

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

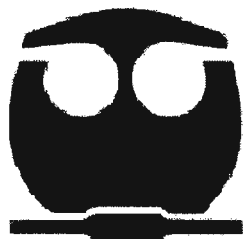
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA
PARTICIPACIÓN DE LA ESTREPTIDINA
PROVENIENTE DE ESTREPTOMICINA POR
HIDRÓLISIS EN LA
VESTIBULOTOXICIDAD

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
OMAR GRANADOS PORTILLO

Tutor: DRA. GRACIELA MEZA RUÍZ



MÉXICO, D. F.

Mayo 2005

m. 344692



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO DOCTORAL ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
1ER VOCAL: Dra. NORAH BARBA BEHRENS
2DO VOCAL: Dra. HELGI JUNG
3ER VOCAL: Dr. EDGAR VÁZQUEZ CONTRERAS
SECRETARIO: Dra. MARTA MENJIVAR IRAHETA
PRIMER SUPLENTE: Dra. NORMA BOBADILLA SANDOVAL
SEGUNDO SUPLENTE: Dr. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

OMAR GRANADOS PORTILLO



NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

GRACIELA MEZA RUÍZ



ESTA TESIS DOCTORAL SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DE LA Dra.
GRACIELA MEZA RUÍZ EN EL LABORATORIO DE OTONEUROBIOQUÍMICA, EN EL
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la gran oportunidad de adquirir las herramientas necesarias para tener un futuro mejor.

A la Dra. Graciela Meza Ruíz, por su invaluable ayuda en mi formación como investigador y por haberme introducido en el fascinante mundo del oído interno, mil gracias.

Al Dr. Adolfo García Sainz, Director del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por su constante apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca durante los estudios de doctorado (registro 121713) y del donativo 38952-M a la Dra. Graciela Meza Ruíz. Asimismo, agradezco a DGEP-UNAM por la beca otorgada durante la realización de los estudios del doctorado.

A la Dra. Norah Barba-Behrens, del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química, UNAM por la donación de la estreptidina utilizada en este proyecto.

A la Dra. Inés Fuentes, del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM por su asesoría en la implementación de la técnica de HPLC.

A la Unidad de Servicios de Análisis Instrumentales (USAI) de la Facultad de Química, UNAM por su gran ayuda en la obtención de los espectros de masas y los análisis elementales de los compuestos derivados de la estreptomina.

Al Dr. Anatoli Iatsimirski, de la Facultad de Medicina, UNAM por su asesoría en los métodos de Espectroscopía de Fluorescencia.

A los Drs. Mark West y Luis Fernando Oropeza, de la Unidad de Microscopía Electrónica del IFC, UNAM por su asistencia técnica en la metodología de HPLC.

Al Sr. Rodolfo Paredes, de la Unidad de Microscopía Electrónica del IFC, UNAM por su excelente asistencia técnica en la captura de las imágenes de microscopía óptica.

Al Sr. Federico García Jandete, de la unidad de Histología del Departamento de Neurociencias del IFC, UNAM por su excelente ayuda técnica en los cortes histológicos.

A la MVZ. Claudia Rivera y colaboradores, del Bioterio del IFC, UNAM por su invaluable apoyo en la obtención y cuidado de los animales utilizados en este trabajo.

A la Sra. Cecilia Escalona, por su ayuda técnica en la decapitación y perfusión de las ratas y la disección de las bulas auditivas, utilizadas en este estudio

A la IQ. Gabriela Martínez, por su invaluable ayuda técnica computacional.

A la Dra. Tatiana Fiordelisis y a la QFB. Tony Nava, por su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos de fluorescencia y de HPLC, respectivamente.

A La Sra. Luz Ma. Bravo y colaboradores de los Laboratorios Clínicos de Tlalpan, por su apoyo en la obtención del suero humano.

A la Dra. Carmen Tirado, del Departamento de Otorrinología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), por la obtención del suero de pacientes tratados con estreptomycin.

DEDICATORIAS

A mi padre Pedro Granados Escoto, mi madre Martha Portillo Fuero y mi hermana Rigel Granados Portillo, por su apoyo incondicional en la toma de mis decisiones y por ser el pilar de mi vida, sin ellos no podría haber cumplido con mis sueños y mis metas.

A la Dra. Irma Villalpando Fierro y a la Dra. Graciela Meza Ruíz no sólo por formarme como estudiante y profesionista, sino por hacerme sentir parte de un segundo hogar en sus respectivos laboratorios.

A mis grandes amigos, Euclides Ávila Chávez, Carlos Ugarte Briones, Víctor Ortíz Ortega, Luis Martínez y Luis T. Sánchez Linares con los que he llegado a formar una gran hermandad, gracias por ser parte de mi vida.

A mis amigas del IFC, la Dra. Guadalupe Guerra y la QFB. Concepción José, por apoyarme y ayudarme en los momentos difíciles.

Al mundo maravilloso de la Ciencia y el Conocimiento que me ha hecho crecer como ser humano.

ESTA TESIS ESTA BASADA EN LOS SIGUIENTES ARTICULOS:

- I. G. Meza, N. Barba-Behrens, O. Granados, A. Hernández-Cruz and A. Toxqui. (2001). Vestibular histofluorescence could be due to accumulation of both the antibiotic and its derivative, streptidine, after acute streptomycin treatment in the guinea pig. *Histol Histopathol.* 16: 1143-1148.
- II. O. Granados and G. Meza (2005). Streptidine, a metabolic derivative produced after administration of streptomycin *in vivo*, is vestibulotoxic in rats. *Histol Histopathol.* 20: 357-364.
- III. Graciela Meza y Omar Granados (1999). Alfa-glucosidasa con posible acción hidrolítica sobre aminoglicósidos en la sangre y el vestíbulo de ratas. *An ORL Mex.* 44: 134-137.

La referencia a estos trabajos se hace a lo largo de esta tesis con el número romano respectivo.

ABREVIATURAS

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
dB	Decibeles
DihidroSTP	Dihidroestreptomicina
pNP	p-Nitrofenol
pNPG	p-Nitrofenil- α -D-glucósido
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
STD	Estreptidina
STP	Estreptomicina
TCA	Acido tricloroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
USP	United States Pharmacopoeia

ÍNDICE

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCIÓN	3
III	BREVE DESCRIPCIÓN DEL OIDO EN MAMÍFEROS	12
IV	ANTECEDENTES	
	La vestibulotoxicidad de la estreptomina:	
	a) Estudios en humanos	19
	b) Estudios en animales	22
	c) Toxicidad de otros aminoglicósidos	25
	d) Efecto sobre el epitelio sensorial vestibular	26
	e) Activación o transformación metabólica de los aminoglicósidos	32
	f) Posibles blancos estructurales de la hidrólisis de la estreptomina	35
V	MODELO EXPERIMENTAL	40
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	43
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
VIII	CONCLUSIONES	94
IX	REFERENCIAS	96
X	APÉNDICE I. TRABAJOS PRESENTADOS BASE DE ESTA TESIS	
XI	APÉNDICE II. APLICACIÓN Y EXPERIMENTOS ADICIONALES. Estudios <i>in vitro</i> en el suero humano de individuos normales y en pacientes tratados con estreptomina	I-VI

I. RESUMEN

Actualmente, la estreptomycinina sigue siendo utilizada en el tratamiento de pacientes que sufren tuberculosis y otras enfermedades infecciosas en los países en vías de desarrollo. Sin embargo, existe un riesgo potencial en los pacientes para que se produzcan alteraciones en el mantenimiento del equilibrio y la postura y otros efectos involucrados en el daño específico de las células pilosas del epitelio sensorial vestibular. El establecimiento de estos efectos se demora para después ir progresando gradualmente. Esta observación permite pensar que un derivado metabólico, la estreptidina, resultado de la hidrólisis de la estreptomycinina, y no el antibiótico sea el agente dañino al oído interno.

Para estudiar la existencia de este metabolito se realizaron experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* tomando como modelo experimental ratas jóvenes macho pigmentadas de la cepa Long-Evans. La presencia de estreptomycinina o estreptidina fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución.

Asimismo, para estudiar la hidrólisis del antibiótico en condiciones *in vivo*, se realizó un tratamiento crónico con estreptomycinina o su derivado estreptidina a diferentes periodos de tratamiento (25, 35 y 45 días). El análisis de la conducta en el nado se usó para evaluar el daño vestibular y para observar después de éste, las características del epitelio sensorial y la cuantificación de las células pilosas en cortes del órgano utricular en todos los grupos por microscopia de luz.

Los experimentos *in vitro* de la hidrólisis de la estreptomycinina en la sangre de la rata mostraron una producción de estreptidina a una concentración de 5.6 $\mu\text{g/ml}$ proveniente de estreptomycinina (160 $\mu\text{g/ml}$) después de 24 horas a 37° C.

Por otro lado, después del tratamiento con estreptomycinina (400 mg/kg) por 25, 35 y 45 días, fue identificado en la sangre de las ratas, un metabolito con las mismas propiedades cromatográficas que el estándar de estreptidina. Las concentraciones encontradas del metabolito fueron de 2.26 $\mu\text{g/ml}$ a los 25 días y alrededor de 8.0 $\mu\text{g/ml}$ tanto a los 35 como a los 45 días de tratamiento, mientras que la estreptomycinina se encontraba por debajo de su nivel de detección, durante el tiempo de administración. En ratas tratadas con estreptidina (50 mg/kg), la concentración de este compuesto fue de 1.0, 1.84 y 4.94 $\mu\text{g/ml}$ a los 25, 35 y 45 días de tratamiento, respectivamente. El tratamiento con estreptomycinina o estreptidina dió como resultado datos semejantes en los patrones anormales de nado, así como alteraciones histológicas del epitelio utricular. La pérdida de las células pilosas fue semejante en ambos grupos aún cuando la

estreptidina fue administrada en una dosis del 10% que la dosis de estreptomina.

La aparición gradual de estreptidina como un derivado metabólico del antibiótico en la sangre de las ratas, o después de la administración de este compuesto, produce un deterioro funcional y estructural vestibular igual al observado en los animales tratados con estreptomina, y apoya la idea que la estreptidina está contribuyendo potencialmente a la ototoxicidad después de la administración prolongada del antibiótico.

ABSTRACT

In our days, streptomycin is still been used in the treatment of patients suffering from tuberculosis or other infectious diseases in developing countries. However, it has a potential risk to produce damage in the maintenance of equilibrium and posture, and other effects involved in the specific damage of the hair cells in the sensory vestibular epithelium, whose onset is delayed and gradual. This observation led to the notion that a metabolic derivative, streptidine, result of the hydrolysis of streptomycin, and not the antibiotic itself is the damaging agent for the inner ear.

To further study the existence of this metabolite, *in vitro* and *in vivo* experiments were performed using as experimental model pigmented young male rats (Long-Evans). The presence of streptomycin or streptidine was assessed by high performance liquid chromatography.

Likewise, to study the hydrolysis of the antibiotic on *in vivo* conditions, chronic treatment with streptomycin or its putative derivative, streptidine, was carried out to different periods of treatment (25, 35 and 45 days). Analysis of swimming behavior was used to evaluate vestibular damage and observations of the features of the sensory epithelium and quantification of hair cells were attained in sections of the utricular organ of all groups by light microscopy.

In vitro experiments of the hydrolysis of the streptomycin in the rat blood showed streptidine release in a concentration of 5.6 $\mu\text{g/ml}$ from streptomycin (160 $\mu\text{g/ml}$) after 24 hours at 37° C.

On the other hand, after treatment with streptomycin (400 mg/kg) at 25, 35 and 45 days, a metabolite with the same chromatographic properties as the streptidine standard run in parallel was identified in the blood of rats. Concentrations of the metabolite were 2.26 $\mu\text{g/ml}$ on the 25th day and around 8.0 $\mu\text{g/ml}$ in both the 35th and 45th day of treatment, while streptomycin was below its detection level at either period. In streptidine-treated rats (50 mg/kg), the concentration of this compound was 1.0, 1.84 and 4.94 $\mu\text{g/ml}$ on the 25th, 35th and 45th treatment days, respectively. Treatment with either streptomycin or streptidine resulted in similar abnormal swimming patterns and histological alterations of the utricular epithelium. Loss of hair cells was roughly equivalent even though streptidine was administered in a dose of 10% that the streptomycin doses.

The gradual appearance of streptidine as a metabolic derivative of the antibiotic in the blood of rats or the administration of this compound alone, causing similar functional and structural vestibular deterioration seen in streptomycin-treated animals, supports the notion that streptidine is a

II. INTRODUCCIÓN

Historia de los aminoglicósidos

La estreptomina (STP) es un antibiótico del tipo aminoglicósido, que fue aislado de *Streptomyces griseus* por Waksman y colaboradores en 1944 (Schatz et al., 1944). Waksman recibió el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1952 por el descubrimiento de la STP, primer antibiótico introducido en la terapéutica, con la ventaja de su gran eficacia frente a gran número de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, y principalmente por ser el primer fármaco con eficacia clínica contra el *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, el surgimiento de bacilos Gram-negativos y cocos Gram-positivos (enterococos) resistentes a la STP, limitó su uso clínico siendo solamente utilizado como un agente de segunda o tercera línea contra la tuberculosis.

Desde un principio se observó que la STP afectaba las funciones del oído. Dos años más tarde en 1946 con el objetivo de eliminar los efectos vestibulotóxicos, se desarrolló el primer derivado semi-sintético, la dihidroestreptomina (DihidroSTP), por hidrogenación de la molécula de STP (Sande and Mandell, 1996). Sin embargo, la elevada vestibulotoxicidad de la STP y cocleotoxicidad de la DihidroSTP aunada a la aparición de bacterias resistentes al tratamiento con estos antibióticos, estimuló la búsqueda de nuevos aminoglicósidos de origen natural.

En 1949, Waksman y Lechevalier aislaron de *Streptomyces fradiae* a la neomicina, que tiene dos formas: A y B. En la actualidad, se usa solamente la neomicina B en forma tópica u oral por su efecto local sobre la flora intestinal pero si se administra parenteralmente es nefrotóxica y ototóxica (Sande and Mandell, 1996).

Umezawa y colaboradores en 1957 aislaron a la kanamicina de *Streptomyces kanamyceticus*, la que tenía efectos contra gran variedad de bacilos Gram-negativos. Sin embargo, por su gran toxicidad coclear, este antibiótico ha sido eliminado de los tratamientos clínicos y reemplazado por nuevos aminoglicósidos (Sande and Mandell, 1996).

Posteriormente, se desarrollaron la gentamicina y la netilmicina, antibióticos de amplio espectro, derivados de la especie del actinomiceto *Micromonospora* y no de la bacteria *Streptomyces sp.* La gentamicina se estudió y describió por el grupo de Weinstein en 1963, pero no fue aislada, purificada y caracterizada sino hasta 1964 por Rosselot y colaboradores. Este antibiótico es utilizado con gran frecuencia en la actualidad a pesar de su gran toxicidad renal y ototóxica. La tobramicina y la amikacina fueron introducidas a la clínica hasta principios de los años setentas. La tobramicina tiene una actividad antimicrobiana y toxicidad similar a la gentamicina, mientras que la amikacina y la netilmicina son productos semisintéticos derivados de la kanamicina y de la sisomicina, respectivamente (Sande and Mandell, 1996), cuya acción tóxica es tanto renal como óptica, afectando tanto al vestíbulo como a la cóclea (Begg and Barclay, 1995).

Clasificación química y origen de los aminoglicósidos

Todos los aminoglicósidos están compuestos de 2 o más amino azúcares unidos entre sí por enlaces glucosídicos a un núcleo tipo hexosa o aminociclitol. Existen dos tipos de aminociclitoles: la estreptidina (STD) presente solamente en la estreptomina (STP) y la 2-deoxiestreptamina, característica del resto de los aminoglicósidos (Figura 1).

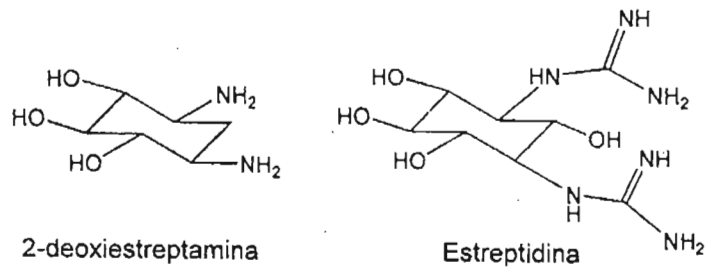


Figura 1. Aminociclitolos componentes de los aminoglicósidos.

Asimismo, a diferencia del común de los aminoglicósidos (gentamicina, kanamicina y neomicina), la STD no se encuentra en la parte central de la molécula, sino que éste aminociclitol encabeza a la molécula, seguido por la estreptosa y la N-metilglucosamina (Figura 2) (Sande and Mandell., 1996).

En general los aminoglicósidos pueden ser divididos en 4 familias (Figura 2): familia de la STP (STP y DihidroSTP); familia de la Kanamicina (kanamicina, amikacina y trombamicina); familia de la Gentamicina (gentamicina y netilmicina) y la Neomicina. La mayoría de ellos son biosintetizados por especies de bacterias del género *Streptomyces* con excepción de la familia de las gentamicinas producidas por *Micromonospora* (bacteria familia cercana de *Streptomyces*) (Sande and Mandell., 1996).

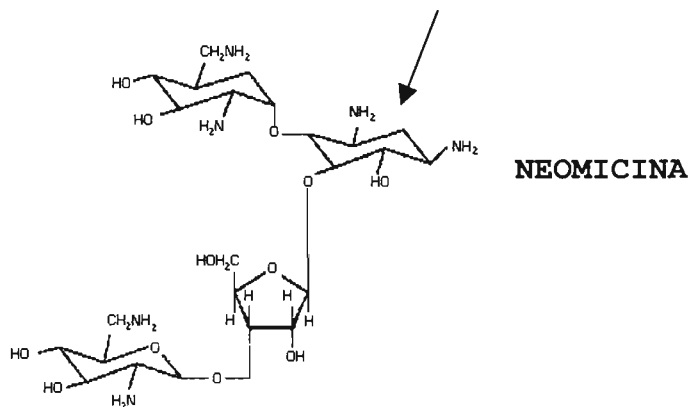
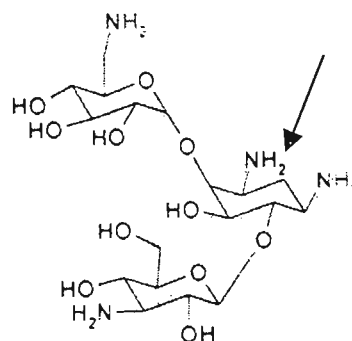
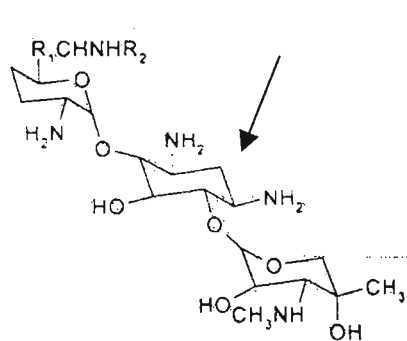
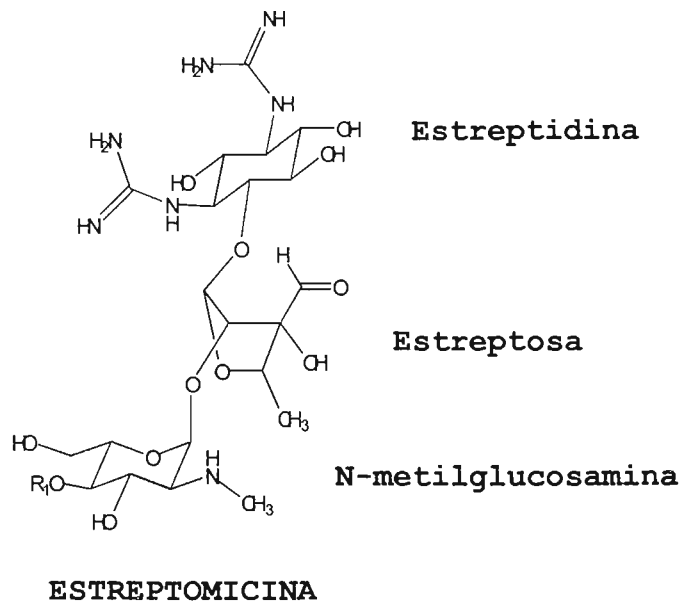


Figura 2. Estructuras básicas de las principales familias de los aminoglicósidos. Las flechas señalan al aminociclitol, 2-deoxiestreptamina.

Mecanismo de acción bactericida

El mecanismo de acción antimicrobiano de los aminoglicósidos es a través de su capacidad de inhibir la síntesis de proteínas y decrecer la fidelidad de la traducción del RNAm al ribosoma (Shannon and Phillips, 1982).

Estos antibióticos llegan al espacio periplasmático de las bacterias Gram-negativas por difusión a través de poros formados por porinas presentes en la membrana externa (Nakae and Nakae, 1982). Desde el espacio periplásmico los aminoglicósidos acceden al interior de la bacteria, mediante un proceso de captación que cursa dos fases, EDP1 y EDP2 (EDP, energy-dependent phase) ambas dependientes de energía (Barrigon y Montañes, 1993).

La fase EDP1, precede a la inhibición de la síntesis proteica y pérdida de la viabilidad de las bacterias. Esta fase depende del transporte de electrones debido al requerimiento de un potencial de membrana (negativo en el interior) a permear el paso del antibiótico (Mates et al., 1983) y precisa del curso activo de componentes de la cadena transportadora de electrones, por lo que se puede bloquear con inhibidores del transporte electrónico (cianuro) e inhibidores de la fosforilación oxidativa (dinitrofenol). Es un proceso limitante que se ve inhibido en presencia de altas concentraciones de cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} o en situaciones en que se disipa el potencial de membrana tales como en medio ácido o en anaerobiosis (Bryan and Kwan, 1981). Cuantitativamente no existe una gran captación neta de antibiótico en esta fase. Los antibióticos que alteran la permeabilidad de la membrana, como los β -lactámicos, potencian (probablemente durante esta fase) el efecto antimicrobiano de los aminoglicósidos facilitando la penetración de éstos a través de la membrana bacteriana (Barrigon y Montañes, 1993).

Por el contrario, en la fase EDP2 existe una importante captación del antibiótico, progresivamente creciente, también dependiente de la energía proveniente del transporte de electrones y de la hidrólisis del ATP. Esta fase está ligada a la ruptura de la estructura de la membrana citoplasmática (Bryan, 1989). Para que esta fase tenga lugar se precisa que exista síntesis proteica, por lo que es inhibida por la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas como el cloranfenicol, requiriéndose que los aminoglicósidos estén unidos a ribosomas funcionales (Barrigon y Montañes, 1993).

El blanco primario de acción intracelular de los aminoglicósidos es la subunidad ribosomal 30S, donde la STP se une al menos a 3 de las 21 proteínas ribosomales que la constituyen y muy probablemente al RNAr 16S, lo cual contribuye a la unión del antibiótico a dicha subunidad (Cundliffe, 1989); mientras que los otros aminoglicósidos se unen a varios sitios tanto en la subunidad 30S como en la 50S (Davies, 1988).

Por todo lo anterior, los aminoglicósidos rompen con el ciclo normal de la función del ribosoma al menos en parte con la iniciación de la síntesis de proteínas provocando una acumulación de complejos de iniciación anormales (Luzzatto et al., 1969) así como la inducción de lecturas erróneas (misreading) del RNAm con la incorporación incorrecta de aminoácidos al crecimiento de la cadena polipeptídica (Tai et al., 1978).

Farmacocinética

a) Absorción

Debido a que los aminoglicósidos son compuestos catiónicos altamente polares, su absorción en el tracto gastrointestinal es muy baja (menos del 1% de la dosis administrada oralmente o rectalmente). Sin embargo, todos los aminoglicósidos son

absorbidos rápidamente después de una administración intramuscular, pudiéndose encontrar al antibiótico en la sangre entre 30-90 minutos después de su administración en los pacientes tratados con este tipo de antibióticos (Barrigon y Montañes, 1993; Sande and Mandell, 1996).

b) Distribución

La naturaleza polar de estos antibióticos impide su entrada a una gran variedad de células entre las que se encuentran las del sistema nervioso. El porcentaje de unión a proteínas plasmáticas es bajo (<10%) salvo para la STP que es del 30%, por lo que el volumen de distribución (Vd) se aproxima al del líquido extracelular (0.24-0.28 l/kg) (Barza et al., 1975). Asimismo, como se esperaría, las concentraciones de aminoglicósidos en secreciones y tejidos son bajas, encontrándose únicamente altas concentraciones del antibiótico en la corteza renal, y en la endolinfa y perilinfa del oído interno, donde pueden llegar a alcanzar hasta 20 veces las concentraciones plasmáticas. La cinética de eliminación desde estas estructuras es mucho más lenta que la eliminación del plasma, por lo que tienden a concentrarse (a esto se ha atribuido su efecto tóxico renal y en el oído interno; Davies et al., 1984). La concentración del aminoglicósido presente en la bilis y en el fluido cerebroespinal es muy limitada, siendo del 10% y 30% de las concentraciones plasmáticas, respectivamente (Strausbaugh et al., 1977; Sande and Mandell, 1996).

c) Eliminación

Este tipo de antibióticos es eliminado íntegramente en la orina por filtración glomerular. Este proceso de eliminación condiciona que la vida media de estos antibióticos en el plasma sea muy similar y muy breve entre 2-3 horas en pacientes con

función renal normal. En pacientes anefróticos, la vida media puede incrementarse de 3 a 5 días (Barrigon y Montañas, 1993; Sande and Mandell, 1996).

Los aminoglicósidos alcanzan el oído a través de la sangre. Como podemos observar en la Tabla 1, todos los aminoglicósidos se concentran en la perilinfa alrededor de las 4 horas de ser administrados intramuscularmente.

Tabla 1. Farmacocinética de los aminoglicósidos en la perilinfa de animales.

<i>Estudio</i>	<i>Animal</i>	<i>Ensayo</i>	<i>AM*</i>	<i>Dosis (mg/kg)</i>	<i>Ruta</i>	<i>Tiempo de muestreo (horas)</i>	<i>Concentración en perilinfa (µg/ml)</i>	<i>Tiempo promedio de la más alta Conc. en la perilinfa (horas)</i>
Vrabec et al., 1965	Gato	Bio	STP	30	IM	5	6	5
						11	4.5	
Voldrich, 1965	Cuy	Bio	STP	200	IM	4	13	4
						24	0	
			KA	150	IM	4	10	4
						8	4.5	
			NEO	150	IM	24	1.5	4
						3-6	7-8	
24	2.5							
Stupp, 1970	Cuy	Bio	STP	250	IM	1	18	5
						5	20	
						18	13	
Tran Ba Huy P et al., 1981	Rata	RIA	GE	4	IM	0.5	0.099	3
						1.0	0.103	
						1.5	0.133	
						2.0	0.121	
						3.0	0.143	
						4.0	0.099	
						5.0	0.056	
						6.0	0.063	
						7.0	0.056	
						8.0	0.042	
9.0	0.033							

AM* = Aminoglicósido. STP = estreptomina; GE = gentamicina; KA = kanamicina; NEO = neomicina; IM = intramuscular; Bio = ensayo biológico; RIA = radioinmunoensayo.

En estudios a corto plazo en cuyos, a los que se administró STP intraperitonealmente, se observó que todas las estructuras del oído interno, tanto en la cóclea como en las crestas vestibulares, una marcada acumulación de fluorescencia después de 1 hora de la inyección del antibiótico, sugiriendo que la STP ha llegado al oído vía los vasos sanguíneos y alcanzado todas las estructuras en el oído (Bareggi et al., 1986). Asimismo, se ha calculado que la vida media de la STP en la perilinfa en el oído interno es de 4 horas y su concentración decrece hasta ser completamente eliminada después de 24 horas (Voldrich, 1965; Tran Ba Huy P et al., 1981).

Debido a que la incidencia de nefrotoxicidad y ototoxicidad de los aminoglicósidos está íntimamente ligada a su acumulación, es crítico contar con métodos de determinación precisos y rápidos para hacer un seguimiento de niveles adecuados del antibiótico en la sangre de los pacientes tratados con aminoglicósidos. Además, como la STP, objeto de esta tesis, es exclusivamente vestibulotóxica, es conveniente revisar las estructuras del oído para entender correctamente el blanco celular de acción de este antibiótico y sus posibles derivados.

III. BREVE DESCRIPCION DEL OIDO EN MAMIFEROS

El oído está dividido en tres regiones (Figura 3): el oído externo conformado por la oreja y el canal auditivo; el oído medio formado por la membrana timpánica (tímpano) y tres huesecillos (el martillo, el yunque y el estribo) responsables de transmitir los estímulos auditivos externos recibidos por el tímpano a las estructuras del oído interno en los vertebrados confinado en el hueso temporal situado a ambos lados de la cabeza en el llamado *laberinto óseo*. Dentro de este laberinto óseo se encuentra protegido el *laberinto membranoso*. El oído interno está conformado por dos sistemas: el vestibular y el auditivo (Cóclea).

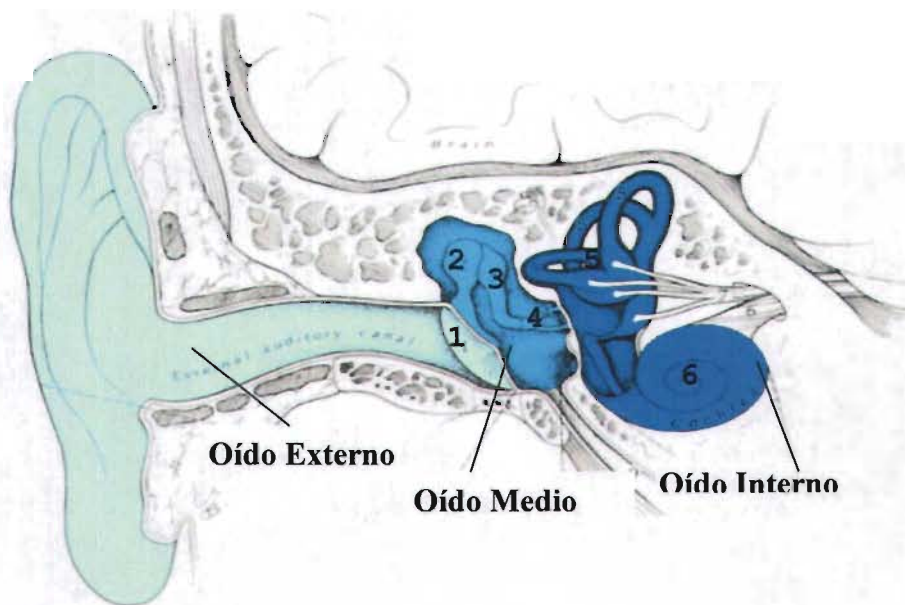


Figura 3. Las regiones del oído. (1) tímpano, (2) martillo, (3) yunque, (4) estribo, (5) laberinto vestibular y (6) Cóclea.

LABERINTO VESTIBULAR

El sistema vestibular es la parte del oído interno involucrado en el mantenimiento del equilibrio, la postura y la

fijación visual. El vestíbulo se compone de 5 órganos: tres canales semicirculares (anterior, posterior y lateral) y los órganos otolíticos (el utrículo y el sáculo; Figura 4).

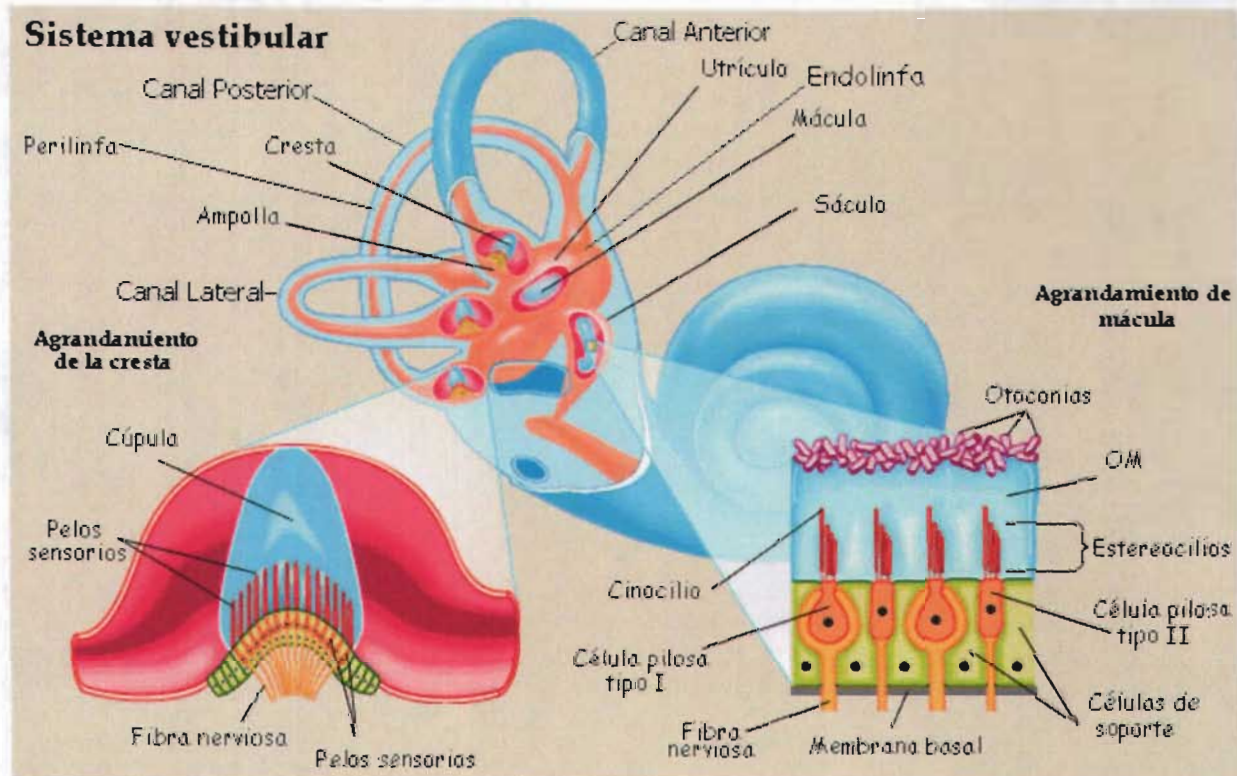


Figura 4. Sistema vestibular. OM, membrana otolítica.

Los canales anterior y posterior recorren planos esencialmente verticales cuando una persona mantiene su cabeza erguida y forman un ángulo recto uno del otro. El canal lateral está más o menos horizontal y forma un plano de ángulo recto con respecto a los otros dos canales (Figura 4). Como consecuencia de este arreglo tridimensional, los canales vestibulares detectan la aceleración angular de la cabeza en cualquiera de estas tres dimensiones (Figura 5A). Los canales emergen del utrículo, presentando una ampliación al final de cada canal llamada ampolla, la cual contiene la porción mecanosensitiva llamada

cresta ampular, en la cual se encuentra el epitelio sensorial que se describirá más adelante (Figura 4).

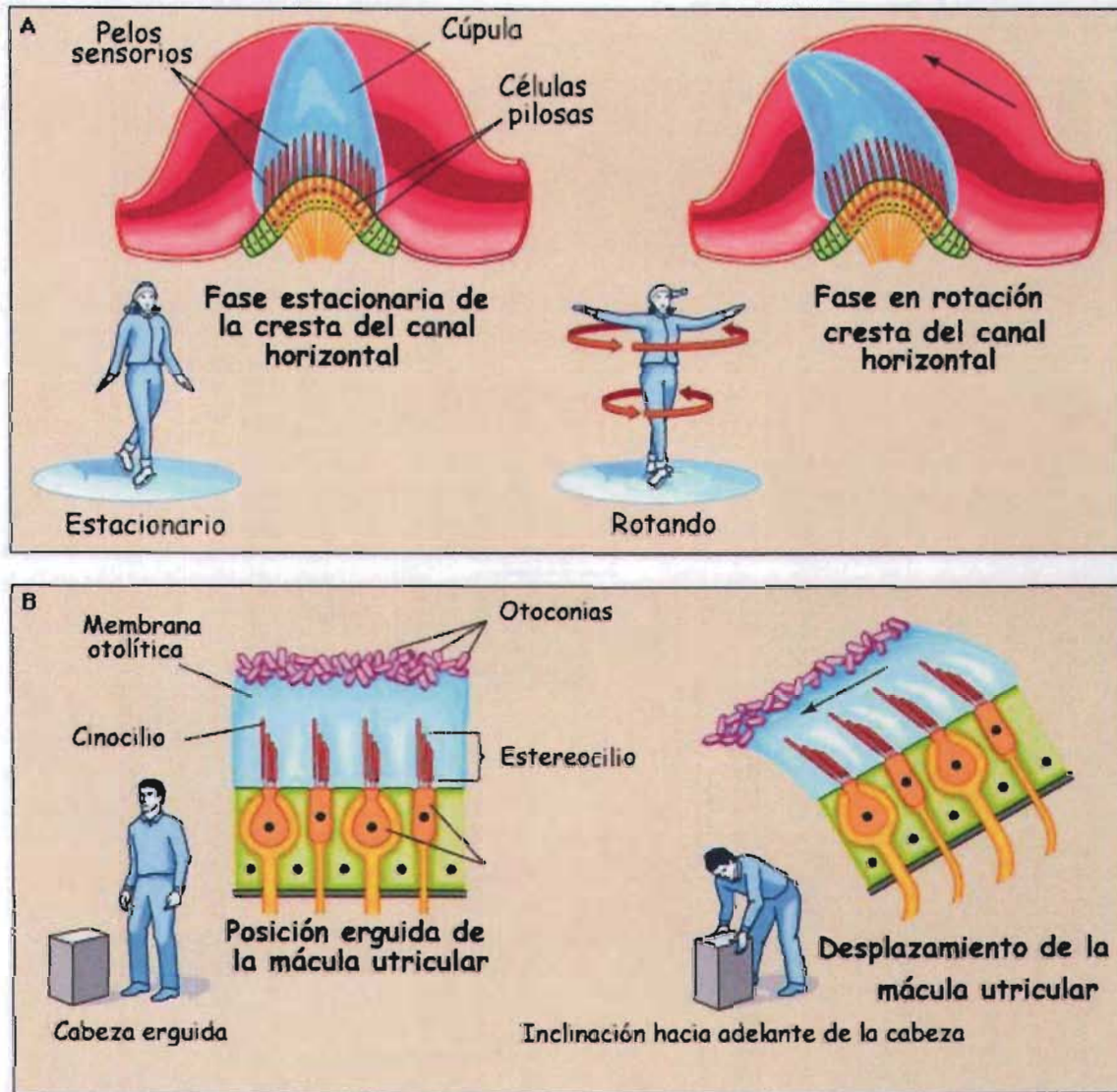


Figura 5. Movimiento de los pelos sensorios en (A) los canales semicirculares, para el monitoreo de los movimientos lineales y en (B) los órganos otolíticos, para el monitoreo de la fuerza de gravedad.

El utrículo y el sáculo son conocidos como órganos otolíticos. Responden a las fuerzas gravitatorias por lo que también se les conoce como receptores de gravedad. Como en el caso de la ampolla en los canales semicirculares, una porción del

piso del utrículo y el sáculo, denominada mácula, también contiene a las células sensoriales y mide unos 2 mm (Figura 4). En los órganos otolíticos, los pelos sensorios se encuentran acoplados a una membrana muy delicada llamada membrana otolítica, la cual es una estructura gelatinosa en cuya superficie se ubican las otoconias, que son cristales de carbonato de calcio (Figura 4). La mácula del sáculo está orientada verticalmente cuando la cabeza se encuentra en su posición normal y puede detectar la posición de la cabeza en el espacio, pero responde selectivamente a las fuerzas lineales verticales. En contraste, cuando la cabeza se mantiene posición horizontal, la mácula del utrículo se encuentra en un plano más o menos horizontal y los otolitos se encuentran sobre ella, pero si la cabeza se inclina los otolitos deforman la masa gelatinosa, lo cual provoca una flexión de los pelos sensorios en las células pilosas (Figura 5B).

Tanto en las crestas, como en los órganos otolíticos, el epitelio sensorial se conforma por: las células pilosas (células sensoriales), las células de soporte y las terminaciones sinápticas nerviosas, aferentes y eferentes que hacen contacto con las células pilosas (Figura 4).

Las células pilosas reciben su nombre por la presencia en su parte apical de un penacho de prolongaciones citoplasmáticas o estereocilios (pelos sensorios). A diferencia de las células pilosas auditivas, las células pilosas vestibulares están flanqueadas por un cilio verdadero o cinocilio (Figura 4).

Las células pilosas sensoriales en el vestíbulo están clasificadas de acuerdo a su morfología. Las células pilosas tipo I son exclusivas de los vertebrados superiores y tienen forma de botella con 60 a 70 pelos sensorios en su parte apical; las terminaciones aferentes rodean toda la parte basal de la célula en forma de cáliz y las terminaciones eferentes son botones conectados sobre las terminales aferentes (Figura 4). Las células

pilosas tipo II están presentes en todos los vertebrados y tienen una forma cilíndrica y alargada; sus terminaciones aferentes y eferentes tienen forma de botón conectados directamente a la parte basal de cada célula (Figura 4).

