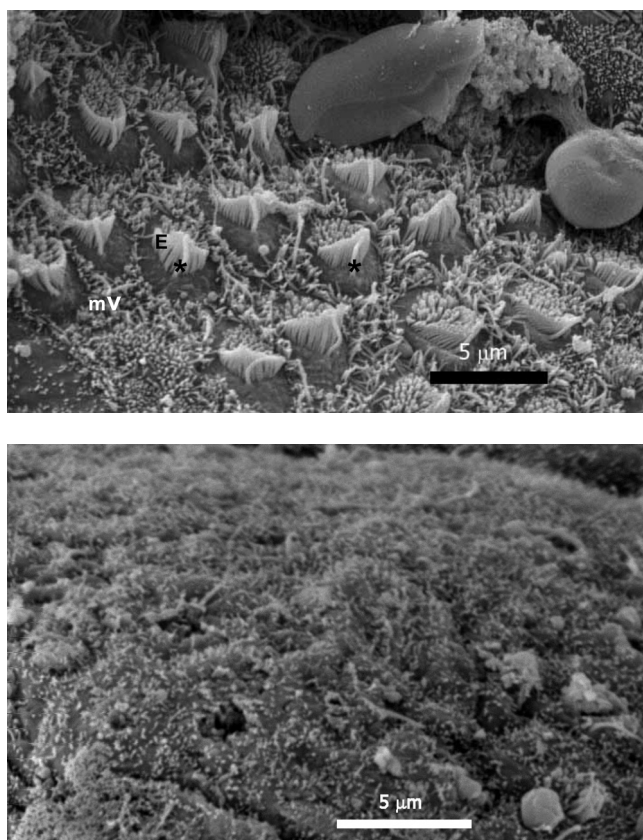


Fig. 3. Cultivos organotípicos del órgano de Corti de rata neonata control, por Microscopia Electrónica de Barrido. Superior: Células ciliadas externas con estereocilios (E) organizados en forma de V, kinocilios (*) centrales; microvellosidades (mv) alrededor. Inferior: Células de soporte cubiertas de microvellosidades.

CONCLUSIONES

Los estudios *in vitro* permiten llevar a cabo la evaluación de productos sin interferencia de ningún efecto sistémico, como ocurre *in vivo*. La similitud entre los cambios inducidos por ototoxicidad *in vitro* e *in vivo* apoya el empleo de los cultivos organotípicos del OC en la validación de terapias potencialmente otoprotectoras.

La exposición de los cultivos a antibióticos aminoglicósidos provoca cambios degenerativos que conducen finalmente a la muerte de las CC y a la formación de una cicatriz falangeal por las células de soporte adyacentes.

En este trabajo se presenta por primera vez la degeneración de las células cocleares *in vitro* por kanamicina.

Las diversas técnicas de Microscopia Óptica y Electrónica han permitido caracterizar el daño ototóxico inducido por agentes terapéuticos a las CC o validar la posible actividad otoprotectora de determinadas sustancias en cultivos organotípicos del OC de ratas y ratones neonatos o ambos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Valia Rodríguez del Centro de Neurociencias de Cuba, por sus útiles consejos y recomendaciones durante el desarrollo del trabajo. Al M.C. Pável Gutiérrez del Centro de Neurociencias de Cuba, por transmitirnos sus conocimientos sobre la preparación de cultivos cocleares. Al compañero Anselmo Aguilar del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, por permitirnos realizar todo el trabajo de cultivo *in vitro* en su laboratorio. Al técnico Osmany González del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, por su cooperación durante la preparación de las muestras para Microscopia Electrónica de Barrido.

