

Prevención y tratamiento médico de la sordera del oído interno. (30 años de investigación traslacional)

Prof. Rafael Ramírez Camacho

Profesor Emérito, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

Ex -Jefe de Servicio de Otorrinolaringología. Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Director del Grupo de Investigación Otológica

Resumen: En la actualidad una de las discapacidades con más prevalencia es la sordera del oído interno. El grupo de investigación otológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid ha realizado numerosos estudios de investigación animal con el objeto de aplicar, de forma preventiva y terapéutica, los conocimientos adquiridos a los pacientes afectados de sordera del oído interno. Sus estudios sobre la sordera inmunomediada y la inducida por cisplatino han sido objeto de numerosas publicaciones y tesis doctorales, fiel reflejo de una prolongada dedicación a la prevención de esta prevalente minusvalía.

Palabras clave: Investigación traslacional, sordera inmunomediada, sordera inducida por cisplatino.

Abstract: Currently one of the most prevalent disabilities is inner ear deafness. The otological research group at the Puerta de Hierro University Hospital in Madrid has carried out numerous animal research studies in order to apply, in a preventive and therapeutic way, the knowledge acquired to patients with inner ear deafness. His studies on immune-mediated and cisplatin-induced deafness have been the subject of numerous publications and doctoral theses, a faithful reflection of a long dedication to the prevention of this prevalent handicap.

Key words: Translational research, immune-mediated deafness, cisplatin-induced deafness.

Introducción

LA sordera de asiento en el oído interno supone una de las discapacidades más prevalentes en todo el mundo, con una importante influencia de las condiciones socio-sanitarias que incluyen el diagnóstico precoz y la rehabilitación destinadas a la reintegración social de quien la padece.

Si bien en los dos últimos tercios del siglo XX se realizaron importantes avances en el tratamiento médico y quirúrgico de la patología inflamatoria (Otorreas) y osteodistrófica (Otosclerosis) del oído medio, sólo fue con la generalización del uso de los implantes cocleares (IC) cuando se pudo proporcionar un remedio parcial a personas afectas de grados severos y profundos de hipoacusia, cuando ya eran inútiles las ayudas auditivas convencionales (audífonos).

Sin embargo el IC y los diferentes diseños de implantes de oído medio que se inician en la actualidad, no dejan de ser prótesis sofisticadas que suplen carencias funcionales secundarias a diversos tipos de lesiones localizadas en el órgano de Corti.

Un mérito colateral de los IC ha sido el hecho de poner la atención del investigador sobre la patología del oído interno, desechada con anterioridad.

Referido a los adultos se considera que un 3% de las personas entre 21 y 34 años presentan algún tipo de déficit auditivo, un 6% entre 35 y 44 años, un 11% entre 44 y 54 años, un 25% entre 55 y 64 años, y un 43% entre 65 y 84 años, estimándose que la pérdida auditiva afecta a 538 millones de personas en todo el mundo; estas cifras se encuentran en aumento pudiendo llegar a los 900 millones para 2025. (Estas cifras incluyen patologías del oído medio e interno).

El desarrollo de la Genética Molecular ha permitido describir y definir un buen número de enfermedades hereditarias que no para de crecer, gracias a los modernos sistemas de *microarrays* que permiten analizar la expresión diferencial de genes, monitoreando de manera simultánea los niveles de miles de ellos.

Por otra parte, la medicina regenerativa mediante diferenciación estructural y células madre no son más que expectativas posibles pero irrealizables en la actualidad.

El envejecimiento, la exposición al ruido y el uso de drogas ototóxicas, entre las que se incluyen determinados antibióticos, diuréticos y citostáticos, junto a las sorderas genéticas, son causa del mayor número de sorderas neurosensoriales. Los conocimientos actuales mediante la Biología Molecular, de los eslabones que concurren en el daño de las estructuras celulares del órgano de Corti, permiten introducir estrategias preventivas contra múltiples tipos de sordera neurosensorial.

Interés por la sordera neurosensorial

El objetivo del Grupo de Investigación Otológica del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda-Universidad Autónoma de Madrid fundado

en 1986, se basa en la realización de investigación de laboratorio traslacional y clínica al objeto de aplicar los conocimientos adquiridos en la investigación animal al paciente afecto de determinados tipos de sordera de asiento en el oído interno con un propósito preventivo y terapéutico.

