



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

“Efecto del tratamiento intratimpánico con factor neurotrófico derivado del cerebro y N-acetil cisteína sobre los cambios audiométricos, histológicos e inmunohistoquímicos en la cóclea de cobayos con ototoxicidad inducida por amikacina”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIDAD EN:
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO

PRESENTA:

DRA. SAMANTHA SILVA ARMENDARIZ

TUTOR:

DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ
DRA. LIZBETH RODRIGUEZ BETO

ASESORES:

M. EN C. J. RAÚL OLMOS ZUÑIGA
M. EN C. MARIANA SILVA MARTINEZ

PROFESOR TITULAR:

DR. ARMANDO ROBERTO CASTORENA MALDONADO



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.

TESIS APROBADA POR:

DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ GARCÍA
Director de Enseñanza

DRA. MARÍA DEL CARMEN CANO SALAS
Subdirectora de Enseñanza

DRA. DAYANNA LORELLY ÁLVAREZ MONTER
Jefa del Departamento de Formación de Posgrado

DR. ARMANDO R. CASTORENA MALDONADO
Profesor Titular de la Especialidad de Otorrinolaringología
y Cirugía de Cabeza y Cuello

DR. GABRIEL TONA ACEDO

Jefe del Servicio de Otorrinolaringología
y Cirugía de Cabeza y Cuello

Tutor de Tesis

DRA. LISETTE CRISTERNA SANCHEZ

Médico adscrito al Departamento de Otorrinolaringología
y Cirugía de Cabeza y Cuello

Tutor de Tesis

DRA. LIZBETH RODRIGUEZ BETO

Médico audiólogo adscrito al Departamento de Otorrinolaringología
y Cirugía de Cabeza y Cuello

Tutor de Tesis

M. EN C. J. RAÚL OLMOS ZUÑIGA

Investigador en Ciencias Médicas "D" de la
Unidad de Trasplante Pulmonar INER

Tutor de Tesis

M. EN C. MARIANA SILVA MARTINEZ

Investigador en Ciencias Médicas "B" de la
Unidad de Trasplante Pulmonar INER

COLABORADORES

Javier Benjamín Contreras
Técnico en histopatología INER

Dr. Mauricio González Navarro
Médico adscrito al Departamento de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello CIENI, INER

Dr. Miguel Gaxiola Gaxiola. Investigador en Ciencias Médicas "C" Departamento de Morfología INER

Dra. Laura Patricia Romero Romero
FMVZ Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por estar siempre conmigo y confiar en mí, por enseñarme a nunca darme por vencida, por ser un ejemplo para seguir y porque gracias a ellos he logrado ser la persona que soy ahora.

A mi hermanos y sobrinos por alegrarme y enseñarme a disfrutar todos los momentos de la vida.

A la Dra. Cristerna, el Dr. Olmos y la Dra. Mariana, por ser mi tutora y mis asesores de tesis, por todo el apoyo, enseñanzas y confianza que han depositado en mí, por adentrarme con paciencia en la investigación.

A la Dra. Rodríguez y el Dr. Mauricio por darme su ayuda y mostrarse siempre disponibles.

A los integrantes del Departamento de Cirugía Experimental: Dr. Jasso, MVZ Sergio Martínez y Beto Rueda, y sus pasantes por todas su amistad y apoyo.

A todos mis compañeros residentes, a los egresados y ahora adscritos algunos, que fueron parte de mi formación y fungieron como mis maestros; a mis adscritos el Dr. Jiménez, la Dra. Marian Radillo, el Dr. Ramírez, el Dr. Carlos López, la Dra. Góngora, el Dr. González, el Dr. Tona, el Dr. Guillermo Pérez, la Dra. Portillo, el Dr. Castorena, al Dr. Lara Estrada, la Dra. Carranco, la Lic. Ivonne Mayer y Vanessa Rojas por compartirme todos sus conocimientos y ser una parte importante de mi formación.

A la Dra. Sánchez por todo su apoyo, consejos y ayuda. A los amigos que encontré.