Es precisamente en los pelos sensorios donde se lleva a cabo el fenómeno de la *transducción*, proceso por el cual una flexión de los pelos a favor del cinocilio en las ampollas (Figura 5A) o por el retraso de movimiento de los estereocilios debido a las otoconias en el sáculo y en el utrículo (Figura 5B), se convierte en una corriente iónica por la entrada K^+ a través de canales mecanosensitivos ubicados en la parte apical de los estereocilios (Huspeh, 1983; 1985).

ENDOLINEA Y PERILINFA

El laberinto membranoso vestibulo-auditivo sigue la forma del laberinto óseo, prácticamente esculpido en la porción esponjosa del hueso temporal. El laberinto membranoso está lleno de un fluido extracelular llamado endolinfa (Figura 4), único por su composición en el cuerpo, puesto que las concentraciones de K^+ son muy altas (150 mM), mientras que las concentraciones de iones sodio y calcio son bajas (15 mM y 20 μ M, respectivamente) (Ferrary et al., 1988; Sterkers et al., 1988b), la cual es formada en el saco endolinfático que al parecer tiene funciones absortivas y fagocíticas (Friberg et al., 1985).

La secreción de la endolinfa es un proceso parcialmente entendido. Se ha demostrado que algunas células especializadas pueden secretar a la endolinfa, como es el caso de la estria vascularis en la cóclea y las células oscuras en el vestíbulo (Sterkers et al., 1988a). Debido a que el laberinto membranoso es un sistema cerrado, el flujo y remoción de los componentes de la

endolinfa son importantes para mantener la homeostasis del sistema (Sterkers et al., 1988a).

En el utrículo y en las ampollas de los canales semicirculares, pero no el sáculo, se presentan células epiteliales especializadas denominadas células oscuras que se concentran en pequeñas áreas alrededor de las células pilosas (Kimura, 1969), en las cuales se sugiere que se lleva a cabo la producción de la endolinfa vestibular y probablemente también están involucradas en el mantenimiento de la composición iónica de la endolinfa por el intercambio de calcio (Preston et al., 1975). En estas células secretoras, el proceso involucrado en la secreción rica en K^+ es a través de una ATPasa- Na^+,K^+ y un co-transportador Na-K-Cl presentes en la porción basolateral de las células, las cuales pueden ser inhibidas por ouabaina (acocantherina), cuya estequiometría es desconocida, así como por los diuréticos bumetamida y furosamida (Sterkers et al., 1988a).

Por otro lado, hay una elevada actividad de adenilato ciclasa en estas células secretoras, sugiriendo que la producción de la endolinfa quizá esté regulada hormonalmente (Schacht J, 1982). Además, en los canales semicirculares se producen las prostaglandinas E2 e I2, principalmente en la parte que contienen a las células oscuras, lo cual hace pensar que estas prostaglandinas jueguen un papel en la formación de la endolinfa (Ferrary et al., 1987).

En el exterior, la perilinfa baña tanto la porción vestibular del laberinto membranoso como el exterior del ducto coclear (Figura 4). Su constitución es similar, pero no idéntica, a otros fluidos extracelulares del cuerpo, como el fluido cerebroespinal. Se caracteriza por tener altas concentraciones de Na^+ (150 mM) y bajas concentraciones de K^+ (5 mM), así como 1 mM de Ca^{2+} (Ferrary et al., 1988; Sterkers et al., 1988b). Aparentemente, la perilinf se forma localmente del plasma

sanguíneo por mecanismos de transporte a través de las paredes de los capilares (Sterkers et al., 1988b).

IV. ANTECEDENTES

La vestibulotoxicidad de la estreptomycinina.

a) Estudios en humanos

Después de su descubrimiento, la STP rápidamente fue utilizada para curar la tuberculosis en todo el mundo en un gran número de pacientes. Las dosis usadas fueron altas y el tratamiento prolongado. Algunos pacientes comenzaron a presentar mareo cuando se levantaban de la cama después del tratamiento con el antibiótico.

Los primeros reportes publicados sobre la disfunción vestibular después de la administración de STP fueron en pacientes cuyos síntomas eran referibles a la afección del nervio octavo craneal (vestíbulo-auditivo) (Hinshaw and Feldman, 1945; Brown and Hinshaw, 1946). Tiempo más tarde se reportaron las observaciones de 16 pacientes cuya disfunción vestibular había ocurrido después de los 21 días de tratamiento con 3 g de STP administrada diariamente (Farrington et al., 1947).

En estudios posteriores con la administración tanto de 2 g/día como de 1 g/día durante un mes, se observó que al menos el 90% de los pacientes con la dosis mayor desarrollaban síntomas vestibulares, mientras que solamente el 30% de los pacientes con la dosis menor la desarrollaban (Feldman and Hinshaw, 1948). Asimismo, Wallner (1949) siguiendo a dos grupos de pacientes tratados con STP por 4 meses, observó que de los 53 pacientes que conformaban el grupo I, cuya dosis de STP fue de 1.8-2 g/día, 42 pacientes (79%) habían tenido complicaciones de disfunción vestibular, mientras que en el grupo II conformado por 40 pacientes que recibieron 1 g de STP, solamente el 45% (18 pacientes) la desarrollaban. Asimismo, otros autores describieron

que con dosis menores de STP (0.5 a 1 g/día), los efectos tóxicos vestibulares eran menos severos o en algunos pacientes nunca se presentaban (Moffitt and Norman, 1948; Fowler and Feind, 1949).

Por otro lado, estudios detallados del daño del sistema vestibular y auditivo en 32 pacientes tratados con 1.8-2 g diarios de STP, mostraron que todos los pacientes habían desarrollado síntomas vestibulares después de 25 días de tratamiento, mientras que la audiometría fue normal, aún después de 2 meses de tratamiento, con excepción de un paciente (Glorig and Fowler, 1947). En cambio, Fowler (1948) administrando 2 g/día de STP, observó pérdida auditiva en sólo 3 pacientes de 130, pero se notaron perturbaciones vestibulares. Finalmente, en otro estudio se reportó pérdida auditiva asociada al tratamiento con STP solamente cuando ésta era administrada en dosis elevadas (>100 g acumulativo) o cuando los pacientes presentaban disfunción renal (Berg, 1951; Grujic et al., 1969). Estas observaciones confirman que la STP es esencialmente vestibulotóxica, mientras que sólo produce efectos auditivos a dosis elevadas o con un antecedente de disfunción renal.

Modo de acción de la STP

El primer síntoma que describían muchos pacientes tratados con STP estaba relacionado con la visión más que con el equilibrio y referían una "visión borrosa al leer" (Glorig and Fowler, 1947), "confusión visual de objetos a distancia" (Northinton, 1950) o bien "visión nebulosa" (Bignall et al., 1951). Sin embargo, esta sensación se debe al movimiento ocular por un cambio en el enfoque de un objeto a distancia a uno cercano y especialmente por el movimiento rápido y repentino de la cabeza.

Por otro lado, todos los autores describían la experiencia inusual de vértigo espontáneo en los pacientes tratados con STP. Frecuentemente este síntoma se presentaba cuando el paciente movía su cabeza o cuando se volteaba en la cama, teniendo la sensación de que el movimiento continuaba aún cuando este había cesado. Este síntoma variaba de paciente a paciente (de Kleyn and van Deinse, 1950; Northinton, 1950).

Asimismo, el vértigo se caracterizaba por una señal positiva de Romberg (vacilación del cuerpo estando el paciente con los pies juntos y los ojos cerrados, signo de ataxia locomotriz) en los pacientes intoxicados con STP (Blohmke, 1950). También los pacientes tendían a detenerse de la pared al caminar. Otros autores reportaban esta dificultad al caminar solamente en la oscuridad, en pisos irregulares o en un colchón (Glorig and Fowler, 1947). Sin embargo, el síntoma más severo fue la pérdida de la coordinación del movimiento; en algunos casos se establecía una franca ataxia, lo cual era más evidente cuando los pacientes bajaban las escaleras (Graf, 1949; Blohmke, 1950).

Debido a esta variedad en la sintomatología, la acción tóxica de la STP primeramente se atribuyó a una acción neurotóxica selectiva en el octavo nervio craneal (Hinshaw and Feldman, 1945). Las subsecuentes investigaciones clínicas inclinaron la hipótesis hacia un sitio de acción más bien de la vía central vestibular que de los órganos periféricos (Fowler and Seligman, 1947; Lindsay, 1947; Dix et al; 1949; Graf, 1951), mientras que otros favorecían la acción en un sitio periférico (Glorig and Fowler, 1947; Moffitt and Norman, 1948; Jatho, 1950; Bignall et al., 1951).

Uno de los primeros reportes histopatológicos en humanos describió una necrosis en el núcleo coclear ventral en 5 pacientes con meningitis tuberculosa, quienes habían muerto después de haber comenzado a presentar sordera mientras recibían

tratamiento con STP (Stevenson et al., 1947). La corroboración clínica más importante fue realizada mediante el exámen histopatológico del hueso temporal de 24 pacientes con meningitis tuberculosa, los cuales habían fallecido después del tratamiento con STP tanto intramuscularmente como intratecalmente, perdiendo la respuesta calórica (Graf, 1951). Seis de ellos habían comenzado a presentar sordera bilateral con pérdida de células pilosas en el órgano de Corti. Además, en tres casos se había observado una desmielinización del nervio octavo, atribuida a la inflamación meningítica, la cual fue observada en el meato interno en todos los pacientes. Ninguna señal de laberintitis fue encontrada, por lo que no había duda de que los cambios histológicos eran en buena medida causados por las deficiencias funcionales previamente observadas, o bien que estaban directamente relacionadas a la acción tóxica de la STP. Asimismo no mostraban ni degeneración de las fibras nerviosas del octavo nervio ni pérdida de células ganglionares, teniendo así una evidencia muy poderosa de la acción tóxica de la STP en un sitio periférico. Sin embargo, por obvias razones, la dilucidación del blanco de acción celular de la toxicidad de la STP se llevó a cabo en estudios realizados en animales.

b) Estudios en animales

La STP salió a la clínica debido a que las pruebas de rutina de toxicidad aguda y crónica en ratones y ratas no habían dado indicio de los efectos sobre el vestíbulo y la cóclea (Schatz et al., 1944). Los primeros indicios de posibles perturbaciones en el laberinto o a nivel neuronal producidas por la STP fueron observados cuando se llevaron a cabo experimentos en perros (Molitor et al., 1946), ya que estos animales presentaban un caminado tembloroso cuando recibían inyecciones diarias del

antibiótico; también se observó necrosis en 3 perros similar a la observada en humanos por el grupo de Stevenson (1947). Aparentemente los huesos temporales no fueron examinados en estos animales.

Los efectos más dramáticos en el equilibrio fueron observados en conejos y especialmente en gatos, los cuales presentaban una deficiencia total de los reflejos del laberinto y una posible degeneración neuronal (Hawkins, 1947). Los nistagmogramas mostraban una pérdida eventual tanto del nistagmo pre-rotatorio como post-rotatorio en estos animales. Además, los gatos parecían también estar sordos. Más tarde, las mediciones electroacústicas revelarían una variedad en el grado de la pérdida de los potenciales cocleares en estos animales, lo que mostraba que la STP inducía defectos auditivos con el involucramiento directo de la cóclea en los gatos (Hawkins, 1950). Por otro lado, la persistencia de un nistagmo rápido en respuesta a la estimulación galvánica sugería que el defecto vestibular era periférico (Vanderhaeghe, 1949; Hawkins, 1950).

Rüedi y colaboradores (1949) reportaron cambios en el núcleo coclear y en el núcleo triangularis de cuyos tratados con STP, que al parecer confirmaba las observaciones hechas por Stevenson et al. (1947) en humanos. Sin embargo, las observaciones del daño en el núcleo vestibular y en el cerebelo causado por STP en gatos (Winston et al., 1948, 1949) y en cuyos (Floberg et al., 1949, Christensen et al., 1950 y 1951) ponían en controversia la hipótesis del daño exclusivamente vestibular.

Un descubrimiento notable de la patología en los órganos vestibulares atribuible a la STP fue realizado por Caussé y colaboradores (1948). Este grupo observó trabajando con ratones tratados con el antibiótico efecto severo vestibular que incapacitaban el nado de los ratones. Posteriormente, se encontraron cambios degenerativos en el epitelio sensorial en la

cresta y en la mácula, principalmente en las células pilosas aunque también en las células de soporte (Caussé et al., 1949). Observaciones similares realizadas en gatos (Berg, 1949; Hawkins and Lurie, 1952) y en cujos (Rüedi et al., 1951) confirmaron estos hallazgos.

La prueba irrefutable de la acción primaria de la STP en la periferia fue realizada en gatos (McGee and Olszewski, 1962). Este grupo de investigadores siguió tanto el nistagmo post-rotatorio como pruebas auditivas mientras los animales eran tratados con STP, así como el examen histológico tanto del oído interno como del cerebro *post mortem*. Se encontraron lesiones características solamente en los órganos del oído, sin observar cambio alguno en el cerebro atribuible directamente a la acción tóxica del antibiótico. Por lo que, su acción puede ser correctamente caracterizada como ototóxica más que neurotóxica.

Ventajas y desventajas de algunos modelos en animales

El gato ha sido el animal experimental favorito para los estudios de ototoxicidad debido a su alto desarrollo de los mecanismos de equilibrio, los cuales se afectan rápidamente al tratarse con STP (de 10-12 días con 200 mg/kg y de 20-22 días con 100 mg/kg), perdiendo su habilidad de saltar del piso a un nivel superior y eventualmente su habilidad para caer correctamente. Las oscilaciones de la cabeza son evidentes y la ataxia se incrementa (Berg, 1951). Sin embargo, en estos animales no sólo el nistagmo vestibular se pierde sino también el componente optocinético de la respuesta a la rotación con los ojos abiertos, debido a que en esta especie el nistagmo optocinético depende de un sistema vestibular intacto (Hawkins, 1959b). Las evidencias clínicas sugieren que en el humano este mecanismo optocinético es independiente (Dix et al., 1949; Keser, 1950).

La paloma ha sido otro animal favorito para las pruebas ototóxicas debido que pierde su habilidad para volar como señal irrefutable de una disfunción vestibular (Gross et al, 1966).

En el cuyo, la ataxia es menos aparente y el nistagmo normal es más difícil de observar y medir. El efecto vestibular usualmente se reconoce por la tendencia del animal a presentar temblores de la cabeza cuando su nariz la levanta y al caminar hacia atrás.

Por último, la rata es un animal que presenta varias ventajas: este mamífero pierde su habilidad de nadar correctamente cuando existe alguna disfunción vestibular (Meza et al., 1994) al igual que en los ratones tratados con el antibiótico (Caussé et al., 1948) asimismo, este comportamiento es idéntico al observado en ratones con ausencia genética de otoconias en sus órganos otolíticos (Trune and Lim, 1983 a y b). Por otro lado, la medición del nistagmo post-rotacional, así como los potenciales cocleares provocados para medir el funcionamiento de los canales vestibulares y la audición, respectivamente son fáciles de realizar y observar (Meza et al., 1994).

c) Toxicidad de otros aminoglicósidos

Al contrario que la STP, la cual es esencialmente tóxica sobre los órganos vestibulares, su pariente semi-sintético, la DihidroSTP, mostró tener significativamente menos toxicidad vestibular (Edison et al., 1948), pero su uso clínico indicó una frecuencia evidente de toxicidad coclear (Cohen et al., 1953; Mahady et al., 1953; Wersäll, 1995).

La neomicina y la kanamicina tienen una acción ototóxica potente confinada a la cóclea (Hawkins and Lurie, 1953; Hawkins, 1959 y 1959a; Wersäll, 1995) mientras que la gentamicina tiene un efecto dominante tóxico vestibular aunque también daña a la cóclea

(Hawkins et al., 1969; Igarashi et al., 1971; Fee, 1980; Wersäll, 1995). Por tanto, es evidente que la diferencia química entre los antibióticos puede determinar cual de los sistemas del oído interno se afecta selectivamente.

Por otro lado, con excepción de la STP todos los aminoglicósidos tienden en menor o mayor grado a ser nefrotóxicos en observaciones tanto en animales como en el humano (Kosek et al., 1974; Bennett, 1983; Francke and Neu, 1983). Esta toxicidad aparentemente es resultado de la acumulación y una ávida retención de los aminoglicósidos en las células del túbulo proximal (Aronoff et al., 1983; Lietman and Smith, 1983). Estudios de la cinética de la unión a membranas renales en rata, han mostrado y corroborado las observaciones hechas en la clínica, donde la neomicina tiene una mayor afinidad a unirse a las membranas (Concentración necesaria para inhibir el 50% de 1 mM de [³H]-amikacina, IC₅₀, de 0.1 mM) lo cual explica su alta nefrotoxicidad. En cambio la gentamicina (IC₅₀ = 0.34 mM) es más nefrotóxica que la amikacina (IC₅₀ = 2.07 mM), mientras que la STP, como se observa en la clínica es esencialmente no nefrotóxica con una IC₅₀ = 10.8 mM (Williams et al., 1987), esta baja nefrotoxicidad también ha sido observada en estudios reportados por el grupo de Meza y colaboradores (1999).

d) Efecto de la STP sobre el epitelio sensorial vestibular

Como se mencionó anteriormente la STP tiene una preferencia vestibular para su acción ototóxica. Estudios morfológicos en animales han mostrado que las células pilosas son el blanco primario, especialmente las células tipo I (Wersäll and Hawkins, 1962; Lindemann, 1969; Igarashi and Jensen, 1981).

Sin embargo, la primera evidencia irrefutable de la predilección de la STP para afectar a las células pilosas

vestibulares fue realizado por nuestro grupo (Meza et al., 1989) en el cual se trató a los animales por un periodo de 50 días con STP (300 mg/kg), midiendo las actividades en homogenados vestibulares (crestas y máculas) de la Glutamato descarboxilasa (GAD) enzima responsable de la síntesis de ácido γ -aminobutírico (GABA) a partir de glutamato, como marcador específico de las células pilosas, debido a que se ha determinado por inmunocitoquímica la presencia de GABA en las células pilosa vestibulares (Usami et al., 1987; Meza et al., 1992; López et al., 1992) así como la localización de la síntesis del GABA a través de la detección de la GAD en el desarrollo de la periferia sensorial vestibular en el pollo y el cuy (Iturbe and Meza, 1986; Meza and Hinojosa, 1987), la cual prevalece en la periferia en ranas con degeneración de las terminales eferentes por ablación del nervio octavo (López and Meza, 1988), y de la Colin acetiltransferasa (ChAT), la cual media la síntesis de acetilcolina (ACh), como marcador específico de las terminales eferentes, debido a que la ChAT se ha localizado en los botones eferentes vestibulares en el desarrollo del cuy y el pollo (Iturbe and Meza, 1986; Meza and Hinojosa, 1987) además la actividad de la ChAT va desapareciendo en la periferia de ranas con degeneración de las terminales eferentes (López and Meza, 1988).

Por otro lado, se midieron las funciones vestibulares y auditivas de estos animales a través de la respuesta nistágmica post-rotacional y por potenciales auditivos provocados, respectivamente, y se realizaron observaciones de la morfología del epitelio sensorial de las crestas vestibulares por microscopia de luz y electrónica en animales tratados y no tratados con el antibiótico.

Este estudio mostró que después de 50 días de tratamiento con STP, los animales presentaban un decremento del 83.6% en la actividad de la GAD con respecto a los animales control inyectados con solución salina isotónica por el mismo periodo de tiempo; mientras que la actividad de la ChAT permanecía sin cambio. Asimismo, el nistagmo post-rotacional desaparecía (Figura 6), pero no se afectaron los potenciales auditivos provocados (Figura 7 y Tabla 2).

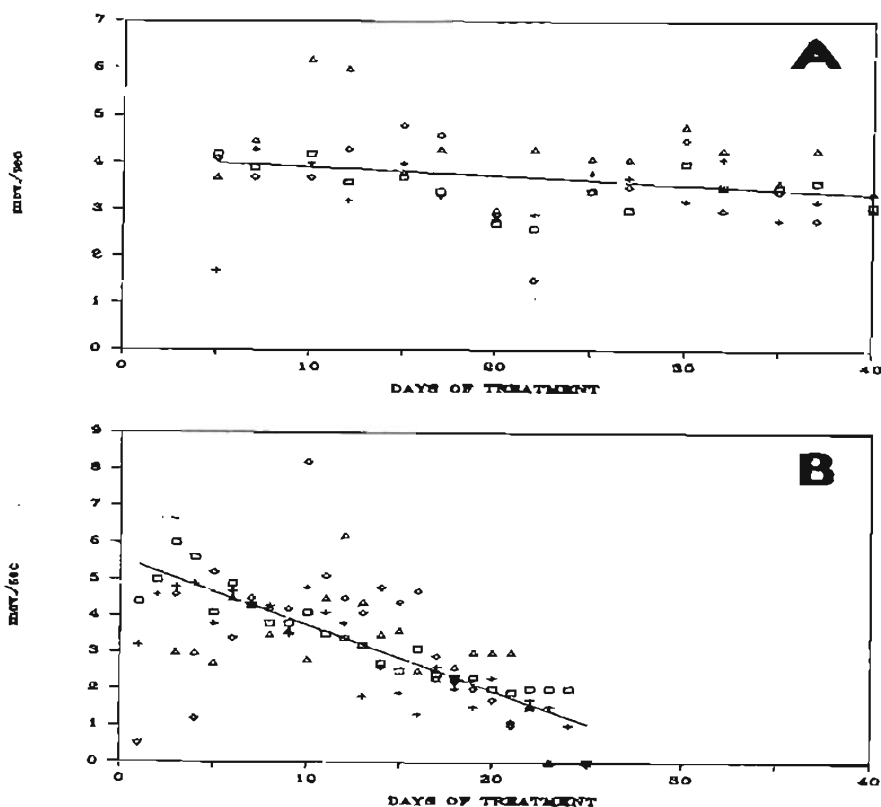


Figura 6. Respuesta del nistagmo post-rotacional de cuyos tratados con solución salina isotónica (A) o con 300 mg/kg con STP (B) por 42 días, medido visualmente después de la estimulación a 45 rpm por 75 seg. Los resultados son los movimientos rápidos coordinados de los ojos por seg a lo largo del tratamiento. Cada símbolo representa el promedio de dos mediciones en intervalos de 15 min c/u. La línea continua representa el análisis de regresión. Tomados de Meza et al., 1989.

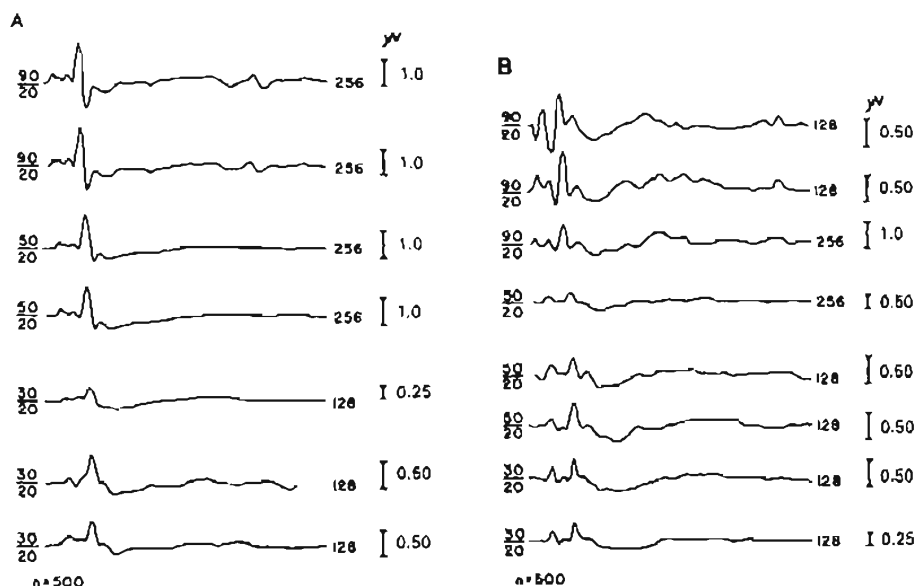


Figura 7. Registro de los potenciales auditivos provocados de: (A) cuyos tratados con solución salina o (B) tratados con STP (300 mg/kg) por 42 días, después de una estimulación de tres niveles de sonido (30, 50 y 90 dB). Las barras indican la calibración de la amplitud. Los registros son el promedio de 500 estímulos (N=500). Tomado de Meza et al., 1989.

Tabla 2. Evaluación de las latencias presentadas de las ondas I a IV de los potenciales auditivos provocados en cuyos tratados con STP (300 mg/kg) o con solución salina durante 42 días.*

Table II. Auditory-evoked brainstem potentials in control pigmented guinea pigs and guinea pigs after 42 days of STP treatment

Waves	db	Latency ^a (milliseconds)			
		I	II	III	IV
Control	90	1.27 (2)	1.65 (2)	2.22 (2)	2.92 (2)
	50	1.5 (1)	2.07 (2)	2.62 (2)	3.4 (2)
	30	1.83 (1)	2.35 (1)	2.83 (2)	3.66 (2)
42 days STP treated	90	1.1 ± 0.015 (3)	1.66 ± 0.13 (3)	1.90 (1)	2.88 ± 0.02 (3)
	50	1.78 ± 0.17 (3)	2.44 (2)	3.05 ± 0.35 (3)	3.77 ± 0.32 (3)
	30	2.0 ± 0.23 (3)	2.90 (1)	2.7 ± 0.05 (3)	3.68 ± 0.13 (3)

^a Numbers are mean values run in duplicate (in succession) for the number of animals in parentheses. ± SEM was calculated when n=3.

*Resultados tomados de Meza et al., 1989.

Morfológicamente se detectó un deterioro de las células pilosas tipo I en el epitelio sensorial de las crestas vestibulares, mientras que las terminales aferentes y eferentes permanecieron sin señales de daño. Estos hallazgos fueron los primeros que mediante estudios multidisciplinarios confirmaron la predilección de la STP para afectar las funciones vestibulares por un daño específico sobre las células pilosas sin afectar a las terminales nerviosas. Estos resultados concuerdan con los hallazgos realizados por otros autores (Wersäll and Hawkins, 1962; Babel et al., 1970; Igarashi and Jersen, 1981).

El efecto sobre el funcionamiento de los canales vestibulares y no la audición, apoyan la idea que la STP podría estar dañando preferentemente a las crestas vestibulares. A diferencia del daño en los órganos otolíticos por la STP observado por otros investigadores (McCabe, 1964, Futaki and Kawabata, 1983, Fermin et al., 1998), en este estudio no se efectuaron mediciones relativas al funcionamiento de los órganos otolíticos.

Por otro lado, como se comentó anteriormente, la observación física del comportamiento del cuyo cuando los órganos otolíticos están dañados, es muy subjetiva. En cambio en la rata, estas observaciones son fáciles de realizar y cuantificar a través del nado de los animales, como ha sido observado tanto en ratones tratados con STP (Caussé et al., 1948) como en ratones con deficiencias genéticas de otoconias (Trune and Lim, 1983 a y b).

Estudios de nuestro laboratorio en ratas pigmentadas (Long-Evans) mostraron a diferencia que en el cuyo, una ausencia de efectos sobre los canales semicirculares así como un efecto nulo en la función auditiva, medidos por el nistagmo post-rotacional y por potenciales auditivos provocados, respectivamente (Meza et al., 1993, 1994), lo cual sugería que la STP provocaba una

disfunción en otra estructura vestibular, que luego resultó ser los órganos otolíticos en la rata.

Tiempo más tarde al realizarse estudios tanto en la conducta del nado como en observaciones histológicas del epitelio utricular en ratas pigmentadas tratadas con STP (400 mg/kg) por 48 días (Meza et al., 1996) se estableció por primera vez la descripción de 4 patrones anormales de nado en los animales afectados descritos como: nado vertical con giros, nado de barrido con giros, nado de tirabuzón y nado con movimiento circular, cuyo establecimiento fue de manera demorada y gradual (Figura 8), los cuales no fueron observados en los animales control (tratados con solución salina).

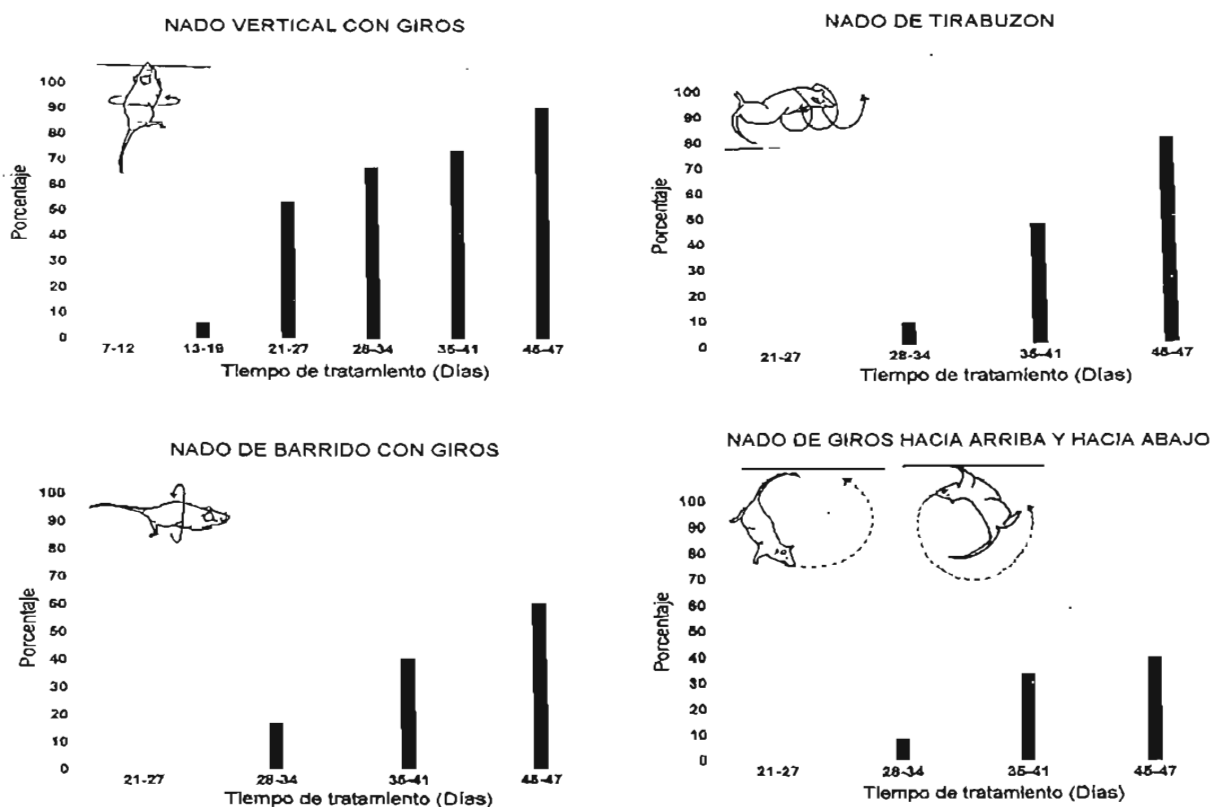


Figura 8. Establecimiento de los 4 diferentes patrones anormales de nado observados en ratas tratadas durante 48 días de tratamiento con 400 mg/kg de STP (Meza et al., 1993).

Las observaciones histológicas del epitelio sensorial utricular por microscopia de luz mostraron presencia de núcleos de células pilosas en proceso de ser eliminados del epitelio, así como evidencia clara de la pérdida de células sensoriales por la observación franca en la disminución de penachos de pelos sensorios y una desorganización en la membrana otolítica en las ratas tratadas con el antibiótico. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la degeneración de las células sensoriales producida por la STP es principalmente en los órganos otolíticos como lo han reportado varios investigadores (McCabe, 1964, Futaki and Kawabata, 1983, Fermin et al., 1998).

e) Activación o transformación metabólica de los aminoglicósidos

A pesar de que se conocen los efectos indeseables producidos por los aminoglicósidos desde hace muchos años, la acción molecular que resulta de estos efectos permanece ignorada, debido a que el establecimiento de los efectos secundarios se presentan de manera demorada y gradual. Algunos investigadores han postulado una transformación metabólica o "activación" del antibiótico que da por resultado la producción de especies moleculares derivadas del antibiótico, las cuales podrían presentar mayor toxicidad que la droga per se, o bien, actuar de manera sinérgica con la STP para ocasionar la ototoxicidad.

Owada (1962) fue el primero en observar que los productos de hidrólisis ácida de la kanamicina presentaban una cocleotoxicidad equivalente o mayor al antibiótico mismo. Este autor determinó que el anillo aminociclitol de la kanamicina, la 2-deoxiestreptamina, al ser administrada intravenosamente a ratones mostraba tener una toxicidad equiparable a la kanamicina, debido a que la LD₅₀ (Dosis letal) del aminociclitol era de 337 mg/kg, mientras que la del antibiótico era de 214 mg/kg. En cambio, en

cuyos no era la 2-deoxiestreptamina la tóxica, sino la otra parte de la molécula, la aminohexosa (3-glucosamina) al ser administrada intramuscularmente a una concentración equivalente de 200 mg/kg de kanamicina; mostrando que el reflejo de Preyer (un chasquido o sonido ligero retrasado de la audición de un sonido de 96 dB a 20 kHz) a 80 dB desaparecía después de 10 días de tratamiento con la 3-glucosamina, mientras que la disminución de este reflejo solamente se observaba después de 30 días de tratamiento con el antibiótico. Asimismo, observó que la respuesta microfónica coclear de estos animales decrecía a los 6 días de tratamiento con la 3-glucosamina, necesitándose 20 días de administración de kanamicina para obtener el mismo resultado.

Esta hipótesis metabólica de los aminoglicósidos no se retomó sino hasta principios de los años 90's, cuando un extracto *in vitro* de la gentamicina, presentó un mayor efecto que el antibiótico en el decremento de la viabilidad de células pilosas externas aisladas del cuyo (Huang and Schacht, 1990; Crann et al., 1992).

Huang y Schacht (1990) mostraron que al incubar 10 mM de gentamicina en presencia de una fracción subcelular hepática de cuyos, denominada S9, por espacio de 60 min a 37° C y exponer células pilosas externas del mismo animal, midiendo la viabilidad celular por la incorporación de Yoduro de propidio en las células con exclusión nuclear, observaron una mayor muerte celular cuando el antibiótico era preincubado con la fracción S9 (56%) que cuando las células estaban expuestas tanto en la fracción hepática S9 pura, como cuando se incubaba la gentamicina en una fracción hepática S9 inactivada a 100° C por 1.5 min (15%). Asimismo, observaron que el metabolismo de la gentamicina era mediado por mono-oxigenasas asociadas al citocromo P450, debido a que cuando se omitió la presencia de NADP para prevenir la generación de NADPH y cuando se adicionó 250 mM de ketoconazol

para inhibir el metabolismo oxidativo (Sheets and Manson, 1984; Meredith et al., 1985), la formación del producto tóxico de la gentamicina se previno, manteniéndose la viabilidad celular a los niveles del control (70%) en ambas condiciones.

Más tarde, cuando se trató de caracterizar al metabolito derivado de la gentamicina a través de filtrados de peso molecular (Crann et al., 1992) éste no pudo ser identificado puesto que presentaba un peso molecular de 500, cuando el rango de las gentamicinas C₁, C_{1a} y C₂ van de 452 a 482. Por otro lado, estos autores obtuvieron un resultado contradictorio a su reporte anterior (Huang and Schacht, 1990) en lo que respecta al papel de las enzimas del P450 en la hidrólisis del antibiótico, puesto que al realizar un fraccionamiento de las membranas se demostró que ni la fracción nuclear, ni la fracción lisosomal/mitocondrial, ni los microsomas eran responsables de dicha actividad, solamente la fracción citosólica, la cual resultó ser independiente de la presencia de NADP.

Aún con este resultado, Crann y Schacht (1996) postularon la hipótesis de que la activación de los aminoglicósidos precedía a sus acciones tóxicas, así como que la capacidad de dicha activación no estaba confinada al hígado. Después de realizar hidrolizados *in vitro* de varios aminoglicósidos (kanamicina, neomicina, netilmicina, sisomicina, trobamicina, gentamicina, dihidroSTP y STP) en presencia tanto de la fracción hepática S9 de cuyos como en homogenados del tejido proveniente de las paredes laterales de la cóclea y realizando bioensayos de viabilidad celular en células pilosas externas aisladas, demostraron que el porcentaje de la viabilidad celular era de entre 30-45% después de la incubación de los aminoglicósidos en la fracción hepática S9, mientras que los controles presentaban una viabilidad del 70%. Asimismo, esta viabilidad era del 35%

cuando la gentamicina era incubada en presencia de los homogenados del tejido de las paredes laterales de la cóclea.

Por otro lado, Wang et al. (1999) trabajando en humanos, demostraron que el suero de pacientes sensibles a aminoglicósidos, tenía la capacidad de metabolizar a la STP con la producción de un metabolito con propiedades citotóxicas mayores que la STP misma. Sin embargo, el metabolito solamente fue observado por HPLC como un nuevo pico cromatográfico en las incubaciones del antibiótico en el suero de los pacientes, sin haber sido caracterizado ni identificado.

f) Posibles blancos estructurales de la hidrólisis de la estreptomina

La molécula de STP está conformada por tres entidades moleculares: la estreptidina (STD), un aminociclitol con dos grupos guanidinos en posición 1 y 3 del anillo; una pentosa, la estreptosa, y la N-metilglucosamina. Estos compuestos están unidos entre sí a través de enlaces glucosídicos (Figura 9).

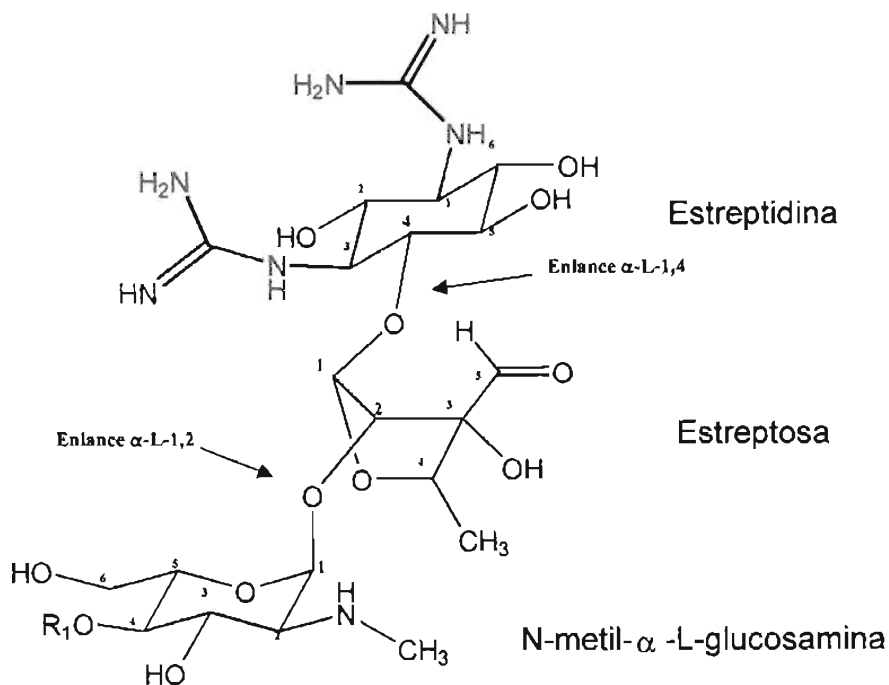


Figura 9. Componentes estructurales de la molécula de estreptomina.

En estudios químicos, la aplicación tanto de hidrólisis básica como ácida de la STP dan como resultado STD, como uno de los productos, lo cual indica que el enlace glucosídico α -1,4 entre la STD y la estreptosa, es la región más lábil del antibiótico (Barba-Behrens et al., 1990) (Figura 10).

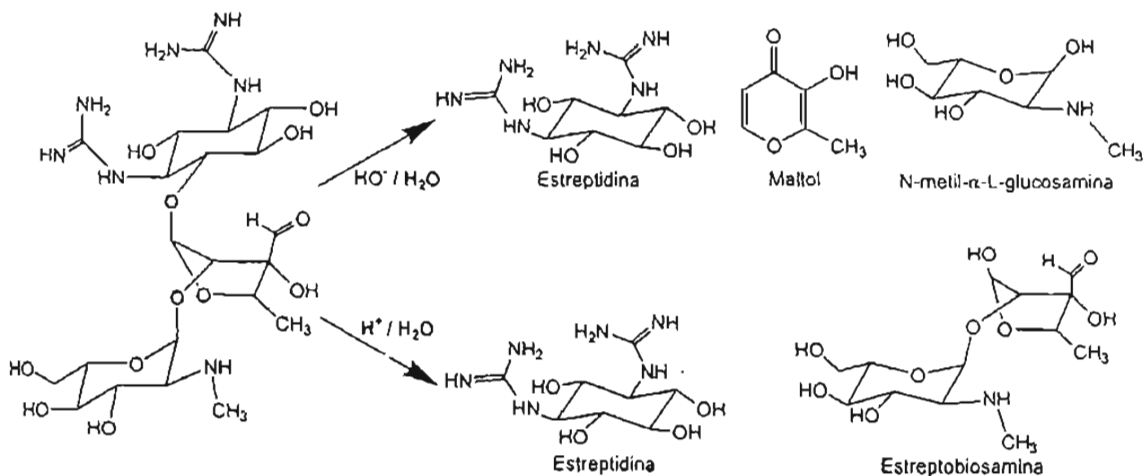


Figura 10. Productos de hidrólisis de la estreptomicina.