1. Fase de estudio de la sordera inmunomediada

- a. La asistencia en 1988 a un paciente que padecía una importante sordera de ambos oídos de asiento en oído interno a lo que se unía una poliarteritis nodosa, que refería mejorar su audición tras ser tratado con corticoides por esta afección, comprobado con audiometrías en diversas ocasiones, estimuló el interés por una patología considerada como irreversible, cuando no, progresiva. Hasta el momento, solo era posible la aplicación de ayudas auditivas (audífonos). Una revisión de la literatura condujo hasta la publicación de McCabe (1) en que se definía la primera forma de sordera neurosensorial reversible. Esta publicación nos incitó a estudiar en los pacientes tal patología mediante estudio de casos clínicos (2, 3, 4, 5, 6), así como la creación de un modelo experimental en nuestro laboratorio (7).
- b. La acumulación de evidencias nos llevó a los trabajos encaminados a elaborar la Tesis doctoral titulada ESTUDIO DE LA PATOLOGÍA INMUNOINDUCIDA EN EL OIDO INTERNO, defendida en 1996, cuyos resultados se publicaron en 1997 (8).
- c. De la traslación de los datos experimentales a la clínica humana, fue posible realizar actualizaciones de aquella patología reversible que por entonces era desconocida entre los otólogos españoles (9), definiéndose los criterios diagnósticos (10, 11) que se extendieron a determinadas formas de sordera súbita (12, 13, 14).
- d. Un momento clave en el futuro de las investigaciones fue cuando se aplicó un estudio analítico mediante Western blot de la HSP 70, considerado en su momento como de una gran sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la sordera súbita. El hecho de que nuestros resultados discreparan con los previamente publicados en una larga serie de pacientes, agrupados bajo los estándares clínicos mundialmente aceptados (15), nos llevó a crear un modelo de ototoxicidad experimental en rata Whistar mediante el cisplatino, un fármaco antitumoral de conocido efecto tóxico sobre oído y riñón, cuya acción está alejada de los mecanismos inmunomediados. Sobre este modelo se podría valorar la influencia de la *heat shock*

protein-70 (HSP 70) en la lesión del oído interno (16) lo que demostró que HSP-70 era un marcador precoz de lesión celular en el órgano de Corti, pero sin especificidad frente a la sordera inmunomediada. Se ha seguido trabajando en la línea de la sordera inmunomediada (17, 18), aplicando los recientes diseños de anticuerpos inmunomoduladores (19, 20, 21 22) y las mejoras en el diagnóstico (23), que dio lugar a otra Tesis doctoral titulada TERAPIAS BIOLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD INMUNOMEDIADA DEL OÍDO INTERNO. ESTUDIO CLÍNICO-EXPERIMENTAL CON ETANERCEPT, defendida en 2013, dentro de cuya línea se ha realizado una revisión clínica sistemática (24) y de los test empleados en su diagnóstico (25, 26) y analizando los efectos adversos del tratamiento (27) y las propuestas de nuevas vías de aplicación (28). El conjunto de las líneas de investigación sobre sordera inmunológica del Grupo de Investigación Otológica del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro, se recogieron en el libro titulado LA ENFERMEDAD INMUNOMEDIADA DEL OÍDO INTERNO (29).

2. Fase de estudio de la lesión inducida por cisplatino (CDDP)

La aplicación de CDDP, fármaco introducido en la clínica en 1960 por Barnett Rosenberg había sido descrito por Peyrone en 1845, ha demostrado ser un agente quimioterápico altamente efectivo contra ciertos tumores sólidos, incluyendo tumores de cabeza y cuello, pulmón, ovario y testículo; sin embargo, presenta diversos efectos secundarios como nefrotoxicidad, neurotoxicidad y ototoxicidad, para los que no existe tratamiento. En relación a la ototoxicidad inducida por CDDP se han descrito dos vías. Una, consiste en el ligamiento con las bases de guanina del DNA nuclear, con un bloqueo de la replicación y transcripción. Otra, se realiza mediante un efecto directo sobre el DNA mitocondrial que altera el transporte electrónico de la síntesis de proteínas dando lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (30).