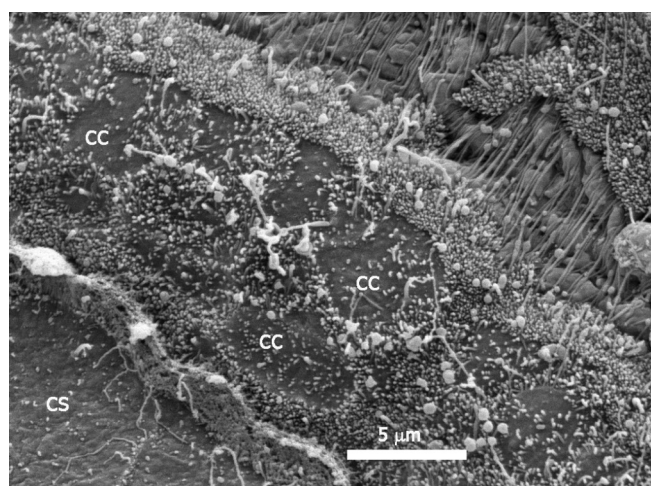
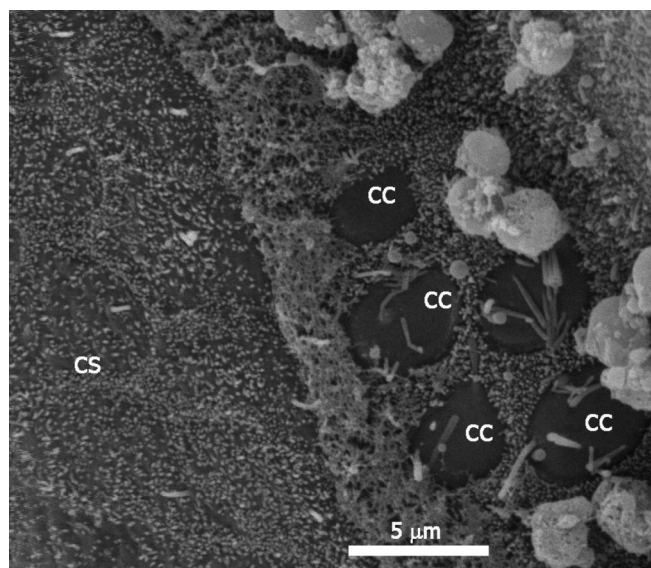


Fig. 4. Cultivos organotípicos del órgano de Corti de ratas neonatas tratados con kanamicina. Pérdida de estereocilios en la superficie apical de las células ciliadas externas. Superior: Kanamicina 6 mmol/L, exposición durante 24 h. Inferior: Kanamicina 3 mmol/L, exposición durante 48 h. Células ciliadas (CC), células de soporte (CS).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zine A, Ribaupierre F. Replacement of mammalian auditory hair cells. *Neuroreport*. 1998;9:263-8.
2. García VP, Martínez AF, Agustí EB, Mencía LA, Asenjo VP. Drug-induced ototoxicity: current status. *Acta Otolaryngol*. 2001;121:569-72.
3. Forge A, Schacht J. Aminoglycoside Antibiotics. *Audiol Neurotol*. 2000;5:3-22.
4. Kusunoki T, Cureoglu S, Schachern PA, Sampaio A, Fukushima H, Oktay MF, et al. Effects of aminoglycoside administration on cochlear elements in human temporal bones. *Auris Nasus Larynx*. 2004;31:383-8.
5. Zheng JL, Gao WQ, Concannon A. Concannon A protects hair cells against gentamicin ototoxicity in rat cochlear explant cultures. *Eur J Neurosci*. 1996;8:1897-05.
6. Daudet N, Ripoll C, Lenoir M. Transforming Growth Factor- α -induced cellular changes in organotypic cultures of juvenile, amikacin-treated rat organ of Corti. *J Comp Neurol*. 2002;442:6-22.
7. Rodríguez S, Coro RM, Ancheta O, Valdés T, Harvey Y, Leiva E. Las células del órgano de Corti y su relación con las neuronas del ganglio espiral en un modelo de ototoxicidad. *Acta Microscópica*. 2008;7(1):9-15.