Por otro lado, estudios fisicoquímicos de la STP a través de experimentos *in vitro* de unión a membranas, para determinar qué componente del antibiótico podría ser el responsable de su vestibulotoxicidad y debido a que la STP se caracteriza por presentar el anillo aminociclitol STD, el cual contiene dos grupos guanidinos (Figura 9), se incubaron *in vitro* membranas celulares aisladas de órganos vestibulares de cuyos o ratas con ^3H -espermidina (molécula análoga estructural de la STP). Se midió la capacidad de desplazamiento específico con STP, STD (como una molécula con posibles efectos tóxicos vestibulares por la presencia de los grupos guanidinos), Kanamicina (antibiótico carente de STD y cocleotóxico), Guanidina y N-acetilglucosamina (como un análogo estructural de la N-metilglucosamina). Se

demonstró que tanto la STP como la STD se unen a un sitio catiónico de alta especificidad ubicado en las membranas vestibulares y que esta unión es a través de sus grupos guanidinos como lo evidenciaba el porcentaje de desplazamiento de la ^3H -espermidina por la STP de un 81% y de un 80% por la STD, la guanidina (50%) mientras que la Kanamicina mostró un 56%, lo que explica su nulo efecto sobre el vestíbulo debido a que en su estructura la STD es sustituida por la 2-deoxiestreptamina carente de grupos guanidinos, y por último la glucosamina con un 15% de desplazamiento (Figura 11A) (Meza et al., 1999).

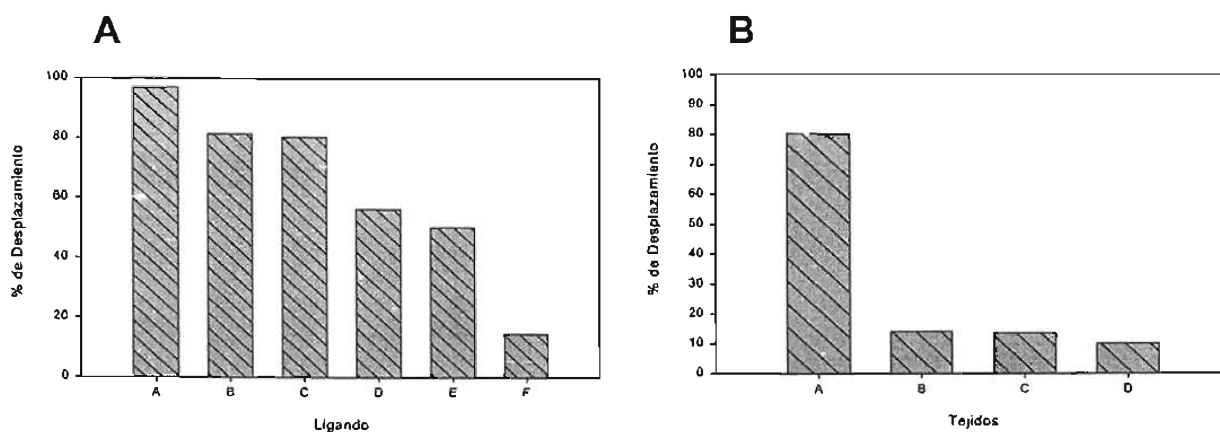


Figura 11. Histogramas en que se muestra el porcentaje de desplazamiento de la $[\text{H}^3]$ -espermidina. En el panel A, por STP (columna B) y análogos (columna A, espermidina; C, STD; D, kanamicina; E, guanidina y F, glucosamina) en homogenados totales vestibulares de rata (73 μg de proteína) y en el panel B, por 10 mM de STP en diferentes membranas de tejidos [(A) membranas de oído (7 g de proteína), (B) cerebro, (C) riñón y (D) hígado (40-70 g de proteína, respectivamente)]. Ambos resultados fueron tomados de Meza et al., 1999.

Asimismo, para determinar la especificidad tóxica vestibular de la STP, se comparó la capacidad de desplazamiento de la ^3H -espermidina por STP en membranas aisladas de los órganos vestibulares y provenientes de riñón, hígado y cerebro (Figura 11B). Se demostró que mientras la STP desplazaba un 80% en las membranas vestibulares, en los otros órganos el desplazamiento fue de alrededor del 14%, lo cual corrobora la baja nefrotoxicidad de la STP. Este estudio nos dio la pauta para

establecer la posibilidad de que la porción STD de la molécula de STP, fuera un probable metabolito con propiedades vestibulotóxicas iguales o mayores al antibiótico.

OBJETIVOS

Por lo anterior, es evidente que sólo existen datos incompletos que apoyen la transformación metabólica o "activación" de la STP, por lo que el propósito de este trabajo es aportar evidencias experimentales a favor de la participación de la STD como un metabolito derivado de la STP en la vestibulotoxicidad.

El objetivo principal de este estudio fue el determinar la presencia de STD como un derivado ototóxico de la STP. Este trabajo cubre los siguientes objetivos particulares:

- Determinar si la STP se acumula en el epitelio sensorial vestibular.
- Investigar en condiciones *in vitro*, si la STD es producto de la hidrólisis de la STP en el suero y el vestíbulo de la rata.
- Investigar la participación de la STD en la vestibulotoxicidad de la rata.
- Determinar la actividad de α -glucosidasa en el suero y el vestíbulo de la rata, como posible enzima responsable de la hidrólisis de la STP.
- Identificar a la STD en la recuperación del pico con las mismas características cromatográficas que el estándar de STD después de la hidrólisis *in vitro* e *in vivo*.

V. MODELO EXPERIMENTAL

Para ello se realizaron experimentos bioquímicos en condiciones *in vitro* e *in vivo*, así como estudios de comportamiento natatorio y morfológicos de los efectos en el tratamiento crónico con STP o STD, usando como modelo experimental ratas macho de la cepa *Long-Evans*. Los enfoques experimentales fueron los siguientes:

- a) Incubación *in vitro* de la STP en el suero de la rata y seguimiento de la aparición del derivado metabólico por cromatografía.
- b) Administración de STP y STD en ratas a diversos tiempos y establecimiento del daño por técnicas conductuales e histológicas y su relación con la aparición de la STD proveniente de STP, en comparación con los efectos de la administración de la STD sola.

Experimentos *in vitro*

Como se describió en los antecedentes de esta tesis, existe la hipótesis que un derivado metabólico de los aminoglicósidos es más ototóxico que el antibiótico mismo. Sin embargo, con excepción de los experimentos en ratones y cuyos realizados por Owada (1962) con los productos de la hidrólisis ácida de la kanamicina, en los que se demostró que los componentes 2-deoxiestreptamina y 3-glucosamina de la kanamicina eran tóxicos en los ratones y en el cuyo, respectivamente. Las evidencias de toxicidad de los metabolitos de gentamicina (Huang and Schacht, 1990; Crann et al., 1992), STP (Wang et al., 1999) y otros aminoglicósidos (Crann and Schacht, 1996) han permanecido en pruebas *in vitro* de toxicidad, pero nunca se ha caracterizado el

metabolito, ni tampoco se cuenta con experimentos concluyentes *in vivo*.

Dado que ya se tenían evidencias químicas de que la STP por hidrólisis podría dar lugar a la STD (Barba-Behrens et al., 1990) y para apoyar su posible acumulación en el oído, se efectuaron experimentos *in vitro* de fluorescencia de la STD y la STP en los diferentes buffers utilizados en la perfusión de los animales. Con estos experimentos, se demostró que la STD *per sé* presentaba fluorescencia y que al mezclarse con la STP, ésta aumentaba de manera aditiva, lo cual apoya la idea de que la acumulación de la fluorescencia observada en el epitelio de las crestas vestibulares de cuyos en tratamientos agudos con STP después de 4 horas post-inyección, podría ser debida a la acumulación conjunta de la STP y la STD en el epitelio (Meza et al., 2001).

En busca de una evidencia más directa, se planeó una serie de experimentos *in vitro* en los cuales se determinó y caracterizó por primera vez la producción de la STD, como un derivado metabólico proveniente de STP. Para ello, primeramente se estableció y validó una técnica de separación y medición de la STP y su derivado, STD en el suero de la rata, mediante la modificación de una técnica de detección directa de STP en solución por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a un detector de UV (Whall, 1981).

Una vez establecida la técnica, se procedió a obtener una evidencia directa de que la STP podía ser hidrolizada en presencia del suero de rata, puesto que la sangre es el primer compartimento al que llega el antibiótico después de ser administrada intramuscularmente. Por lo anterior, se realizaron experimentos *in vitro* de hidrólisis de la STP en presencia del suero de rata, para posteriormente separar y medir ambos compuestos (STP y STD) por HPLC. Este hallazgo junto con la caracterización de la producción de la STD, como un derivado

metabólico proveniente de STP después de una incubación *in vitro* en el suero de la rata, nos permitió desarrollar la experimentación *in vivo*.

Experimentos in vivo

Se utilizó un enfoque conductual-histológico. Este enfoque fue necesario debido a que se postuló la participación de la STD en los efectos tóxicos vestibulares. Por lo tanto, era necesario comprobar que este compuesto al ser administrado crónicamente, producía los mismos efectos ototóxicos que los ya descritos para la STP en las ratas, tanto en el establecimiento de los mismos patrones anormales de nado como en los daños observados en el epitelio sensorial del utrículo, descritos en los antecedentes de esta tesis.

Debido a que el porcentaje de la producción de STD por hidrólisis de la STP en condiciones *in vitro* en el suero de la rata no fue mayor del 5% de la concentración inicial del antibiótico, fue necesario demostrar que la administración de STD a una dosis muy baja en comparación a la dosis inyectada de STP, era suficiente para producir los efectos tóxicos vestibulares.

Por medio de este enfoque se demostró que la STD administrada en una dosis alrededor del 10% de la dosis de la STP, produce los mismos patrones anormales de nado, así como daño más acentuado en el epitelio sensorial del utrículo, con una pérdida aún mayor de células pilosas que en los animales tratados con el antibiótico. Lo anterior sugiere que la STD proveniente de STP por hidrólisis enzimática en la sangre de la rata es prácticamente la responsable de los efectos vestibulotóxicos observados.

VI. MATERIALES Y METODOS

Reactivos utilizados en:

Tratamiento de animales:

- Glicerol (J.T.Baker. Xalostoc, México)
- Solución salina fisiológica: NaCl (Sigma; St. Louis, MO, USA).
8.5 g/1000 ml

Técnicas histológicas

1. Sulfato de estreptomicina (Pisa Laboratories, México)
2. p-formaldehído en polvo (Polysciences, Warrington, Filadelfia, USA(PWFUSA))
3. Cacodilato de sodio (PFWUSA)
4. Sacarosa (Sigma, St. Louis, MO,USA)
5. Azul de toluidina (Electron Microscopy Science, Fort Washington, Filadelfia, USA)
6. Alcohol etílico absoluto (J.T. Baker, Xalostoc, Mex)
7. Parafina-Paraplast (PFWUSA)

Técnica de HPLC

1. Sulfato de estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO, USA)
2. Hexanosulfonato de sodio (Regis, Morton Grove, IL, USA), 3.76 g/1000ml (20 mM); Na₃PO₄ (J.T. Baker, Xalostoc, Mex), 9.52 g/1000ml (25 mM); Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), 150 ml/1000 ml. Ajustar pH = 6.0 con ácido fosfórico (85%)(J.T. Baker, Xalostoc, Mex).
3. Acido tricloroacético (Sigma), 20 g/100 ml

Actividad de α -glucosidasa

1. Buffer de reacción: KH₂PO₄ (Sigma)(50mM), 0.68 g/100 ml; EDTA (Sigma, 1 mM), 35 mg/100ml; β -mercaptoetanol (Sigma, 1 mM), 7 μ l/100 ml y se ajusta el pH a 6.8 con NaOH (J.T.Baker), 4 g/100 ml (1N)

2. p-Nitrofenil- α -1,4-D-glucósido (Sigma)
3. Maltosa (Sigma)
4. Na₂CO₃ (J.T. Baker), 10.6 g/100 ml (1M)

La metodología usada en este trabajo se puede dividir en tres partes: Química, Bioquímica y Conductual-histológica.

Parte Química

Síntesis de la estreptidina.

La estreptidina fue sintetizada en el laboratorio de la Dra. Norah Barba-Behrens del Depto. de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química, por el método de la hidrólisis ácida de la estreptomicina, en el cual 1g de sulfato de STP en agua (78 ml) se le adicionan 2 ml de H₂SO₄ concentrado y 70 ml de acetona. La disolución resultante se calienta a 60° C durante 48 hrs hasta que presenta una coloración naranja y un precipitado blanco. El precipitado se separa mediante filtración, se lava con agua y posteriormente con acetona. Para cristalizarlo, el precipitado se disuelve en agua acidulada con H₂SO₄ y se deja evaporando lentamente hasta la aparición de cristales (Barba-Behrens et al., 1990).

Pureza de la estreptomicina y la estreptidina.

La pureza de la STP y la STD utilizadas en este estudio fue determinada por Análisis elemental y por Resonancia magnética nuclear.

a) Análisis elemental.

Los análisis elementales se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. Norah Barba-Behrens del Depto. de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química y fueron realizados en la Unidad de Servicios de Análisis Instrumentales (USAI) en el misma Facultad de Química.

Para estos estudios se utilizó un analizador elemental marca Fison Instruments, modelo EA 1108 (CHNS-O). Para ello, se utilizó sulfanilamida (para el análisis de CHNS) y acetanilida (para análisis de CHN) como estándares de calibración, se pesó de 2 a 3 mg de la muestra dentro de la cápsula de estaño, se comprime y se deja caer dentro del reactor de combustión a 1020°C. Los gases producidos son arrastrados (con ayuda de una corrientes de He, O₂ y aire) a través de una columna de cuarzo que contiene WO₃ y Cu, los cuales catalizan la transformación de la muestra a N₂, CO₂, H₂O y SO₂. La mezcla resultante es dirigida a una columna cromatográfica donde los componentes son separados con la ayuda de un detector de conductividad térmica, registrándose el porcentaje de la muestra. El instrumento se calibra previamente con el análisis de compuestos estándar usando un método de regresión lineal.

b) Resonancia magnética nuclear de 1-H y de 13-C.

La RMN de ¹H y de ¹³C en disolución se llevó a cabo en la Unidad de Servicios Analíticos e Investigación de la Facultad de Química UNAM (USAI-UNAM), en un espectrofotómetro Jeol, modelo FX-90Q a 22.48 Mhz en tubos de 5mm a una temperatura normal de prueba (27 ± 2°C). Los compuestos fueron estudiados en soluciones de D₂O usando acetona como referencia externa. Estos análisis se han probado con éxito en el estudio de la estructura de la STP y la STD (Barba-Behrens et al., 1990).

Determinación de la STD por espectroscopia de masas

La determinación de la STD producida por la hidrólisis de la STP en el suero de la rata tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo*, se llevó a cabo a través de una cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas en la Unidad de Servicios de Análisis Instrumentales (USAI) de la Facultad de Química.

Se utilizó un equipo GCQ System. Empleando una columna capilar J&W Scientific DB-5MS (30 x 0.25 mm D.I. x 0.25 m), en un intervalo de 20-400 m/z. Las muestras fueron obtenidas de la recuperación del pico cromatográfico de la STD después de: a) la hidrólisis de la STP a 37° C por 24 horas en el suero de la rata, y b) del corrimiento de muestras de un extracto de suero de 15 ratas tratadas con 400 mg/kg de STP por 45 días. Ambas muestras se compararon con el espectro de masas del estándar de STD utilizado en los experimentos *in vivo*.

Determinación de la fluorescencia *in vitro* de la STP y la STD.

Se cuantificó la emisión de fluorescencia, tanto de la STP como de la STD, en forma individual y de ambos compuestos mezclados. Las concentraciones de ambos compuestos fueron equimolares (100 µM), disueltos en las diferentes soluciones utilizadas para la perfusión de los animales: NaCl al 0.85% (solución salina isotónica); buffer de fosfatos de sodio 0.1 M, pH 7.4; buffer de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 (SCB) o p-formaldehído al 4% en SCB.

Para la medición de la fluorescencia se utilizó un Espectrofluorómetro marca Spee Fluoromax. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm, mientras que la emisión de la fluorescencia se midió en el rango de los 520-560 nm, tanto a 22° C como a 37° C. En cada caso, el valor de la línea basal obtenida

de cada buffer fue restada automáticamente de la medición de la muestra problema.

Parte Bioquímica

Determinación de Estreptomicina y Estreptidina.

Los métodos oficiales de análisis reportados tanto en la USP (The United States Pharmacopoeia, 1985) como en la farmacopea mexicana (2000) para el Sulfato de Estreptomicina (STP) son mediante procesos microbiológicos turbidimétricos. Asimismo, Boxer y colaboradores (1947) reportaron un método colorimétrico basado en la formación del maltol a partir de la estreptosa liberada por hidrólisis alcalina de la STP. Sin embargo, ninguno de los métodos antes mencionados tienen la combinación deseada de rapidez, especificidad, simplicidad, sensibilidad y precisión que las técnicas cromatográficas.

a) Cromatografía en capa fina (TLC)

El primer intento de separar la STP de la STD fue por TLC. Se realizó una variación de la técnica descrita por Devenyi (1974) para la separación de antibióticos solubles en agua.

Se utilizaron placas cromatográficas de intercambio iónico (POLYGRAM IONEX 25-SA), las cuales son láminas de poliéster recubiertas de una mezcla de sílica y una resina intercambiadora catiónica o aniónica, respectivamente. Adicionalmente estas placas contienen un aglutinante orgánico inerte. Las placas se cortaron de 2 x 10 cm.

El eluyente consistió en: 2M de NaCl, 0.5 M de acetato de sodio y 10% de t-butanol, pH 7.0. Se colocó (a 1 cm de distancia de la base de la placa) 2 µl de muestra dejándola secar a

temperatura ambiente. Las paredes internas de la cámara de elución se forraron con papel filtro, se colocaron 5 ml del eluyente dejando saturar la cámara por espacio de 10 min. Posteriormente se introdujo la cromatoplaque dejando eluir por espacio de 20 min, la placa se sacó de la cámara y se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior revelado.

El revelado de las placas se realizó por la formación de cloroaminas. Para ello se preparó una solución de o-toluidina (160 mg de o-toluidina se disolvieron en 30 ml de ácido acético y se diluyó a 500 ml con agua destilada más 1 g de Yoduro de potasio). La cromatoplaque se colocaba en una atmósfera de cloro, mezclando dentro de una cámara para cromatografía una solución de KMnO_4 al 1.5% y HCl al 10% en una relación 1:1, por espacio de 20 min, la placa se sacó de la cámara dejando evaporar el exceso de cloro bajo una campana de extracción durante 5 min, después de lo cual se roció con la solución de o-toluidina, dejándola secar a temperatura ambiente.

b) Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se han reportado diferentes métodos de separación de aminoglicósidos y sus derivados por HPLC haciendo derivatización a otros compuestos fluorescentes. Sin embargo, Whall (1981) reportó una técnica de cromatografía de fase reversa en combinación con un detector de UV para la medición directa de los componentes deseados. Fue este método el que esencialmente se siguió en nuestros estudios.

a) Aparatos

El sistema cromatográfico consistió de una bomba Waters 600E equipado con un automuestreador Water 717plus y un detector PDA

Waters 996 ubicado en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular. La columna analítica utilizada fue una PRODIGY ODS3, fase reversa, 5µm, 250 x 4.60 mm (PHENOMENEX). El flujo en la columna se mantuvo a 1.3 ml/min a una temperatura de 25° C (\pm 0.1). La longitud de onda del detector se estableció a 200 \pm 0.2 nm. Después de cada análisis diario, la columna se lavó con una mezcla de acetonitrilo:agua (65:35).

La fase móvil se preparó con una mezcla de Hexanosulfonato de sodio 20 mM y Na₃PO₄ 25 mM en agua y Acetonitrilo. Las condiciones óptimas de medición fueron de 12% de Acetonitrilo en el análisis de STP y 15% de Acetonitrilo en el análisis de STD. En ambos casos las soluciones fueron ajustadas a pH=6.0 con ácido fosfórico (85%), filtradas a través de filtros Millipore de 0.22 µm y desgasificadas antes de ser utilizadas.

b) Reactivos

Se utilizaron como estándares Sulfato de estreptomicina (SIGMA) y Sulfato de estreptidina obtenida a partir de estreptomicina por hidrólisis ácida (Barba-Behrens et al., 1990) en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química de la UNAM. Acetonitrilo grado HPLC (PROLABO), 1-Hexanosulfonato de sodio (REGIS), Fosfato tribásico de sodio y ácido fosfórico al 85% (Mallinckrodt-Becker) y agua bidestilada.

c) Análisis de los estándares

Se analizó el sulfato de STP en un rango de concentraciones entre 80-400 µg/ml y de 5-80 µg/ml. Mientras que el sulfato de STD se analizó en un rango de 1.9-16 µg/ml tanto en buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8, como en suero de rata. Se inyectaron

quintuplicados de 20 μ l con un intervalo de 10-15 minutos entre ellos para cada una de las concentraciones de STP y STD. Se tomó el área de los picos para calcular la concentración.

d) Cálculos

El contenido de STP y STD antes y después de la hidrólisis se calculó por extrapolación directa de las áreas de los picos en la curva de concentración del estándar de STP o STD.

Hidrólisis *in vitro* de la estreptomicina.

Se incubó a la estreptomicina (STP) a una concentración final de 160 μ g/ml en suero u homogenado vestibular de rata en un volumen total de 1 ml en un tubo de ensaye a 37° C por 24 horas. El control consistió de una muestra, que no fue incubada (t = 0 min).

a) Preparación de las muestras

Homogenado de Vestíbulo

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 12 minutos y se procedió a inyectar el sobrenadante.

Suero

Para la precipitación de las proteínas séricas después de transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 120 μ l de TCA al 20%, se mezcló perfectamente y se centrifugó a 10, 000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se inyectó directamente en el cromatógrafo.

b) Análisis estadístico

Después del análisis de regresión, la significancia estadística entre las muestras control y las muestras de la hidrólisis de la STP en el suero, se determinó con las pruebas Turkey HSD y Scheffe usando el software SPSS 11.0. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Parte Conductual-histológica

Análisis del comportamiento en el nado de las ratas

El comportamiento del nado fue observado en cada una de las ratas agrupadas en 3 grupos dependiendo del tiempo de tratamiento (25 días, 35 días y 45 días) a su vez cada grupo fue subdividido en 9 subgrupos experimentales: 3 subgrupos tratados con STP (400 mg/kg) por 25, 35 y 45 días, respectivamente; 3 subgrupos bajo los mismos periodos de tratamiento, pero tratados con STD (50 mg/kg) y 3 subgrupos tratados con glicerol al 70% (0.5 ml/kg, ratas control) por los respectivos días de tratamiento con STP o STD.

El análisis del nado se comenzó a los 25 días de tratamiento, continuándose en intervalos semanales hasta completar los 45 días de tratamiento. Las ratas eran introducidas en un tanque lleno de agua a 27° C y la actividad del nado fue grabada en video durante 45 segundos. El análisis y la clasificación de los patrones de nado fueron realizados después de la prueba. Las ratas que presentaron patrones anormales de nado en cada grupo tratado con STP o STD en los periodos de 25, 35 y 45 días de tratamiento fueron utilizadas para el análisis histológico de la mácula utricular, realizando al mismo tiempo los animales tratados y los controles tratados con glicerol.

Histología

a) Perfusión y fijación de la muestra.

Los animales se sobreenestesiaron con una solución de hidrato de cloral (475 mg/kg de peso, Sigma) por vía intraperitoneal y se procedió a la perfusión cardiaca, primeramente con una solución salina isotónica (0.85% NaCl, Sigma) para eliminar y lavar todos los órganos de sangre, seguido de una solución fijadora (p-formaldehído al 4%, Polysciences Inc) en un buffer de Cacodilatos de sodio 0.1M, pH 7.4 a 4° C.

En todos los casos se siguieron las reglas humanitarias para el manejo de los animales aprobadas por la Secretaría de Salud (México) y el Comité Local.

b) Disección de las muestras.

Terminada la perfusión, se decapitó al animal, se abrió el cráneo sagitalmente y el cerebro se desechó. Se separaron las bulas auditivas, las cuales se abrieron y sumergieron en la misma solución fijadora fría, dejándolas por espacio 2 horas bajo una agitación lenta (post-fijación).

c) Procesamiento de las muestras.

Terminado el tiempo de post-fijación, las bulas auditivas se lavaron tres veces con buffer de cacodilatos de sodio 0.1 M, pH 7.4 por 10 min cada lavado. Después de los lavados, se procedió a realizar la disección de las crestas vestibulares (artículo I) o la mácula utricular (artículo II) bajo un microscopio estereoscópico. El órgano disecado (cresta vestibular o utrículo) fue recibido en el mismo buffer de cacodilatos utilizado para los

lavados. A partir de aquí se realizaron dos tipos de técnicas de inclusión.

I) Procesamientos de las muestras para la observación de la histofluorescencia (artículo I).

a) Inclusiones para cortes en frío.

Este procesamiento de las muestras se utilizó para la observación de la histofluorescencia (artículo I). Después de 1, 12 o 24 horas de la inyección en cada caso, se disecó la cresta vestibular proveniente de cuyos macho pigmentados tratados con STP (300 mg/kg) disuelta en solución salina fisiológica o con la pura solución salina (controles). La cresta fue recibida en buffer de cacodilatos 0.1 M, pH 7.4 después de su disección. Se retiró el buffer con ayuda de una pipeta Pasteur y se sustituyó por una solución de sacarosa al 10%, se dejó en esta solución en agitación ligera por espacio de 3 horas. Transcurrido dicho tiempo, se eliminó la solución de sacarosa al 10% con el mismo procedimiento anterior, y se sustituyó por una solución de sacarosa al 30%, dejando al órgano en esta solución durante 24 horas a 4° C. Al día siguiente, el tejido es incluido cuidadosamente en Tissue-Tek, se lleva a congelación por espacio de 15 min, para posteriormente proceder a realizar los cortes.

b) Cortes en frío.

Se realizaron cortes de 15 μm de los bloques congelados de Tissue-Tek, en los cuales se había incluido las crestas vestibulares. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo marca LKB o Sorval MT-2 semiautomático con la utilización de cuchillas de acero. Los cortes se recibieron en porta-objetos de

vidrio recubiertos con gelatina. Para su análisis los cortes fueron inmersos en agua para eliminar la resina del Tissue-Tek y montados con Poly-Mount y cubiertos con un cubre-objetos. Las preparaciones fueron guardadas en congelación, no más de una semana, para la observación de la fluorescencia.

c) Microscopia Cónfocal.

Se utilizó un microscopio cónfocal marca Bio-Rad 1025, equipado con un laser Ar-Kr y acoplado a un microscopio invertido marca Nikor TMD 300. La muestra se excitó a una longitud de onda de 488 nm a través del laser Ar-Kr y la fluorescencia emitida fue filtrada en el rango de 522-532 nm.

Las imágenes fueron capturadas y convertidas a formato TIFF con el software del confocal Todd Clark Brelje 4.02. La determinación de la intensidad de la fluorescencia se obtuvo de las imágenes capturadas por medio del software Image-Pro Plus, media Cybernetics y se cuantificó tanto en la región del epitelio sensorial de la cresta vestibular como en las fibras nerviosas. Así mismo la fluorescencia proveniente de los animales control (inyectados con solución salina) fue restada de la medición del tejido proveniente de los animales inyectados con STP (300 mg/kg).

d) Análisis estadístico

La fluorescencia específica entre los diferentes grupos se analizó estadísticamente a través de una ANOVA con la utilización del software Statview 4.5 (Abacus Concepts Inc.).

II) Procesamiento de las muestras para las observaciones histológicas por microscopía de luz (artículo II).

a) Inclusión en parafina.

En este caso el órgano disecado fue la mácula utricular de ratas pigmentadas, la cual fue recibida en el buffer de cacodilatos 0.1 M, pH 7.4. El buffer se eliminó con ayuda de una pipeta Pasteur para proceder a deshidratar el tejido a través de la sustitución de soluciones etanólicas en agua al 35%, 50%, 70%, 80%, 95% y 100% durante 5 min a 4° C en cada una de las soluciones, para después sustituir el alcohol al 100% por una solución etanol-xilol (1:1) por 5 min y finalmente 2 min con xilol al 100%, al terminó del cual se incluyó el tejido en parafina-paraplast.

b) Cortes en parafina.

La mácula utricular fue seccionada en cortes de 3 μm hasta alcanzar el borde medio (95-115 μm de la mácula), obteniéndose a partir de este momento un mínimo de 80 cortes. Los cortes fueron montados en portaobjetos recubiertos de gelatina para su posterior tinción.

c) Tinción con azul de toluidina.

Para realizar la tinción de los cortes es necesario eliminar primero la parafina calentando los porta-objetos a 56° C por espacio de 5 min en una estufa de temperatura controlada. Posteriormente, el tejido es rehidratado por inmersión de los porta-objetos por espacio de 2 min en cada una de las siguientes soluciones: xilol al 100%, Etanol al 100%, 96%, 80%, 70% y 50%,

por último en agua destilada. Al término de este lavado, los porta-objetos se sacan y meten 3 veces en una solución de azul de toluidina al 0.2% y 2 min en agua destilada para eliminar el exceso de colorante, se escurren en una servilleta de papel absorbente y se procede a deshidratar nuevamente el tejido por inmersión de los porta-objetos de manera inversa (desde la solución etanólica al 50% hasta el xilol al 100%) por 2 min cada vez. Los porta-objetos se dejan secar sobre una servilleta de papel, se colocan unas gotas de Poly-Mount para cubrir con un cubre-objetos y se deja secar.

d) Microscopia de luz.

Para las observaciones de las muestras se utilizó un microscopio de luz marca Polyvar con iluminación Nomarski. El corte del utrículo primero se localizó con el objetivo 10x y luego se enfocó la región de interés del corte con el objetivo 40x.

Las imágenes fueron capturadas digitalmente a través del software Matrox PC-VCR, para su posterior edición con el software Adobe Photoshop 5.0 y convertidas a formato TIFF con el software GIMP.

e) Cuantificación del número de células pilosas en la mácula utricular.

El efecto de la STD o la STP sobre las células pilosas en el epitelio sensorial utricular fue evaluado por el estimado del número de células pilosas. Las células pilosas fueron identificadas por la presencia bien definida del penacho de estereocilios emergiendo de la superficie del epitelio sensorial.

La metodología seguida fue esencialmente como la descrita por Ross (1997) y López et al. (2002). Para ello cada corte de 3 μm del epitelio utricular se dividió en cuatro secciones adyacentes de 150 μm cada una: 2 segmentos periféricos (1 de cada lado) y 2 segmentos intermedios. La cuantificación se realizó en el segundo segmento intermedio de los 300-450 μm del largo del epitelio utricular como se muestra en la Figura 3A del artículo II, debido a que en esta región el grosor del epitelio es mayor facilitando la visualización de los cambios morfológicos. En la Figura 3B del artículo II se muestra una imagen típica del área amplificada (40x) (aproximadamente de 3.9 mm^2) para la cuantificación celular. El número total de células se obtuvo de multiplicar el número promedio de células pilosas contadas dentro de los 20 μm por el número de todos los cortes de 3 μm .

Presencia de α -Glucosidasa (artículo III).

a) Preparación de los homogenados vestibulares y del suero de rata.

Se utilizaron 10 ratas macho pigmentadas (150-200 g) por experimento. Los animales fueron decapitados y se extrajeron las bulas, las cuales se recibieron en un buffer con KH_2PO_4 50 mM (pH 6.8), EDTA 1 mM y β -mercaptoetanol 1 mM. Los órganos vestibulares (máculas y crestas) fueron disectados y se homogeneizaron en 500 μl de buffer.

Por otro lado, se obtuvo la sangre fresca de las mismas ratas, la cual se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, eliminando posteriormente el coagulo, el suero

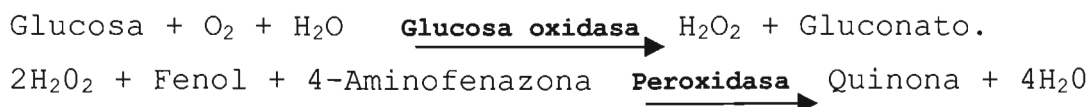
resultante se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos; el sobrenadante se usó para las determinaciones enzimáticas.

Tanto en los homogenados vestibulares, como en el suero de la rata, la concentración de proteína se determinó por el método de Lowry et al. (1951). La concentración de proteína utilizada en todas las determinaciones de actividad fue de 0.045-0.055 mg en ambos casos.

b) Actividad enzimática.

La actividad de la α -glucosidasa se determinó por la técnica del p-Nitrofenol-1,4- α -D-glucósido (pNPG) donde se mide el p-Nitrofenol (pNP) liberado a una densidad óptica de 400 nm. (Needleman and Eaton, 1974; Needleman et al., 1978) en un rango de concentración de 0.25-10 mM en un volumen total de 0.5 ml para el homogenado vestibular y 1 ml para el suero. Se incubó a 37° C por 45 minutos para el suero y por 1.5 horas para el vestíbulo. Después del tiempo de incubación, se agregó un volumen igual de una solución fría de Na₂CO₃ 1M para detener la reacción. La mezcla de reacción se filtró a través de filtros de 0.22 μ m. La cantidad de pNP liberado se extrapoló de una curva realizada con una α -glucosidasa bacteriana comercial (SIGMA) utilizando un intervalo de concentraciones entre 0.005 μ M y 0.5 μ M.

Para la medición de la actividad de la α -glucosidasa presente en el suero de la rata utilizando la maltosa como sustrato, se utilizó el método de Trinder (Trinder, 1969) según las siguientes reacciones:



La determinación de glucosa fue mediante una técnica enzimática-colorimétrica. Se usó un Kit comercial GOD-PAP (SPINREACT, Sant Esteve De Bas; España). El método es lineal hasta valores de 28 mM de glucosa. Para ello se utilizó un rango de concentración de maltosa de 0.25-20 mM en un volumen total de 1 ml, incubando a 37° C por 45 minutos, después del cual se tomó una alícuota de 15 µl y se le adicionó 1.5 ml del reactivo, incubando por 10 min. a 37° C. La Quinona formada se lee a 505 nm.

El cálculo de la concentración de glucosa liberada por acción de la glucosidasa sérica fue a través de la comparación de la densidad óptica de una muestra con 15 µl de un estándar de glucosa (5.55 mM) con la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\text{mM Glucosa} = [\text{D. Op. Problema} / \text{D. Op. Estándar}] \times 5.55$$

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

Experimentos *in vitro*

Entre las propiedades químicas de la STP, está la emisión de fluorescencia específica en 445 nm a través de sus grupos guanidinos (Bareggi et al., 1986). Por esta razón se investigó una evidencia más de que la STD por tener estos grupos era capaz de fluorecer independientemente de la STP y que la fluorescencia incrementara cuando estos dos compuestos (STP y STD) estuvieran juntos. Asimismo, la fluorescencia se había observado en el epitelio vestibular después de 1 hora de haber administrado la STP (300 mg/kg) en el cuyo (Bareggi et al., 1986) de allí que la medición de la fluorescencia *in vitro* de la STP y la STD se realizó en todas las soluciones utilizadas en la perfusión de los animales (NaCl al 0.85%, buffer de fosfatos de sodio 0.1 M, pH 7.4, buffer de cacodilatos de sodio 0.1 M, pH 7.4 (SCB) y p-formaldehído al 4 en SCB).

En la Tabla 3 se muestran los resultados de este experimento, pudiéndose observar que ambos compuestos presentaron fluorescencia y ésta aumentó de manera aditiva cuando ambos compuestos estaban presentes. Esto refuerza la posibilidad de que la STD este alcanzando la perilinfa acumulándose junto con la STP, siendo muy probable que la STD permanezca en el epitelio a lo largo del tiempo, mientras que la STP es eliminada a partir de las 4 horas post-inyección como lo indican los datos farmacocinéticos (Voldrich, 1965; Tran Ba Huy et al., 1981).

El primer intento de la separación de la STP y la STD fue a través de la técnica de TLC descrita en Materiales y Métodos. Inicialmente se trabajó con una mezcla de STP y STD en solución. Debido a que los grupos guanidino de ambos compuestos deben estar ionizados, los compuestos se disolvieron en HCl 0.1 N.

Tabla 3. Niveles de la fluerecencia derivada de la estreptomocina o la estreptidina en las diferentes soluciones utilizadas para la perfusión de los animales.*

Table 2. Level of streptomycin* - or streptidine* - derived fluorescence** in various salt solutions***.

	PHOSPHATES	NaCl	CACODYLATES	p-FORMALDEHYDE +CACODYLATES
STD	1319±21	192±17	236±22	333±29
STP	217±18	50±27	206±20	251±22
STP+STD	628±24	260±25	410±27	531±38

*: figures are mean values of c.p.s units for the fluorescence emitted between 522-532 nm±standard errors after excitation at 488 nm, of three independent experiments; **: concentration of either STP, STD or STP+STD was of 100 µM; ***: composition as described in Material and Methods.

*Tomada del artículo I, base de ésta tesis.

La STP y la STD se separaron satisfactoriamente con Rf's de 0.77 y 0.65, respectivamente. Sin embargo, esta técnica por lo general es cualitativa, siendo semicuantitativa sólo si se utiliza un escáner, el cual hace una evaluación en absorción y fluorescencia de la muestra dando un valor absoluto de la concentración, lo cual no fue posible realizar. Además, esta técnica resulto ser poco sensible a bajas concentraciones del compuesto, esto se observó al querer resolver la STD liberada por la hidrólisis básica de diversas concentraciones de STP (0.02-0.1 mg/ml). Para ello, la STP a la concentración deseada en un volumen total de 2.5 ml de agua, se le adicionó 1 ml de NaOH 2N y se incubó a 60° C por 15 min, posteriormente el medio se acidificó a pH 5.0 con HCl 0.1N. En todos los casos nunca se pudo observar la mancha de la STD, solamente la STP era visible con menos intensidad después de realizar la hidrólisis.

Debido a lo anterior, fue necesario buscar un método con alta sensibilidad de detección a concentraciones muy pequeñas de STD, así como detectar pequeñas variaciones de concentración de la STP con exactitud y precisión.

Para ello, se implementó y validó una metodología de Cromatografía de Alta Resolución (HPLC) para determinar y cuantificar STP y STD, nunca antes descrita en suero de rata. Esta técnica se basó en un método isocrático de HPLC para separar y detectar a la STP en fase acuosa por absorbencia en la región del ultravioleta (Whall, 1981). Existen otros métodos para determinar STP en suero, sin embargo consumen mucho tiempo debido a que se requiere de un pretratamiento de la muestra (Kurosawa et al., 1985) , o bien utilizan una derivatización del antibiótico con ninhidrina (Kubo et al., 1987). También se han desarrollado métodos de inmunodetección pero ninguno de estos disciernen entre la STP de la STD (Schwenzer and Anhalt, 1983).

La validación del método consistió en la medición de los siguientes parámetros: Linealidad, Precisión, Exactitud, Porcentaje de recuperación, Límites de detección y cuantificación de la STP y la STD en el suero de la rata.

VALIDACION DEL METODO CROMATOGRAFICO

La técnica de HPLC separó satisfactoriamente la STD de la STP, como lo muestra la Figura 12. Los tiempos de retención fueron alrededor de 6.0 min y 13.4 min para la STD y la STP, respectivamente, utilizando 12% de acetonitrilo (Figura 12A). Cuando se usó este solvente al 15%, los tiempos de retención decrecieron a 3.8 min para la STD y 7.0 min para la STP (Figura 12B).