El interés por el estudio de los efectos del CDDP sobre la audición surgió, como se ha dicho, al buscar una forma de lesionar el oído interno distinta al modelo de sordera inmunomediada que habíamos diseñado, al objeto de valorar la eficacia de la HSP-70.

Para la aplicación de un modelo experimental se pasó por una serie de fases que se ven reflejadas en publicaciones:

- Adquisición de una metodología de exploración histológica de la cóclea dañada por el CDDP mediante microscopia electrónica de barrido (31, 32, 33, 34) de transmisión (33, 34) y confocal (35).
- Cuantificación de CDDP y otros aductos en oído, cerebro, riñón e hígado de la rata Wistar, realizado en colaboración con la Cátedra de Química Analítica de la UCM (36, 37, 38) mediante *coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)*, lo que permitió definir diferencias significativas del depósito del metal en función de proteínas específicas de la cóclea.
- Definición de las líneas celulares implicadas en el inicio de la cascada apoptótica que conduce a la muerte celular programada tras la exposición a noxas patogénicas (39, 40, 41, 42), mediante el análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que intervienen en el daño celular y los mecanismos de protección endógena (43).
- Todo ello ha llevado a determinar los daños celulares inducidos por la aplicación general de CDDP (44) y a revisar los diferentes mecanismos de producción de la muerte celular en el oído del animal de experimentación (45) en una publicación que es citada frecuentemente por otros investigadores. También hemos realizado un análisis sistemático de los diferentes agentes protectores contra la ototoxicidad por CDDP (46). Ambos suponen una base para nuestra investigación posterior destinada a buscar métodos de prevención de la ototoxicidad por CDDP como modelo de diferentes tipos de sordera neurosensorial que siguen caminos comunes hasta la desaparición de las células cocleares.

El carácter traslacional de las investigaciones nos han obligado a definir los patrones auditivos en la población española al objeto de trasladar los resultados experimentales obtenidos en el laboratorio (47, 48, 49) que ha constituido la Tesis doctoral titulada DETERMINACIÓN DE LOS UMBRALES DE AUDICIÓN EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA. PATRONES DE NORMALIDAD DE LA TOTALIDAD DEL ESPECTRO AUDITIVO HUMANO Y SU AMPLIACIÓN A ULTRA ALTAS FRECUENCIAS, imprescindibles para valorar fases precoces de la ototoxicidad lo que matiza el uso de los audífonos.

3. Fase de interés por los factores intervinientes en la sordera por la edad (presbiacusia)

Sobre la base de la existencia de vías comunes en el desarrollo de la apoptosis celular inducida por diferentes noxas (45), hemos investiga-

do sobre la posibilidad de prevenir el envejecimiento mediante el uso de antioxidantes (50, 51).

4. Fase de protección activa frente a la acción tóxica del CDDP

Como consecuencia de una línea de interés que ya cumple 30 años, se ha planteado la necesidad de intentar una prevención activa contra la sordera secundaria a la toxicidad del CDDP, dado que supone una frecuente e irreversible causa de daño auditivo, sin tratamiento hasta el momento actual.

Nuestro modelo experimental se basa en:

- Aplicación de CDDT por perfusión intraperitoneal en animal de experimentación que produce pérdida auditiva en frecuencias agudas, comprobado mediante realización de potenciales evocados de estado estable (ASSR) antes y después de la inyección.
- Aplicación de sustancias protectoras en oído derecho.
- Utilización del oído izquierdo como control.
- Extracción de ambas bullas timpánicas para estudios morfológicos e inmunohistoquímicos mediante microscopía convencional, electrónica de barrido, de transmisión y láser confocal, comparando la protegida con la cóclea considerada control.

Nos hemos basado en una práctica clínica cada vez más implantada en Servicios de Otorrinolaringología de todo el mundo como es la dispensación de medicamentos por vía intratimpánica, al objeto de que los principios activos penetren la membrana de la ventana redonda hasta el punto de que, desde la perilinfa, se pongan en contacto con las células ciliadas donde actúan. Esta elección se basa en evitar los mecanismos indeseables del CDDP sobre el oído sin inhibir la acción antitumoral para la que se ha indicado. De emplear una vía general para la protección podría desaparecer o disminuir su principal función.