Contenido

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
Hipoacusia	2
Clasificación de la hipoacusia	5
Ototoxicidad	7
Ototoxicidad por aminoglucósidos	8
Mecanismos de ototoxicidad producida por aminoglucósidos	9
Detección de la Ototoxicidad	11
Tratamientos para disminuir la ototoxicidad producida por los aminoglucósidos	13
N-acetilcisteína (NAC)	14
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
Animales de experimentación	19
Grupos de estudio	20
Aplicación del tratamiento	21
Técnica quirúrgica	22
Evaluación	24
Clínica	25
Valoración audiológica	25
Histología	26
Inmunohistoquímica	26
Determinación de la apoptosis celular	28

Análisis estadístico	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44

Efecto del tratamiento intratimpánico con factor neurotrófico derivado del cerebro y N-acetil cisteína sobre los cambios audimétricos, histológicos e inmunohistoquímicos en la cóclea de cobayos con ototoxicidad inducida por amikacina.

RESUMEN.

La ototoxicidad (OTT) por amikacina (AMK) resulta de la formación de radicales libres de oxígeno (ROS) y apoptosis de las células cocleares, y no hay tratamiento que la evite. El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y la N-acetilcisteína (NAC) son antioxidante que disminuyen la apoptosis, por lo que hipotetizamos que su uso en la OTT por AMK (OTT-AMK) la revertirá. **Objetivo.** Evaluar el efecto del tratamiento intratimpánico con BDNF embebido en esponja de colágena y de la administración simultáneamente VO de NAC con AMK, sobre los cambios audiológicos, histológicos y apoptóticos en la cóclea de cobayos con OTT-AMK.

Metodología. Cincuenta cobayos (10 por grupo) con OTT-AMK, tratados con: **Grupo I:** OTT-AMK sin tratamiento, **Grupo II:** OTT-AMK tratados NAC post-hipoacusia, **Grupo III:** AMK y NAC simultánea, **Grupo IV:** OTT-AMK con solución salina intratimpánica y **Grupo V:** OTT-AMK con BDNF intratimpánico. Se evaluaron con emisiones otoacústicas por productos de distorsión (EOApd). Histológicamente en las cócleas se evaluó su integridad y por inmunohistoquímica la producción de glutatión peroxidasa (GPx) y apoptosis. **Resultados.** Postratamiento, ningún animal revirtió la hipoacusia producida por la OTT-AMK ($p < 0.001$, ANDEVA). Los grupos I, II, III y IV, mostraron pérdida severa de las células ciliadas (CC) y leve en el V ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). La expresión de GPx fue severa en el grupo I; moderada en los grupos II, III y IV, y leve el grupo V ($p < 0.01$, ANDEVA). En todos los grupos hubo apoptosis severa en el ligamento y limbo espiral ($p < 0.05$ ANDEVA), leve en las CC, ganglionares y estría vascular. **Conclusión.** El tratamiento intratimpánica con BDNF, la administración simultánea de NAC con AMK y posthipoacusia, no evitan la producción GPx, apoptosis de las células cocleares en cobayos con OTT-AMK, pero si la disminuyen. Tampoco revierten la hipoacusia, ni los cambios histológicos que se producen en la cóclea con OTT-AMK.

Palabras clave: Ototoxicidad, Amikacina, Apoptosis, Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), N-acetilcisteína (NAC), Glutatión peroxidasa (GPx), Hipoacusia.

INTRODUCCIÓN.

El oído es el órgano encargado de captar los cambios que se producen en el aire cuando se produce una onda sonora y transmitirlos al cerebro para que sean interpretadas como sonido; pero para que esto ocurra, dichas ondas deben de pasar a través de diferentes áreas del oído (oído externo, medio, e interno), las cuales tiene una función específica, para el procesamiento de la energía mecánica a energía eléctrica.

El procesamiento de la energía mecánica a energía eléctrica se da en 3 etapas:

- Conducción o transmisión: el oído externo compuesto por el pabellón auricular y el conducto auditivo externo conduce las ondas sonoras hacia la membrana timpánica causando su vibración y transmitiendo la energía por la cadena osicular (martillo-yunque-estribo) hasta alcanzar el oído interno.