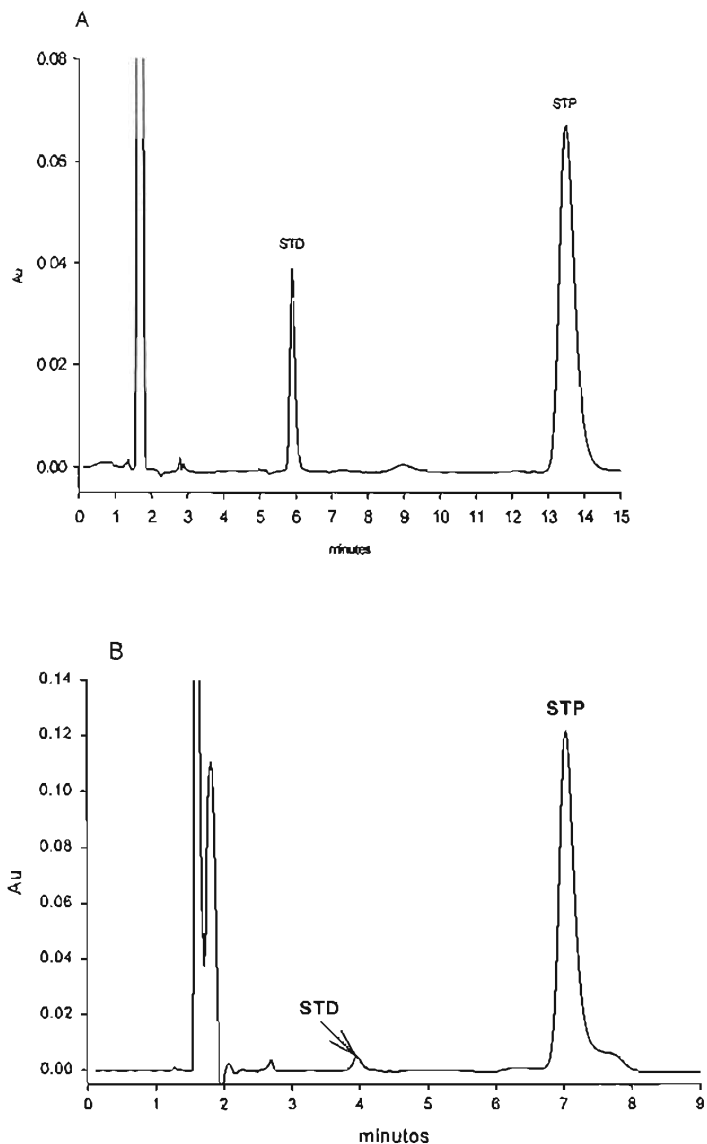


Figura 12. Cromatogramas de HPLC del sulfato de estreptidina (STD) y el sulfato de estreptomina (STP) en buffer de fosfatos de sodio, pH 6.8. (A) acetonitrilo al 12%, STD 12 $\mu\text{g/ml}$ y STP 160 $\mu\text{g/ml}$. (B) acetonitrilo 15%, STD 5.0 $\mu\text{g/ml}$ y STP 160 $\mu\text{g/ml}$. Au = unidades arbitrarias.

En la Figura 13, se muestra la Linealidad de las curvas de calibración para la STP y la STD. La STP se analizó en un rango de concentraciones entre 80-400 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la STD en un rango de concentraciones de 1.9 a 6.05 $\mu\text{g/ml}$. El coeficiente de correlación fue de $r \geq 0.99$ para ambos compuestos. El análisis de la recuperación de STD y STP se correlacionó con el valor del

área del pico tanto en los extractos del suero como en soluciones buffer, aplicando la siguiente fórmula:

Recuperación = (Área del pico del analito (STD o STP) en un extracto de suero/Área del pico del analito en buffer) x 100

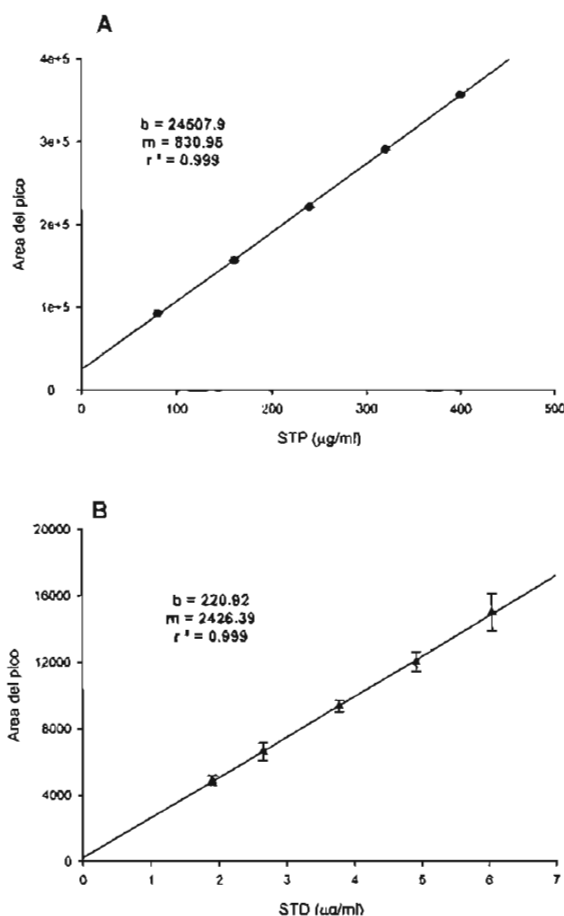


Figura 13. Análisis de la regresión lineal de las curvas de calibración por la adición de estándares: (A) 80 a 400 µg/ml de STP (●) y (B) 1.90 a 6.05 µg/ml de STD (▲) a suero de rata después de la precipitación de proteínas con TCA al 20%.

En la Tabla 4 se muestra, en la última columna, el porcentaje de recuperación de cada una de las concentraciones analizadas las cuales fueron mayores al 98%. En la misma Tabla 4, se muestran los datos del análisis de la Precisión y la Exactitud del método. Se puede observar que el porcentaje relativo de la

desviación estándar (RSD) en la precisión intradía (repetición de la metodología por la misma persona, usando el mismo equipo y reactivos en un día) fue de 0.2-1.0% para la STP y de 2.6-8.2% para la STD. La precisión interdía (repetición de la metodología bajo las mismas condiciones en dos días diferentes) fue de 0.5-2.5% y de 3.3-7.3% para la STP y la STD, respectivamente.

Tabla 4. Ensayo Intradía e Interdía de la Precisión y la Exactitud para el sulfato de STP y el sulfato de STD en suero de la rata.

	<u>Concentración</u> ($\mu\text{g/ml}$)	<u>Intradía</u> <u>Precisión</u> (%RSD)	<u>Intradía</u> <u>Exactitud</u> (%RSD)	<u>Interdía</u> <u>Precisión</u> (%RSD)	<u>Interdía</u> <u>Exactitud</u> (%RSD)	<u>Recuperación</u> (%)
STP	80	1.0	0.8	1.9	-0.6	98.4
	160	0.4	-0.8	2.5	0.7	100.3
	240	0.3	-1.5	0.5	-1.3	99.1
	320	0.3	0.0	1.1	-0.9	99.5
	400	0.2	-0.08	0.5	-0.4	99.9
STD	1.90	8.2	1.4	6.8	-1.6	101.1
	2.65	4.8	-0.4	7.3	1.3	99.5
	3.78	5.5	-0.5	3.3	-0.9	99.6
	4.92	4.2	-1.0	4.2	1.2	98.9
	6.05	2.6	-0.7	5.7	-1.2	100.6

Por otro lado, la exactitud intradía e interdía presentó un rango de -1.6 a 1.4% para ambos compuestos en el suero de la rata (Tabla 4). Por lo tanto, nuestros estimados de concentración están dentro del valor esperado de 80-400 $\mu\text{g/ml}$ para la STP y de 1.9-6.05 $\mu\text{g/ml}$ para la STD. Lo cual correlaciona con los porcentajes de recuperación tanto de la STP ($99.4\% \pm 0.65$) como de la STD ($99.9\% \pm 0.79$).

La estimación de los límites de detección y cuantificación se realizó en función de la relación con la señal del ruido. El límite de detección se tomó de una relación de 3:1 obteniéndose un límite de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ para la STP y de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ para la STD, inyectando un volumen de 20 μl . La relación utilizada para los límites de cuantificación fue de 10:1 y fueron de 3.4 $\mu\text{g/ml}$ y 1.7 $\mu\text{g/ml}$ para la STP y la STD, respectivamente.

Ventajas de este método

El método de HPLC establecido incluye una desproteínización del suero usando TCA al 20%, sin una derivatización previa de los compuestos. Cada determinación lleva entre 8-15 minutos, reduciendo significativamente el tiempo de análisis. Además, es una técnica sumamente sensible y exacta para determinar y cuantificar STP y STD, que a diferencia de los métodos de análisis de la STP como principio activo, utilizan ensayos microbiológicos de turbidimetría o cromatografía en capa fina (British Pharmacopoeia, 1998; Farmacopea Mexicana, 2000) o bien, utilizan ensayos microbiológicos (The United States Pharmacopoeia, 2004). Ninguno de estos métodos posee una combinación de rapidez, especificidad, simplicidad, sensibilidad y precisión mejor que la técnica de HPLC implementada en este estudio.

HIDRÓLISIS *in vitro* DE LA STP EN EL SUERO DE LA RATA

La STP se acumula en el oído interno y se elimina del organismo antes de las 24 horas de su administración (Anderson et al., 1945; Voldrich, 1965). Por esto, nuestro interés en conocer si la STP podía sufrir una transformación metabólica durante esas 24 horas en condiciones *in vitro* en el suero de la rata.

En la Figura 14, se muestran cromatogramas típicos obtenidos cuando la STP se incubó a 37° C por 24 horas en el suero de la rata. En el extracto del suero de la rata que no contenían ni STP ni STD (Figura 14A) los picos correspondientes a la STD y a la STP están ausentes.

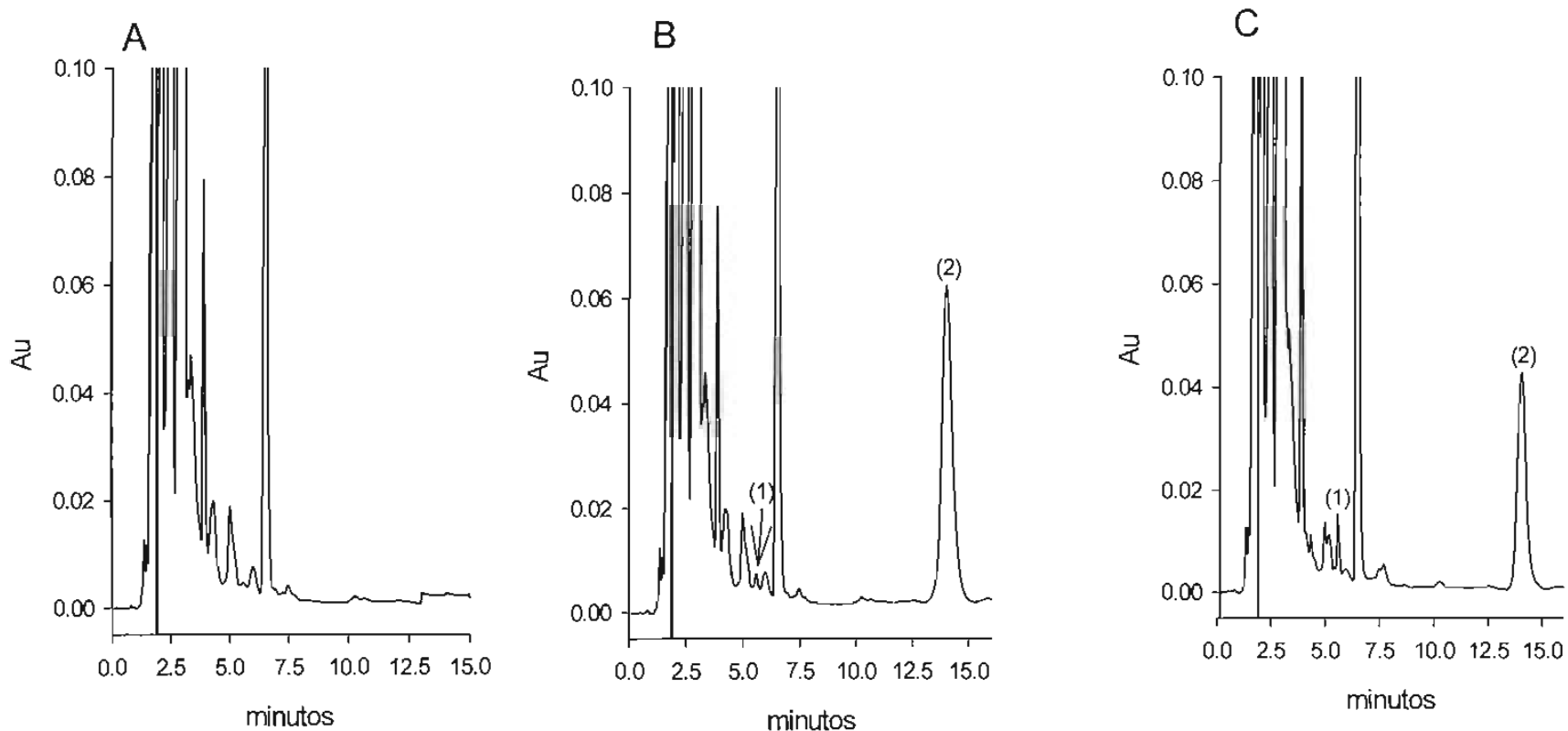


Figura 14. Cromatogramas típicos de los estándares y picos desconocidos de un corrimiento cromatográfico con suero de rata. La separación se realizó en una columna Produgy ODS3 y una fase móvil con 12% de acetonitrilo, ph 6.0, a un flujo de 1.3 ml/min. Los tiempos de retención para la STD (1) y la STP (2) fueron aproximadamente 6.0 min y 13.4 min, respectivamente. (A) Extracto del suero de rata, (B) Estándares de STD 1.9 $\mu\text{g/ml}$ y STP 160 $\mu\text{g/ml}$ antes de incubación ($t=0$ min), y (C) 160 $\mu\text{g/ml}$ de STP después de 24 hrs a 37° C. Este método fue utilizado para la determinación de STP en el suero de la rata.

En la Figura 14B, se presenta un extracto del suero de la rata cuando se agregaron los estándares de STD y STP. El pico de STP presentó un tiempo de retención de 13.4 min, mientras que el pico de STD tuvo un tiempo de retención de 6.0 min. En contraste, cuando se analizó una muestra del hidrolizado (STP en suero) (Figura 14C), se obtuvieron dos picos con las mismas características cromatográficas que los estándares de STD y STP, siendo el pico de STD más elevado que en el panel B. Estos hallazgos sugieren que una fracción de STD fue liberada a partir de la STP, puesto que hay un decremento del pico correspondiente de STP. Debido a que el único estándar disponible es la STD, faltaría hacer una identificación de los picos y una cuantificación para saber el porcentaje de recuperación o si hay algún otro metabolito no detectable por este método.

Asimismo, los experimentos efectuados con una concentración de Acetonitrilo al 15% para cuantificar a la STD, se muestran en la Figura 15. Se pueden observar dos características evidentes: 1) La disminución del pico de STP ($T_R = 7.0$ min) y 2) un incremento en el pico de STD ($T_R = 3.8$ min) semejante al pico del estándar de STD en la Figura 15B.

En la Tabla 5, se muestran los resultados de la hidrólisis *in vitro* de la STP en el suero de la rata: En las muestras control, siempre se encontró una pequeñísima concentración de STD de alrededor de 0.52 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, este valor de concentración lo podemos tomar como ruido debido a que está por debajo de los límites de detección y cuantificación.

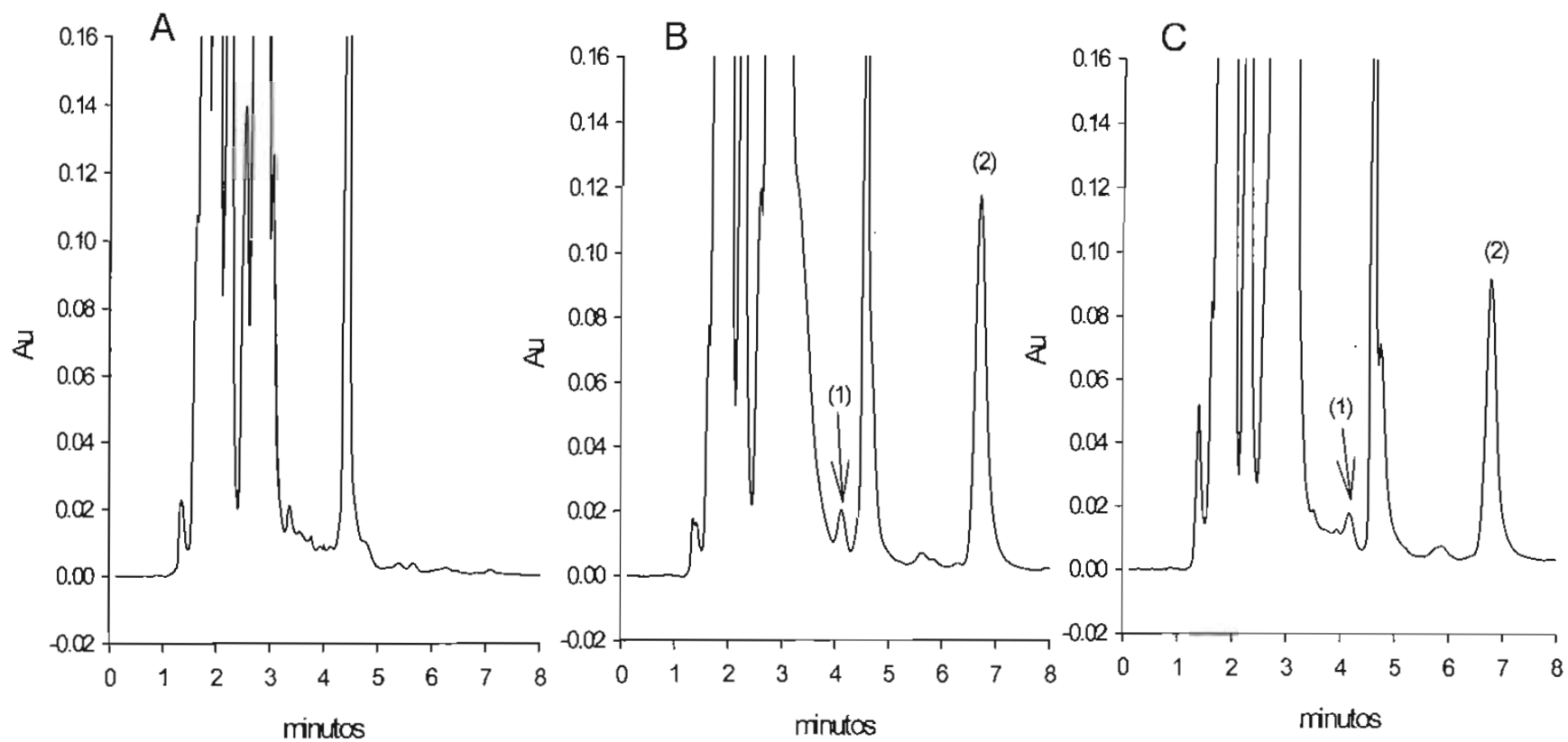


Figura 15. Cromatogramas típicos de los estándares y picos desconocidos de un corrimiento cromatográfico con suero de rata. La separación se realizó en una columna Prodigy ODS3 y una fase móvil con 15% de acetonitrilo, pH 6.0, a un flujo de 1.3 ml/min. Los tiempos de retención para la STD (1) y la STP (2) fueron aproximadamente 3.8 min y 7.0 min, respectivamente. (A) Extracto del suero de rata, (B) Estándares de STD 6.05 $\mu\text{g/ml}$ y STP 160 $\mu\text{g/ml}$ antes de incubación ($t=0$ min), y (C) 160 $\mu\text{g/ml}$ de STP después de 24 hrs a 37° C. Este método fue utilizado para la determinación de STD en el suero de la rata.

Tabla 5. Concentraciones de STP y STD antes y después de la incubación de 160 µg/ml de STP en el suero de rata.

	<i>µg/ml STP</i> Media + S.D.*	C.V. (%)	<i>µg/ml STD</i> Media + S.D.*	C.V. (%)
CONTROL (t= 0 min)	157 ± 1.76 (n=6)	1.1	0.52 ± 0.050	9.6
HIDRÓLISIS (37° C, 24 hr)	134.5 ± 3.84 (n=6)	2.8	5.60 ± 0.37	6.6

*Los valores promedio son de seis experimentos diferentes (indicado entre paréntesis) por triplicado. S.D.= desviación estándar; C.V.= coeficiente de variación. El valor de las concentraciones de STP y STD entre control y suero después de la incubación fue significativo estadísticamente (p=0.001). Una diferencia significativa de $p < 0.05$ fue usada en ambos casos.

Las concentraciones derivadas de ambos cromatogramas de la STP y la STD antes y después de la incubación se muestran en la misma Tabla 5. En los controles, la STD estuvo ausente. En contraste, la concentración de STD después de la hidrólisis se incrementó al menos 10 veces (de 0.52 µg/ml a 5.60 µg/ml) con un decremento en la concentración de STP de 157 µg/ml a 134.5 µg/ml, lo cual al calcular por diferencia en las concentraciones de STP antes (control) y después de la hidrólisis, un 14% de hidrólisis *in vitro* de la STP. El análisis estadístico mostró que hubo una diferencia significativa en las concentraciones de la STP y la STD antes y después de la hidrólisis *in vitro* en el suero de la rata. Sin embargo, no se puede saber si la producción de esta STD es a través de la ruptura de los 2 enlaces glucosídicos de manera independiente o bien, solamente el enlace α -1,4 de la STD y la estreptibiosamina (estreptosa + N-metilglucosamina). Sin embargo, esta estreptibiosamina eluyó en el volumen muerto de los extractos acuosos descritos por Whall (1981); éstas reacciones podrían estar ocurriendo en nuestro estudio, pero no pudimos corroborarlo.

No obstante, este resultado de la liberación de la STD por hidrólisis de la STP aunado a sus propiedades de reconocimiento a

un sitio cationico de unión en las membranas vestibulares a través de los grupos guanidino idéntico al que sucede con la STP (Meza et al., 1999), hace de este metabolito un candidato idóneo para ser el derivado metabólico de la STP.

Por otro lado, era necesario determinar si esta producción de STD proveniente de STP observada en los estudios *in vitro* en el suero de la rata, también ocurría cuando la STP era administrada de manera sistémica en la rata, y que esta STD por si misma, puede producir los mismos efectos tóxicos vestibulares observados con la administración crónica de la STP en las ratas. Por lo que se realizaron los experimentos *in vivo*.

Experimentos *in vivo*.

Para ello, las observaciones de los efectos de la administración de la STD en las ratas pigmentadas se siguió aprovechando el modelo en el comportamiento anormal en el nado de las mismas por el establecimiento del daño en los órganos otolíticos (Meza et al., 1993, 1994, 1996) así como, de las evidencias que se tienen del daño en el epitelio sensorial utricular producido por la STP en estas ratas (Meza et al., 1994, 1996; Fermin et al., 1998). Cabe señalar que tanto el vestíbulo de la rata como el del humano poseen los mismos tipos de órganos (tres canales semicirculares, un utrículo y un sáculo), el mismo tipo de células pilosas (I y II) e inervaciones en el epitelio sensorial vestibular, por ser ambos mamíferos. Asimismo, se ha visto que el vestíbulo de ambos vertebrados es muy sensible a los antibióticos aminoglicosídicos (Nadol, 1981). De allí la importancia de este estudio que permitiría extrapolar de forma directa lo que podría estar sucediendo en los pacientes tratados con STP.

Por otro lado, debido a que las concentraciones máximas en suero de STP después de una administración intramuscular de 1 g del antibiótico están en el orden de 25-30 $\mu\text{g/ml}$ (Sande and Mandell, 1996) se realizó una nueva validación de STP para abarcar concentraciones menores del antibiótico. Asimismo, se aumentó el intervalo en las concentraciones de STD, debido a que no sabíamos en qué intervalo de concentraciones se iba encontrar este compuesto después de la administración del antibiótico.

Las concentraciones de STP estudiadas fueron de 5-80 $\mu\text{g/ml}$ y de STD 5-16 $\mu\text{g/ml}$, utilizando la misma técnica descrita para los experimentos *in vitro*. En la Figura 16, se muestra la Linealidad de las curvas estándar de STP y STD en el intervalo de concentraciones utilizadas.

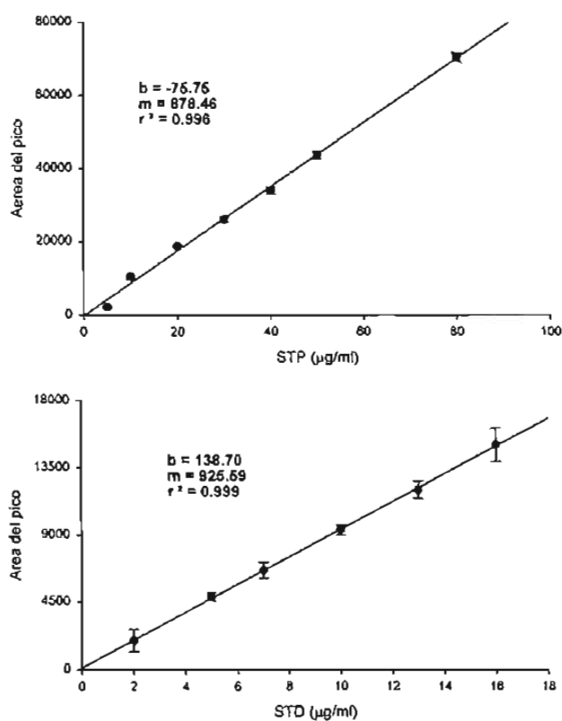


Figura 16. Curvas estándar de STP y STD presentes en el suero de la rata para el análisis de la determinación de ambos compuestos en las ratas tratadas con STP o STD.

En la Tabla 6, se muestran los porcentajes del análisis de la Precisión y la Exactitud. Se puede observar que la metodología resultó cubrir todos los parámetros de validación: La Linealidad fue excelente con una $r \geq 0.99$; la recuperación de ambos compuestos fue $\geq 98\%$; la Precisión intradía fue de 1.7-6.5% y de 3.5-7.7% para la STP y la STD, respectivamente. Mientras que interdía fue de 2.0-6.6% para STP y de 3.1-6.8% para la STD (Tabla 6).

En la misma Tabla 6, se puede observar el análisis de exactitud para ambos compuestos con porcentajes de intradía e interdía desde -2.4 a 2.2%, mientras que el porcentaje de recuperación para STP fue de $101\% \pm 3.5$ y de $99.6\% \pm 0.71$ para la STD en todo el intervalo de concentraciones estudiadas.

Tabla 6. Ensayo de la Precisión y exactitud Intradía e Interdía para sulfato de STP y STD en suero de rata.

	<u>Concentración</u> ($\mu\text{g/ml}$)	<u>Precisión</u> <u>Intradía</u> (%RSD)	<u>Exactitud</u> <u>Intradía</u> (%RSD)	<u>Precisión</u> <u>Interdía</u> (%RSD)	<u>Exactitud</u> <u>Interdía</u> (%RSD)	<u>Recuperación</u> (%)
STP	5.0	1.9	-3.6	2.3	-4.0	99.7
	10.0	6.5	-0.9	6.6	-1.0	109.2
	20.0	1.7	2.0	5.3	-2.4	98.0
	30.0	2.8	-0.1	2.1	0.7	98.4
	40.0	3.0	0.1	2.4	-0.4	100.2
	50.0	2.4	-0.2	2.0	2.6	101.7
	80.0	4.8	-3.1	6.4	2.2	100.4
STD	2.0	6.2	1.4	6.8	-1.6	98.5
	5.0	5.7	-1.4	6.5	1.6	99.9
	7.0	7.7	0.4	6.6	-2.2	100.8
	10.0	3.5	0.5	3.1	1.0	99.2
	13.0	4.5	1.0	4.0	-1.1	100.0
	16.0	7.1	-0.3	5.5	1.3	99.5

El límite de detección fue de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ para la STP y de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ para la STD, mientras que los límites de cuantificación fueron de 2.4 $\mu\text{g/ml}$ y 1.0 $\mu\text{g/ml}$ para la STP y la STD, respectivamente.

En la Figura 17, se muestran los trazos típicos del corrimiento cromatografico de los grupos experimentales utilizados en este estudio. En el cromatograma A se presenta una

muestra de los estándares de STP y STD mezclados en el suero de una rata control con tiempos de retención de 3.6 y 6.8 minutos, respectivamente.

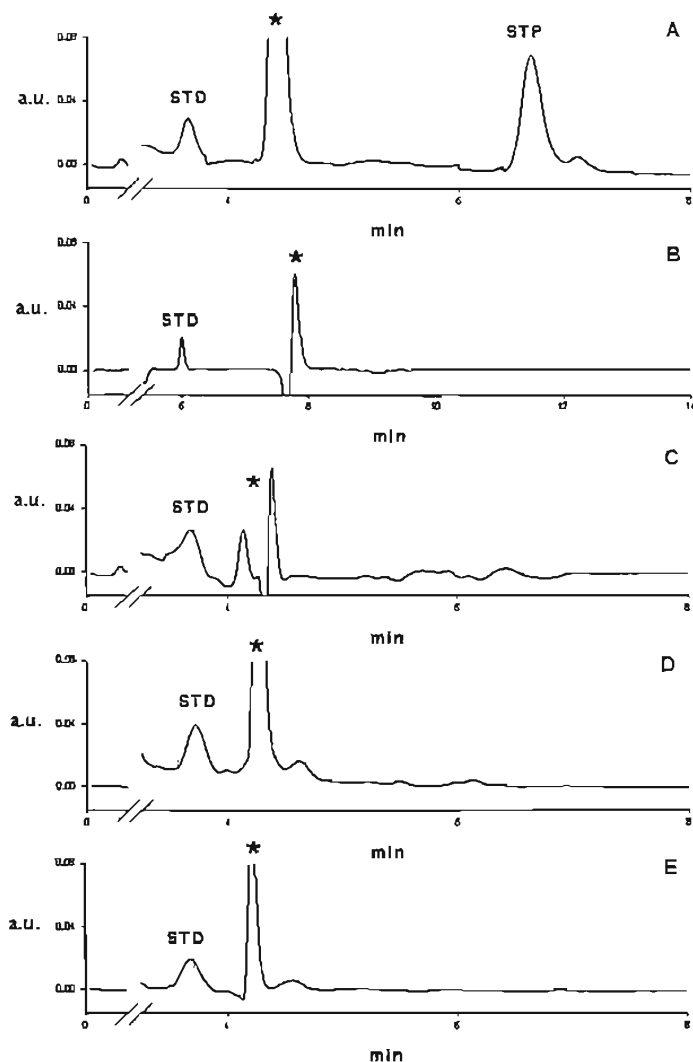


Figura 17. Cromatogramas de un ensayo típico del suero de rata de los diversos grupos experimentales corridos en paralelo. (A) Extracto del suero de rata con la adición de los estándares de STD, 7.2 $\mu\text{g/ml}$ y STP, 77 $\mu\text{g/ml}$. (B) extracto del suero de ratas tratadas con STP (400 mg/kg) por 25 días, (C) 35 días y (D) 45 días de tratamiento. (E) Extracto del suero de las ratas tratadas con STD (50 mg/kg) por 45 días de tratamiento. *, pico de absorbancia de componentes del suero. (Tomada de la figura 1 del artículo II, base de ésta tesis).

Después de analizar los cromatogramas de la sangre derivada de los animales tratados con STP, no se observó ningún pico en la

región de la STP. Sin embargo, se observó un pico que se incrementó en altura con respecto al incremento en el periodo del tratamiento, en la región de la STD (Cromatogramas B, C y D de la Figura 17).

De forma similar, en los animales tratados con STD un pequeño pico de STD apareció a los 25 y 35 días de tratamiento, el cual se incrementó a los 45 días (Cromatograma E de la Figura 17). Por otro lado, el suero de las ratas control, nunca mostró ningún pico de STD ni de STP.

En la Tabla 7, se presentan las concentraciones de STD proveniente *in vivo* de STP. Después de 25 días de tratamiento se encontró una concentración de 2.26 µg/ml, mientras que después de 35 y 45 días de tratamiento con STP se encontró una concentración de STD de 8.69 y 7.70 µg/ml, respectivamente. Con respecto a los animales tratados con STD, las concentraciones encontradas de este compuesto fueron de 1.0, 1.84 y 4.94 µg/ml a los 25, 35 y 45 días de tratamiento con STD, en forma respectiva.

Tabla 7. Concentraciones de STD en el suero de ratas tratadas con STP (400 mg/kg) o STD (50 mg/kg).*

Table 1. Concentration of STD In serum of rats after treatment with STP (400mg/kg) or STD (50 mg/kg)*.

DAYS OF TREATMENT	STD (µg/ml) IN STP-TREATED	STD (µg/ml) IN STD-TREATED
25	2.26±0.11 (4)	1.00±0.20 (5)
35	8.69±0.52 (9)	1.84±0.30 (7)
45	7.70±0.29 (9)	4.94±0.35 (11)

*: Figures are mean values ± standard error of the mean for the number of rats in parenthesis whose extract was run in triplicate.

*Tomada del artículo II, base de ésta tesis.

Estos resultados demuestran *in vivo* la presencia de STD después de un tratamiento crónico con STP. Ya que la STD sólo

podría provenir *in vivo* de la hidrólisis del antibiótico en el suero de la rata, estos resultados apoyan la hipótesis de la "activación" o transformación metabólica previamente sugerida para otros aminoglicósidos (Huang and Schacht, 1990; Crann et al., 1992; Crann and Schacht, 1996) a través de la hidrólisis del antibiótico. Por otro lado, la presencia *in vivo* de la STD en la sangre de las ratas tratadas con STP contradice la idea de que la STP (y posiblemente otros antibióticos aminoglicósidos), son eliminados en la orina, sin cambio estructural (Schentag and Jusko, 1977; Pratt and Fekaty, 1986).

Ya que se había obtenido el compuesto STD derivado de la STP en la sangre, era necesario probar que producía los mismos efectos que la STP. Por lo tanto, se analizó el comportamiento de nado de los animales de cada grupo experimental. En la Figura 18 se muestran los histogramas con el porcentaje de ratas que presentaron patrones anormales de nado después de ser tratadas con STP (400 mg/kg) o STD (50 mg/kg) paralelamente. Los patrones del nado vertical y el nado vertical con giros, fueron observados en ambos grupos de animales, con la aparición uno seguido del otro, durante el tiempo de tratamiento.

La magnitud de este comportamiento anormal se incrementó subsecuentemente con los días de administración de STP o STD (Figura 18). El porcentaje de ratas que presentaron nado vertical en las ratas tratadas con STD fue de 40%, 42% y 58% después de 25, 35 y 45 días del tratamiento, mientras que en las ratas tratadas con STP fue de 22%, 55% y 50% en los mismos periodos de tratamiento (Figura 18A). El nado vertical con giros fue del 10%, 42% y 76% en los animales tratados con STD, mientras que los tratados con STP presentaron porcentajes de 11%, 55% y 71%, respectivamente (Figura 18B).

De esta manera, se muestra que después de un tratamiento crónico con STD, se produce una irrupción similar en las

funciones vestibulares relacionadas con el órgano utricular como se ha descrito con anterioridad en ratas tratadas con STP (Meza et al., 1994, 1996; Fermin et al., 1998), aún cuando la dosis de STD era solamente el 10% que la dosis administrada de STP, la cual se esperaba en la STD proveniente de STP, considerando su distribución corporal.

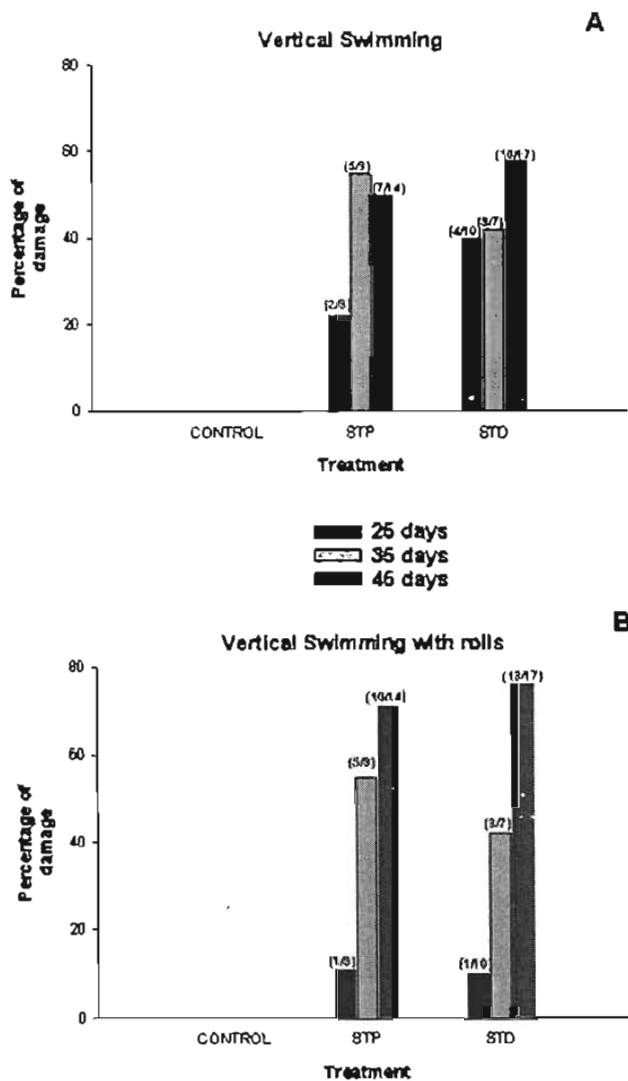


Figura 18. Histogramas del porcentaje de las ratas que presentaron los patrones anormales de nado: (A) Nado vertical y (B) Nado vertical con giros, en los grupos control y ratas tratadas con STP y STD por 25, 35 y 45 días de tratamiento. El número de ratas dañadas/número total de ratas esta indicado entre paréntesis sobre cada una de las columnas (Tomada de la Figura 2 del artículo II, base de ésta tesis).

Cuando se analizaron los cortes del órgano utricular y se cuantificaron las células pilosas presentes en el epitelio se observó que en los animales control (tratados con glicerol al 70%) (Figura 19A), el epitelio mostró las características típicas de la mácula utricular con un epitelio pseudoestratificado compuesto por las células pilosas cuyos núcleos forman una capa superior y las células de soporte con núcleos formando una capa inferior. La superficie del epitelio era uniforme proyectándose los pelos sensorios de las células pilosas de ella, y con una membrana otolítica que contenía muchas otoconias polimórficas de tamaño relativamente homogéneo (Figura 19B). Además, el número de células pilosas permaneció sin cambio a través del tratamiento (166, 151 y 157 células pilosas a los 25, 35 y 45 días de tratamiento, respectivamente) (Tabla 8). Estas mismas características se siguieron en los cortes de los animales tratados (Figura 20).

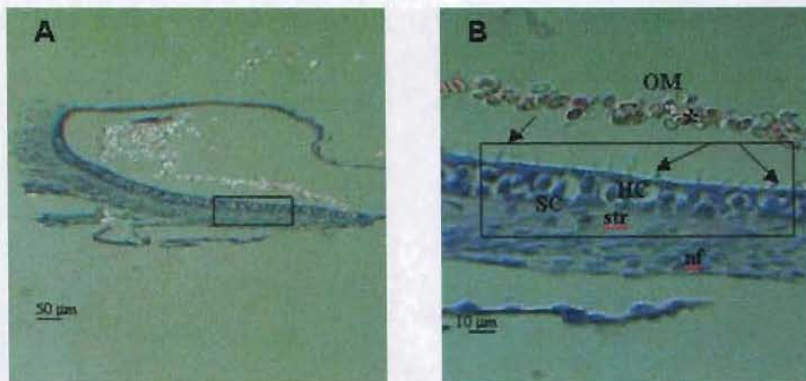


Figura 19. En (A) se muestra una micrografía de luz de un corte de 3 µm del epitelio de la mácula utricular de las ratas control (epitelio normal). En (B) una ampliación del área dentro del rectángulo en A, en cual se realizó el conteo de las células pilosas. OM, membrana otolítica; HC, Célula pilosa; SC, Célula de soporte; str, estroma; nf, fibras nerviosas. Los asteriscos indican las otoconias y el penacho de pelos sensorios están indicados por las flechas. Los cortes fueron observados bajo iluminación Nomarski. (Tomada de la Figura 3 del artículo II, base de ésta tesis).

Después del tratamiento con STP por 25 días el epitelio tuvo una apariencia similar al del control (Figura 20A), pero después

de 35 y 45 días hubo un incremento en los niveles de desorganización y en la pérdida de células pilosas (Figuras 20C y E).