Antes de la aplicación de sustancias preventivas o protectoras se han revisado los diferentes compuestos empleados para la protección coclear (46), así como la posible toxicidad *in vitro* e *in vivo* de los solventes empleados (52), lo que nos ha sido posible al añadir a nuestro modelo animal el uso de cultivos celulares de células ciliadas (HEI-OC1) incorporados a nuestro arsenal a principios de 2015.

5. Luteína

Por comparación con una amplia bibliografía referida al uso del antioxidante luteína en la patología ocular y las similitudes embriológicas e histológicas del ojo y el oído, hemos emprendido un estudio de las posibilidades de protección frente a la ototoxicidad por CDDP, tanto *in vitro* como *in vivo* (53) encontrando protección en HEI-OC1 pero no en el animal de experimentación, hecho que puede deberse al tamaño de la molécula incapaz de atravesar los filtros de membrana que se presentan, a su labilidad por la luz, problemas metabólicos, etc. que se indagaran en próximos ensayos. Estas investigaciones realizadas en nuestro laboratorio dieron lugar a la defensa de la Tesis doctoral titulada EFICACIA DE LA LUTEÍNA EN LA PREVENCIÓN DE LA OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO. ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO*, en septiembre 2015.

6. Nanoencapsulaciones

Una de las vías más prometedoras del tratamiento de la patología neurosensorial del oído es el uso de sustancias nanoencapsuladas, capaces de ser dirigidas hacia las estructuras celulares responsables de la sordera (54).

En un intento por mejorar la biocompatibilidad de la vía transtimpánica de agentes protectores experimentados en la clínica humana, o de resolución de los problemas encontrados al utilizar la luteína, se han iniciado un programa de nanoencapsulaciones mediante una forma clínica de la vitamina E (de acción antioxidante, por sí misma) que compensa la hidrobia de los corticoides más empleados en clínica como la 6 α -metilprednisolona (55), o la dexametasona (56), obteniendo unos significativos resultados auditivos en altas frecuencias entre el oído protegido y el oído control.

Recientemente, se han incorporado formulaciones originales de nanoencapsulación con efecto antiinflamatorio y antioxidante, sensibles al pH de las células (57), lo que mejora su biocompatibilidad y los resultados funcionales.

Estos resultados implican la existencia de una prevención real de determinados tipos de sordera que puedan ser extrapolados a la clínica humana. El animal de experimentación conserva un mejor umbral auditivo en el oído tratado con nuestras nanoencapsulaciones transtimpánicas, mientras que el oído no tratado (control) presenta un importante grado de pérdida auditiva. El uso en otras formas de sordera

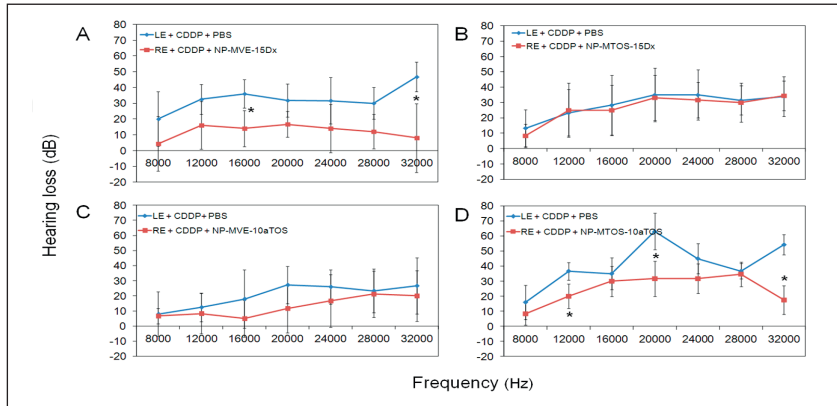


FIGURA 1.—Pérdida auditiva (8-32 KHz) tras inyección intratimpánica en oído derecho de diferentes tipos de nanoencapsulaciones de dexametasona (NP-MVE-15Dx (A), NP-MTOS-15Dx (B), NP-MVE-10 α TOS (C) and NP-MTOS-10 α TOS (D)) y una dosis intraperitoneal de Cisplatino (10 mg/kg) (LE: oído izquierdo; RE: oído derecho). Los audiogramas de ultra altas frecuencias muestran la diferencia auditiva antes y después del tratamiento con la solución de nanopartículas inyectadas en oído derecho y cisplatino intraperitoneal. Se incluyen la media, la desviación estándar (n=6) y los resultados del test independiente TUKEY. (* $p < 0.05$).