- Transformación en el órgano de Corti de la energía mecánica en energía bioeléctrica (transducción). Una vez que la función de pistón del estribo alcanza la ventana oval, se produce movimiento de los líquidos intracocleares y de la membrana basilar que es el sitio donde se asienta el órgano de Corti y en este se encuentran las células ciliadas internas (CCI) y externas (CCE). Debido a estos movimientos por la onda sonora se produce cizallamiento entre las membranas tectoria y la basilar, que ocasiona que los cilios de las células ciliadas se muevan llevando a la despolarización celular, con la consiguiente liberación de glutamato

que es captado por las fibras aferentes del nervio coclear elemento y va a originar un potencial de acción en la fibra nerviosa que viajara por las vías auditivas.

- Vehiculización de la energía eléctrica, a través de vías nerviosas, desde el órgano de Corti hasta la corteza cerebral. Las células cocleares no solo transforman el sonido en impulsos eléctricos, sino que lo hacen preservando las frecuencias. Lo hacen por tener una organización llamada tonotópica a través del ducto coclear. Las células ciliadas en la base de la cóclea son estimuladas por frecuencias agudas, mientras las apicales lo son por las graves. Las CCI son las encargadas transmitir la energía que ha llegado a la cóclea a través de más del 90% las fibras aferentes del nervio coclear con las que hacen sinapsis directa, hacia las vías auditivas. Las CCE se encargan de amplificar los sonidos de bajo nivel y únicamente hacen sinapsis con aproximadamente el 10% de las fibras aferente del nervio coclear. La apreciación de los sonidos, con todas sus cualidades, es función de las áreas auditivas del lóbulo temporal de la corteza (áreas 21-22 y 41-42 de Brodman) (1,2).

Hipoacusia.

La hipoacusia o pérdida de la capacidad auditiva es un defecto funcional que ocurre cuando un sujeto pierde capacidad auditiva, independientemente de la intensidad (2). Esta se presenta con más frecuencia en el mundo desarrollado. Sin embargo, debido a que su presentación puede ser diversa, progresiva e insidiosa, es difícil calcular exactamente su incidencia. Se estima que aproximadamente 1 de cada 500 recién nacidos presentan una pérdida auditiva mayor de 40 decibeles (dB), la cual se incrementa con la edad. Se considera que un 16% de los adultos presentan una pérdida bilateral superior a 25 dB y a partir de los 80 años cerca de la mitad de la

población se ve afectada por esta patología (3,4). Actualmente existen alrededor de 466 millones de personas con discapacidad auditiva a nivel mundial y se considera como la cuarta causa más común de discapacidad, con un costo anual de más de 750 mil millones de dólares (5).

La pérdida de audición tiene efectos importantes en la vida cotidiana de los individuos, ya que los problemas de comunicación pueden generar sensación de soledad, aislamiento y frustración, sobre todo en las personas mayores que padecen la pérdida de ésta. La OMS, por su parte, señala que una persona con sordera congénita podría sentirse más excluida de la vida social que el resto de la población (6). Así mismo, esta organización menciona que conseguir que las personas con esta discapacidad tengan una mejor participación en la comunidad, educación, mundo laboral o vida familiar es teniendo un mejor acceso a los servicios de salud (7).

En México, de acuerdo con el Censo de Población y Vivienda 2020, existen 6,179,890 personas con algún tipo de discapacidad y representan el 4.9 % de la población total del país; mientras que 13,934,448 (11.0%) presentan alguna limitación. De estas personas, el 22% tiene dificultad para escuchar (6).

Personas con discapacidad y limitaciones reportadas en el Censo de Población y Vivienda 2020 de México			
Tipo de discapacidad o limitación.	Personas con discapacidad	Personas con limitaciones	Total
Motriz I. Para caminar subir o bajar.	2 939 986	4 365 640	7 305 626
Motriz II. Para atender el cuidado personal (Bañarse, vestirse o comer).	1 168 098	673 540	1 841 638
Visual. Para ver aun usando lentes	2 691 338	8 974 853	11 666 191
Auditivo. Para oír aun usando aparato auditivo	1 350 802	2 900 108	4 250 910
Comunicación. Para hablar o comunicarse	945 162	864 662	1 809 824
Condición mental Para recordar o concentrarse	1 149 257	2 698 640	3 847 897
Total	6 179 890	13 934 448	30 722 086

Cuadro 1. Muestra el porcentaje de la población mexicana con alguna discapacidad o limitación que le impiden realizar alguna actividad. Fuente: INEGI (6).