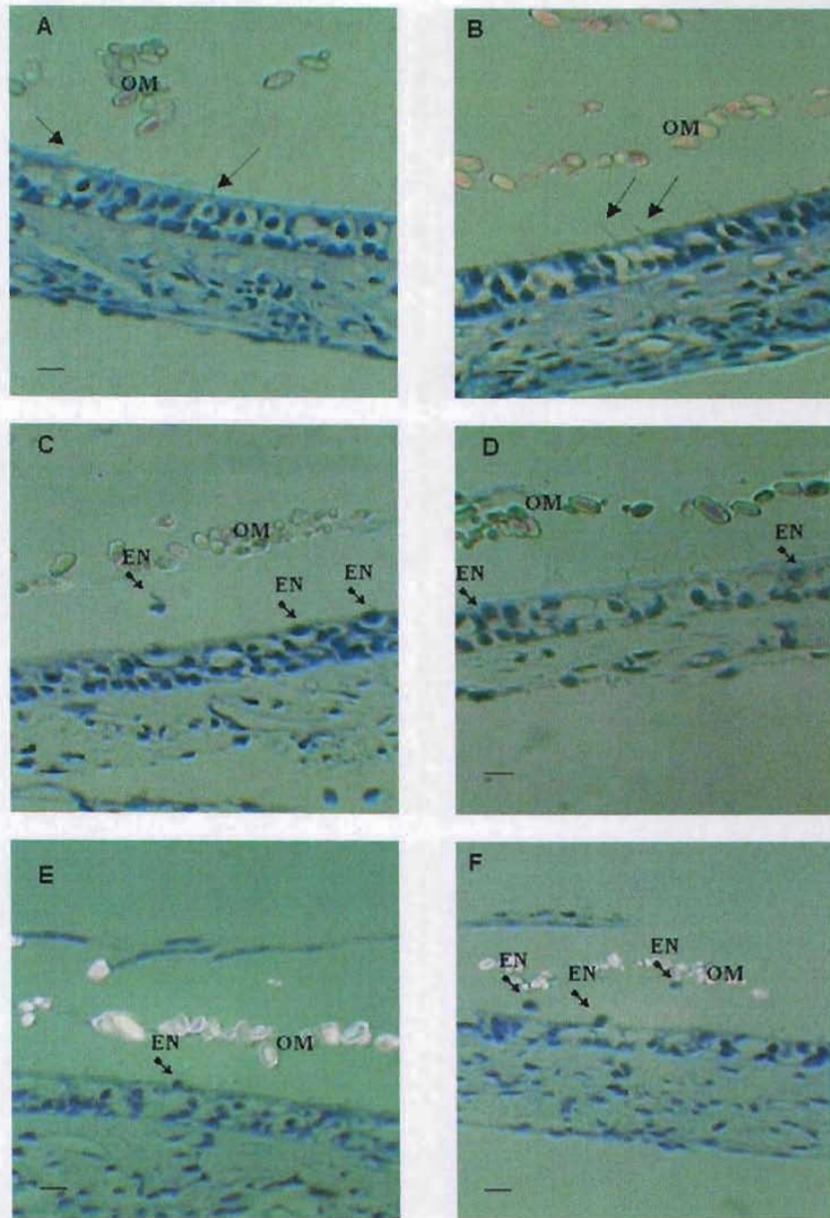


Figura 20. Micrografías típicas de cortes de 3 μm del epitelio utricular. En A, C y D de ratas tratadas con STP (400 mg/kg) por 25, 35 y 45 días de administración, respectivamente. En B, D y F de ratas tratadas con STD a 25, 35 y 45 días, respectivamente. OM, membrana otolítica; EN, núcleos extruidos y las flechas indican el penacho de pelos sensorios. Los cortes fueron observados bajo iluminación Nomarski. Barras: 10 μm (Tomada de la Figura 4 del artículo II, base de ésta tesis).

El número de células pilosas fue de 151, 88 y 79 después de cada periodo de tratamiento, respectivamente (Tabla 8). Esta pérdida de células pilosas se vio acompañada morfológicamente por una reducción visible de pelos sensorios y evidencias de núcleos de células pilosas en proceso de ser eliminados del epitelio, así como irregularidades en la superficie del epitelio y en la pseudoestratificación.

Tabla 8. Estimación del número de células sensoriales en la mácula utricular después del tratamiento con STP o STD.*

Table 2. Estimation of the number of sensory cells in the utricular macula after treatment with STP or STD*.

DAYS OF TREATMENT	CONTROL	STP	STD
25	166±6.38 (3)	151±12.87 (3)	157±9.18 (4)
35	173±7.57 (3)	88±10.48 (5)	95±11.20 (5)
45	176±10.31 (3)	79±9.89 (5)	49±8.10 (5)

*: Figures are values ± standard error of the mean of cell number estimated as described in Methods for rats indicated in parenthesis.

*Tomada del artículo II, base de ésta tesis.

Por otro lado, en los animales tratados con STD, los cambios en el epitelio utricular en cada estadio fueron similares a los observados en las ratas tratadas con STP (Figuras 20B, D y F). La pérdida de células pilosas fue de 157, 95 y 49 después de 25, 35 y 45 días de tratamiento, respectivamente (Tabla 8). Además en último periodo de tratamiento se observó una reducción en el tamaño aparente de las otoconias.

Estos hallazgos demuestran un decremento específico similar en el número de células pilosas en la mácula utricular tanto en los animales tratados con STP, como con una dosis mucho menor de STD. Asimismo, apoyan nuestra hipótesis de que la STD es el mayor agente ototóxico liberado en la sangre, el cual produce una alteración en las funciones vestibulares en el tratamiento crónico con STP en ratas (artículo I). Otros estudios han demostrado que la STP se acumula en la perilinfa y permanece ahí

por un periodo de tiempo corto (0-4 horas) después de las cuales es eliminada (Voldrich, 1965; Tran Ba Huy et al., 1981). Por lo tanto, creemos que la STD tanto la que proviene de la STP como cuando se administra directamente, esté acumulándose en la perilinfa al igual que la STP, pero la STD permanece mayor tiempo acumulada pudiendo producir los daños observados en el epitelio utricular.

Todo lo anterior apoya aún más nuestra hipótesis de que es la STD y no la STP, el compuesto que se acumula en el epitelio vestibular causando los efectos dañinos sobre las células pilosas, como lo muestran los experimentos agudos con STP en cuyos (artículo I). La figura 21, nos muestra imágenes de cortes en frío de la cresta ampular por microscopía cónfocal. En los paneles B, C, y D se observan diferentes grados de fluorescencia en cuyos inyectados con STP. Esto es: su intensidad varió con el tiempo, siendo a la hora después de la inyección cuando se detecta la acumulación más alta de fluorescencia, tanto en las células sensoriales y de soporte como en las fibras nerviosas del estroma (Figura 21B), esta florescencia decreció significativamente a las 12 hrs post-inyección (Figura 21C). Mientras que a las 24 horas después de la inyección de la STP, la intensidad de la florescencia decreció a los niveles de los animales controles, los cuales fueron inyectados con solución salina fisiológica y sacrificados a la hora de la inyección (Figura 21A).

Asimismo, se determinó que la acumulación de la fluorescencia era significativamente mayor en el epitelio sensorial que en las fibras nerviosas en todos los periodos de tiempo estudiados, mostrado en los histogramas de la Figura 22. Sin embargo, los estudios farmacocinéticos de la STP realizados en la perilinfa del cuyo y la rata, muestran que la vida media de éste es de 4 horas y su concentración decrece hasta ser

completamente eliminado después de 24 horas (Voldrich, 1965; Tran Ba Huy et al., 1981), lo cual sugiere que en nuestros experimentos un agente fluorescente adicional (probablemente la STD) ha alcanzado el oído y se acumuló durante el periodo de 4-12 horas.

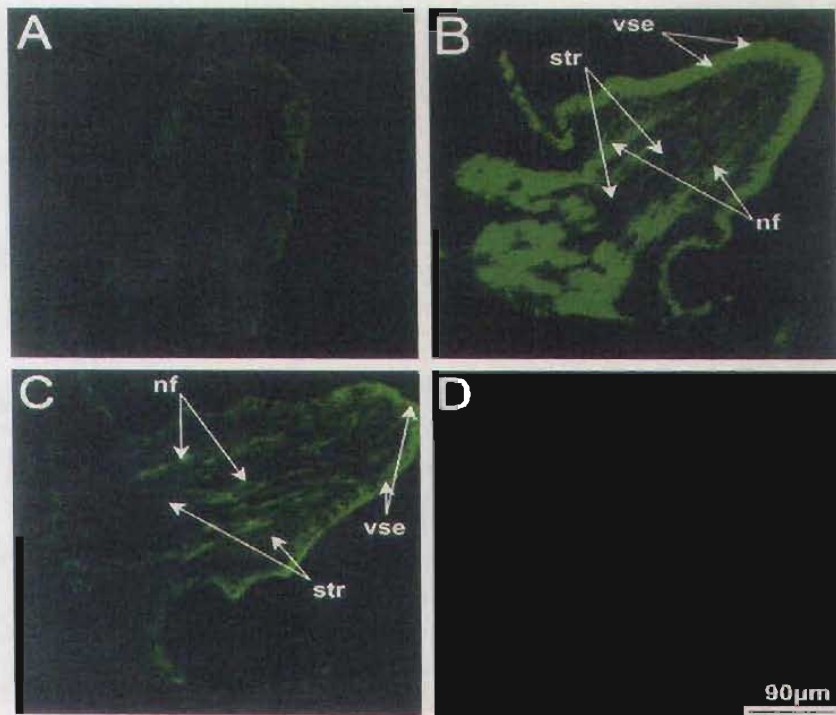


Figura 21. Imágenes de microscopía cónfocal de cortes de 15 µm de la cresta ampular de cuyos tratados con (A) solución salina fisiológica (SSF) (control) o con STP (300 mg/kg) disuelta en SSF después de 1 hora (B), 12 horas (C) o 24 horas (D) después de la inyección. La fluorescencia se distribuyó uniformemente en el epitelio sensorila (VSE) y en las fibras nerviosas del estroma (str) tanto a la hora como a las 12 horas (A-C), sin embargo después de 24 horas de la inyección, las crestas vestibulares presentaron una fluorescencia semejante a las del control (D) (Tomada de la Figura 2 del artículo I, base de ésta tesis).

Estos resultados cambian la idea que se tenía de que los antibióticos aminoglicósidos no son metabolizados en los mamíferos (incluyendo al humano) y que su eliminación en la orina era esencialmente sin ningún cambio estructural (Schentag et al., 1977; Pratt and Fekaty, 1986). Lo que nuestros hallazgos muestran

es que la STD puede provenir de la STP por una importante hidrólisis de la STP en el suero de la rata *in vivo*. Con esta evidencia demostramos que el antibiótico es metabolizado, lo que concuerda con lo sugerido por otros autores (Huang and Schacht, 1990; Crann et al., 1992; Crann and Schacht, 1996).

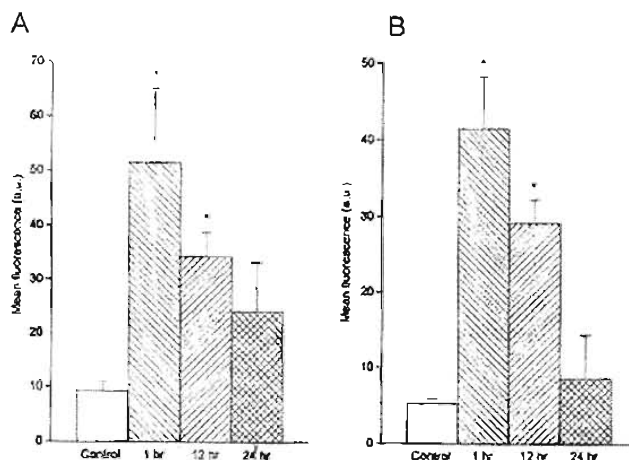


Figura 22. Medida de la fluorescencia en: (A) el epitelio sensorial y en (B) las fibras nerviosas. Cada columna es el promedio de 4 experimentos diferentes con S.E.M indicada por la barra. Diferencias significativas ($p < 0.0001$) se presentaron en todos los casos, con excepción entre el control y 24 horas postinyección. Cuando se comparó la fluorescencia entre el epitelio sensorial y las fibras, los niveles de ésta fueron significativamente menores en las fibras nerviosas que en el epitelio sensorial en todos los tiempos observados (Tomada de la Figura 3 del artículo I, base de ésta tesis).

Además, se ha descrito la presencia de un metabolito derivado de la incubación de STP en la sangre de pacientes tratados con el antibiótico. Este metabolito mostró tener propiedades citotóxicas sobre células pilosas cocleares en cultivo aisladas del cuyo (Wang et al., 1999). Sin embargo, a pesar de que la técnica de HPLC utilizada se basó en la misma que la de nosotros, el compuesto derivado de la STP no se identificó y los tiempos de retención de la STD y la STP fueron diferentes. Nuestras observaciones mostraron que al variar la concentración de acetonitrilo, el tiempo de retención de ambos compuestos cambia, lo cual podría explicar esta discrepancia.

Lo que sí es claro es que nuestro estudio identifica al metabolito como STD proveniente de la molécula de STP. Nuestra postulación es que el metabolito citotóxico producido por hidrólisis enzimática en el suero de la rata, es la STD. Esta afirmación es sustentada por tres observaciones: 1) Los grupos guanidinos de la STD son esenciales para el reconocimiento de un sitio catiónico de alta especificidad, el cual fue reportado en el epitelio vestibular del cuyo y compite satisfactoriamente con la molécula de STP (Meza et al., 1999), 2) El incremento de la citofluorescencia observada en el tejido vestibular de los cuyos después de un tratamiento agudo con STP (Figuras 16 y 17) podría deberse a la STP y su metabolito STD (ver Tabla 1) posiblemente derivada de STP por una hidrólisis enzimática y 3) La presente demostración de la liberación de STD en el suero de la rata por hidrólisis de la STP, así como de experimentos preliminares de la producción de STD por la hidrólisis *in vitro* de la STP en el suero humano (Granados et al., 2002).

Los datos anteriormente descritos, apoyan la idea que la STP da lugar a un derivado metabólico que es la STD como fue reportado en el artículo II. Sin embargo, si el primer compartimento al que llega la STP después de ser administrada es la sangre, debería existir un mecanismo enzimático capaz de hidrolizar al antibiótico con la liberación de STD, la cual estuviera en circulación y alcanzara al oído interno para causar los efectos tóxicos observados. Por tal motivo, se investigó si pudiera existir algún componente en el suero de la rata que realizaría tal función. Ya que la unión entre la STD con la estreptobiosamina (molécula conformada por la unión entre la estreptosa y la N-metilglucosamina, ver Figura 2) es a través de un enlace glucosídico α -1, 4; sería probable que la enzima responsable de la hidrólisis de la STP pudiera ser una α -

glucosidasa (maltasa, EC 3.2.1.20). Por lo que nos dimos a la tarea de buscar dicha actividad en la sangre y el vestíbulo de la rata.

En el artículo III se publicaron los datos preliminares de esta caracterización debido a que hallamos evidencias de actividad de α -glucosidasa en el suero y el vestíbulo de la rata. En un principio se pensó que parte de la STP era hidrolizada en la sangre de la rata y tanto la STP no hidrolizada como la STD liberada de la hidrólisis llegasen al epitelio vestibular, acumulándose en la perilinfa y que la acción de la glucosidasa presente en el vestíbulo también hidrolizará al antibiótico contribuyendo a una mayor concentración de STD acumulada y que ésta a su vez produjera los efectos tóxicos mencionados.

En la Figura 23, se muestran las gráficas de actividad de la α -glucosidasa en el suero (Figura 23a) y en el vestíbulo (Figura 23b).

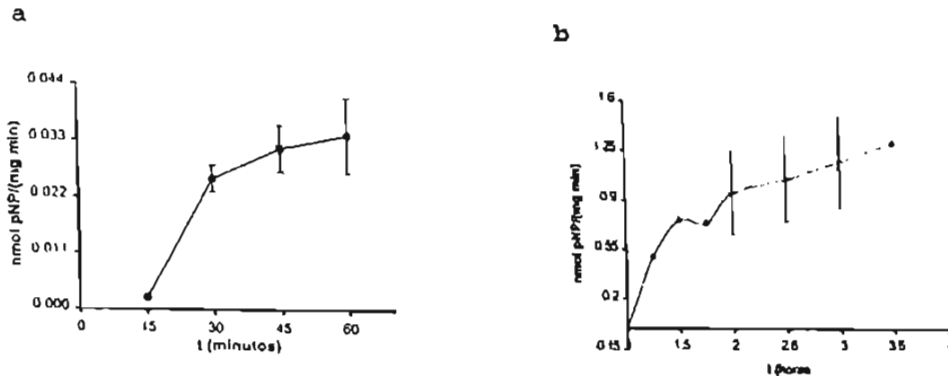


Figura 23. Gráficas en que se muestra en (a) la actividad de α -glucosidasa en el suero y en (b) en el vestíbulo de la rata. En (a) todos los puntos son de 3 experimentos diferentes, mientras que en (b) solamente los puntos de 2 y 2.5 horas de incubación provienen de 3 experimentos distintos. Los demás puntos son promedios de 2 experimentos. Las barras indican el promedio \pm desviación estándar (Tomada de la Figura 4 del artículo III, base de ésta tesis).

La actividad para la glucosidasa vestibular y sérica fue de 1.3 y 0.035 nmol pNP/mg proteína/min, respectivamente (Tabla 9), es decir la glucosidasa vestibular fue 37 veces más activa que la

glucosidasa presente en el suero de la rata. Estas actividades son muy parecidas a la encontrada para una glucosidasa hepática (1.5 nmol pNP/mg proteína/min) (Dissous et al., 1981).

Tabla 9. Comparación de las actividades de la α -glucosidasa en el suero, vestibulo e hígado de rata.*

TABLA I
Comparación de la actividad en suero, vestibulo en hígado de rata

<u>Organo</u>	<u>nmol pNP/mg proteína/min</u>
Suero	0.035
Vestibulo	1.3
Hígado*	1.5

*Dissous C et al. Anal Biochem 116:35-39

*Tomada del artículo III, base de ésta tesis.

En la Figura 24, se muestran las gráficas de la actividad de la glucosidasa encontrada en el vestibulo y en el suero de la rata, respectivamente, en función de la concentración de sustrato.

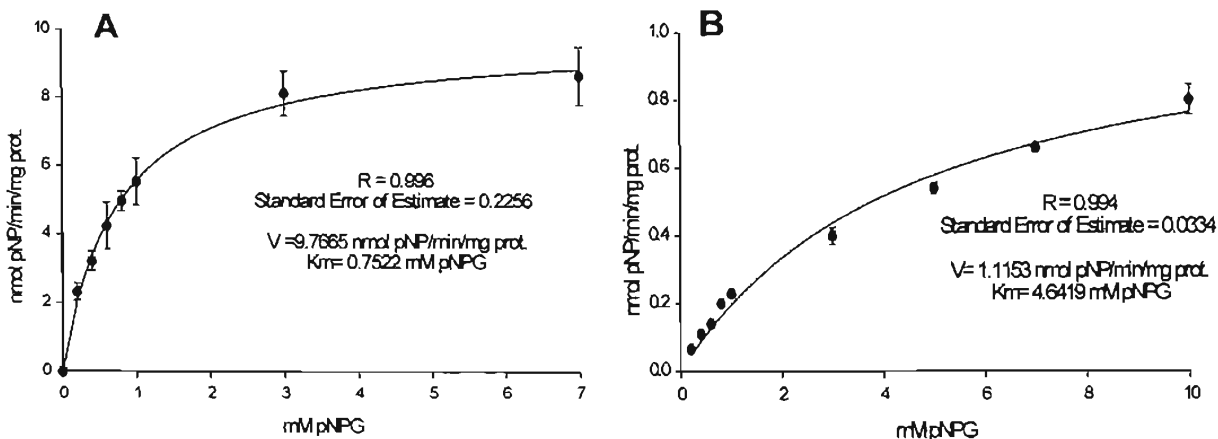


Figura 24. Actividad de la α -glucosidasa vestibular (A) y en el suero (B) de la rata. El sustrato utilizado fue el pNPG (1,4-p-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido). Cada punto representa el valor promedio de tres experimentos diferentes con los errores estándares respectivos (barras).

La α -glucosidasa presente en el vestíbulo de la rata es una enzima más afín al sustrato (K_m de 0.75 mM), que la enzima presente en el suero con una K_m de 4.64 mM, cuando se utilizó el pNPG como sustrato.

Sin embargo, cuando se realizaron los experimentos de hidrólisis *in vitro* de la STP en homogenados vestibulares, no se encontró hidrólisis del antibiótico (Tabla 10). Debido a esto solamente se midió la actividad de la α -glucosidasa sérica utilizando a la maltosa como sustrato (Figura 24).

Tabla 10. Concentraciones de STP y STD antes y después de la hidrólisis *in vitro* en homogenados vestibulares de la rata.

	STP	STD
T = 0 min	154.1 ± 12.4 (n=3)	-----
37° C, 24 hrs	150.7 ± 10.7 (n=3)	-----

El valor es en $\mu\text{g/ml}$ ± error estándar de tres experimentos diferentes.

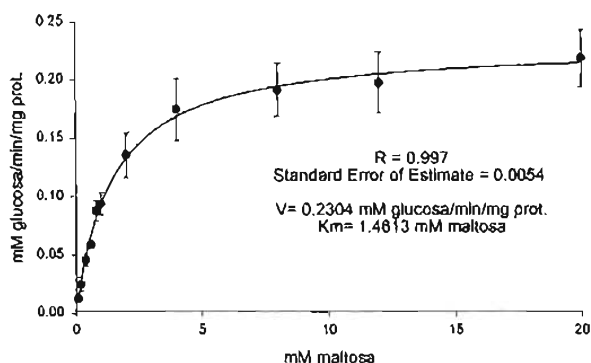


Figura 24. Curva de la actividad de la α -glucosidasa sérica en la rata. El sustrato utilizado fue la maltosa. Cada punto representa el valor promedio de tres experimentos diferentes con los errores estándares (barras) respectivos.

Para cerciorarnos de que esta enzima podía ser la responsable de la hidrólisis de la STP en el suero de la rata, se utilizaron diversas concentraciones de Acarbosa, un inhibidor específico de la α -glucosidasa. Este compuesto usado en la

terapéutica de la diabetes (Myo et al., 1999), es un inhibidor competitivo de la enzima que presenta una K_i de $0.059 \mu\text{M}$ para la α -glucosidasa intestinal de la rata (Kim et al., 1999).

En la Tabla 11, se encuentran los resultados de estos experimentos, donde las concentraciones de STD y STP fueron similares en presencia o ausencia de la Acarbosa. Por lo que, muy probablemente la α -glucosidasa presente en el suero de la rata no sea la responsable de la liberación de STD proveniente de la STP, o alternativamente se encuentre en la fracción globular en la sangre, lo que podría explorarse posteriormente.

Tabla 11. Concentraciones de STP y STD antes y después de la hidrólisis *in vitro* en el suero de la rata en presencia de diferentes concentraciones de Acarbosa.

Acarbosa (mM)	STP ($\mu\text{g/ml}$)*	STD ($\mu\text{g/ml}$)*
0	130.00 ± 3.45	5.44 ± 0.63
1.0	133.22 ± 2.82	6.05 ± 0.91
2.5	131.82 ± 0.74	5.85 ± 0.70
5.0	133.42 ± 0.33	5.09 ± 0.74

*El valor es el promedio \pm error estándar de tres experimentos diferentes, cada uno por triplicado.

Existen otras posibilidades para explicar el mecanismo hidrolítico de la STP en el suero de la rata. Una posibilidad es a través de enzimas de la familia del citocromo P450 como ya se había sugerido para la gentamicina por acción de la fracción S9 hepática (Huang and Schacht, 1990). Debido a que en el humano la expresión de los genes del citocromo P450 ha sido determinada en células mononucleares de la sangre periférica (Furakawa et al., 2004), se ha observado que antibióticos alternos en el tratamiento de la tuberculosis como la rimfampicina provocan la inducción de RNAm's para el citocromo P450 en las células mononucleares humanas (Asghar et al., 2002). La segunda

posibilidad proviene de la observación en experimentos químicos preliminares con sales de cloruro y sulfato de Zn^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} , capaces de hidrolizar *in vitro* a la STP con la ruptura del enlace α -1,4 glucosídico entre la STD y la estreptosa, en soluciones metanólicas a 37° C por 24 horas y a concentraciones entre 4-40 mM (Alfaro et al., 2003a y b). Estos elementos son constituyentes del suero en el que están a concentraciones normales de 12-16 μ M de Zn^{2+} , 3.4-32 nM de Mn^{2+} y 2.25-2.65 mM de Ca^{2+} . Lo que no sabemos es que si a esas concentraciones serian capaces de realizar dicha hidrólisis. Además, las sales que forman estos elementos en la sangre son principalmente fosfatos y bicarbonatos en solución acuosa a pH 7.4.

Por otro lado, en los mismos experimentos, dependiendo de las condiciones de reacción, se encontró que los grupos guanidino de la STD pueden hidrolizarse formando estreptamina (Alfaro et al., 2003a y b), lo cual es un fenómeno muy interesante puesto que se ha reportado que la 2-deoxiestreptamina de la kanamicina mostró ser en ratones un compuesto igualmente tóxico que el antibiótico, mientras que su componente 3-glucosamina resultó más tóxico en cuyos (Owada, 1962) con la salvedad de que estos compuestos afectaron a la cóclea y no al vestíbulo. Sin embargo, el estudio de estos mecanismos estan siendo iniciados por nuestro grupo.

Por último, para realmente comprobar que la STD era el compuesto determinado y medido por la técnica de HPLC, tanto en los hidrolizados *in vitro* de la STP en el suero de la rata, como después del tratamiento crónico con STP de los animales, ambos tipos de experimentos de hidrólisis se realizaron y se corrieron ambas muestras por la técnica de HPLC descrita y el pico con las características cromatográficas del estándar de STD se recuperó en ambos casos y se liofilizó.

Debido a que para identificar a la STD se contó sólo en su tiempo de retención, se decidió realizar un segundo corrimiento cromatográfico, bajo las mismas condiciones descritas, del recuperado del pico de STD, en el cual se disolvió 100 mg del liofilizado en 1 ml de buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.8, pero se agregó una concentración conocida del estándar de STD (estándar interno), observándose un incremento en el pico correspondiente a la STD (Figura 25).

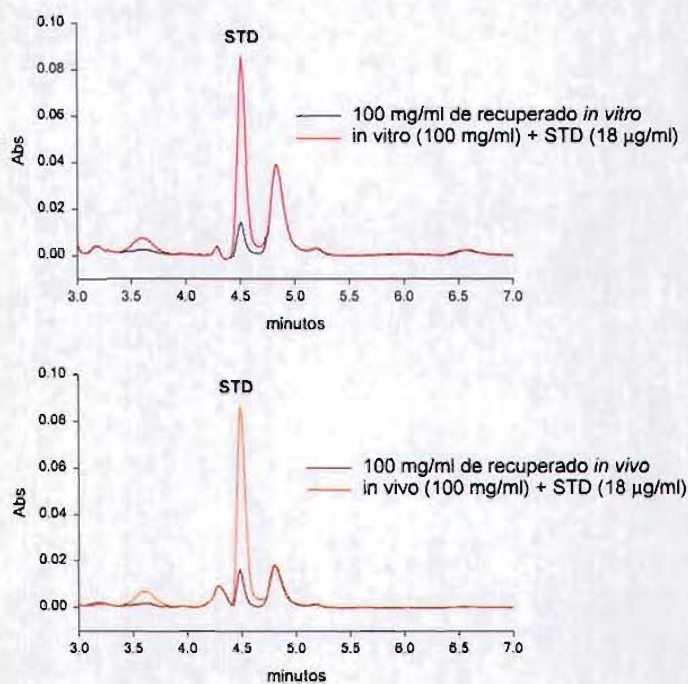
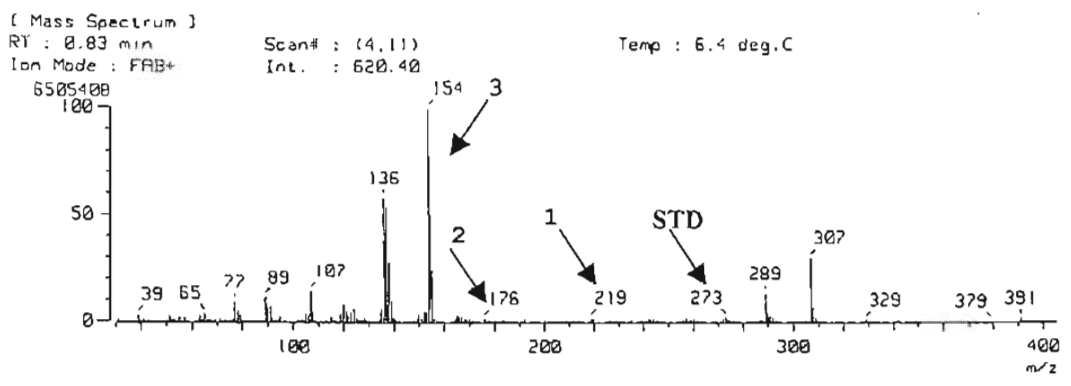


Figura 25. Segundo corrimiento cromatográfico del pico recuperado de los experimentos de hidrólisis *in vitro* e *in vivo* de la STP. El corrimiento se realizó bajo las mismas condiciones cromatográficas que la técnica de HPLC descrita en ésta tesis.

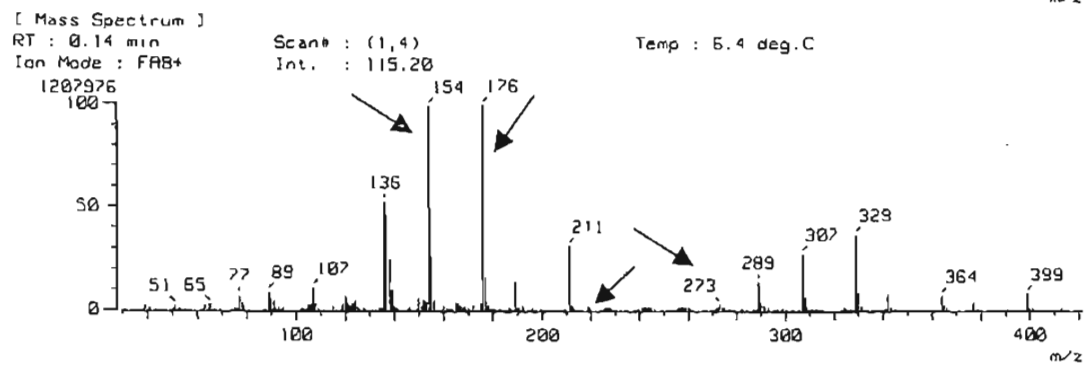
Por otro lado, se analizaron por espectroscopía de masas los recuperados del pico con las características cromatográficas de la STD junto con una muestra de nuestro estándar de STD. En la Figura 26, se muestran los espectros de masas obtenidos de estos experimentos, las flechas señalan las posibles entidades que se

están formando por la fragmentación de la molécula de STD (Figura 27).

Estándar de STD



In vitro



In vivo

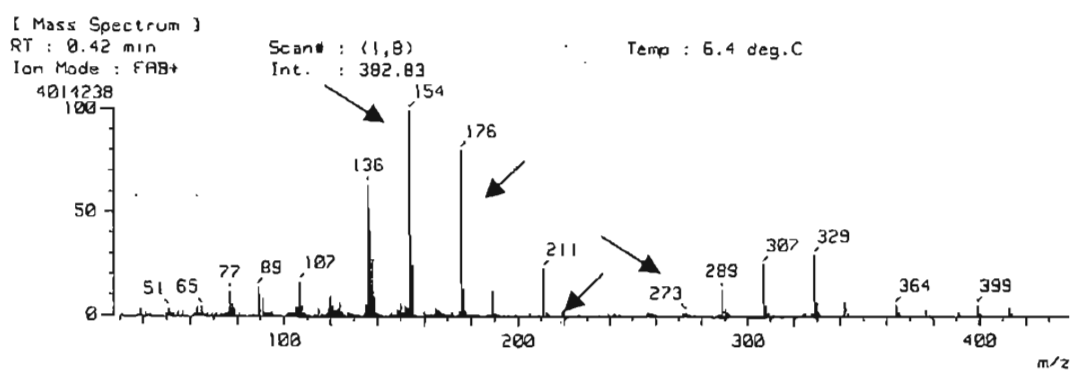


Figura 26. Espectro de masas del estándar de STD y los recuperados del pico de STD en los experimentos de hidrólisis *in vitro* de la STP y después de tratar a ratas con STP por 45 días. Las flechas señalan las masas de la STD y de 3 posibles entidades moleculares formadas por la fragmentación de ésta, mostradas en la Figura 27. En los tres espectros de masas se observan esencialmente las mismas señales.

Las señales en los recuperados de los experimentos *in vitro* e *in vivo* son las mismas y la magnitud de las señales fue semejante. Esto nos confirma inequívocamente, que la señal obtenida en la región de la STD realmente es STD.

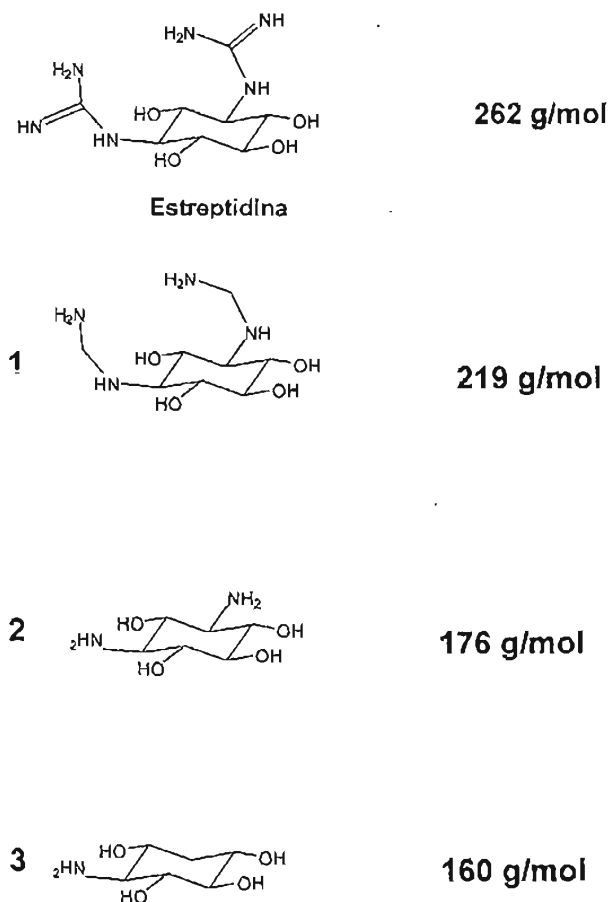


Figura 27. Estructura de la estreptidina (STD) y de las tres posibles entidades moleculares que probablemente estén formándose por la fragmentación de ésta, donde (2) es la estreptamina. Nótese que los sustituyentes en posiciones 1 y 3 del anillo (grupos guanidino en la STD) son los que cambian. Cada número corresponde a las señales marcadas con las flechas en los espectros de masas de la figura 26.

Este es el primer reporte que identifica a la STD como un compuesto vestibulotóxico derivado *in vivo* de la STP. Wang y colaboradores (1999) describieron un metabolito citotóxico

proveniente de la STP en el suero de pacientes con pérdida auditiva resultado del tratamiento con el antibiótico. La técnica de HPLC utilizada por este grupo fue la misma que la que utilizamos en el presente estudio, el compuesto derivado de la STP presentó un tiempo de retención semejante a la STD. Sin embargo, Wang et al. (1999) nunca identificó el compuesto derivado de la STP.

Este hallazgo también corrobora la observación de los efectos vestibulotóxicos específicos de la STP sin ningún efecto nefrotóxico reportados para otros aminoglicósidos (Williams et al., 1987; Begg and Berclay, 1995) como lo mostró el estado saludable de los animales en nuestro estudio. En la Figura 28, se muestran las curvas del incremento en peso de los 3 grupos de ratas experimentales tratadas con STD (50 mg/kg), STP (400 mg/kg) o glicerol al 70% (0.5 ml/kg, Controles). Durante el transcurso del tratamiento hasta los 45 días, los animales nunca mostraron una pérdida de peso considerable, por el contrario el incremento en el peso corporal fue directamente proporcional al transcurso del tiempo, lo cual es otro indicio del mantenimiento saludable de los animales a lo largo del tratamiento.

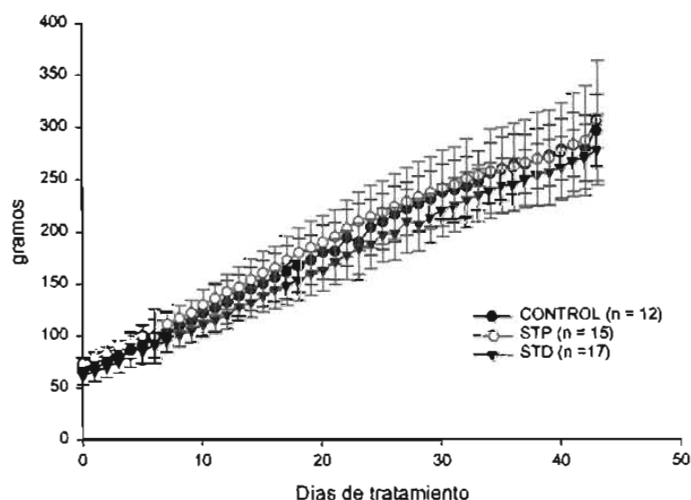


Figura 28. Incremento de peso a lo largo de 45 días de tratamiento. El número entre paréntesis indica el total de animales por grupo experimental.

VIII. CONCLUSIONES

Con objeto de aportar evidencias en favor de la STD como un metabolito derivado de la STP con propiedades tóxicas vestibulares, se estudió la producción de STD a partir de STP. Asimismo, se evaluaron los efectos sobre la función otolítica utricular de la rata a través de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Con la experimentación *in vitro* se intentó demostrar que en el suero de la rata existía un mecanismo capaz de hidrolizar a la STP con la consistente producción de STD. Se encontró que efectivamente la STP es hidrolizada en el suero de la rata, con la comitante producción de STD. Se demostró que un pico observado por HPLC con las mismas características cromatográficas del estándar de STD tanto en la hidrólisis *in vitro* de la STP como en el suero de ratas tratadas por 45 días con el antibiótico, tenía una identidad con el estándar de STD dilucidado por espectroscopía de masas.

Por otro lado, al realizar experimentos *in vivo*, la STD administrada intramuscularmente en ratas, mostró tener efectos directos sobre la función del epitelio utricular, ya que se observó el establecimiento de patrones anormales de nado similares a los observados en animales tratados con STP. En el epitelio sensorial utricular de dichos animales, se observó una disminución en el número de células pilosas conforme aumentaba el tiempo de tratamiento, observándose daño más pronunciado con STD a los 45 días, tanto sobre el epitelio sensorial como en la membrana otolítica, mostrando una desorganización y una disminución aparente en el tamaño de la otoconias. Asimismo, los núcleos de las células pilosas mostraban un proceso de eliminación del epitelio. Todo este daño fue causado por la STD aún cuando la dosis administrada fue alrededor del 10% de la dosis del antibiótico (50 mg/kg de STD contra 400 mg/kg de STP).

Por otro lado, continuando con la dilucidación de un posible mecanismo hidrolítico del antibiótico en el suero de la rata, se encontró actividad específica de α -glucosidasa, enzima que escinde las uniones α -1,4 de los azúcares. No obstante, al incubar con un agente bloqueador de la enzima, no se observó disminución de la hidrólisis del antibiótico; esto permite especular que dicha hidrólisis pudiera ser mediada por otro tipo de enzima relacionada por ejemplo, con el citocromo P450 en las células mononucleares de la sangre. Aunque aparentemente la α -glucosidasa presente en el suero de la rata no es la responsable de la hidrólisis de la estreptomina, la búsqueda precisa del mecanismo bioquímico es esencial para encontrar un posible bloqueador (inhibidor) de dicha conversión metabólica de la estreptomina a estreptidina, el cual permitiría generar un tratamiento seguro, al administrarlo simultáneamente con el antibiótico en los pacientes que requieren estreptomina, el cual está siendo investigado por nuestro grupo.

Con este estudio se puede postular a la STD como un derivado metabólico de la STP capaz de ejercer un efecto vestibulotóxico, que permanezca en la sangre aún cuando el antibiótico haya desaparecido de ella, como sucede después de una administración crónica de la STP. Asimismo, este estudio es de suma importancia pues tiene una aplicación inmediata a la clínica al determinar y cuantificar los niveles de estreptomina y estreptidina de una manera sencilla en pacientes tratados con el antibiótico (ver Apéndice II) y, por tanto, sugerir que se continúe el tratamiento o se reemplace con uno alternativo para evitar los efectos tóxicos vestibulares.