8. López-González MA, Delgado F, Lucas M. Aminoglycosides activate oxygen metabolites production in the cochlea of mature and developing rats. *Hear Res*. 1999;136:165-8.
9. Rodríguez S, Ancheta O, Coro RM, Valdés T, Harvey Y, et al. Cambios histológicos inducidos por ototoxicidad en ratas. Citoarquitectura del órgano de Corti y del ganglio espiral. *Revista Ecuatoriana de Neurología*. 2005;14:13-7.
10. Richardson GP, Russel IJ. Cochlear cultures as a model system for studying aminoglycoside induced ototoxicity. *Hear Res*. 1991;53:293-11.
11. Low W, Dazert S, Baird A, Ryan AF. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) protects rat cochlear hair cells in organotypical culture from aminoglycoside injury. *J Cell Physiol*. 1996;167:43-50.
12. Romand R, Chardin S. Effects of growth factors on the hair cells after ototoxic treatment of the neonatal mammalian cochlea *in vitro*. *Brain Res*. 1999;825:46-58.
13. Lowenheim H, Kil J, Gultig K, Zenner HP. Determination of hair cell degeneration and hair cell death in neomycin treated cultures of the neonatal rat cochlea. *Hear Res*. 1999;128:16-26.
14. Pirvola U, Xing-Qun L, Virkkala J, Saarma M, Murakata C, Camoratto AM, et al. Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurosci*. 2000;20:43-50.
15. Corbacella E, Lanzoni I, Ding D, Previatti M, Salvi R. Minocycline attenuates gentamicin induced hair cell loss in neonatal cochlear cultures. *Hear Res*. 2004;197:11-8.
16. Sano H, Yoneda S, Iwase H, Itoh A, Hashimoto D, Okamoto M. Effect of geranylgeranylacetone on gentamicin ototoxicity in rat cochlea culture. *Auris Nasus Larynx*. 2007;34:1-4.
17. Monge A, Nagy I, Bonabi S, Schmid S, Gassmann M, Bodmer D. The Effect of Erythropoietin on Gentamicin-Induced Auditory Hair Cell Loss. *Laryngoscope*. 2006;116:312-6.
18. Battaglia A, Pak K, Brors D, Bodmer D, Frangos JA, Ryan AF. Involvement of ras activation in toxic hair cell damage of the mammalian cochlea. *Neuroscience*. 2003;122:1025-35.
19. Ding D, Stracher A, Salvi RJ. Leupeptin protects cochlear and vestibular hair cells from gentamicin ototoxicity. *Hear Res*. 2002;164:115-26.
20. McFadden SL, Ding D, Salvemini D, Salvi RJ. M40403, a superoxide dismutase mimetic, protects cochlear hair cells from gentamicin, but not cisplatin toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;186:46-54.
21. Kotecha B, Richardson GP. Ototoxicity *in vitro*: effects of neomycin, gentamicin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. *Hear Res*. 1994;73:173-84.
22. Wang J, Van De Water TR, Bonny C, de Ribaupierre F, Puel JL, Zine A. A Peptide Inhibitor of c-Jun N-Terminal Kinase Protects against Both Aminoglycoside and Acoustic Trauma-Induced Auditory Hair Cell Death and Hearing Loss. *The J Neurosci*. 2003;17:8596-07.
23. Nicotera TM, Ding D, McFadden SL, Salvemini D, Salvi R. Paraquat-Induced Hair Cell Damage and Protection with the Superoxide Dismutase Mimetic M40403. *Audiol Neurotol*. 2004;9:353-62.
24. Wei X, Zhao L, Liu J, Dodel RC, Farlow MR, Du Y. Minocycline prevents gentamicin-induced ototoxicity by inhibiting p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. *Neuroscience*. 2005;131:513-21.
25. Rodríguez S, Mercerón D, Coro RM, Valdés T, Harvey Y, Toledo C, et al. Ototoxicidad por kanamicina *in vitro*. Efectos sobre las células del órgano de Corti. *Acta Microscópica*. En prensa 2009;18 Suplemento C.
26. Kashio A, Sakamoto T, Suzukawa K, Asoh S, Ohta S, Yamasoba T. A protein derived from the fusion of TAT peptide and FNK, a Bcl-x(L) derivative, prevents cochlear hair cell death from aminoglycoside ototoxicity *in vivo*. *J Neurosci Res*. 2007;85:1403-12.