Clasificación de la hipoacusia.

Como ya se mencionó, la hipoacusia es un defecto funcional que se presenta cuando disminuye la capacidad auditiva, Esta puede clasificarse en diversas categorías dependiendo de su localización, intensidad, evolución, etc.

Hipoacusia topográfica: Este tipo de hipoacusia se refiere al sitio anatómico y funcional afectado y se subdivide hipoacusia conductiva, neurosensorial o mixta.

- *Hipoacusias de transmisión o de conducción:* Son originadas por lesiones del aparato transmisor de la energía sonora, como, por ejemplo, lesiones obstructivas en el oído externo o del oído medio, que ocasionan alteración de la membrana timpánica, cadena de huesecillos o ambas estructuras.

- *Hipoacusias neurosensoriales o de percepción:* Se presentan por lesiones en el órgano de Corti (hipoacusias cocleares), alteración de las vías acústicas (hipoacusias retrococleares) o por trastornos en la corteza cerebral auditiva (hipoacusias corticales). Este tipo de hipoacusia puede ser originada por múltiples factores y su etiología generalmente es difícil de diagnosticar a diferencia de la hipoacusia conductiva; las principales causas de la HNS adquirida son (presbiacusia, exposición a ruido ocupacional y recreacional y OTT por fármacos (4).

- *Hipoacusia mixtas:* Son las producidas por alteraciones simultáneas en la transmisión y en la percepción del sonido en el mismo oído.

Cabe mencionar que cualesquiera de estas hipoacusias pueden ocasionar cualquiera de las clasificaciones de hipoacusias.

Hipoacusias por intensidad o cuantitativa: Son las que dependen de la intensidad de la pérdida de audición, la OMS la clasifica de la siguiente manera y se subdividen en: ligera que presentan pérdidas auditivas de 16-25dB, leves: 26-40dB, moderadas o medianas: 41 - 55 dB, moderadamente severas: 56-70dB, severas: 71 - 90 dB y profundas: pérdida mayor a 90 dB.

Hipoacusia de clasificación cronológica: de acuerdo con el momento de aparición de la hipoacusia, tomando como referencia el momento del parto:

- *Hipoacusias prenatales o congénitas:* Son hipoacusias que aparecen antes del nacimiento. Tienen un origen genético en un 80% y el 20% restante es adquirida; existen hipoacusias de presentación tardía, es decir posterior al nacimiento, que pueden ser causadas por defectos genéticos o hereditarios. Además, Dentro de las causas genéticas, aproximadamente un 20% de las hipoacusias serán una manifestación más de una enfermedad sindrómica y un 80% se presentarán como hipoacusias no sindrómicas. Las condiciones sindrómicas y no sindrómicas se pueden subclasificar por patrón de herencia como autosómica dominante, autosómico recesivo, ligado al cromosoma X, mitocondrial, o complejo (2,4).

Dentro de estas hipoacusias se ha descrito que influyen diversos factores como contribuyentes o desencadenantes de la misma, entre los que sobresalen:

A. Causas prenatales: infecciones durante el embarazo (TORCH, sífilis, VIH), ototóxicos maternos, patologías sistémicas del embarazo (diabetes, hipotiroidismo materno, hipertensión arterial), síndrome alcohólico-fetal, drogas de abuso materno.

B. Causas perinatales: hipoxia – anoxia perinatal, prematuridad y bajo peso al nacimiento, hipertensión pulmonar persistente, oxigenación extracorpórea, ventilación mecánica, hiperbilirrubinemia, ototóxicos.

C. Causas postnatales: traumatismos craneales, exposición a ruido, infecciones (meningitis, parotiditis, sífilis), ototóxicos, enfermedad inmunomediada del oído interno, fístula perilinfática, enfermedades metabólicas como el hipotiroidismo, enfermedades neoplásicas (neurinomas del acústico, tumores del ángulo pontocerebeloso, tumores del hueso temporal, neoplasias hematológicas), alcohol, tabaco, enfermedades idiopáticas (enfermedad de Menière, sordera brusca idiopática) y presbiacusia.