IX. REFERENCIAS

- Alfaro-Fuentes I., Barba-Behrens N., Granados O and Meza G. (2003a). Streptomycin: hydrolysis and ototoxicity. 7th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry. Guanajuato, México. Abstr. PO-57, 109.
- Alfaro-Fuentes I., Granados O., Meza G and Barba-Behrens N. (2003b). Toxicidad de la estreptomycin y sus derivados, estudios biológicos y químicos. Encuentro de química inorgánica. Cuernavaca, México. Abstr. CA-1.
- Anderson DG and Jewell M. (1945). Absorption, excretion and toxicity of streptomycin in man. *New England J. Med.* 233, 485-491.
- Aronoff GR., Pottratz ST., Brier ME., Walker NE., Fineberg NS., Glant MD and Luft FC. (1983). Aminoglycoside accumulation kinetics in rat renal parenchyma. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 74-78.
- Asghar A., Gorski CJ., Haehner-Daniels B and Hall DS. (2002). Induction of multidrug resistance-1 and cytochrome P450 mRNAs in human mononuclear cells by rifampin. *Drug Metab Dispos.* 30, 20-26.
- Babel J., Bischoff A and Spöndlin H. (1970). In: *Ultrastructure of the peripheral nervous system and sense organs*. 2th edition. Bischoff A. (Ed). Mosby Company, St Louis. pp 286-291.
- Barba-Behrens N., Bautista LJ., Ruíz EM., Nathan JP., Flores PA and Contreras R. (1990). Coordination compounds derived from the interaction of streptomycin and cobalt, nickel, copper and calcium salts characterized by ¹³C NMR and spectroscopic studies. Structure and bonding properties of the streptidine fraction. *J Inorg. Biochem.* 40, 201-215.
- Bareggi R., Narducci P., Grill V., Mallardi F., Zweyer M and Fusaroli P. (1986). Localization of an aminoglycoside (streptomycin) in the inner ear after its systemic administration. *Histochemistry.* 84, 237-240.
- Barrigon S and Montañes P. (1993). Antibióticos aminoglucósidos. En: *Farmacología de Velázquez*. (Velasco MA, Lorenzo FP, Molina SJ y Andrés-Trelles F. Eds). Interamericana-Mc Graw-hill, Madrid. pp 967-975.
- Barza M., Brown RB., Shen d., Gibaldi M and Weinstein L. (1975). Predictability of blood levels of gentamicin in man. *J Infect Dis.* 132, 165-174.
- Begg JE and Barclay LM. (1995). Aminoglycosides-50 years on. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 39, 597-603.
- Bennett WM. (1983). Aminoglycoside nephrotoxicity. *Nephron.* 35, 73-77.

- Berg K. (1949). The toxic effect of streptomycin in the eighth cranial nerve. *Ann Otol.* 58, 448-456.
- Berg K. (1951). The toxic effect of streptomycin on the vestibular and cochlear apparatus. An experimental study in cats. *Acta Otolaryngol (Stockh). Suppl.* 1-77.
- Bignall JR., Crofton JW and Thomas JAB. (1951). Effect of streptomycin on vestibular function. *Brit Med J.* 1, 554-559.
- Blohmke A. (1950). Über schädigungen des 8. Hirnnerven bei streptomycin behandlung. *Z Laryng Rhinol.* 29, 121-129.
- Boxer GE, Jelinek VC and Leghorn MP. (1947). The colorimetric determination of streptomycin in clinical preparation, urine and broth. *J. Am. Chem. Soc.* 70: 153-165.
- British Pharmacopoeia (1998), Vol. II, Appendix XIVA. Biological assay of antibiotics, HMSO, London.
- Brown HA and Hinshaw HC. (1946). Toxic reaction of streptomycin on the eighth nerve apparatus. *Proc Staff Meet Mayo Clinic.* 21, 348-351.
- Bryan LE. and Kwan S. (1981). Mechanisms of aminoglycoside resistance of anaerobic bacteria and facultative bacteria grown anaerobically. *J Antimicrob Chemother.* 8, Suppl. D 1-8.
- Bryan LE. (1989). Cytoplasmic membrane transport and antimicrobial resistance. In: *Microbial resistance to drugs. Handbook of experimental pharmacology.* Bryan LE (Ed). Vol.91. Springer-Verlag, Berlin pp 35-57.
- Caussé R., Gondet I and Vallancien B. (1948). Action vestibulaire de la streptomycine chez la souris. *Compt Rend Soc Biol.* 142, 747-749.
- Caussé R., Gondet I and Vallancien B. (1949). Action of streptomycin sur les cellules ciliées des organes vestibulaires chez la souris. *Compt Rend Soc Biol.* 143, 619-620.
- Christensen E., Hertz H., Riskaer N and Vrou-Jensen G. (1950). Experiments on neurotoxic effect of streptomycin. *Acta Pharm Toxicol.* 6, 201-218.
- Christensen E., Hertz H., Riskaer N and Vra-Jensen G. (1951). Histological investigations in chronic streptomycin poisoning on guinea pigs. *Ann Otol.* 60, 343-349.
- Cohen SS., Johnsen L., Lichtenstein MR and Lynch WJ. (1953). A comparative study of streptomycin and dihydrostreptomycin in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc.* 68, 229-237.
- Crann AS., Hang YM., McLaren DJ and Schacht J. (1992). Formation of a toxic metabolite from gentamicin by a hepatic cytosolic fraction. *Biochemical Pharmacol.* 43, 1835-1839.
- Crann AS and Schacht J. (1996). Activation of aminoglycoside antibiotics to cytotoxins. *Audiol. Neurootol.* 1, 80-85.

- Cundliffe E. (1989). Methylation of RNA and resistance to antibiotics. In: Microbial resistance to drugs. (Bryan LE Ed). Spring-Verlag, Berlin. pp 291-312.
- Davies BD., Brummett RE., Bendrick TW and Himes DL. (1984). Dissociation of maximum concentration of kanamycin in plasma and perilymph from ototoxic effect. *J Antimicrob Chemother.* 14, 291-302.
- Davies BD. (1988). The lethal action of aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother.* 22, 1-3.
- Denenyi T. (1974). Separation of water-soluble antibiotics. In: Thin Layer Chromatography Manual. Macherey-Nagel (Ed). Germany. pp A19.
- Dissous C., Ansart JF., Cheron A and Kembel J. (1981). Purification of rat liver lysosomal-glucosidase. *Anal Biochem.* 116: 35-39.
- Dix MR., Hallpike CS and Harrison MS. (1949). Some observations upon the otological effects of streptomycin intoxication. *Brain.* 72, 241-245.
- Edison AO., Frost BM., Graessle OE., Hawkins JE Jr., Kuna S., Mushett CW., Silber RH and Solotorovsky M. (1948). An experimental evaluation of dihydrostreptomycin. *Am Rev Tuberc.* 58, 487-493.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2000). Tomo I. Ensayos Microbiológicos de antibióticos. México. pp 1297-1299.
- Farrington RF., Hull-Smith H., Bunn PA and McDermott. (1947). Streptomycin toxicity. Reactions to highly purified drug on long-continued administration to human subjects. *J.A.M.A.* 134, 679-688.
- Fee EW Jr. (1980). Aminoglycoside Ototoxicity in the Human. *The Laryngoscope. Suppl.* 24, 1-19.
- Feldman WH and Hinshaw HC. (1948). Streptomycin: a valuable antituberculosis agent. *Brit Med J.* 1, 87-92.
- Fermin CD., Lychacov D., Campos A., Hara H., Sondag E., Jones T., Jones S., Taylor M., Meza-Ruiz G. and Martin DS. (1998). Otoconia biogenesis, phylogeny, composition and functional attributes. *Histol Histopathol.* 13, 1103-1154.
- Ferrary E., Bernard C., Sterkers O and Escoubet B. (1987). Prostaglandins in the semicircular canal of the frog. *Hearing res.* 26, 139-144.
- Ferrary E., Tran Ba Huy P., Roinel N and Bernard C. (1988). Calcium and the inner ear fluids. *Acta Otolaryngol (Stockh). Suppl.* 460, 13-17.
- Floberg LE., Hamberger CA and Hydén H. (1949). Inhibition of nucleic acid production in vestibular nerve cells by streptomycin. *Acta Otolaryng. Suppl.* 75, 36-52.

- Fowler EP and Seligman E. (1947). Otic complications of streptomycin therapy. *J.A.M.A.* 133, 97-91.
- Fowler EP. (1948). Streptomycin treatment of vertigo. *Trans Amer Acad Ophthal Otol.* 52, 293-301.
- Fowler EP and Feind CR. (1949). Toxicity of streptomycin for the auditory and vestibular mechanisms. *Am Rev Tuberc.* 60, 39-44.
- Francke E and Neu HC. (1983). Nephrotoxicity of aminoglycosides. *Infect. Surg.* 3, 205-214.
- Friberg UD., Bagger S and Raskandersen H. (1985). The lateral intercellular spaces in the endolymphatic sac. A pathway for fluid transport?. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 426, 1-17.
- Furakawa M., Nishimura M., Ogino D., Chiba R., Ikai I., Ueda N., Naito s., Kuribayashi S., Moustafa AM., Uchida T., Sawada H., Kamataki T., Funae Y and Fukumoto M. (2004). Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear in comparison with the liver. *Cancer Sci.* 95, 520-529.
- Futaki T and Kawabata I. (1983). An experimental investigation of streptomycin ototoxicity to the otolith organ by the parallel swing and observation of otoconia through SEM in the guinea pig. *Adv Otorhinolaryngol.* 30, 264-267.
- Glorig A and Fowler EP. (1947). Test for labyrinth function following streptomycin therapy. *Ann Otol.* 56, 379-394.
- Graf K. (1949). Streptomycindosierung und neurotoxische nebenwirkungen. *Schweiz Med Wschr.* 35, 793-814.
- Graf K. (1951). Histologische veränderungen des innenohres nach behandlung der meningitis tuberculosa mit streptomycin. *Acta Otolaryng.* 39, 121-131.
- Granados O., Meza G and Barba-Behrens N. (2002). Streptidine is released from streptomycin by enzymatic hydrolysis in the human serum. 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Abstr.* P1078, 241.
- Gross Nb., Luke-Barbara P and Hybalis RL. (1966). Film: Streptomycin ototoxicity in the pigeon. Kresge Hearing Research Institute. University of Michigan. Ann. Arbor.
- Grujic M., Popovic J., Putnik DJ., Zegarac D., Martinis U., Praso R., Vanic D., Milovanovic M., Djuric-Milosavljevic and Stosic Z. (1969). Ostencenje sluha kod lecenih bolesnika streptomycinom. *Tuberkuloza.* 15, 348-357.
- Hawkins JE Jr. (1947). Disturbances of vestibular function produced in animals by streptomycin. *Fed Proc.* 6, 201.
- Hawkins JE Jr. (1950). Cochlear signs of streptomycin intoxication. *J Pharm Exp Therap.* 100, 38-44.
- Hawkins JE Jr and Lurie MH. (1952). The ototoxicity of streptomycin. *Ann Otol.* 61, 789-806.

- Hawkins JE Jr and Lurie MH. (1953). The ototoxicity of dihydrostreptomycin and neomycin in the cat. *Ann Otol.* 62, 1128-1148.
- Hawkins JE Jr. (1959). The ototoxicity of Kanamycin. *Trans Am Otol Soc* 47, 67-84.
- Hawkins JE Jr. (1959a). The ototoxicity of Kanamycin. *Ann Otol.* 68, 698-715.
- Hawkins JE Jr. (1959b). Antibiotics and the inner ear. *Trans Am Acad Ophthal otolaryng.* 63, 206-217.
- Hawkins JE jr., Johnsson LG and Aran JM. (1969). Comparative tests of gentamicin ototoxicity. *J Infect Dis.* 119, 417-426.
- Hinshaw HC and Feldman WH. (1945). Streptomycin in treatment of clinical tuberculosis. *Proc Staff Meet Mayo Clinic.* 20, 313-318.
- Huang YM. and Schacht J. (1990). Formation of a cytotoxic metabolite from gentamicin by liver. *Biochemical Pharmacol.* 40, R11-R14.
- Hudspeth AJ. (1983). Mechanoelectrical transduction by hair cells in the acousticolateralis sensory system. *Annu. Rev. Neurosci.* 6, 187-215.
- Hudspeth AJ. (1985). The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science Wash. DC* 230, 745-752.
- Igarashi M., Lundquist PG., Alford BR and Myata H. (1971). Experimental ototoxicity of gentamicin in squirrel monkeys. *J infec Dis. Suppl.* 124, S114-S124.
- Igarashi M and Jensen DW. (1981). Vestibulotoxicity experiments in animals. In: *Aminoglycoside Ototoxicity.* 1a Ed. Lerner AS., Matz JG. and Hawkins EJ Jr. (eds). Little, Brown and Company. Boston. pp 127-136.
- Iturbe AG and Meza G. (1986). Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. *Int J Neurosci. Suppl* 4, 32.
- Jatho K. (1950). Uber vestibularis und cochlearisschädigungen bei streptomycinbehandlung und deren bedeutung für die otologie. *Arch Ohr-usw Heilk, u Z Hals-usw Heilk.* 157, 276-300.
- Keser H. (1950). Nistagmigraphie der streptomycinschädigungen des vestibularis. *Arch Ohr-usw Heilk, u Z Hals-usw Heilk.* 156, 475-478.
- Kim MJ., Lee SB., Lee HS., Lee SY., Baek SJ, Kim D., Moon WT., Robyt FJ and Park HK. (1999). Comparative study of the inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and cyclomaltodextrin glucosyltransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose. *Arch biochem biophys.* 371, 277-283.
- Kimura RS. (1969). Distribution, structure, and function of dark cells in the vestibular labyrinth. *Ann Otol.* 78, 542-561.

- de Kleyn A and van Deinse JB. (1950). Influence of streptomycin on the vestibular system. *Acta Otolaryng.* 38, 3-7.
- Kosek JC., Mazze RI and Cousins MJ. (1974). Nephrotoxicity of gentamicin. *Lab Invest.* 30, 48-57.
- Kubo; H; Li, H; Kobayashi, Y and Kinoshita, T. (1987). Fluorometric determination of streptomycin in serum by high-performance liquid chromatography using mobile phase containing fluorogenic reagent. *Anal. Biochem.* 162, 219-223.
- Kurosawa, N; Kuribayashi, S; Owada, E and Ito, K. (1985). Determination of streptomycin in serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography.* 343, 379-385.
- Lietman PS and Smith CR. (1983). Aminoglycoside nephrotoxicity in humans. *J Infect Dis. Suppl.* S284-S292.
- Lindeman HH. (1969). Regional differences in sensitivity of the vestibular sensory epithelia to ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 67, 177-189.
- Lindsay JR. (1947). Pathology of vertigo arising from the peripheral vestibular apparatus. *Ann Otol.* 56, 541-556.
- López I and Meza G. (1988). Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. *Neurosci.* 25, 13-18.
- López I., Wu YJ and Meza G. (1992). Immunocytochemical evidence for an afferent GABAergic neurotransmission in the guinea pig vestibular system. *Brain Res.* 589, 341-348.
- López I., Ayala C and Honrubia V. (2002). Synaptophysin immunohistochemistry during vestibular hair cell recovery after gentamicin treatment. *Audiol Neurootol.* 8, 80-90.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ(1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luzzatto L., Apirion D and Schlessinger D. (1969). Polyribosome depletion and blockage of the ribosome cycle by streptomycin in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 42, 315-335.
- Mahady SCF., Armstrong FL., Beck F., Horton R and Lincoln NS. (1953). A comparative study of streptomycin and dihydrostreptomycin in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc.* 68, 238-248.
- Mates SM., Patel L., Kaback HR and Miller MH. (1983). Membrane potential in anaerobically growing *Staphylococcus aureus* and its relationship to gentamicin uptake. *Antimicrob Agents Chemother.* 23, 526-530.
- McCabe BF. (1964). Nystagmus response of the otolith organs. *Laryngoscope.* 74, 372-381.
- McGee TM and Olszewski J. (1962). Streptomycin sulphate and dihydrostreptomycin toxicity. Behavioral and histopathologic studies. *Arch Otolaryng.* 75, 295-311.

- Meredith CG., Maldonado Al and Speeg KV. (1985). The effect of ketoconazole on hepatic drug metabolism in the rat *in vivo* and *in vitro*. Drug Metab Dispos. 13, 156-162.
- Meza G and Hinojosa R. (1987). Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitters in the chick vestibule. Hear Res. 28, 73-85.
- Meza G., López I., Paredes MA and Poblano A. (1989). Cellular target of streptomycin in the internal ear. Acta Otolaryngol.(Stockh). 107, 406-411.
- Meza G., Wu JY and López I. (1992). GABA is an afferent vestibular neurotransmitter in the guinea pig. Ann NY Acad Sci. 656, 943-946.
- Meza G., Daunton N., López-Griego L and Salas M. (1993). Streptomycin vestibulotoxicity in pigmented rats. Soc Neurosci. Abstr. 19(2), 989.
- Meza G., Daunton N., Fox R., López-Griego L., Pratt H and Zepeda H. (1994). Vestibulotoxicity of streptomycin in the pigmented rat. Collegium Otorhinolaryngol. Abstr. 57, 45-46.
- Meza G., Bohne B., Daunton N., Fox R and Knox J. (1996). Damage and recovery of otolith function following streptomycin treatment in the rat. Ann NY Acad Sci. 781, 666-669.
- Meza G., Guerra G., Granados O., Barba B., Toxqui A y Hernández C. (1999). Estreptomina: propiedades fisicoquímicas y toxicidad vestibular. Ann. Otorrinol. Mexicana. 44, 21-25.
- Meza G., Barba-Behrens N., Granados O., Hernández-Cruz A and Toxqui A. (2001). Vestibular histofluorescence could be due to accumulation of both the antibiotic and its derivative, streptidine, after acute streptomycin treatment in the guinea pig. Histol Histopathol. 16, 1143-1148.
- Moffitt OP and Norman WB. (1948). Streptomycin toxicity in the labyrinth. Ann Otol 57, 999-1006.
- Molitor H., Graessle OE., Kuna S., Mushett CW and Silber RH. (1946). Some toxicological and pharmacological properties of streptomycin. J Pharm Exp Therap. 86, 151-173.
- Myo JK., Soo BL., Hee SL., Su YL., Jin SB., Doman K., Tae WM., Robyt FJ and Kwan HP. (1999). Comparative study of the inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and cyclomalto-dextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbose, and acaviosine-glucose. Arch. Biochem. Biophys. 371, 277-283.
- Nadol BJ Jr. (1981). Histopathology of human aminoglycoside ototoxicity. In: Aminoglycoside ototoxicity. 1a Ed. Lerner AS., Matz JG. and Hawkins EJ Jr. (eds). Little, Brown and Company. Boston. pp 409-435.

- Nakae R and Nakae T. (1982). Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 22, 554-559.
- Needleman R and Eaton RN. (1974). Selection of yeast mutants constitutive for maltase synthesis. *Molec Genet.* 133: 135-140.
- Needleman BR., Federoff JH., Eccleshall RT., Buchferer B and Marmur J. (1978). Purification and characterization of an α -glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochemistry* 17, 4657-4661.
- Northington P. (1950). Syndrome of bilateral vestibular paralysis and its occurrence from streptomycin therapy. *Arch Otolaryng.* 52, 380-396.
- Owada K. (1962). Experimental studies of the toxicity of kanamycin its hydrolysed products and neomycin. *Chemotherapia.* 5, 277-293.
- Pratt WB and Fekaty R. (1986). Bactericidal inhibitors of protein synthesis, the aminoglycosides. In: *The antimicrobial drugs.* Chapter 7, Oxford University Press, Oxford, pp 153-183.
- Preston RE., Johnsson LG., Hill JH and Schacht J. (1975). Incorporation of radioactive calcium into otolithic membranes and middle ear ossicles of the gerbil. *Acta Oto-Laryngol.* 80, 269-275.
- Ross DM. (1997). Morphological evidence for local microcircuits in rat vestibular maculae. *J. Comp. Neurol.* 379, 333-346.
- Rüedi L., Furrer W., Escher F und Lüthy F. (1949). Toxische wirkungen des streptomycins. *Acta Otolaryng. Suppl.* 78, 66-77.
- Rüedi L., Furrer W., Graf K., Nager G., Tscirren B et Lüthy F. (1951). Nouvelles constatations sur la toxicité de la streptomycine et de la quinine à l'égard de l'oreille du cobaye. *Rev Laryng Bordeaux* 72, 238-264.
- Sande AM. and Mandell LG. (1996). Antimicrobial agents. The Aminoglycosides. In: *The Pharmacological Basis of the Therapeutics.* 8a ed. Goodman SL. and Gilman A. (eds). Pergamon Press. New York. pp 1098-1116.
- Schacht J. (1982). Adenylate cyclase and cochlear fluid balance. *Am J Otolaryngol.* 3, 328-331.
- Schatz A., Bugi E and Waksman SA. (1944). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med.* 55, 66.
- Schentag JJ and Jusko WJ. (1977). Renal clearance and tissue accumulation of gentamicin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 22, 364-370.

- Schwenzer, SK and Anhalt, PJ. (1983). Automated fluorescence polarization immunoassay for monitoring streptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 683-687.
- Shannon K and Phillips I (1982). Mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 9, 91-102.
- Sheets JJ and Manson JI. (1984). Ketoconazole: a potent inhibitor of cytochrome P-450-dependent drug metabolism in liver. *Drug Metab Dispos.* 12, 603-606.
- Sterkers O., Bernard C., Ferrary E., Sziklai I., Tran Ba Huy P and Amiel C. (1988a). Possible role of Ca ions in the vestibular system. *Acta Otolaryngol (Stockh). Suppl.* 460, 28-32.
- Sterkers O., Ferrary E and Amiel C. (1988b). Production of inner ear fluids. *Physiological Rev.* 68, 1083-1128.
- Stevenson LD., Alvord EC Jr and Correl JW. (1947). Degeneration and necrosis of neurones in eighth cranial nuclei caused by streptomycin. *Proc Soc Exper Biol Med.* 65, 86-88.
- Strausbaugh LJ., Mandalaris CD and Sande AM. (1977). Comparison of four aminoglycoside antibiotics in the therapy experimental E. Coli meningitis. *J. Lab. Clin. Med.* 89, 692-702.
- Stupp HF. (1970). Untersuchung der antibiotikaspiegel in den innenohrflüssigkeiten und ihre bedeutung für die spezifische ototoxizität der aminoglykosidantibiotika. *Acta Otolaryngol. (Stockh). Suppl.* 262.
- Tai PC., Wallace BJ and Davis BD. (1978). Streptomycin causes misreading of natural messenger by interacting with ribosomes after initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 275-279.
- The United States Pharmacopoeia (2004). *Microbiological Assay of Antibiotics*, Rockville, Md. 984-985.
- Tran Ba Huy P., Manuel C and Meulemans A. (1981). Kinetics of aminoglycoside antibiotics in perilymph and endolymph in animals. In: *Aminoglycoside Ototoxicity*. 1a Ed. Lerner AS., Matz JG. and Hawkins EJ Jr. (eds). Little, Brown and Company. Boston. pp 81- 98.
- Trinder P. (1969). Determination of blood glucose using a oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol.* 22:158-161.
- Trune DR and Lim DJ. (1983a). A morphometric study of the pallid mutant mouse inner ear. *Am. J. Otolaryngol.* 4, 261-272.
- Trune DR and Lim DJ. (1983b). The behavior and vestibular nuclear morphology of otoconia-deficient pallid mutant mice. *J. Neurogenet.* 1, 53-69.

- Usami S., Igarashi M and Thompson G. (1987). GABA-like immunoreactivity in the chicken vestibular end organs. *Brain Res.* 418, 383-387.
- Vanderhaeghe H. (1949). Sur les troubles de l'équilibre provoqués par streptomycine. *Arch Int Pharm.* 79, 269-272.
- Voldrich L. (1965). The kinetics of streptomycin, kanamycin and neomycin in the inner ear. *Acta oto-laryng.* 60, 243-248.
- Vrabec DP., Cody DT and Ulrich JA (1965). A study of the relative concentrations of antibiotics in the blood, spinal fluid, and perilymph in animals. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 74, 688-691.
- Wallner LJ. (1949). The otologic effects of streptomycin therapy. *Ann Otol.* 58, 112-116.
- Wang S., Bian Q., Liu Z., Feng Y., Lian N., Chen H., Hu Ch., Dong Y and Cai Z. (1999). Capability of serum to convert streptomycin to cytotoxin in patients with aminoglycoside induced hearing loss. *Hearing Res.* 137, 1-7.
- Wersäll J and Hawkins JE. (1962). The vestibular sensory epithelia in the cat labyrinth and their reactions in chronic streptomycin intoxication. *Acta Otolaryng.* 54, 1-23.
- Wersäll J. (1995). Ototoxic antibiotics: a review. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 519, 26-29.
- Whall TJ. (1981). Determination of streptomycin sulfate and dihydrostreptomycin sulfate by high performance liquid chromatography. *J Chromatography.* 219, 89-100.
- Williams PD., Bennett DB., Gleason CR and Hottendorf GH. (1987). Correlation between renal membrane binding and nephrotoxicity of aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 570-574.
- Winston J., Lewey FH., Parenteau A., Marden PA and Cramer B. (1948). An experimental study of the toxic effects of streptomycin on the vestibular apparatus of the cat. *Ann Otol.* 57, 738-753.
- Winston J., Lewey FH., Parenteau A., Marden PA and Cramer B. (1949). Further experimental studies of the toxic effects of streptomycin on the central vestibular apparatus of the cat. *Ann Otol.* 58, 988-1105.

X. APENDICE I

TRABAJOS PRESENTADOS BASE DE ESTA TESIS

TRABAJO 1

Vestibular histofluorescence could be due to accumulation of both the antibiotic and its derivative, streptidine, after acute streptomycin treatment in the guinea pig

G. Meza¹, N. Barba-Behrens³, O. Granados¹, A. Hernández-Cruz² and A. Toxqui³

¹Departamento de Neurociencias and ²Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. and ³Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Summary. Acute treatment with 300 mg/kg of pigmented guinea pigs with streptomycin sulfate induces an elevation of endogenous fluorescence in vestibular ampullary cristae. Fluorescence accumulates in all compartments of the epithelium, i.e., vestibular sensory and supporting cells and nerve fibers of the stroma and it was very intense 1 and 12 hours after its administration. Fluorescence decreased to control levels 24 hours following streptomycin injection. Fluorescence levels were very low either in untreated animals or in animals injected with saline physiological solution. To investigate whether this fluorescence was an intrinsic property of the antibiotic or whether it was due to a derivative of it, or both, an *in vitro* fluorescence spectrum was performed with 100 μ M solutions of streptomycin or streptidine, or both, dissolved in various buffer solutions at 488 nm of excitation.

A discrete level of fluorescence was observed in the spectrum regardless of media when separate solutions of both streptomycin or streptidine were studied. Fluorescence notably increased at 522-532 nm when the solutions contained both streptomycin and streptidine together.

These results suggest that streptidine putatively derived from streptomycin may contribute to the observed fluorescence accumulation in vestibular preparations after acute treatment. Thus, these metabolic properties of the inner ear which transform streptomycin into streptidine, something never considered earlier, could be claimed as partially responsible for converting a therapeutic agent into a compound which could be as harmful as STP to the inner ear.

Key words: Histofluorescence, Aminoglycosides Rodents, Ototoxicity

Introduction

The preferential damage of inner ear structures by aminoglycoside antibiotics may be explained by the fact that after their accumulation they are eliminated more slowly from inner ear fluids than from the blood (Federspil et al., 1976; Tran Ba Huy et al., 1981)

Specific deterioration of vestibular function has been described in patients suffering from tuberculosis treated with streptomycin (STP) (Igarashi and Jensen, 1981) and numerous papers investigating the cellular target of STP and other structurally related aminoglycosides (AG) have been published (Duvall and Wersäll, 1964; Aran et al., 1982; Bareggi et al., 1986; Meza et al., 1989, 1996; Fermin et al., 1998). Autoradiographical studies after administration of radioactive dihydrostreptomycin (DHSTP) have shown aminoglycoside accumulation in the cytoplasm of sensory cells in the cochlea (Von Ilberg et al., 1971), whereas histochemical studies conducted after systemic administration of DHSTP have shown a non-specific pattern of distribution of dihydrostreptomycin within inner ear structures (Hawkins, 1981). Presently, what seems to be clear is that long-term administration of STP damages the sensory cells of the vestibular organs without any alteration of nerve fibers or auditory function (Meza et al., 1989, 1996). Whether this preference is established from the beginning of exposure to AG or whether these latter exert their action structurally complete or broken down to a derived metabolite is unclear.

Bareggi et al. (1986) reported that when a very large dose of STP (750 mg/kg) was intraperitoneally administered to guinea pigs, all inner ear structures, both in the cochlea and the vestibular cristae showed a

remarkable level of fluorescence when examined 1 hour after injection, which suggests that STP has already arrived to the ear via the blood vessels and reached all the structures in the ear. Whether this fluorescence may be attributed to physical properties of STP or for how long the AG remained in the inner ear complete or modified is presently undetermined.

As our observations of specific sensory cell destruction by STP were in chronic experiments using 300-400 mg/kg of the antibiotic respectively in guinea pigs and rats. (Meza et al., 1989, 1996), we decided to perform acute experiments undertaking fluorescence observations of frozen sections of cristae ampullaris of guinea pigs 1 hour after intramuscular STP injection and extended the observations to 12 and 24 hours after STP administration. This extended experimentation was performed because it is known that STP accumulates in the inner ear perilymph and is eliminated from the body within 24 hours of its injection (Anderson and Jewell, 1945; Voldrich, 1965). Thus, the presence or absence of fluorescence could be an indication of the antibiotic permanence in or its clearance from the ear structures.

Additionally, as STP may give rise to streptidine (STD) by enzymatic hydrolysis (breakage of the $\alpha 1 \rightarrow 4$ glycosidic bond. Meza and Granados, 1999) (Fig. 1) in order to investigate whether this fluorescence is due to STP itself or to STD, that can accumulate and fluoresce, or both, we performed a series of *in vitro* experiments seeking for a fluorescence signal derived from STP or STD through analyzing by spectrofluorometry solutions of 100 mM of STP or STD or both dissolved in 0.85% NaCl, phosphate buffer, buffered cacodylate or paraformaldehyde solutions. These experiments were designed to imitate the salt milieu to which STP is exposed, during perfusion of the animal to prepare the specimens for fluorescence microscopy.

Materials and methods

Treatment

Twenty young male pigmented guinea pigs (*Cavia cobaya*) weighing around 100 g were used in this work. Fifteen animals received one intramuscular injection of commercial STP (Pisa Laboratories, México, 300 mg/kg) dissolved in commercial physiological saline solution (SPS), in the thigh of either hindleg. The remaining five animals were either untreated or received injections of SPS in the same conditions as the experimental ones.

Fixation and embedding procedures

One, 12 or 24 hrs after STP administration, animals in each time interval group ($n=5/\text{group}$) were deeply anesthetized with 1.5 g/kg chloral hydrate (Sigma) and transcardial perfusion was immediately started with isotonic saline solution (0.85% NaCl Sigma), followed by 4% paraformaldehyde (Polysciences Inc.) in 0.1M

sodium cacodylate buffer (Electron Microscopy Sciences) (SCB) pH 7.3 (fixative solution). After perfusion, the cranium was opened and auditory bullae were dissected and placed in cold fixative; bullae were opened under a dissecting microscope to expose vestibular organs which were postfixed in the same fixative as above for 2 hrs at 4 °C under slight agitation. Animals that were either injected with SPS and sacrificed 1 hour later or animals that were not injected at all served as controls and were subjected to the same procedure as those treated with STP.

Regardless of the experimental group, ampullary cristae extracted from the bulla of only one ear of each animal were immediately placed in SCB at 4 °C. Cristae were then washed 3 times for 10 minutes in the same fixative under the same conditions, and were transferred to cold (4 °C) 10% sucrose (Sigma) in which they remained for 3 hours; organs were then placed in 30% sucrose and left for 24 hrs at 4 °C. Ampullary cristae were embedded in tissue freezing medium, sectioned in 15 μm slices and mounted on glass slides. Sections were then briefly immersed in water to remove the embedding medium and mounted in Permaflour Aquous Mountant.

Confocal microscopy

Preparations that were kept in the cold for no more than one week were observed for fluorescence. The scanning head of a Bio-Rad 1025 confocal microscope equipped with an Ar-Kr laser (Bio-Rad, UK) and coupled to a Nikon TMD 300 inverted microscope was used. Fluorescent light was collected with a Nikon 10x, 0.25 N.A. objective. The laser intensity of the confocal microscope was set to 30% and the iris opening was of 6.0 units providing lateral or axial resolution of about 2 μm , respectively. The excitation wavelength was selected using an interference filter centered at the 488 nm line of the Ar-Kr laser. Emitted fluorescence was filtered at 522/32 nm. Image acquisition was performed

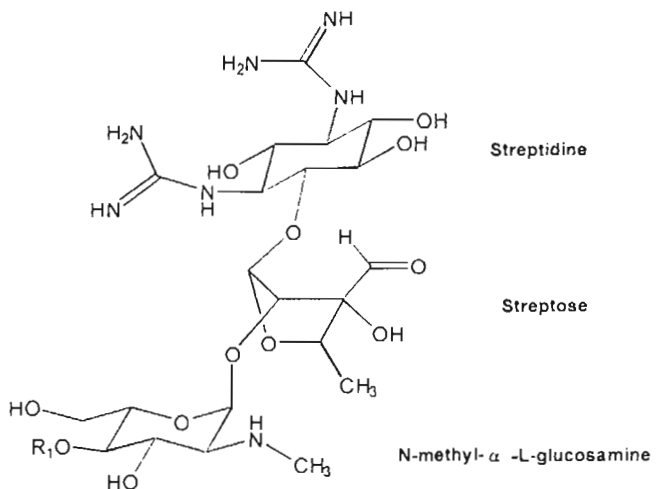


Fig 1. Chemical structure of streptomycin showing its components.

Streptomycin and streptidine-induced vestibulofluorescence

using the MLP 1024 (Bio-Rad); captured images (Kalman averaged, $n=9$) were converted to TIFF format using Confocal assisted 4.02 software by Todd Clark Brelje, 1994. Fluorescence intensity determination of each image was conducted as follows: a small ($15\ \mu\text{m}$) circular area of interest was defined and mean fluorescence intensity values were measured by moving the circle over the sensory epithelia, or nerve fibers of the vestibular cristae. In addition, two measurements away from the vestibular cristae were performed to determine the background fluorescence level (Image-Pro Plus; media Cybernetics). This value was subtracted from measurement of tissue. Statistical analysis of specific fluorescence between different groups (ANOVA) was conducted using StatView 4.5 (Abacus Concepts Inc.) and plot bars in Figure 3 were drawn with Origin 3.78 (Microcal software). Final editing and lettering of the images was performed using Paintshop Pro 5.01 (Jasc Software).

Fluorescence spectrum determination of STP, STD or STP-STD solutions

Individual experiments with solution concentration of $100\ \mu\text{M}$ STP or STD or both, in 0.85% NaCl pH 7.0; 0.1M sodium cacodylate buffer (SCB) pH 7.4; 0.1 M sodium phosphate (SPB) buffer, pH 7.4 or 4% paraformaldehyde (PAF) in SCB, pH 7.4 were scanned from 520 to 560 nm emission under 488 nm of excitation in a Spec Fluoromax Spectrofluorometer either at $22\ ^\circ\text{C}$ or at $37\ ^\circ\text{C}$. The basal line value for each buffer was automatically subtracted from measurements.

Elemental analysis

Purity of STP (Pisa Laboratories, México) was determined by elemental analysis of C, N, H, S and O in an EA 1108 Elemental Analyzer (Fisan Instruments) using sulfanilamide as standard of calibration. STD that was prepared from STP as already described (Barba-Bahrens et al., 1990) was also checked for purity by the same elemental analysis methodology.

Results

Elemental analysis of the purity of STP or STD

Percentage of elements (C, H, N, S) constituting these compounds showed that they were essentially pure, with hydrating content of 6 water molecules for STP and 1 H_2O for STD (Table 1). These results are of paramount importance, since observations and conclusions drawn from experiments either in vivo or in vitro could be entirely attributed to properties of STP or STD and not to any impurity that these compounds may carry with them.

Vestibular cristae fluorescence after STP injection

All ampullary cristae of animals injected with STP

and observed under a confocal Laser Microscope (Fig. 2 A-D) showed some degree of fluorescence. However, its intensity varied with time: 1 hour after injection, a high level of fluorescence was present in all structures, sensory and supporting cells and fibers of the stroma (Fig. 2B), and decreased significantly within 12 hours after injection (Fig. 2C). In vestibular cristae derived from animals 24 hours after STP injection, intensity of fluorescence notably decreased in all structures (Fig. 2D) to reach the control level (Fig. 2A). Calculations of fluorescence intensity in sensory epithelium and nerve fibers as expressed in arbitrary units is presented in Fig. 3A,B. It can be observed that fluorescence accumulated at a higher level in the sensory epithelium (Fig. 3A) than in nerve fibers of the stroma at all the time intervals observed and it had the same disappearance rate in both compartments.

STP and STD fluorescence in the various buffer solutions

To determine whether the observed fluorescence in tissue sections could be emitted by accumulated STP or STD as its derivative, or both present in vestibular structures, a fluorescence spectrum of $100\ \mu\text{M}$ solutions of STP, STD or STP-STD, dissolved in 0.85 NaCl, SPB, GASCB or SCB was obtained in a spectrofluorometer. Both compounds fluoresce regardless of the media but fluorescence signal of STD was higher than that of STP, at equimolar concentrations. Notwithstanding, when fluorescence was determined in a mixed STP-STD solution, its level was additive except for the phosphate buffer solution, in which case the fluorescence decreased

Table 1. Elemental Analysis of STP and STD Sulfate Salts

	PERCENT FOUND				H_2O Molecules
	C	H	N	S	
STP	32.71	6.30	12.57	6.29	6
STD	26.0	6.05	22.00	9.37	1

Percents were calculated considering minimal formulae:

STP: $(\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_{12})_2 (\text{H}_2\text{SO}_4)_3$

STD: $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Table 2. Level of streptomycin* - or streptidine* - derived fluorescence** in various salt solutions***.

	PHOSPHATES	NaCl	CACODYLATES	p-FORMALDEHYDE +CACODYLATES
STD	1319±21	192±17	236±22	333±29
STP	217±18	50±27	206±20	251±22
STP+STD	628±24	260±25	410±27	531±38

*: figures are mean values of c.p.s units for the fluorescence emitted between 522-532 nm±standard errors after excitation at 488 nm, of three independent experiments; **: concentration of either STP, STD or STP-STD was of $100\ \mu\text{M}$; ***: composition as described in Material and Methods.

(Table 2). These observations suggest that both chemical substances may contribute to the fluorescence observed in tissue sections.

Discussion

This paper presents evidence that histofluorescence in guinea pig ampullary cristae structures observed after acute treatment with STP is not only due to the accumulation of this antibiotic but also to the presence of a metabolite derived from it, which according to recent experiments from our group, could well be STD. (Meza and Granados, 1999). This statement is originated from the observation that fluorometric scanning of solutions of STP or STD in various buffers imitating the salt milieu to which this antibiotic is exposed in fixed inner ear structures resulted in fluorescence emitted at 522-532 nm increase when both compounds were together (Table 2); STD fluorescence signal in phosphate buffer, however, was higher than the mixture STD-STP probably due to a quenching effect. The wavelength of

emission of this *in vitro* signal is the same at which 15 μm cryostat sections of ampullary cristae fluoresce after STP administration. These observations are in line with and extend the reported histofluorescence produced 1 hour after 750 mg intraperitoneal injection of this antibiotic in inner ear structures of the guinea pig (Bareggi et al., 1986), which ascribed the observed fluorescence solely to accumulation of STP itself in inner ear structures. However, our interpretation is in disagreement with that of this group as some other possibilities may occur and are discussed below.

Histofluorescence is not due to any impurity of STP or STD

One interpretation of these results could be that observed fluorescence is not due to STP or STD but to an impurity present in either compound which accumulates in inner ear structures. This possibility was overruled when elemental analysis of STP or STD sulfate used showed that these compounds are

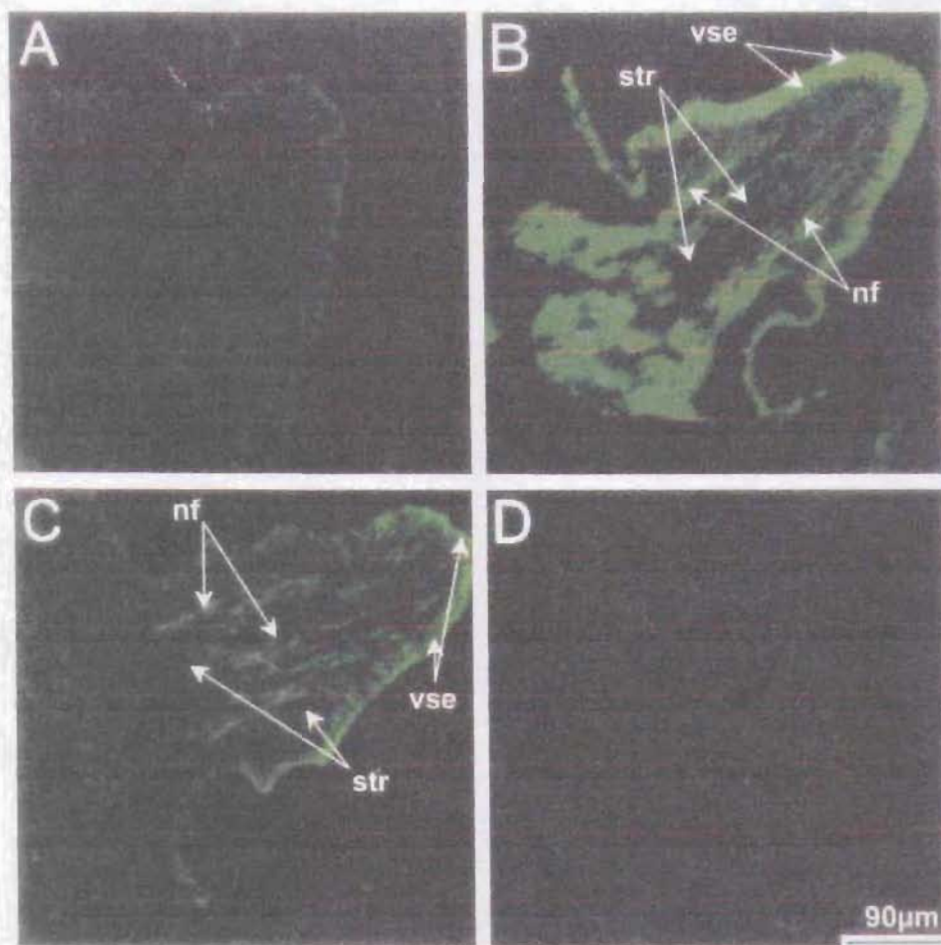


Fig. 2. Confocal microscopy images of 15 μm ampullary cristae sections of control (untreated) guinea pigs (A) or 300 mg/kg STP dissolved in saline physiological solution (SPS)-injected animals, one hour (B), 12 hours (C) or 24 hours (D) after injection. Fluorescence is uniformly distributed in the sensory epithelium (vse) and nerve fibers of the stroma (str) in both 1 hour and 12 hour-treated animals (A-C) whereas 24 hours after injection, the vestibular cristae presented as low a fluorescence level as the control (D).