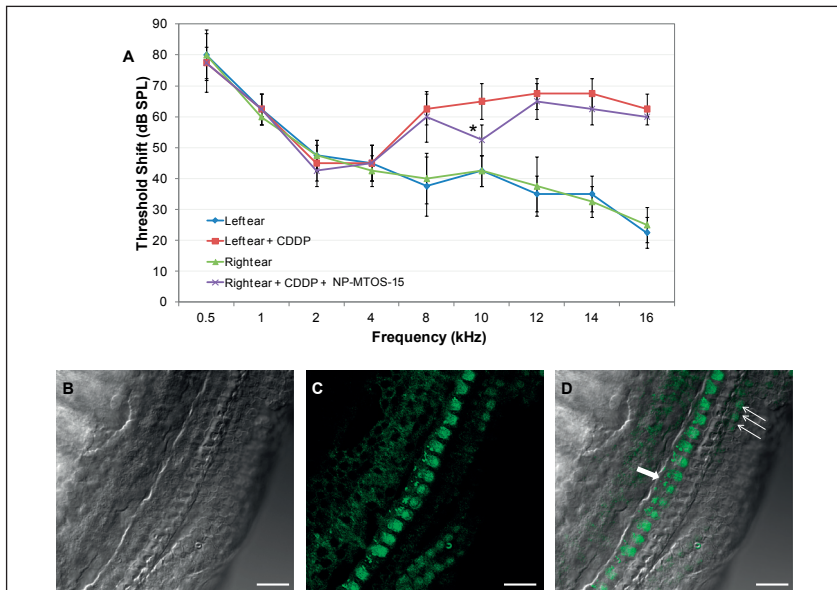


FIGURA 2.—Preparación de superficie de órgano de Corti de rata Whistar tras inyección intraperitoneal de cisplatino. B. Imagen original, C. Cuma-rina contenida en nanopartículas sobre órgano de Corti en células lesionadas. D. Superposición de B y C mostrando el depósito de nanopartículas cargadas en células ciliadas internas (flecha gruesa) y tres filas de células ciliadas externas (flechas finas). Microscopia Confocal.

de asiento en oído interno (sordera súbita idiopática, inmunomediada, Menière, algunos acúfenos...) de nuestras preparaciones que contienen sustancias no nocivas al organismo y de eficacia probada, puede suponer un importante avance en el manejo de una de las más frecuentes afectaciones responsables de la sordera.

Búsqueda de dianas terapéuticas

Una vía paralela y concluyente, ha sido la descripción por primera vez en la literatura, de la expresión de los receptores de cannabinoides -2 (CB2) en determinadas estructuras celulares del órgano de Corti y la estría vascular (58), hecho de gran trascendencia terapéutica que permitirá enlazar con la dispensación mediante nanoencapsulaciones de medicamentos. Este descubrimiento supone el hallazgo de una diana de actuación del tóxico auditivo susceptible de ser tratado.

El conjunto de las investigaciones mostradas suponen la dedicación prolongada a la prevención de una de las minusvalías que influyen decisivamente en el comportamiento cognitivo, relacional y médico del ser humano, y en el que los resultados avalan la hipótesis que las incentivó desde el principio. Una visión global pero específica de las diferentes patologías del oído interno, puede ser encontrada en el libro LA SORDERA NEUROSENSORIAL. DE LAS BASES MOLECULARES A LA CLÍNICA (59).