Ototoxicidad.

La OTT es la degeneración celular de los tejidos cocleares y/o vestibulares que conduce a su deterioro funcional, como resultado de la exposición a fármacos, metales o solventes que provocan reacciones tóxicas en los tejidos del oído interno. Con la evolución de la industria farmacéutica se han aumentado el número de agentes potencialmente ototóxicos (8). (Dentro de los fármacos que ocasionan OTT encuentran los antibióticos aminoglucósidos (AG), agentes quimioterapéuticos a base de platino, diuréticos de asa, antibióticos macrólidos y los antimaláricos (Cuadro 3) (9,10), los cuales tienen una eficacia bien documentada contra diversas infecciones y neoplasias malignas en niños y adultos.

Ototoxicidad por AG

La gentamicina, AMK, kanamicina y tobramicina, son antibióticos AG de amplio espectro que son muy eficaces contra muchas cepas bacterianas gramnegativas y continúan siendo el tratamiento de primera línea en diversas patologías, incluyendo enfermedades multidrogoresistentes, las cuales son un problema de salud pública (9).

En los mamíferos, los AG son selectivamente tóxicos para las células del túbulo proximal renal (nefrotóxico) y para las células ciliadas sensoriales del oído interno (ototóxico); sin embargo, el daño renal inducido por fármacos es reversible si se detecta a tiempo y se suspende la medicación a diferencia de las células ciliadas en las que produce daño permanente, ya que estas no pueden proliferar y recuperarse (8,11).

En la literatura se ha descrito que los AG vestibulotóxicos, en orden de gravedad decreciente son la estreptomycin, gentamicina, tobramicina y netilmicina; mientras que los cocleotóxicos son la neomicina, AMK, kanamicina y dihidroestreptomycin (12,13). También se ha reportado que la incidencia de OTT asociada a cocleotoxicidad inducida por AG oscila entre el 0% y el 63% y los pacientes que la padecen a menudo mencionan problemas de equilibrio antes de cualquier cocleotoxicidad percibida, la cual se manifiesta por la presencia acúfeno, plenitud ótica, alteraciones en la discriminación e hipoacusia (10-13). Durante está, el daño coclear puede ser latente desde el punto de vista clínico, es decir, la hipoacusia puede manifestarse con cierto retraso, ya que la afectación sensorial sólo produce síntomas clínicos cuando se sobrepasa un umbral crítico. Algunos síntomas como acúfeno y dificultad para entender en ambientes ruidosos pueden preceder a la

hipoacusia, la cual puede presentarse en diferentes grados de severidad, ser progresiva y permanente (14). Por otro lado, la vestibulotoxicidad puede presentarse hasta en el 60% de los casos y se manifiesta por la presencia de mareos, oscilopsia, vértigo, ataxia y nistagmo (12,14).

El rango tan variado de la incidencia de la cocleotóxicidad y vestibulotoxicidad, puede deberse a que existen muchas inconsistencias en los datos informados, diferentes criterios para definir OTT, tipo de fármaco utilizado y sus características (biodisponibilidad a los diferentes regímenes de dosificación, así como concentraciones séricas alcanzadas), vía de administración, duración del tratamiento, sensibilidades de las pruebas audiológicas y la pérdida auditiva preexistente. Además, puede estar influenciada por factores como: edad, sexo y comorbilidades como la insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal, hipertensión, susceptibilidad genética, factores geográficos (13,15,16).

Mecanismos de ototoxicidad producida por AG

Los AG son moléculas policatiónicas con masas molares entre 300 y 600 g/mol y un diámetro transversal máximo de ~0,8 nm, los cuales para producir OTT después de su administración para llegar al oído interno, utilizan los siguientes mecanismos: a) tráfico de la droga a través de las capas de barrera endotelial y epitelial, b) absorción de las ototóxicas por las células ciliadas y c) la interrupción de las vías fisiológicas intracelulares (12,14).

a) Tráfico de ototoxinas al oído interno

Cuando los AG son administrados por vías sistémicas, atraviesan la barrera hemato-laberíntica (BHL) (o barrera del laberinto sanguíneo) e ingresan al oído interno a través de la estría vascular; mientras que cuando son administrados tópicamente, el fármaco puede evitar el BHL en el oído medio e ingresa a través de la ventana redonda al oído interno (8).