Streptomycin and streptidine-induced vestibulofluorescence

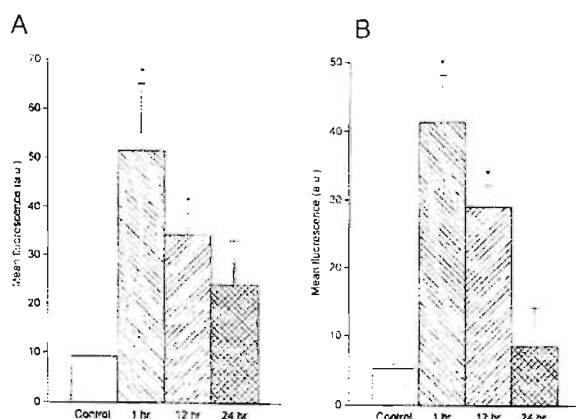


Fig 3. Fluorescence measurement in sensory epithelium (A) and nerve fibers of the stroma (B), as explained in Methods. Each column is the mean of 4 experiments with S.E.M. indicated by the bar. Significant differences ($p < 0.0001$) between control and STP-treated were as follows: In A control vs 1 hr; control vs 12 hr; 1 hr vs 12 hrs; 12 hr vs 24 hrs; 1 hr vs 24 hr; values of control vs 24 hr were not significant. In B: control vs 1 hr; control vs 12 hr; 1 hr vs 12 hr; 12 hr vs 24 hr; values of control vs 24 hr were not significant. When fluorescence in sensory epithelium and nerve fibers were compared, the levels of fluorescence were significantly lower in nerve fibers than in sensory epithelium at all times observed.

essentially pure.

Histofluorescence is not induced by stress

Another possibility could be that stress produced by the injection and handling of animals might be responsible for the accumulation of a fluorescent compound structurally unrelated to STP, in the inner ear. This phenomenon is not likely to occur since both Bareggi et al. and our group found a very low fluorescent level when observations were made in inner ear structures of untreated guinea pigs (Bareggi et al., 1986, results not shown in their paper, only described) or our own results in either untreated or injected animals with a volume of SPS equivalent to that used as the vehicle for the STP treatment and handled equally as the STP-treated ones (Fig. 2A).

Histofluorescence is due not only to STP but additionally to a fluorescent metabolite derived from it (streptidine) which may contribute to vestibulotoxicity or be the actual toxic agent

The rise of histofluorescence level observed in vestibullary structures over a period of one hour after injection of STP in doses equivalent to those used for medication in humans, and its decrease 12 hours after treatment partially agrees with reports (Voldrich, 1965; Anderson and Jewell, 1945) showing that STP specifically accumulates in the perilymph of the inner ear, 4 hours being the time of highest concentration of

the antibiotic, in contrast with our observations of high fluorescence intensity one hour after treatment, but it is in line with the same reports describing 24 hours the time of clearance. However, the level of fluorescence was significantly lower in nerve fibers than in the vestibular epithelium at all times observed. These results may explain the specificity observed with light microscopy in guinea pigs, showing some alterations of sensory cells of ampullary cristae and not of nerve fibers even at very short time periods after administration of the antibiotic (Meza and Iturbe, 1986). As both STP and its derivative STD may contribute to "in vitro" fluorescence, it follows that maybe after parenteral administration, STD derived from STP, by enzymatic hidrolisis (Meza and Granados, 1999) is accumulating in vestibular cristae structures together with STP and contributes to its toxicity. The disappearance of fluorescence after 24 hours of administration may mean that both compounds have been transported inside either the sensory cell or another compartment, whose identity is yet to be discovered.

Acknowledgements. We thank Dr. Anatoli Iatsimirski for invaluable advice in fluorescence spectroscopy methods, and Dr. Robert Fox (Manheim, PA, USA) for his careful review and correction of the manuscript. The technical expertise of Mr. Federico Garcia Jandete, Miss Concepción José and Ms. Tatiana Fiordeliso in histology, dissection and statistics, respectively, is gratefully acknowledged, as is the expert secretarial assistance of Mrs Myriam Morales. Grant E 27876 from CONACyT (México) to G.M. partially financed this investigation.

References

- Anderson D.G. and Jewell M. (1945). Absorption, excretion, and toxicity of streptomycin in man. *New England J. Med.* 233, 485-491.
- Aran J.M., Erre J.P., Guilhaume A. and Aurosean C. (1982). The comparative ototoxicities to gentamicin, tobramycin and dibekacin in the guinea pig. *Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl.* 390, 3-30.
- Barba-Behrens N, Bautista J.L., Ruiz M.E., Joseph-Nathan P., Flores-Parra A. and Contreras R. (1990). Coordination compounds derived from the interaction of streptomycin and cobalt, nickel, copper and calcium salts characterized by CNMR and spectroscopic studies. Structure and bonding properties of streptidine fraction. *J. Inorg Biochem.* 40, 201-215.
- Bareggi R., Narduccin P., Grill V., Mallardi F., Zweyer M. and Fusarolo P. (1986). Localization of an aminoglycoside streptomycin in the inner ear after its systemic administration. A histochemical study using fluorescence microscopy. *Histochemistry* 84, 237-240.
- Duvall A.J. and Wersäll J. (1964). Site of action of streptomycin upon inner ear sensory cells. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 57, 581-598.
- Fermin C.D., Lychakov D., Campos A., Hara H., Sondag E., Jones T., Jones S., Taylor M., Meza-Ruiz G. and Martin D.S. (1998). Otoconia: biogenesis, phylogeny, composition and functional attributes. *Histol. Histopathol.* 13, 1103-1154.
- Federspil P., Schätzle W. and Tiesler E. (1976). Pharmacokinetics and ototoxicity of gentamicin, tobramycin and amikacin. *J. Infect. Dis.* 134 (Suppl) S200.
- Hawkins J.E. Jr. (1981). Introduction: Historical aspects. In: *Aminoglycoside ototoxicity.* Lerner S.A., Metz G.J. and Hawkins J.E.

Streptomycin and streptidine-induced vestibulofluorescence

- (eds). Little, Brown and Co. Boston. pp XVII-XX.
- Igarashi M. and Jensen D.W. (1981). Vestibulotoxicity experiments in animals. In: Aminoglycoside ototoxicity. Lerner S.A. Matz G.J. and Hawkins J.E. (eds. Little, Brown and Co. Boston. pp 127-145.
- Meza G. and Granados O. (1999). Alta-glucosidasa con posible acción hidrolítica sobre aminoglicósidos en la sangre y vestibulo de ratas An. ORL Méx. 44, 134-137.
- Meza G. and Iturbe A.G. (1986). Cellular localization of neurotransmitters in the guinea pig vestibule. Assoc. Res. Otolaryngol. Abs. 89.
- Meza G., Bohne B., Daunton N. and Fox R. (1996). Damage and recovery of otolithic function following streptomycin treatment in the rat. Ann. NY Acad. Sci. 781, 666-669.
- Meza G., López I., Paredes M.A., Peñaloza Y. and Poblano A. (1989). Cellular target of streptomycin in the internal ear. Acta Otolaryngol. (Stockh) 107, 406-411
- Tran Ba Huy P., Manuel C. and Meulemans A. (1981). Kinetics of aminoglycoside antibiotics in perilymph and endolymph in animals. In: Aminoglycoside ototoxicity. Lerner S.A., Matz G.J., Hawkins J.E. (eds). Little, Brown and Co. Boston. pp 81-97.
- Voldrich L. (1965). The kinetics of streptomycin, kanamycin and neomycin in the inner ear. Acta Otolaryngol. 60, 243-248.
- Von Ilberg C., Spöndling H. and Arnold W. (1971). Autoradiographical distribution of locally applied dihydrostreptomycin in the inner ear. Acta Otolaryngol. 71, 159-165.

Accepted July 9, 2001

TRABAJO II

Streptidine, a metabolic derivative produced after administration of streptomycin *in vivo*, is vestibulotoxic in rats

O. Granados and G. Meza

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF

Summary. Streptomycin is the treatment of choice in developing countries for patients suffering from tuberculosis or other infectious diseases. However, it produces incapacitating vestibular symptoms whose onset is delayed and gradual. This observation led to the notion that a streptomycin metabolic derivative and not the antibiotic itself is the damaging agent for the inner ear.

To study further the existence of this ototoxic metabolite, chronic treatment with streptomycin or its putative derivative streptidine was carried out in young male Long Evans rats. The presence of streptomycin or streptidine in the blood of animals of either experimental group was assessed by high performance liquid chromatography and analysis of swimming behavior was used to evaluate vestibular damage. Features of the sensory epithelium and quantification of hair cells were attained in sections of the utricular organ of all groups by light microscopy.

After 25, 35 and 45 days of treatment with streptomycin, a metabolite with the same chromatographic properties as the streptidine standard run in parallel was identified in the blood of rats. Concentrations of the metabolite were 2.26 µg/ml on the 25th day and around 8.0 µg/ml in both the 35th and the 45th day of treatment, while streptomycin was below its detection level at either period. In streptidine-treated rats, the concentration of this compound was 1.0, 1.84 and 4.94 µg/ml on the 25th, 35th and 45th treatment days, respectively. Treatment with either streptomycin or streptidine resulted in similar abnormal swimming patterns and histological alterations of the utricular epithelium. Loss of hair cells was roughly equivalent even though streptidine was administered in a dose 90% lower than streptomycin.

The gradual appearance of streptidine as a metabolic

derivative of the antibiotic in the blood of rats or the administration of this compound alone, causing similar functional and structural vestibular deterioration seen in streptomycin-treated animals, supports the notion that streptidine is a potential contributor to ototoxicity after prolonged antibiotic administration.

Key words: Ototoxicity, Streptidine, Streptomycin, Streptomycin derivatives

Introduction

Primary tuberculosis (TB) has become a pandemic ailment in the last 20 years and it is an opportunistic disease in AIDS patients. Because streptomycin (STP) is cheap, has a rapid onset of bactericidal action and has no major side effects such as hepatitis associated with combined rifampicin-isoniazid therapy (Akanu et al., 2002), STP is the main therapeutic agent used in the treatment of TB and other infections in developing countries.

The widespread use of STP is of concern, due to a potential risk of serious disruption of balance and other side effects that may arise from specific damage to the hair cells of the sensory epithelium of vestibular cristae (Meza et al., 1989, 1996) or utricular maculae (Meza et al., 1994, 1996; Fermin et al., 1998), as well as damage to vestibular and auditory function typical of aminoglycosidic antibiotics (Fee, 1980; Wersäll, 1995). However, the abnormal swimming patterns observed in rats correlate well with the disorientation behavior shown in water by mutant mice (pallid mutant mouse), which often lack otoconia in both, saccular and utricular maculae (Trune and Lim, 1983a,b).

Although the unwanted side effects of aminoglycosides have been known for an extensive period, the molecular action that results in these effects remains unknown. Because the onset of offensive side effects is delayed and gradual, some investigators have postulated a metabolic transformation or activation of

the antibiotic to produce molecular species, which either may have greater toxicity than the drug itself or may act synergistically with STP to produce ototoxicity (Crann and Schacht, 1996). Attempts to identify ototoxic metabolites derived from kanamycin (Owada, 1962), gentamicin (Huang and Schacht, 1990; Crann et al., 1992) or STP (Wang et al., 1999) have failed to characterise these putative compounds.

The STP molecule is composed of three molecular entities: streptidine (STD), an aminated cyclitol bearing two guanidine groups (in positions 1 and 5 of the ring); streptose, a five-carbon ring sugar and N-metilglucosamine. These compounds are bound to one another via respective glycosidic links (Meza et al., 2001). In chemical studies the application of either basic or acidic hydrolysis to STP always resulted in STD as one of the products, indicating that the alpha 1,4-glycosidic bond between STD and streptose is the most labile region of the molecule (Barba-Behrens et al., 1990; Meza et al., 1999).

In vitro incubation of STP in human serum gave rise to STD which could be metabolically separated from the rest of the molecule (Granados et al., 2002). Other studies suggested that STD might be the active ototoxic part of the molecule because when isolated cell membranes of rat (kidney, liver, brain or vestibular hair cells) were incubated with either STP or any of its three components, only the STD portion of STP was bound to hair cell membranes of the vestibule to a highly specific cationic site through its guanidine groups (Meza et al., 1999).

Cytofluorescence experiments in vestibular tissue of guinea pigs acutely treated with STP have demonstrated fluorescence attributed to the antibiotic accumulation in the vestibular sensory cells and nerve fibers of the stroma (Bareggi et al., 1986; Meza et al., 2001). Fluorescence was very intense after 1 hour of treatment with STP and increased after 12 hours, decreasing to control levels 24 hours after treatment (Meza et al., 2001). STP reaches the ear through blood and its entry to the cerebrospinal fluid is very limited (Strausbaugh et al., 1977; Sande and Mandell, 1996). In turn, the half-life of STP is 4 hours in the inner ear perilymph and its concentration decreases until being completely cleared out after 24 h (Voldrich, 1965; Tran Ba Huy et al., 1981), suggesting, in our experiments, an additional fluorescent agent (probably STD) had reached the ear and accumulated during a 4-12 hour period.

We could corroborate these observations when STP and STD were incubated individually or together in a test tube in various buffer solutions and spectrofluorescent observations detected an increase of the signal only when both compounds were together (Meza et al., 2001).

To study further the proposed existence of STD as a putative ototoxic metabolic derivative of STP we conducted parallel biochemical, behavioral and morphological studies of the effects of chronic treatment with STP or STD on male rats.

Materials and methods

Animals

Young male Long-Evans rats weighing around 70-80 g were used in this study. Animals were housed individually under a standard 12-h light/12-h dark cycle at room temperature of 22 °C with food and water *ad libitum*. All experimental manipulations were performed after each experimentation period during the light phase of the cycle. The general good health of the animals throughout experimentation time was ascertained by the estimation of body weight increase. All methods used were in compliance with the Rules in Health Matter (Ministry of Health, México) with the approval of local Animal Care Committee.

Treatment

Rats were given daily intramuscular injections of STP (400 mg/kg body weight) (Pisa Laboratories, México) or 50 mg/kg of STD, which was obtained by acid hydrolysis of STP and purified and identified, as already described (Barba-Behrens et al., 1990; Meza et al., 2001) in alternate right or left hind leg. Due to STD partial water insolubility, both compounds were dissolved in 70% glycerol for administration. Control rats received 70% glycerol alone for the same time interval and conditions as their experimental comrades.

Experimental groups

Data from 3 experimental conditions are used in this report. The animals in the first experimental paradigm (Group 1) were used to study the possible transformation of STP into a derivative in the blood of animals during STP treatment. This group was subdivided into 4 experimental subgroups: 3 of them were treated with STP and the animals were sacrificed 25, 35 or 45 days after treatment (n=4 to 9 each) and a group of normal glycerol-treated animals which served as controls (n=4 each) sacrificed on the respective STP treatment days.

In the second experimental approach (Group 2), the animals were subdivided into 4 experimental subgroups: 3 subgroups were treated with streptidine (STD), putative metabolic derivative of STP and the rats were sacrificed 25, 35 and 45 days after treatment (n=5 to 11 each). The fourth group was the control-glycerol-treated animals (n=4 each) sacrificed on respective 25, 35 and 45 days after treatment.

The third experimental condition (Group 3) was designed to assess whether alterations in swimming behaviour (putatively attributable to vestibular utricular damage) were present in the rats 25, 35 and 45 days after treatment with either STP or STD and whether histological damage occurred in either treatment group.

This group of animals was subdivided in turn into 9 experimental subgroups: 3 subgroups (n=9 to 14 each) were treated with STP for 25, 35 or 45 days,

Ototoxicity of streptidine in chronically treated rats

respectively. 3 subgroups (n=7 to 17 each) underwent 25, 35 or 45 days of respective STD administration, and 3 subgroups of control glycerol-treated animals (n=5 each) for respective STP or STD treatment days.

HPLC conditions for groups 1 and 2

The HPLC method was performed essentially as described by Whall (1981). The chromatographic system consisted of a Pump Waters 600E (Waters Assoc., Milford, MA, USA) equipped with an autosampler Waters 717plus and a Photo diode array (PDA) detector Waters 996. The analytical column was a Prodigy ODS3 reversed-phase, 5 μ m, 250x4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The column flow-rate was maintained at 1.3 ml/min and its temperature was set to 25 \pm 0.1 $^{\circ}$ C. The detector wavelength was of 200 \pm 0.2 nm. Upon completion of daily analysis, the column was washed with a mixture of acetonitrile: water (65:35).

The mobile phase to separate and estimate STD and STP contained 20 mM sodium 1-hexanesulfonate (REGIS, Morton Grove, IL, U.S.A) and 25 mM tribasic sodium phosphate (J.T. Baker, Xalostoc, México), in a water:acetonitrile (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) mixture (85:12-15 v/v). The solutions were adjusted to pH 6.0 with 85% phosphoric acid (J.T. Baker, Xalostoc, México) and filtered through a 0.22 μ m filter (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) prior to use.

Rat serum

Trunk blood was collected by decapitation and serum was obtained by centrifugation for 12 min at 12,000 rpm at room temperature. Procedures were conducted individually on controls, STP or STD-treated rats at treatment days of 25, 35 and 45 days.

Extraction of STP and STD and HPLC determination

Individual sera were deproteinized by addition of 20% trichloroacetic acid (TCA). Supernatant was used for chromatography after separation from precipitate by centrifugation at 14,000 rpm for 40 min.

Concentration of either STP or STD present in serum of treated rats was calculated from standard curves derived from analysis performed in deproteinized serum of control rats to which a mixture of 5 increasing amounts (from 5-80 μ g/ml) of STP or STD (from 5-16 μ g/ml) were added.

Swimming analysis and histology for group 3

Swimming behaviour was assessed for each animal of the nine subgroups of group 3, starting on the 25th day of treatment and continuing at approximately one-week intervals, with animals tested repeatedly as the duration of treatment was extended. Rats were placed in a water tank at 27 $^{\circ}$ C and swimming activity was recorded on videotape for 45 sec as described by Meza et al. (1996).

Analysis and classification of swimming patterns were performed after the test.

Fixation and embedding procedures for histological studies

One day after treatment was interrupted, each individual animal which presented abnormal swimming patterns throughout STD or STP administration and their respective controls were deeply anaesthetised with 475 mg/kg chloral hydrate (Sigma, St. Louis, MO, USA) and processed essentially as already reported (Meza et al., 1996; Fermin et al., 1998). They were transcardially perfused, first with isotonic saline solution (0.85% NaCl, Sigma) and secondly with 4% paraformaldehyde (Polysciences Inc.) in 0.1 M sodium cacodylate (Electron Microscopy Sciences) buffer (SCB) pH 7.4 at 4 $^{\circ}$ C (fixative solution). After perfusion, the cranium was opened and auditory bullae were dissected and placed in the same cold fixative solution for a 2-hour post-fixation under slight agitation. After that, bullae were opened under a dissecting microscope to expose vestibular organs and the utricular macula was extracted. The utricular macula was then thoroughly rinsed, dehydrated and embedded in paraffin.

The maculae were then sectioned at 3 μ m until the medial border was reached. After sectioning into the region further to reach the targeted area a minimum of 80 serial sections were obtained from within the medial part of the macula (95 to 115 μ m). Sections were then mounted on gelatin-coated slides, stained with 0.2% toluidine blue and examined under light microscopy with Nomarski illumination.

Light microscopy

Sections from each group were observed using a Polyvar light microscope (Reichert-Jung, Wien, Austria). The specimens to be analysed were located using a 10x objective and later focused with a 40x objective to ensure maximum detail. Permanent record images were captured with a digital video camera (Jai, Tokyo, Japan) coupled to the microscope using Matrox PC-VCR software. For publication, they were edited and labelled with Adobe Photoshop 5.0 LE program after which they were converted to TIFF format using GIMP software.

Criteria for hair (sensory) cell identification

Hair cells were identified by the presence of well-defined stereociliary tufts emerging from a smooth upper surface located at the luminal portion of the sensory epithelia.

Quantitative estimation of number of sensory cells in the utricular macula

The methodology followed was essentially as

described by Ross (1997) and López et al. (2002). An area of about 3.9 mm² in the central part of the macular section was chosen for quantitative estimation of the sensory cells (Fig. 3A,B). To obtain total hair cell count the average cell counts of sections within 20 µm were multiplied by the ratio of all sections in the interval (20 µm) to the thickness of the counted sections (3 µm).

Results

Determination of STD in blood of STP or STD-treated rats by HPLC

A mixture of 7.2 µg/ml of STD plus 77 µg/ml of

STP in deproteinized control rat serum rendered satisfactory separation of STD from STP, with retention times of 3.6 min and 6.6 min, respectively (Fig. 1A).

After chromatographic analysis of blood derived from rats treated for 25, 35 or 45 days with STP, no peak was observed in the STP region; however, a peak that increased in height with increasing treatment period was observed at the region of STD (Fig. 1B,C and D).

Similarly, in animals treated with STD a discrete STD peak was evident on the 25th or 35th treatment days which increased in height 45 days after treatment (Fig. 1E). In serum of control animals, no STD or STP peaks were found (not shown).

The concentrations of STD derived *in vivo* from STP

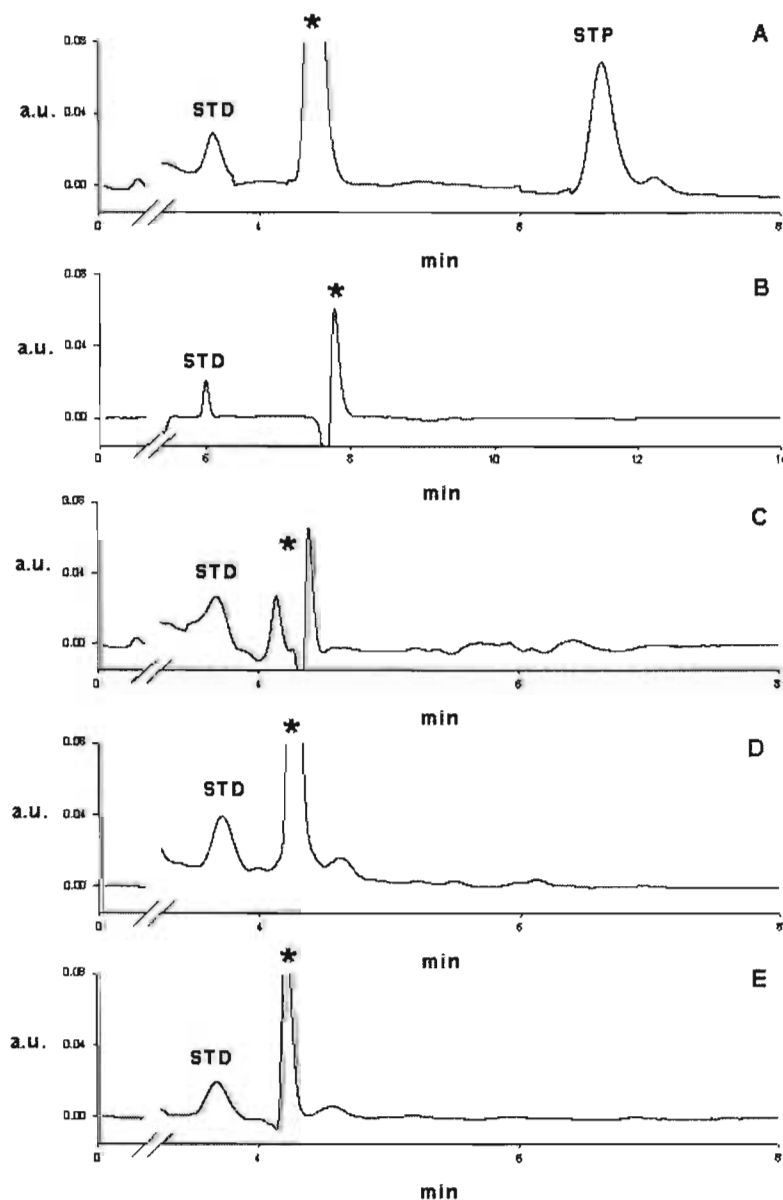
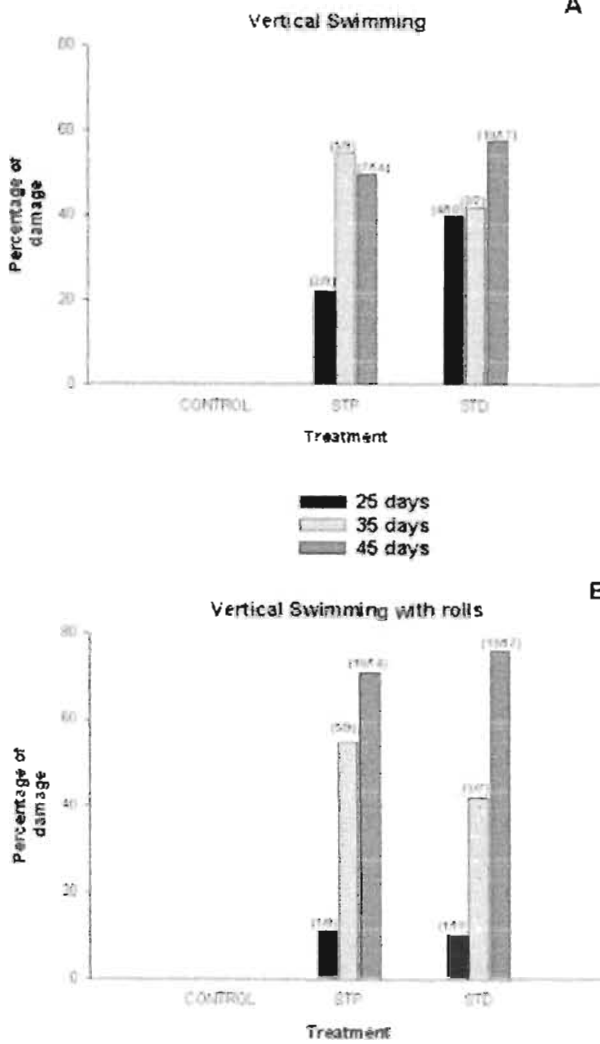


Fig. 1. Chromatograms of a typical assay of rat serum of the various experimental groups run in parallel. **(A)** STD, 7.2 µg/ml and STP, 77 µg/ml standards in rat serum extract. **(B)** Serum extract of STP-treated rats (400 mg/kg) at 25 days, **(C)** 35 days and **(D)** 45 days of treatment. **(E)** Serum extract of STD-treated rats (50 mg/kg) at 45 days of treatment. Asterisks indicate a peak of absorbance of the serum contents. Retention time (RT) for STD at 25 days of treatment in 12% acetonitrile was of 6.0 min. RT for STD and STP in 15% acetonitrile were 3.6 to 6.6 min, respectively. a.u.: arbitrary units.

Ototoxicity of streptidine in chronically treated rats



A

are presented in Table 1. After 25 days of treatment, a concentration of 2.26 µg/ml of STD was found and concentrations of 8.69 and 7.70 µg/ml of STD were present at 35 or 45 days of STP treatment, respectively. By the same token, in STD-treated animals, the respective STD concentrations at 25, 35 and 45 days after treatment were of 1.0, 1.84 and 4.94 µg/ml (Table 1).

Swimming behavior

Abnormal swimming patterns, already described for STP treated rats (Meza et al., 1994, 1996) which consisted of vertical swimming and vertical swimming

B

Table 1. Concentration of STD in serum of rats after treatment with STP (400mg/kg) or STD (50 mg/kg)*.

DAYS OF TREATMENT	STD (µg/ml) IN STP-TREATED	STD (µg/ml) IN STD-TREATED
25	2.26±0.11 (4)	1.00±0.20 (5)
35	8.69±0.52 (9)	1.84±0.30 (7)
45	7.70±0.29 (9)	4.94±0.35 (11)

*: Figures are mean values ± standard error of the mean for the number of rats in parenthesis whose extract was run in triplicate.

Fig. 2. Histograms of the percentage of rats displaying the disrupted swimming patterns (Vertical swimming, A; Vertical swimming with rolls, B) in control, STP and STD-treated rats at 25, 35 and 45 days of treatment. The number of damaged rats/total number of rats is indicated in parenthesis above the respective columns.

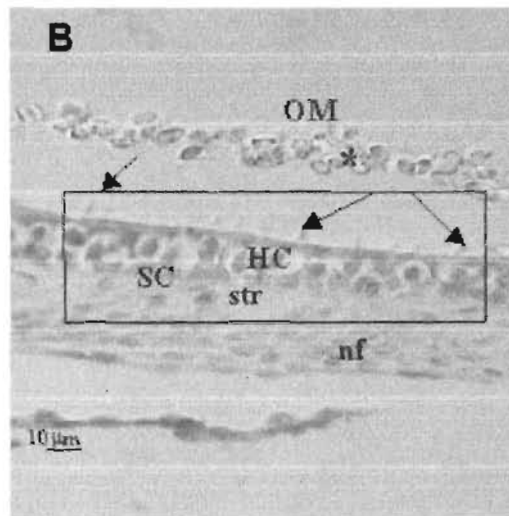
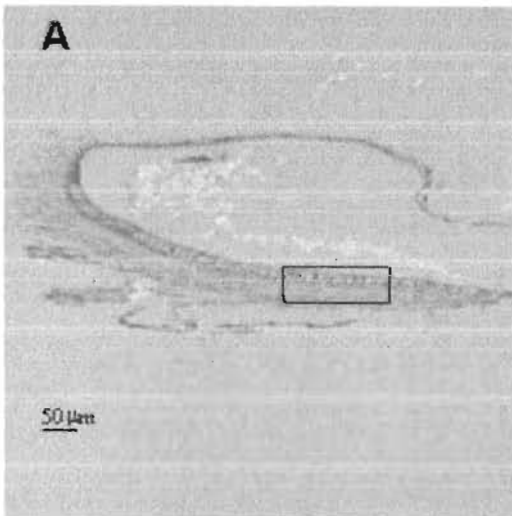


Fig. 3. A. Light microscopy of the normal rat utricular macula (control rats). B. A higher magnification view of area within the rectangle in A. OM, otolithic membrane; HC: hair cells; SC: supporting cells; str: stroma; nf: nerve fibres. Asterisks indicate otoconia and hair bundles (arrows). Sections were observed under Nomarski illumination.

Ototoxicity of streptidine in chronically treated rats

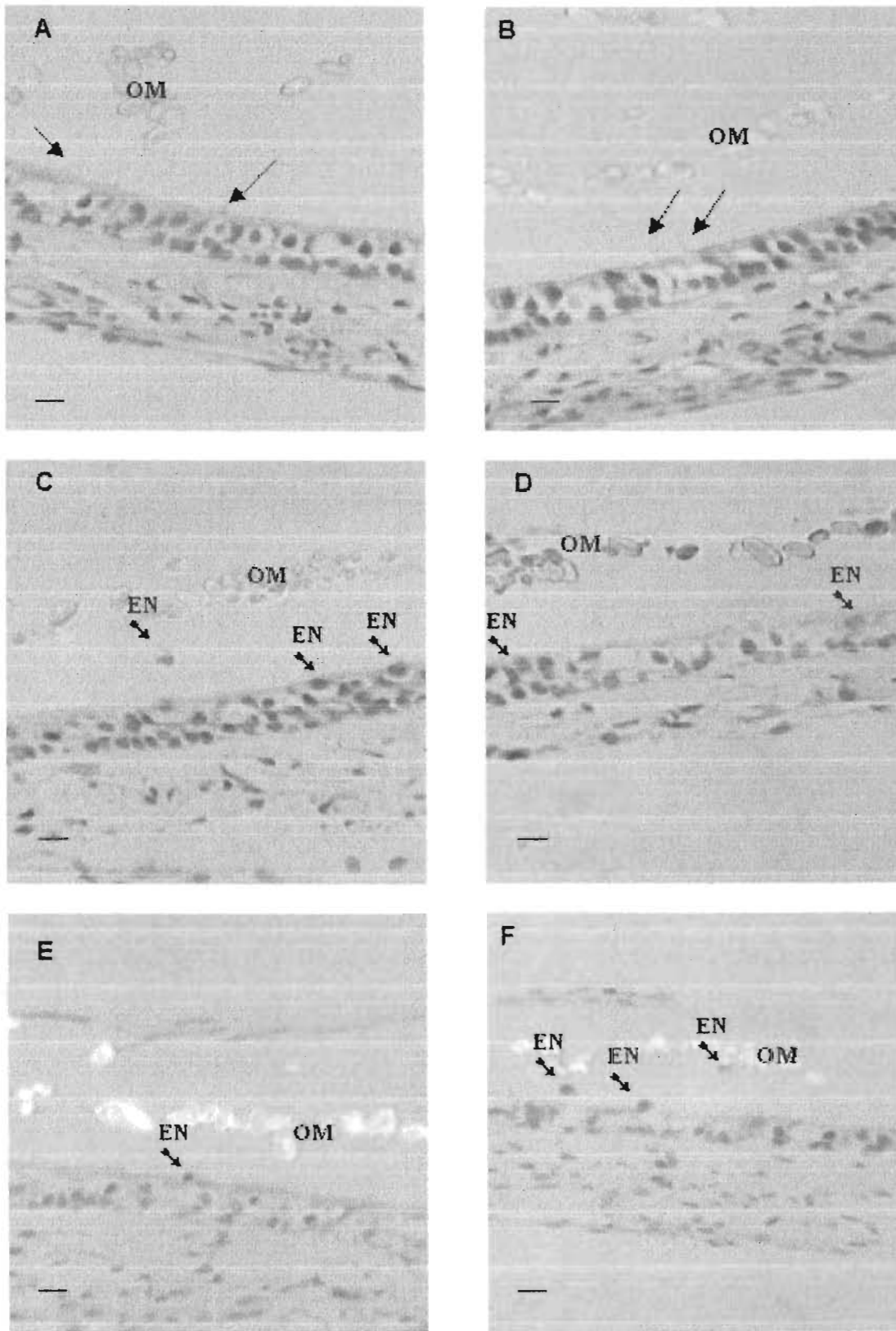


Fig. 4. Typical digital light micrographs of 3 μ m utricular epithelium sections. A, C and E. STP-treated rats (400 mg/kg) after 25, 35 and 45 days of administration, respectively. B, D and F. STD-treated rats (50mg/kg) at 25, 35 and 45 days, respectively. OM: otoithic membrane; EN: extruded nuclei and hair bundles (arrows). Sections were observed under Nomarski illumination. Bars: 10 μ m.

Ototoxicity of streptidine in chronically treated rats

with rolls, the former appearing earlier than the latter. These patterns were observed in both STP and STD-treated animals (Fig. 2). However, the effects increased in magnitude on subsequent days of STP or STD administration (Fig. 2).

The percentage of rats in either treatment showing vertical swimming was 40%, 42% and 58% for 25, 35 and 45 day-STD-treated animals; 22%, 55% and 50% for STP-treated rats for respective 25, 35 and 45 days of treatment (Fig 2A). Whereas animals presenting vertical swimming with rolls was 10%, 42% and 76% for STD-treated animals; 11%, 55% and 71% for STP-treated rats (Fig 2B), respectively.

Morphological damage in the utricular epithelium after STD or STP treatment

Three-micrometer sections of utricular organs of control animals injected with glycerol alone (Fig. 3B) showed the typical features of the utricular macula were a pseudostratified epithelium composed of hair cells with their nuclei in an upper layer, and supporting cells with their nuclei forming a lower layer. The upper surface of the epithelium was smooth with hair bundles projecting from it into the overlying otolithic membrane that contained many polymorphous otoconia of relatively homogeneous size.

The number of hair cells in utricular sections of glycerol-control animals stayed unchanged throughout treatment (n=166, 173 and 176) (Table 2). These features were followed in sections of treated animals.

After STP treatment for 25 days, the epithelium had a similar appearance to the control (Fig. 4A), but after 35 and 45 days there was increasing levels of disorganisation and hair cell loss (Fig. 4C,E). Thus numbers of hair cells were 151, 88 and 79 after each treatment period, respectively (Table 2). This loss of hair cells was accompanied morphologically by a reduction in visible hair bundles, some evidence of extruded hair cells nuclei and irregularities in the surface of the epithelium and in the psuedostratification.

After STD treatment, the changes of the utricular epithelium at each stage were similar as STP-treated animals (Fig. 4B,D,F) and the hair cells loss was 157, 95

and 49 after 25, 35 and 45 days, respectively (Table 2). One further alteration noted in the latter treatment was reduction in the apparent size of the otoconia.

Discussion

Our results demonstrate the presence of STD *in vivo* following chronic treatment with STP. Further, we show that chronic treatment with STD, as assessed by swimming behaviour observations, produces disruption of utricular organ-related vestibular function earlier described by us in rats treated with STP (Meza et al., 1994, 1996; Fermin et al., 1998). These effects of STD on swimming are similar as those produced by STP, even when the dose of STD is only 10% that of the STP dose.

The putative source *in vivo* of STD is hydrolysis of the aminoglycoside in the rat blood, as the metabolic transformation that has been previously suggested for other aminoglycosides (Huang and Schacht, 1990; Crann et al., 1992; Crann and Schacht, 1996).

These findings, in concert with a similar specific decrease in the number of sensory cells in the utricular macula produced in either STP-treated animals or by a lesser dose of STD, support our hypothesis that blood-borne STD is the major ototoxic agent producing disruption of vestibular function in STP therapy (Meza et al., 2001). Other studies have demonstrated that this antibiotic accumulates in the perilymph and remains there for a short time period (0 to 4 hours) after which it is excreted (Voldrich, 1965; Tran Ba Huy et al., 1981).

The *in vivo* presence of STD in the blood of STP-treated animals contradicts the assertion that STP, and possibly other aminoglycoside antibiotics, are excreted in urine essentially unchanged (Schentag and Jusko, 1977). This finding also corroborates the observation of specific ototoxic effects of STP without any nephrotoxic effects reported for other antibiotics (Williams et al., 1987; Begg and Barclay, 1995) as the general health of the animals in our study was preserved.

This is the first report to our knowledge to identify STD as a vestibulotoxic compound derived *in vivo* from STP. Wang and collaborators (1999) described a cytotoxic metabolite that was converted from STP in serum of patients with hearing loss, resulting from treatment with STP. The HPLC technique in Wang et al. (1999) was similar to that used here, and the compound derived from STP produced an HPLC peak at a retention time similar to that of the STD on this study. However, Wang et al. (1999) did not use procedures that identified the specific compound that derived from STP.

These results confirm that there is a longstanding metabolic capability in the rat blood to metabolise systemically administered STP and convert it to STD. Further, these data suggest this metabolite is potentially contributing together with STP for damage to the inner ear. However, the precise biochemical mechanism and the possible blocking of this conversion, which may lead to a safer treatment to patients requiring STP, is presently being investigated.

Table 2. Estimation of the number of sensory cells in the utricular macula after treatment with STP or STD*.

DAYS OF TREATMENT	CONTROL	STP	STD
25	166±6.38 (3)	151±12.87 (3)	157±9.18 (4)
35	173±7.57 (3)	88±10.48 (5)	95±11.20 (5)
45	176±10.31 (3)	79±9.89 (5)	49±8.10 (5)

*: Figures are values ± standard error of the mean of cell number estimated as described in Methods for rats indicated in parenthesis.

Acknowledgements. Thanks are due to Dr. Robert A. Fox (Manheim, PA, USA) for careful review and correction of the manuscript, to Dr. Luis Fernando Oropeza for HPLC technique assistance, to Mr. Federico Garcia Jandete, Mr. Rodolfo Paredes, Miss Gabriela Martínez and Mrs. Cecilia Escalona for valuable technical help and to CONACyT (México) Grant 38952M to GM for partial financial support.