Referencias

1. McCabe BF Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1979 ;88(5 Pt 1):585-9.
2. García Berrocal JR, Pinilla Urraca M, Ramírez-Camacho R, González Martín F, López Cortijo C [Inner ear diseases of probable autoimmune origin and its response to steroid treatment]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1995; 46(6):416-20).
3. García Berrocal JR, Pinilla Urraca M, Vergara Trujillo J, Ramírez-Camacho RA. [Removal and processing inner ear specimens for morphological research on guinea pig ear]. *An Otorrinolaringol Ibero Am.* 1996; 23(2):189-99).
4. Arellano B, García Berrocal JR, Górriz C, González FM, Vicente J, Ramírez Camacho R [Treatment protocol for sudden deafness]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1997; 48(7):513-6).
5. García Berrocal JR, Arellano B, Vargas JA, Trinidad A, Ramírez Camacho R, Vergara J ([Immune-mediated inner ear disease: report of clinical cases].. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1997; 48(7):565-70).
6. García Berrocal JR, Vargas JA, Vaquero M, Ramón y Cajal S, Ramírez-Camacho RA. Cogan's syndrome: an oculo-audiovestibular disease.. *Postgrad Med J.* 1999; 75(883):262-4.
7. García-Berrocal JR, Vicente J, Arellano B, González F, Ramírez-Camacho R. [Experimental autoimmune labyrinthitis: evaluation of various models in guinea pigs]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1997; 48(1):5-10).
8. García-Berrocal JR, Vargas JA, Ramírez-Camacho RA, González FM, Gea-Banacloche JC, Vergara J, Durántez A . Deficiency of naive T cells in patients with sudden deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997; 123(7):712-7. Erratum in: *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123(11):1172.
9. García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Immune response and immunopathology of the inner ear: an update. *J Laryngol Otol.* 2000; 114(2):101-7.
10. García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Zurita M, Arellano B [Early cellular immune response in experimental labyrinthitis: immunohistochemical study].. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2000; 51(7):557-61).
11. García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Vargas JA, Millán I. Does the serological testing really play a role in the diagnosis immune-mediated inner ear disease? *Acta Otolaryngol.* 2002; 122(3):243-8.
12. Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Sudden sensorineural hearing loss: supporting the immunologic theory. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002; 111(11):989-97).

13. García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Millán I, Górriz C, Trinidad A, Arellano B, Lobo D. Sudden presentation of immune-mediated inner ear disease: characterization and acceptance of a cochleovestibular dysfunction.. *J Laryngol Otol.* 2003 ; 117(10):775-9).
14. García-Berrocal JR, Górriz C, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Ibáñez A, Rodríguez Valiente A, González JA. Ootosyphilis mimics immune disorders of the inner ear. *Acta Otolaryngol.* 2006; 126(7):679-84.
15. García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Arellano B, Vargas JA. Validity of the Western blot immunoassay for heat shock protein-70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope.* 2002; 112(2):304-9.
16. Ramírez-Camacho R, Citores MJ, Trinidad A, Verdaguer JM, García-Berrocal JR, Marero AM, Puente A, González-García JA, Vargas JA. HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity. *Acta Otolaryngol.* 2007; 127(6):564-7.
17. García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Zurita M, de la Fuente R, Lobo D. Controversies and criticisms on designs for experimental autoimmune labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2004; 113(5):404-10).
18. García-Berrocal JR, Trinidad A, Ramírez-Camacho R, Lobo D, Verdaguer M, Ibáñez A. Immunologic work-up study for inner ear disorders: looking for a rational strategy.. *Acta Otolaryngol.* 2005; 125(8):814-8.
19. Lobo D, Trinidad A, García-Berrocal JR, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R. TNFalpha blockers do not improve the hearing recovery obtained with glucocorticoid therapy in an autoimmune experimental labyrinthitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006; 263(7):622-6).
20. Lobo D, García-Berrocal JR, Trinidad A, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R. (Review of the biologic agents used for immune-mediated inner ear disease. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2013; 64(3):223-9).
21. García-Berrocal JR, Ibáñez A, Rodríguez A, González-García JA, Verdaguer JM, Trinidad A, Ramírez-Camacho R. Alternatives to systemic steroid therapy for refractory immune-mediated inner ear disease: A physiopathologic approach. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006 ; 263(11): 977-82).
22. Lobo DR, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. New prospects in the diagnosis and treatment of immune-mediated inner ear disease.. *World J Methodol.* 2014; 26; 4(2):91-8.
23. García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Trinidad A. [Autoimmune hearing loss: improving diagnostic performance]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2007; 58(4):138-42.
24. García Berrocal JR, Lobo D, García López F, Ramírez-Camacho R. [Immunomediated inner ear disease: diagnostic validation by means of a systematic analysis of the scientific literature]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2007 ; 58(5):208-16).