B) Captación celular de los AG

Una vez en el oído interno, el fármaco se absorbe por endocitosis en la superficie apical de las células ciliadas externas o por canales de transducción y provocan alteraciones de las mismas (8,17-19).

C) Mecanismos intracelulares que provocan la OTT.

Los AG que ingresan al oído interno promueven la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS), los cuales activan otros mediadores químicos como la quinasa c-Jun Nterminal (JNK) y la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK), que a su vez inducen la apoptosis principalmente de las CCE y en menor grado de las CCI (20). Además, se ha descrito que la apoptosis de las células ciliadas está regulada principalmente por la activación de caspasas a través de vías internas o externas. Mientras que, en la vía interna, las mitocondrias liberan factores apoptogénicos en el citoplasma para activar las caspasas, en la vía externa, las caspasas se activan mediante la unión de ligandos a receptores de muerte como Fas y TNFR1 (12).

Detección de la OTT

Existen diversas clasificaciones para definir e identificar OTT, las más utilizadas son el sistema de clasificación de Chang, sistema de clasificación de Tune y los de la Asociación Americana del Habla, Lenguaje y Audición (ASHA). Sin embargo, cada una de estas clasificaciones utiliza métodos audiológicos y umbrales diferentes, por lo que no son uniformes. Además, algunas de estas clasificaciones se centran en el cambio de audición a partir de un audiograma de referencia y otras en el impacto funcional de la pérdida auditiva (21).

Grado	Sistema de clasificación Chang	Sistema de clasificación Tune
0	< 20dB a 1,2 y 4kHz	Sin pérdida de audición
1a	≥ 40dB a cualquier frecuencia de 6 a 12 kHz	Desplazamiento de umbral ≥ 10 dB a 8, 10 y 12,5 KHz
1b	> 20 y< 40dB a 4kHz	Desplazamiento de umbral ≥ 10 dB a 1,2 y 4 KHz
2bis	≥ 40dB a 4kHz y superior	Desplazamiento de umbral ≥ 20 dB a 8, 10 y 12,5 KHz
2b	> 20 y< 40dB a cualquier frecuencia inferior a 4kHz	Desplazamiento de umbral ≥ 20 dB a 1,2 y 4 KHz
3	≥ 40dB a 2 o 3 kHz y superior	≥ 35dB a 1,2 y 4 KHz
4	≥ 40dB a 1kHz y superior	≥ 70dB a 1,2 y 4 KHz
ASHA		
≥ 20dB de disminución de los umbrales de tono puro en cualquier frecuencia de prueba o disminución de ≥ 10 dB en dos frecuencias adyacentes o disminución de la respuesta a tres frecuencias de prueba consecutivas.		
ASHA enfatiza la evaluación de línea de base para la identificación temprana de la ototoxicidad y Chang/ Tune enfatiza la documentación de los umbrales audiométricos de alta frecuencia y la clasificación de la pérdida auditiva. Por lo tanto, se recomienda una combinación de las clasificaciones ASHA y Chang/Tune como mejor práctica para la identificación temprana y el monitoreo posterior de la ototoxicidad.		

Cuadro 3. Muestra las escalas utilizadas para definir OTT. Adaptada de Crundwell et al (21).

La ASHA y la Academia Americana de Audiología (AAA) recomiendan que la evaluación de referencia debe incluir medidas de comportamiento como la audiometría de tono puro o tonal liminar (ATL) de 250 Hz a 8,000 Hz y la audiometría de alta frecuencia (AAF) de 9,000 Hz a 20,000 Hz, además de medidas objetivas como las emisiones otoacústicas por productos de distorsión (EOApd) y la timpanometría, junto con cuestionarios de autoevaluación (22).