References

- Akano E., Maekawa T., Uchinashi M. and Kanamori R. (2002). A study of streptomycin blood level information of patients undergoing hemodialysis. *Biopharm. Drug Dispos.* 23, 47-52.
- Barba-Behrens N., Bautista L.J., Ruiz E.M., Nathan J.P., Flores P.A. and Contreras R. (1990). Coordination compounds derived from the interaction of streptomycin and cobalt, nickel, copper and calcium salts. Characterized by ¹³C NMR and spectroscopic studies. Structure and bonding properties of the streptidine fraction. *J. Inorg. Biochem.* 40, 201-215.
- Bareggi R., Narducci P., Grill V., Mallardi F., Zweyer M. and Fusaroli P. (1986). Localization of an aminoglycoside (streptomycin) in the inner ear after its systemic administration. *Histochemistry* 84, 237-240.
- Begg J.E. and Barclay L.M. (1995). Aminoglycosides-50 years on. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 39, 597-603.
- Crann A.S., Hang Y.M., McLaren D.J. and Schacht J. (1992). Formation of a toxic metabolite from gentamicin by a hepatic cytosolic fraction. *Biochem. Pharmacol.* 43, 1835-1839.
- Crann A.S. and Schacht J. (1996). Activation of aminoglycoside antibiotics to cytotoxins. *Audiol. Neurootol.* 1, 80-85.
- Fermin C.D., Lychacov D., Campos A., Hara H., Sondag E., Jones T., Jones S., Taylor M., Meza-Ruiz G. and Martin D.S. (1998). Otoconia biogenesis, phylogeny, composition and functional attributes. *Histol. Histopathol.* 13, 1103-1154.
- Fee E.W. Jr. (1980). Aminoglycoside Ototoxicity in the Human. *The Laryngoscope. Suppl.* 24, 1-19.
- Granados O., Meza G. and Barba-Behrens N. (2002). Streptidine is released from streptomycin by enzymatic hydrolysis in the human serum. 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abstr. P1078, 241.
- Huang Y.M. and Schacht J. (1990). Formation of a cytotoxic metabolite from gentamicin by liver. *Biochem. Pharmacol.* 40, R11-R14.
- López I., Ayala C. and Honrubia V. (2002). Synaptophysin immunohistochemistry during vestibular hair cell recovery after gentamicin treatment. *Audiol. Neurootol.* 8, 80-90.
- Meza G., López I., Paredes M.A., Peñaloza Y. and Poblano A. (1989). Cellular target of streptomycin in the internal ear. *Acta Otolaryngol. (Stockh).* 107, 406-411.
- Meza G., Daunton N., Fox R., López-Griego L., Pratt H. and Zepeda H. (1994). Vestibulotoxicity of streptomycin in the pigmented rat. *Collegium Otorhinolaryngol. Abstr.* 57, 45-46.
- Meza G., Bohne B., Daunton N., Fox R. and Knox J. (1996). Damage and recovery of otolith function following streptomycin treatment in the rat. *Ann NY Acad. Sci.* 781, 666-669.
- Meza G., Guerra G., Granados O., Barba N., Toxqui A. and Hernández C. (1999). Estreptomina: propiedades fisicoquímicas y toxicidad vestibular. *Ann. Otorinol. Mexicana* 44, 21-25.
- Meza G., Barba-Behrens N., Granados O., Hernández CA. and Toxqui A. (2001). Vestibular histofluorescence could be due to accumulation of both the antibiotic and its derivative, streptidine, after acute streptomycin treatment in the guinea pig. *Histol. Histopathol.* 16, 1143-1148.
- Owada K. (1962). Experimental studies of the toxicity of kanamycin, its hydrolysed products and neomycin. *Chemotherapia* 5, 277-293.
- Ross D.M. (1997). Morphological evidence for local microcircuits in rat vestibular maculae. *J. Comp. Neurol.* 379, 333-346.
- Sande A.M. and Mandell L.G. (1996). Antimicrobial agents. The Aminoglycosides. In: *The pharmacological basis of the therapeutics.* 8th ed. Goodman S.L. and Gilman A. (eds). Pergamon Press. New York. pp 1098-1116.
- Schentag J.J. and Jusko W.J. (1977). Renal clearance and tissue accumulation of gentamicin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 22, 364-370.
- Strausbaugh L.J., Mandalari C.D. and Sande A.M. (1977). Comparison of four aminoglycoside antibiotics in the therapy of experimental E. Coli meningitis. *J. Lab. Clin. Med.* 89, 692-702.
- Tran Ba Huy P., Manuel C. and Meulemans A. (1981). Kinetics of aminoglycoside antibiotics in perilymph and endolymph in animals. In: *Aminoglycoside ototoxicity.* 1a ed. Lerner A.S., Matz J.G. and Hawkins E.J Jr. (eds). Little, Brown and Company. Boston. pp 81-98.
- Trune D.R. and Lim D.J. (1983a). A morphometric study of the pallid mutant mouse inner ear. *Am. J. Otolaryngol.* 4, 261-272.
- Trune D.R. and Lim D.J. (1983b). The behavior and vestibular nuclear morphology of otoconia-deficient pallid mutant mice. *J. Neurogenet.* 1, 53-69.
- Voldrich L. (1965). The kinetics of streptomycin, kanamycin and neomycin in the inner ear. *Acta oto-laryng.* 60, 243-248.
- Wang S., Bian Q., Liu Z., Feng Y., Lian N., Chen H., Hu Ch., Dong Y. and Cai Z. (1999). Capability of serum to convert streptomycin to cytotoxin in patients with aminoglycoside induced hearing loss. *Hearing Res.* 137, 1-7.
- Wersäll J. (1995). Ototoxic antibiotics: a review. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 519, 26-29.
- Whall T.J. (1981). Determination of streptomycin sulfate and dihydrostreptomycin sulfate by high performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 219, 89-100.
- Williams P.D., Bennett D.B., Gleason C.R. and Hottendorf G.H. (1987). Correlation between renal membrane binding and nephrotoxicity of aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 570-574.

Accepted October 13, 2004

TRABAJO III

ALFA-GLUCOSIDASA CON POSIBLE ACCIÓN HIDROLÍTICA SOBRE AMINOGLICÓSIDOS EN LA SANGRE Y EL VESTÍBULO DE RATAS

ALPHA-GLUCOSIDASE WITH POSSIBLE HYDROLYTIC ACTION OVER AMINOGLYCOSIDES IN THE BLOOD AND VESTIBULE OF RATS

GRACIELA MEZA, OMAR GRANADOS
Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, DF

RESUMEN

Antecedentes e hipótesis. La estreptomycin (STP) es un antibiótico aminoglicósido que se usa en el tratamiento de la tuberculosis, con efectos tóxicos importantes sobre la función vestibular. Los antecedentes farmacocinéticos muestran que la STP se acumula en un principio en la parte perilinfaica y por mecanismos aún no descritos pasa a la endolinfa donde su principal blanco de acción son los cilios sensorios de las células pilosas vestibulares. Consideramos importante averiguar que parte de la molécula de STP es la responsable de su toxicidad vestibular, y tenemos evidencias que señalan la parte estreptidina (STD) como la porción activa, por lo que se propone que la STP actúa fragmentada por acción de una alfa-glucosidasa que hidroliza el enlace -1,4 con la liberación de la STD y que esté presente ya sea en el vestíbulo, en el torrente sanguíneo o en ambos. *Método.* Se determinó la actividad de alfa-glucosidasa en el suero y en homogeneizado vestibular de la rata usando p-nitrofenil--d-glucósido como sustrato; siguiendo el p-nitrofenilo (pNP) liberado espectrofotométricamente a 400 nm. *Resultados.* Se encontró alfa-glucosidasa tanto en el suero como en el vestíbulo de la rata con actividades específicas de 0.035 y 1.3 nmol de pNP/mg proteína/min respectivamente. *Conclusión.* La actividad encontrada en vestíbulo es semejante a la de la alfa-glucosidasa lisosomal del hígado de la rata (1.5 nmol de pNP/mg proteína/min) por lo que es posible que la alfa-glucosidasa presente en el suero y en el vestíbulo pueda romper a la STP, liberando la parte STD que actuaría sobre el oído.

Palabras Clave: Alfa-glucosidasa, Aminoglicósidos, Vestíbulo de rata

ABSTRACT

Background and hypothesis. Streptomycin (STP) is an aminoglycosidic antibiotic used in the treatment of tuberculosis with toxic effects on the vestibular function. Its pharmacokinetics show that STP accumulates in the perilymph of the inner ear and through unknown mechanisms, passes to the endolymph where its main targets are the sensory hair tufts of hair cells. It would be important to find which part of the molecule is responsible for its vestibular toxicity. We have evidences that the streptidine (STD) moiety of the molecule is its active part. Therefore, we propose that STP does not act complete, but fragmented by the action of an alfa-glucosidase enzyme (which hydrolyzes the STD portion of STP) present either in the vestibule, in the blood or in both. *Methods.* Activity of alpha-1,4 glucosidase (EC 3.2.1.20) was determined in serum and in homogenate of vestibular tissue of pigmented rats. *Results.* We found a specific activity of 0.035 and 1.3 nmol of pNP/mg protein/min in serum and vestibule, respectively. This activity is similar to the one found in rat liver lysosomes (1.5 nmol of pNP/mg protein/min). *Conclusion.* It is conceivable that the enzyme present in both the blood and the inner ear could fragment STP to its components which would act upon the sensory cells, damaging them.

Key Words: Alphaglucoisidase, Aminoglycosidic antibiotics, Rat vestibule

INTRODUCCIÓN

La alfa-glucosidasa (EC 3.2.1.20) o -D-glucósido glucohidrolasa se puede clasificar en dos grandes grupos de acuerdo al pH óptimo de su actividad, como alfa-glucosidasa ácida (pH 4-5) ó alfa-glucosidasa neutra (pH 6-7)¹. Su actividad biológica consiste en hidrolizar enlaces -1,4 glucosídicos. *In vitro* rompe residuos de glucosa de terminales no reductoras de anillos de alfa-glucano de disacáridos y polisacáridos de alto peso molecular como el almidón (Fig. 1)^{1,2}

Esta enzima se describe por primera vez en *E. coli* cultivada en medios ricos de maltosa por Monod y Torriani en 1948 (citado en 3). Posteriormente, se ob-

serva que la ausencia de la forma ácida produce anomalías metabólicas en el almacenaje del glucógeno en lisosomas por lo que comienza a determinarse su actividad en diversos tejidos como hígado, corazón y músculo esquelético^{1,4}. Por otro lado, de la alfa-glucosidasa neutra o maltasa, no se conoce función en el metabolismo.

Tanto la forma ácida como la neutra se han purificado de diversas fuentes como hígado, músculo, placenta, intestino, suero, etc. y de especies tan diferentes como bacterias, levaduras y mamíferos^{1,2,4-10}. Sin embargo, la ubicación de esta enzima es diferente en cada

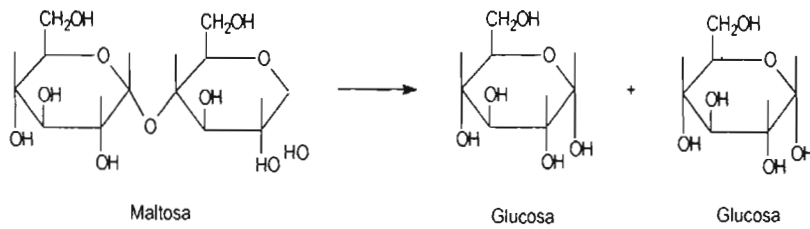


Fig. 1. Esquema en que se muestra el tipo de compuestos -glucanos que hidroliza la α -glucosidasa

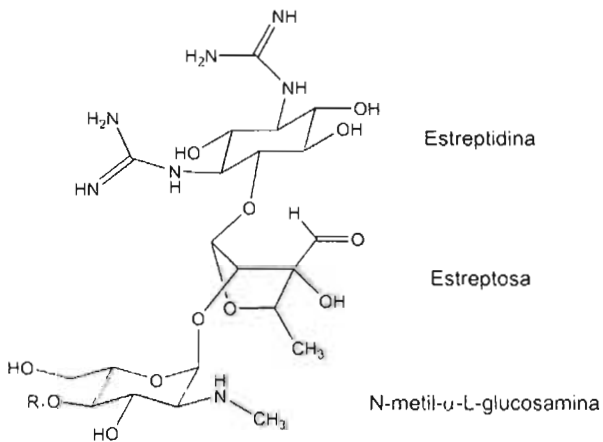


Fig. 2. Estructura de la estreptomina (STP) y las entidades moleculares que la componen

caso. Al parecer la α -glucosidasa de hígado y placenta tiene un origen lisosomal⁴⁻⁶, mientras que la intestinal y la renal es una proteína con doble actividad por lo que se le conoce como maltasa-glucoamilasa y al parecer juega un papel en el transporte de azúcares a través de las vellosidades intestinales y renales puesto que es una proteína membranar de estas estructuras^{7,8,10,11}.

Por otro lado, la estreptomina (STP) es un antibiótico aminoglicosídico formado por 3 azúcares unidos entre ellos por un enlace α -1,4 y un enlace β -1,2 respectivamente.

Su ototoxicidad se ha atribuido a su acumulación en la perilinfa del oído interno. Sin embargo, su blanco primario de acción son los cilios de las células sensori-

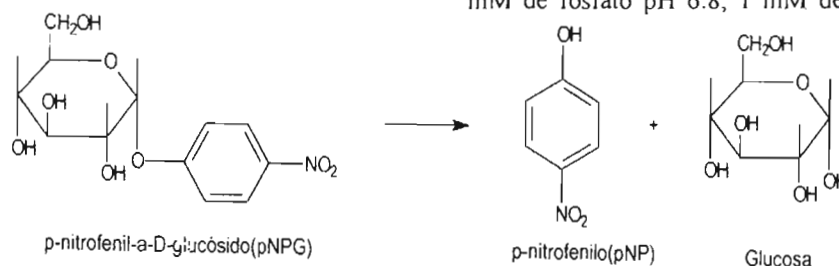


Fig. 3. Esquema en que se muestra la reacción química que se lleva a cabo con el p-Nitrofenil--D-glucósido en presencia de la α -glucosidasa

ales, a los cuales tendría acceso solamente abandonando el compartimento perilinfático y depositándose en la endolinfa^{12,13}.

A la fecha, no se ha podido determinar si la STP atraviesa completa el epitelio sensorial para después ejercer su acción deletérea sobre los cilios o bien que sea degradada. Por múltiples razones, el enlace más lábil de la molécula sería el enlace α -1,4, lo que liberaría a la parte estreptidina (STD) del resto de la molécula (estreptobiosamina) (Fig. 2); trabajos recientes de nuestro laboratorio¹⁴ parecen indicar que es la STD la responsable de la ototoxicidad. Lo que haría falta en esta postulación, es la demostración de una enzima (la α -glucosidasa) que pudiese romper ese enlace y postular su ubicación en un compartimento al que tuviera acceso el antibiótico.

Por lo anteriormente expuesto, es posible que esta enzima se encuentre en la membrana basal (como se encontró en el riñón) y tuviera ambas acciones sobre el antibiótico: la hidrólisis y posterior transporte al interior de la célula, o bien que otra forma de la enzima estuviese intracelularmente en los lisosomas y ahí ejerciera su acción.

El propósito de este trabajo es investigar la presencia de la α -glucosidasa en el vestibulo y también el suero puesto que es en éste donde primeramente se acumularía la STP.

METODOLOGÍA

Se midió la actividad de la α -glucosidasa siguiendo la técnica del p-nitrofenil- α -D-glucósido (pNPG) descrita por Needleman y Eaton¹⁵, donde se mide, a 400 nm, la liberación de p-nitrofenilo (pNP) (Fig. 3). Para ello se utilizó un buffer que contiene 50 mM de fosfato pH 6.8, 1 mM de EDTA y 1mM de

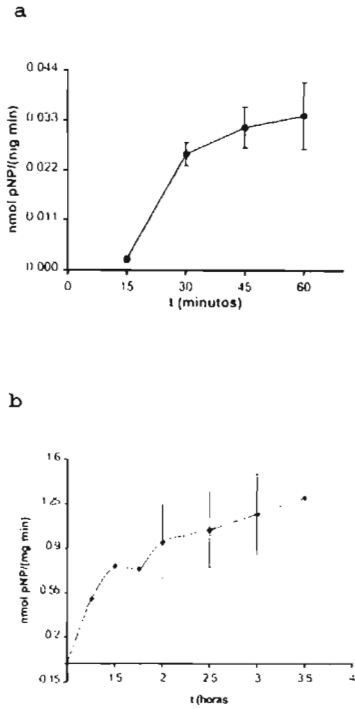


Fig. 4. Gráficas en que se muestra en (a) la actividad de alfa-glucosidasa en el suero y en (b) la actividad encontrada en vestibulo.

En (a) todos los puntos son de tres experimentos diferentes, mientras que en (b) solamente los puntos de 2 a 2.5 horas de incubación son de tres experimentos distintos. Los demás puntos son promedios de dos experimentos. Las barras indican promedios +/- desviación estándar

beta-mercaptoetanol, en el cual se efectúa la homogeneización e incubación con pNPG y posteriormente después de precipitar proteína se efectúa la lectura en el espectrofotómetro

ACTIVIDAD EN SUERO

Se obtuvo la sangre fresca de 10 ratas Long-Evans de 150 g de peso aproximado. El suero se obtuvo dejando la sangre por 10 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos¹.

La mezcla de reacción contenía de 10 a 12 mg de proteína y 1 mM de pNPG. Los tubos se incubaron a 37° C por 15, 30, 45 y 60 minutos. La reacción se detuvo con Na₂CO₃ 1M frío. El pNP liberado se leyó a 400 nm.

ACTIVIDAD EN VESTÍBULO

Se obtuvo el tejido vestibular de 10 ratas Long-Evans por disección recibiendo en el buffer antes mencionado. El tejido se homogeneizó en 530 mml de buffer. Cada

TABLA I
Comparación de la actividad en suero, vestibulo e hígado de rata

Organo	nmol pNP/mg proteína/min
Suero	0.035
Vestibulo	1.3
Hígado*	1.5

*Dissous C et al. Anal Biochem 116:35-39

tubo de reacción contenía de 90 a 120 g de proteína y 1 mM de nPNG. Los tubos se incubaron a 37° C por espacio de 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3 y 3.5 horas. La reacción se detuvo adicionando Na₂CO₃ 1M frío. El pNP liberado se leyó a 400 nm.

RESULTADOS

El suero presenta una actividad específica de alfa-glucosidasa de 0.035 nmol de pNP/mg proteína/min (Fig. 4a). mientras que la alfa-glucosidasa vestibular presentó una actividad de 1.3 nmol de pNP/mg proteína min (Fig. 4b). Como se puede ver, la velocidad de la actividad de la enzima sérica es más rápida en comparación a la enzima vestibular puesto que se necesita solamente 30 minutos para que la enzima del suero alcance su máxima actividad, mientras que para la vestibular es necesario que transcurran casi 2 horas.

Por otro lado, la actividad encontrada en el vestibulo es 35 veces mayor que la presente en el suero. Si comparamos esta actividad con otras alfa-glucosidasas ya caracterizadas encontramos que es muy parecida a una alfa-glucosidasa hepática de origen lisosomal con una actividad específica aparente de 1.5 nmol pNP/mg proteína/min (Tabla I)⁴.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describe el hallazgo de una enzima capaz de hidrolizar enlaces alfa-1,4 glucosidicos en suero y en tejido vestibular de rata. En el primero. esta actividad ya se había reportado en el cerdo y nuestros resultados coinciden¹. Sin embargo, este es el primer trabajo científico, a nuestro entender, en el que se encuentra la enzima en el tejido vestibular.

Estos resultados son de gran importancia para explicar la acción ototóxica de la STP. Esta se ha atribuido a una acumulación del antibiótico en el oído interno. Sin embargo, no se ha descrito si la STP está completa, degradada o modificada. Por lo que trataremos de discutir una hipótesis con base en nuestros hallazgos.

En primer lugar, y ya que se administra parenteralmente, el primer compartimento que encontraría el antibiótico sería la enzima sérica, por tanto habría oportunidad de que ésta actuara sobre la STP y la hidrolizara. A la luz de nuestros experimentos, esto es posible puesto que la acción enzimática parece ser muy

rápida, por lo que habría tiempo de que la STP comenzara a degradarse en este compartimento.

Por otro lado, se ha reportado que la STP se acumula y permanece hasta 4 horas en la perilinfa. Por tanto postulamos que a la llegada de la STP vía sanguínea, una alfa-glucosidasa vestibular tendría suficiente tiempo para hidrolizar enzimáticamente a la STP que aún estaría completa y la convirtiera en STD y estreptobiosamina.

La ubicación de esta enzima podría ser la membrana basal del epitelio vestibular y una vez hidrolizada la STP, la glucosidasa pudiese actuar además como transpor-

tadora de sus productos de hidrólisis al interior de la célula, liberándose éstos al compartimento endolinfático para efectuar su acción sobre los cilios sensorios. Experimentos en proceso en este laboratorio confirmarán más precisamente estas postulaciones en un futuro próximo. En cuanto a sus implicaciones para la clínica, podría sugerirse el uso de un inhibidor de la glucosidasa, lo que no permitiría que los subproductos tóxicos de la STP actuaran sobre el oído, restringiéndose solamente a sus propiedades antimicrobianas.

BIBLIOGRAFÍA

- Hibi N, Chiba S, Shimomura T. Purification and some properties of a neutral -glucosidase from pig serum. *Agr Biol Chem* 1976; 40:1805-1812
- Delqué BP, Vottori C, Sudaka P, Giudicelli J. Purification and properties of neutral maltase from human granulocytes. *Biochem J* 1989; 263: 647-652
- Ritchie AC. *Boyd's textbook of Pathology*. Lea & Febinger, Philadelphia/London pp 1106-1181. 1990
- Dissous C, Ansart JF, Cheron A, Krembel J. Purification of rat liver lysosomal -glucosidase. *Anal Biochem* 1981; 116: 35-39
- Hermans MMP, Kroos AM, Beeumen J, Oostra AB, Reuser JJA. Human lysosomal -glucosidase. *J Biol Chem* 1991; 266: 13507- 13512
- Bruni BC, Auricchio F, Covelli I. Acid -D- glucosidase glucohydrolase from cattle liver. *J. Biol. Chem.* 1969; 244: 4735-4742
- Reiss U, Sacktor B. Kidney brush border membrane maltase: purification and properties. *Arch Biochem Bioph* 1981; 209: 342-348
- Nichols LB, Eldering J, Avery S, Hahn D, Quaroni A, Sterchi E. Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning. *J Biol Chem* 1998; 273: 3076-3081
- Banno Y, Nozawa Y. Purification and characterization of lysosomal -glucosidase secreted by Eukaryote *Tetrahymena*. *J Biochem* 1985; 97: 409-418
- Pereira B, Sivakami S. A comparison of the active site of maltase-glucoamylase from the brush border of rabbit small intestine and kidney by chemical modification studies. *Biochem J* 1991; 274: 349-354
- Seetharam B, Swaminathan N, Radhakrisnan A. Studies on mammalian glucoamylases with special reference to monkey intestinal glucoamylase. *Biochem J* 1970; 117: 939-946
- Meza G, López I, Paredes MA, Peñaloza Y, Poblano A. Cellular target of streptomycin in the internal ear. *Acta Otolaryngol* 1989; 107: 406-411
- Meza G, Bohne B, Dauton N, Fox R, Knox J. Damage and recovery of otolithic function following streptomycin treatment in the rat. *Ann New York Acad Sci* 1996; 781: 666-669
- Meza G, Barba B, Granados O y Toxqui A. Estreptomycin: propiedades fisicoquímicas y vestibulotoxicidad. *An Otorrinol Mexicana* 1999 (en prensa)
- Needleman R, Eaton RN. Selection of yeast mutants constitutive for maltase synthesis. *Molec Genet* 1974; 133: 135-140

XI. APENDICE II

APLICACIÓN Y EXPERIMENTOS ADICIONALES

ESTUDIOS *in vitro* EN EL SUERO HUMANO DE INDIVIDUOS NORMALES Y EN
PACIENTES TRATADOS CON ESTREPTOMICINA.

Hidrólisis *in vitro* de STP en suero humano

Al igual que en los experimentos realizados de la hidrólisis *in vitro* de la STP en el suero de la rata, se hicieron los correspondientes experimentos en las mismas condiciones que las de la rata, pero en el suero humano para comprobar y verificar que la hidrólisis del antibiótico también era posible en el humano y no era solamente un fenómeno en las ratas. El suero para dichos experimentos fue obtenido de un laboratorio de análisis clínicos y provenían de pacientes sanos que nunca habían sido tratados con ningún tipo de aminoglicósido. La metodología de extracción fue la misma que para el suero de la rata.

En las figuras 1 y 2 se muestran cromatogramas típicos obtenidos cuando la STP se incubó en el suero humano; las condiciones cromatográficas fueron exactamente iguales a las usadas en los experimentos con las ratas. En ambas figuras, el recuadro (A) muestra el trazo del extracto del suero humano en ausencia de los estándares de STD y STP. En (B) se tiene un extracto del suero humano pero agregando el estándar de STP, pudiéndose observar que aparece un pequeño pico de STD, mientras que en el recuadro (C) de ambas figuras se muestra el trazo cromatográfico proveniente de una muestra de STP después de haber sido incubada por 24 horas a 37° C, donde se puede observar la presencia de los dos picos con las mismas características cromatográficas que los estándares de STD y STP.

En la tabla 1 se muestran las concentraciones de STP y STD antes y después de la hidrólisis *in vitro* de 160 µg/ml del antibiótico en el suero humano.

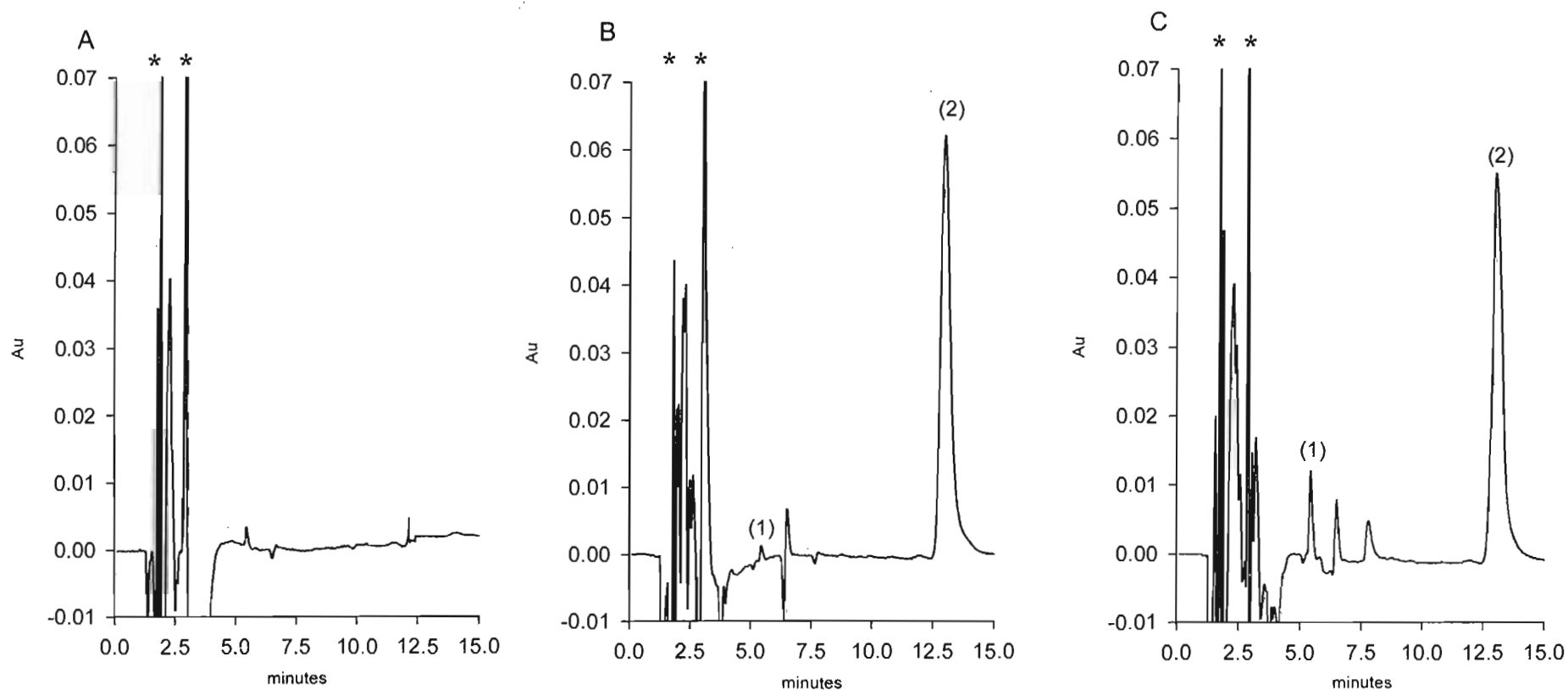


Figura 1. Cromatogramas típicos de estándares de un ensayo *in vitro* con suero humano. La separación fue realizada con una columna Prodigy ODS3 y una fase móvil de buffer:acetonitrilo, pH 6.0 (88:12 v/v), a un flujo de 1.3 ml/min. Los tiempos de retención para la STD (1) y la STP (2) fueron aproximadamente de 6.0 min y 13.4 min, respectivamente. (A) Extracto del suero humano, (B) Estándar de STP 160 $\mu\text{g/ml}$ a $t = "0 \text{ min}"$, (C) STP 160 $\mu\text{g/ml}$ después de 24 hrs a 37° C. Los asteriscos señalan componentes en el suero que absorben a 200nm.

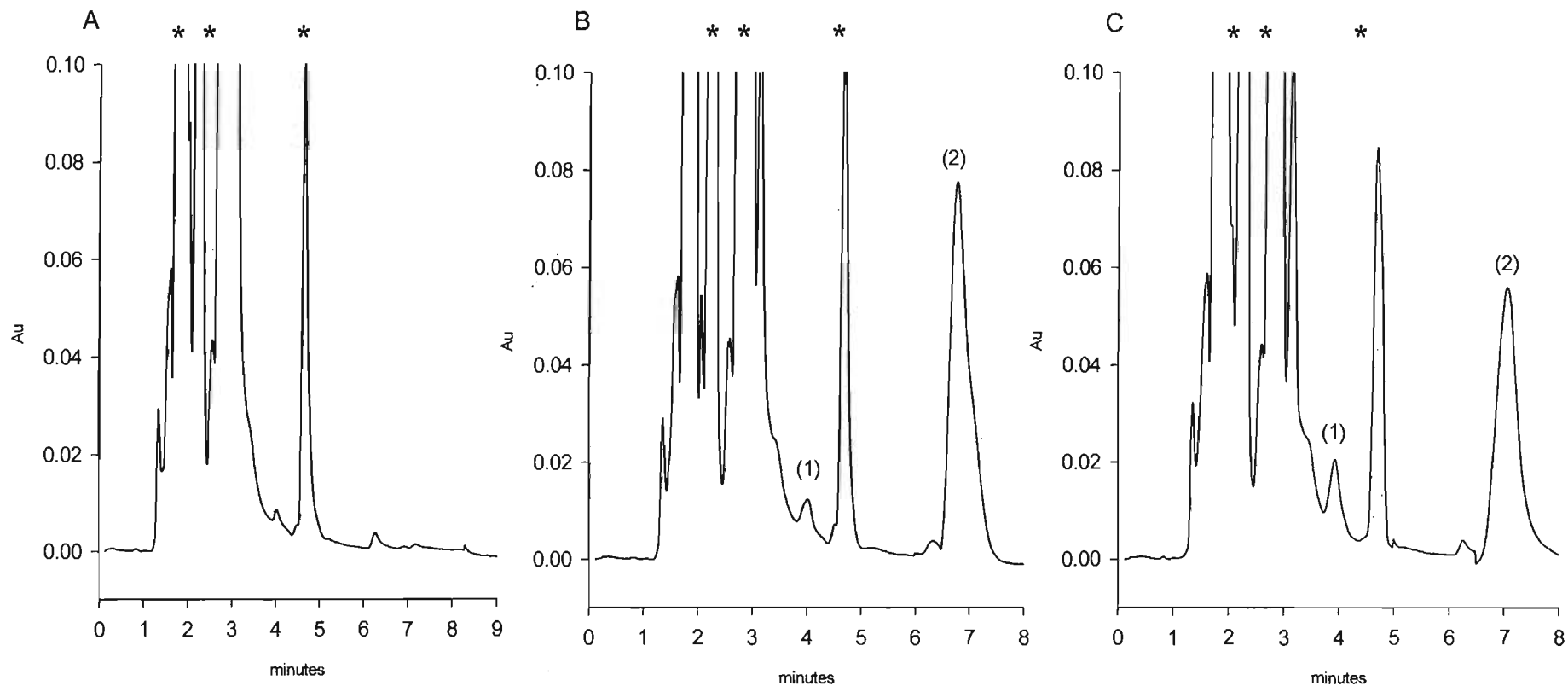


Figura 2. Cromatogramas típicos de estándares de un ensayo *in vitro* con suero humano. La separación fue realizada con una columna Prodigy ODS3 y una fase móvil de buffer:acetonitrilo, pH 6.0 (85:15 v/v), a un flujo de 1.3 ml/min. Los tiempos de retención para la STD (1) y la STP (2) fueron aproximadamente de 3.8 and 7.0 min, respectivamente. (A) Extracto de suero humano, (B) Estándares de STP 160 µg/ml y STD 1.9 µg/ml a t = "0 min", (C) STP 160 µg/ml después de 24 hrs a 37° C. Los asteriscos señalan componentes en el suero que absorben 200nm.

Las muestras control al igual que las obtenidas en el suero de la rata, presentaron una pequeñísima concentración de STD alrededor de 0.60 µg/ml, concentración que esta por debajo de los límites de detección y cuantificación del método. En contraste, la concentración de STD después de la hidrólisis fue de 2.95 µg/ml (5 veces mayor del valor del control) con un decremento en la concentración de STP de 156 µg/ml a 126.5 µg/ml. Esto demuestra que la transformación metabólica o activación de la STP también sucede por la acción de algún componente presente en el suero humano igual al observado en el suero de la rata.

Tabla 1. Concentraciones de STP y STD antes y después de la incubación del antibiótico en el suero humano.

	µg/ml STP		µg/ml STD	
	Promedio + S.D.*	C.V. (%)	Promedio + S.D.*	C.V. (%)
CONTROL (t= 0 min)	156 ± 1.60 (n=3)	1.0	0.58 ± 0.053	9.6
HIDRÓLISIS (37° C, 24 hrs)	126.5 ± 11.69 (n=3)	9.2	2.95 ± 0.12	4.0

*Los datos son los promedios ± la desviación estándar (S.D.) de tres experimentos diferentes corridos por triplicado. C.V.= Coeficiente de variación. Los valores de las concentraciones de STP y STD entre el control y el hidrolizado fueron significativos estadísticamente (p=0.001). Los datos fueron analizados por las pruebas de Turkey HSD y Scheffe, usando el software SPSS 11.0. Una diferencia significativa de p < 0.05 fue utilizada en ambos casos.

Estudios en pacientes tratados con STP

El siguiente paso era determinar que esta transformación metabólica o activación de la STP sucedía en pacientes tratados con el antibiótico. Para ello, se analizaron muestras de pacientes del sexo masculino, cuya edad osciló entre los 44-51 años y estaban siendo tratados con STP (1 g/día) a diversos tiempos de tratamiento, como se muestra en la Tabla 2. Las muestras fueron proporcionadas por el Departamento de

Tuberculosis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Tabla 2. Resultados de 4 pacientes hombres tratados con STP y las concentraciones de STP y/o STD encontradas.

<i>Paciente</i>	<i>Edad</i>	<i>Tiempo de tratamiento con STP (Días)</i>	<i>Síntomas</i>	<i>STD ($\mu\text{g/ml}$)*</i>	<i>STP ($\mu\text{g/ml}$)*</i>
1	44	35	Ausentes	5.65 ± 0.18	7.11 ± 0.98
2	45	45	Vértigo	1.34 ± 0.18	↓N.D
		88	Vértigo	4.95 ± 0.32	↓N.D
3	51	60	Pérdida de frecuencias agudas	1.75 ± 0.14	↓N.D
4	51	90	Hipoacusia bilateral	4.35 ± 0.15	↓N.D

*Los datos son el promedio \pm la desviación estándar de quintuplicados. ↓N.D = por debajo de nivel de detección.

En la Figura 3 se muestran trazos cromatográficos de la sangre de pacientes después del tratamiento con STP (1 g/día), observándose claramente la aparición de la STD y/o de la STP.

En la misma Tabla 2 se muestran las concentraciones de STD y/o STP encontradas en las muestras de los 4 pacientes. Se observa que los síntomas referentes al daño en el oído aparecen a partir de los 45 días de tratamiento, aún cuando a los 35 días estén presentes ambos compuestos en el suero.

Estos resultados confirman por un lado la transformación metabólica de la STP a STD en la sangre del humano igual que la observada en las ratas tratadas con STP en esta tesis y por otro lado, recalcan la utilidad en el uso de la técnica de HPLC antes mencionada para la determinación y cuantificación de los niveles de STP y STD en la sangre de los pacientes tratados con el antibiótico, lo que permite hacer recomendaciones valiosas en la clínica.

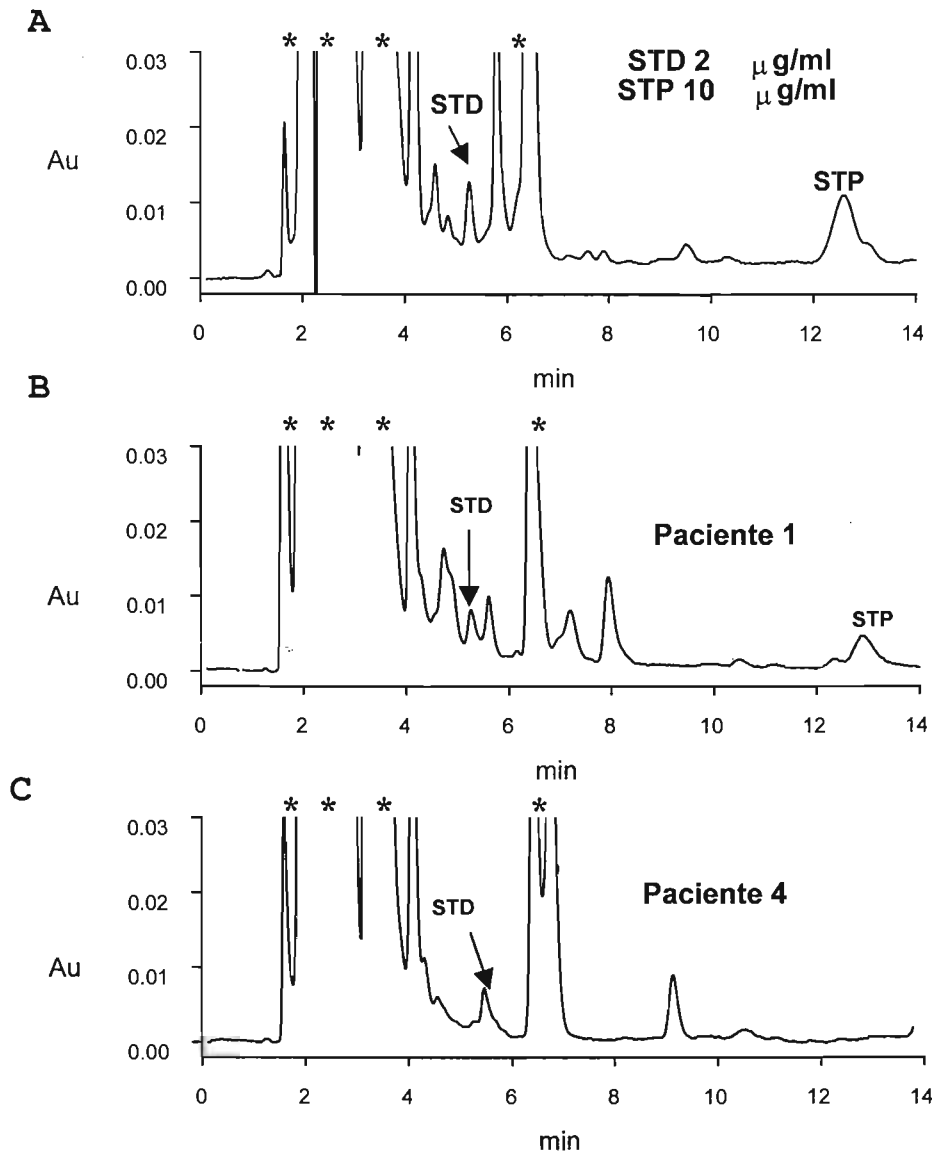


Figura 3. Trazos cromatográficos de la sangre de pacientes tratados con STP: (A) la separación de los estándares de STD y STP adicionados al suero proveniente de una persona sin tratamiento con STP, (B) paciente 1, el cual presentó ambos compuestos, (C) paciente 4 que solamente presentó la señal de STD. Los asteriscos señalan picos de componentes del suero que también absorben a 200nm.