25. Lobo D, López FG, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Diagnostic tests for immunomediated hearing loss: a systematic review. *J Laryngol Otol.* 2008; 122(6):564-73).
26. García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, González-García JA, Verdaguer JM, Trinidad A. Does the serological study for viral infection in autoimmune inner ear disease make sense? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2008; 70(1):16-19.
27. García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Lobo D, Trinidad A, Verdaguer JM. Adverse effects of glucocorticoid therapy for inner ear disorders. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2008; 70(4):271-4.
28. Sáenz-Piñones JC, Villarreal IM, García-Chillerón R, Trinidad A, Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR. Intratympanic Methylprednisolone for Sudden Sensorineural Hearing Loss: Comprehensive Reexamination of the Model. *J Otolaryngol ENT Res* 3(3): 00067.
29. La enfermedad inmunomediada del oído interno (García Berrocal JR editor) *Ars Médica*, Barcelona 2004 (ISBN 84-95670-51-8).
30. Martín-Saldaña S, Palao-Suay R, Trinidad A, Aguilar MR, Ramírez-Camacho R, San Román J. Otoprotective properties of α -methylprednisolone-loaded nanoparticles against cisplatin: In vitro and in vivo correlation. *Nanomedicine.* 2016; 12(4):965-76.
31. Ramírez Camacho R, García Berrocal JR, Trinidad A, Martín Marero A, Buján J. [Cochlear cytotoxic activity of cisplatin in experimentation animals. A study using scanning electron microscopy]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2002; 53(8):538-42).
32. Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Trinidad A, Verdaguer JM, Nevado J. Blebs in inner and outer hair cells: a pathophysiological hypothesis. *J Laryngol Otol.* 2008; 122(11):1151-5).
33. Méndez-Benegassi I, Trinidad A, García-Berrocal JR, Martín C, Martínez-Monedero R, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R. [Ultra-structural study of the lateral portion of the auditory sensorial organ using a decalcification-free method]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2008; 59(8):377-83).
34. García Berrocal JR, Méndez-Benegassi I, Martín C, Ramírez Camacho R. ([Intervention of spiral ligament fibrocytes in the metabolic regulation of the inner ear]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2008; 59(10):494-9.
35. A. Trinidad, JR. García Berrocal, J. Nevado, R. Ramírez Camacho. Microscopic techniques for application in experimental pathology of the middle and inner ear. In *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* , vol 3 (Editors: Antonio Méndez-Vilas and Jesús Díaz Álvarez) Publisher: Formatex Research Center (ISBN (13): 978-84-614-6189-9), 2010, pag: 1127-39).
36. Esteban-Fernández D, Gómez-Gómez MM, Cañas B, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R, Palacios MA. Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues. *Talanta* 2007; 72: 768-73.

37. Esteban-Fernández D, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. Accumulation, fractionation, and análisis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin and carboplatin administration. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(2):140-6.
38. Ramírez-Camacho R, Fernández DE, Verdaguer JM, Gómez MM, Trinidad A, García-Berrocal JR, Corvillo MA. Cisplatin-induced hearing loss does not correlate with intracellular platinum concentration. *Acta Otolaryngol.* 2008; 128(5):505-9.
39. Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Buján J, Martín-Marero A, Trinidad A. Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope.* 2004; 114(3):533-7.
40. Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Trinidad A, González-García JA, Verdaguer JM, Ibáñez A, Rodríguez A, Sanz R Central role of supporting cells in cochlear homeostasis and pathology. *Med Hypotheses.* 2006; 67(3):550-5.
41. García-Berrocal JR, Nevado J, Ramírez-Camacho R, Sanz R, González-García JA, Sánchez-Rodríguez C, Cantos B, España P, Verdaguer JM, Trinidad Cabezas A. The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *Br J Pharmacol.* 2007; 152(7):1012-20.
42. J R García-Berrocal, R Ramírez-Camacho, J A González-García, R Martínez-Monedero. Cisplatin ototoxicity: a key for the understanding of the inner ear pathology. In: *Deafness, Hearing Loss and the Auditory System* (Editor: Derick Fiedler and Rowland Krause) 2010 Nova Science Publishers, Inc. New York (ISBN: 978-1-60741-259-5) Chapter 15, pp: 313-322.
43. González-García JA, Nevado J, García-Berrocal JR, Sánchez-Rodríguez C, Trinidad A, Sanz R, Ramírez-Camacho R. Endogenous protection against oxidative stress caused by cisplatin: role of superoxide dismutase. *Acta Otolaryngol.* 2010; 130(4):453-7.
44. García-Berrocal JR, Nevado J, González-García JA, Sánchez-Rodríguez C, Sanz R, Trinidad A, España P, Citores MJ, Ramírez-Camacho R. Heat shock protein 70 and cellular disturbances in cochlear cisplatin ototoxicity model. *J Laryngol Otol.* 2010; 124(6):599-609.
45. Casares C, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Roldán A, Jorge E, García-Berrocal JR. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012; 269(12):2455-9.
46. Roldán-Fidalgo A, Trinidad A, Rodríguez Valiente A, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Protective agents against cisplatin induced ototoxicity in mammalian models: An overview of literature. *J. Head Neck Phys Surg* 2014; 3:33-56.
47. Rodríguez Valiente A, Pérez Sanz C, Górriz C, Juárez A, Monfort M, García Berrocal JR, Gil Fernández J, Ramírez Camacho R.[Designing