En pacientes que no pueden interactuar con el operador o no responden, se pueden utilizar tres pruebas audiológicas de evaluación objetiva para el monitoreo de la OTT: emisiones otoacústicas (OAE), electrococleografía (ECoChG) y respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR).

Dentro de las emisiones otoacústicas, existen tres tipos de mediciones denominadas espontánea, transitorias y de productos de distorsión, brindan información sobre la presencia o ausencia de la función de las células ciliadas externas (prueba objetiva), a partir de la cual se puede inferir el nivel de audición. Aunque es posible tener EOA en presencia de hipoacusia sensorial leve, la magnitud de la emisión disminuye con umbrales cada vez más elevados; sin embargo, las EOApd separan con precisión los oídos con audición normal de aquellos con hipoacusia moderada y mayores grados de hipoacusia. Presentan una sensibilidad del 78% y especificidad del 87% (23).

Por otro lado, la electrococleografía es una técnica que se utiliza para evaluar las respuestas cocleares, así como neuronales, y puede realizarse de forma invasiva y no invasiva; con una sensibilidad del 75.5% y la especificidad del 91%.

Con respecto a la respuesta auditiva del tronco encefálico, también presenta las mismas limitaciones que ECoChG con respecto a la duración de las pruebas y la

especificidad de la frecuencia. El uso de clics acústicos como estímulos limita la información de respuesta a frecuencias entre 1 y 4 kHz, y por lo tanto disminuye su eficacia en el monitoreo de cocleotoxicidad. Sin embargo, los estudios que utilizan estímulos tone burts para proporcionar información de respuesta específica de alta frecuencia han demostrado que esta técnica ABR es prometedora como una herramienta de monitoreo objetivo para la detección temprana de OTT (23,24).

Tratamientos para disminuir la ototoxicidad producida por los aminoglucósidos.

Para evitar o disminuir la OTT se han propuesto varias estrategias otoprotectoras:

A). Reducir la absorción de AG que llega a la cóclea para prevenir la citotoxicidad (mediante la disminución de inflamación).

B) Interferir con los mecanismos de citotoxicidad inducida por el fármaco a través del bloqueo de la producción de ROS (25). Para esto, en varios estudios experimentales se ha descrito que el uso de vitaminas, NAC, D-metionina, edaravona, timoquinona y revertrol evita el estrés oxidativo que conduce a la muerte de las células cocleares y la pérdida de audición, ya que estas fármacos disminuyen la formación de ROS, inhiben la síntesis de óxido nítrico e inhiben la cascada del Jun N-Terminal Cinasas que desencadena la cascada de caspasas que producen la apoptosis de las células ciliadas (3,26,27). También, debido a que los AG pueden interactuar con el hierro para producir peroxidación lipídica, se ha propuesto el uso de quelantes de metales como la deferoxamina y 2,3-dihidroxibenzoato,

acetilsalicilato (28); pero, los usos de estos no han tenido el éxito deseado, lo que hace necesario buscar otros fármacos que eviten y disminuyan la OTT por AG.

C) Mantener la supervivencia de las células cocleares mediante el uso de factores neurotróficos como el BDNF, el factor neurotrófico ciliar (CDNF), el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), y la neurotrofina 3 (NT-3), ya que estos juegan un papel importante en el desarrollo coclear, ya que reduce la formación de radicales libres de oxígeno y disminuye la producción de genes apoptóticos, como resultado se ha observado que su uso en animales preserva las estructuras cocleares y mejora la audición (29); sin embargo, no se ha establecido la técnica de aplicación y dosis adecuada, para ser utilizada en la OTT-AMK.

N-acetilcisteína (NAC).