- a new tool for hearing exploration]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2009; 60(1):43-8.
48. Rodríguez Valiente A, Trinidad A, García Berrocal JR, Górriz C, Ramírez Camacho R. Extended high-frequency (9-20 kHz) audiometry reference thresholds in 645 healthy subjects. *Int J Audiol.* 2014; 53(8):531-45.
 49. Rodríguez Valiente A, Roldán Fidalgo A, García Berrocal JR, Ramírez Camacho R. Hearing threshold levels for an otologically screened population in Spain. *Int J Audiol.* 2015; 54(8):499-506.
 50. Nevado J, Sanz R, Casqueiro JC, Ayala A, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Ageing evokes an intrinsic pro-apoptotic signalling pathway in rat cochlea. *Acta Otolaryngol.* 2006; 126(11):1134-9.
 51. Nevado J, Sanz R, Sánchez-Rodríguez C, García-Berrocal JR, Martín-Sanz E, González-García JA, Esteban-Sánchez J, Ramírez-Camacho R. Ginkgo biloba extract (EGb761) protects against aging-related caspase-mediated apoptosis in rat cochlea. *Acta Otolaryngol.* 2010; 130(10):1101-12.
 52. Roldán-Fidalgo A, Trinidad A, Rodríguez-Valiente A, García-Berrocal JR, Millán I, Coronado MJ, Ramírez-Camacho R. Effect of intratympanic dimethyl sulphoxide (DMSO) in an in vivo model of cisplatin-related ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014; 271(12):3121-6.
 53. Roldán-Fidalgo A, Martín Saldaña S, Trinidad A, Olmedilla-Alonso B, Rodríguez-Valiente A, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. *In vitro* and *in vivo* effects of lutein against cisplatin-induced ototoxicity. *Exp Toxicol Pathol.* 2016; 68(4):197-204.
 54. Martín-Saldaña S, Aguilar MR, Ramírez-Camacho R, San Román J. Is Nanotechnology the Answer for the Treatment of Cisplatin-Induced Ototoxicity? *J Ear Nose Throat Disord* 1(1): 1008, (2016).
 55. Martín-Saldaña S, Palao-Suay R, Aguilar MR, Ramírez-Camacho R, San Román J. Polymeric nanoparticles loaded with dexamethasone or α -tocopheryl succinate to prevent cisplatin-induced ototoxicity. *Acta Biomater.* 2017; 15;53:199-210.
 56. Martín-Saldaña S, Palao-Suay R, Aguilar MR, García-Fernández L, Arévalo H, Trinidad A, Ramírez-Camacho R, San Román J. pH-sensitive polymeric nanoparticles with antioxidant and anti-inflammatory properties against cisplatin-induced hearing loss. *J Control Release.* 2018; 28;270:53-64.
 57. Martín-Saldaña S, Trinidad A, Ramil E, Sánchez-López AJ, Coronado MJ, García JM, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Spontaneous cannabinoid receptor 2 (CB2) expression in the cochlea of adult albino rat and its up-regulation after cisplatin treatment PLOS ONE 2016;11(8):e0161954.
 58. R. Ramírez Camacho (Edit) LA SORDERA NEUROSENSORIAL. DE LAS BASES MOLECULARES A LA CLÍNICA Edit Springer Heathcare. ISBN 978-84-940118-6-3, Madrid 2016.