La NAC es un derivado del aminoácido cisteína con un grupo acetilo unido al nitrógeno (30), la cual posee potentes propiedades antiinflamatorias (31) y actúa como un reductor de enlaces disulfuro, eliminador de ROS (32) y/o precursor de biosíntesis de glutatión (GSH) intracelular, el cual durante el estrés oxidativo por acción de la glutatión peroxidasa (GPx) proporciona un electrón de hidrogeno para la reducción de peróxidos en agua (33-35), así como un estimulador de las enzimas citosólicas involucradas en la regeneración del glutatión, por lo que se ha utilizado para contrarrestar enfermedades neurodegenerativas y de salud mental (36), proteger contra la muerte neuronal inducida por el estrés oxidativo en neuronas granulares cultivadas (35), como antídoto contra la sobredosis de acetaminofén, recuperación después de una lesión cerebral traumática, isquemia cerebral y en el

tratamiento del vasoespasma cerebrovascular después de una hemorragia subaracnoidea (34), así como para el tratamiento de la hipoacusia posterior a la OTT-AMK (37). Sin embargo, no se ha probado su uso simultáneo con este AG, ni se ha descrito los cambios en la expresión de GSH, ni cambios apoptóticos en la cóclea cuando se administra de forma simultánea con la AMK.

Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

El BDNF es un miembro de la familia de factores de crecimiento de las neurotrofinas. La estructura humana del BDNF está estrechamente relacionada con el BDNF de rata y ratón. Se sintetiza en el retículo endoplásmico RE como una proteína pro-BDNF de 32-35 kDa, pasa por el aparato de Golgi y es expulsado en vesículas, posteriormente se secreta por las dendritas postsinápticas como forma activa (BDNF de 13 kDa).

Está implicado en la neurogénesis ótica con un papel importante durante la maduración de las neuronas conduciendo la señalización para la diferenciación y especialización a células ciliadas (38). Se ha observado que la señalización de la neurotrofina regula la supervivencia celular, la proliferación, destino de los precursores neuronales y el crecimiento de axones y dendritas a través de los receptores TrkB. Además, muestra un efecto neuroprotector en condiciones adversas, como la estimulación glutamatérgica, la isquemia cerebral, la hipoglucemia y la neurotoxicidad (39). Por otro lado, esta neurotrofina actúa a través los receptores: quinasa B relacionada con la tropomiosina (TrkB) que inicia la supervivencia de las células neuronales y la diferenciación y plasticidad de las señales sinápticas, mientras que los TrkB truncados son capaces de inhibir todos

estos procesos cuando se produce su heterodimerización con el TrkB; el receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) regula la supervivencia celular, el ciclo celular, el crecimiento axonal y la formación de mielina; y la sortilina que funciona como un correceptor que regula la expresión de TrkB o p75NTR en respuesta a una pro-neurotrofina e inicia la cascada apoptótica (29,40,41). Se ha descrito que el mejor efecto de este se logra mediante la administración directa, utilizando minibombas de infusión, cocleostomía, uso de materiales biodegradables como Gelfoam o hidrogel embebidos en el factor que contribuyen a un bajo riesgo de toxicidad celular; con el uso de nanopartículas que permitan dirigir los compuestos a la cóclea de manera sostenida y controlada (40). Con base en lo anterior se puede pensar que el administrar de forma intratimpánica el BDNF o la administración NAC vía oral de manera simultánea que la AMK evitará la producción de radicales libres de oxígeno, apoptosis de las células ciliadas cocleares y la HNS permanente en cobayos con OTT producida por este AG.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La OTT producida por los AG ocasiona la expresión de radicales libres de oxígeno, así como apoptosis de las células ciliadas cocleares e hipoacusia neurosensorial permanente y aunque se han implementado múltiples estrategias para tratar de evitarla, disminuirla y revertirla, hasta la fecha no existe algún tratamiento que tenga el éxito deseado.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El tratamiento intratimpánico con BDNF o la administración de NAC vía oral evitaran la producción de radicales libres de oxígeno, apoptosis de las células ciliadas cocleares y la HNS permanente en cobayos con OTT-AMK?

JUSTIFICACIÓN.

La hipoacusia es un problema de salud pública debido a que afecta el desarrollo psicosocial y económico de quien la padece. Es la 4ta causa más común de discapacidad a nivel mundial con una prevalencia estimada de 466 millones de personas. Se desconoce exactamente la incidencia de la OTT inducida por fármacos y en el INER no se cuenta con datos estadísticos sobre los pacientes atendidos en la consulta de audiología con el diagnóstico de OTT; este, es un problema creciente a nivel mundial debido a que los AG son el fármaco de elección en enfermedades multidrogoresistentes (MDR) en donde se usan como los fármacos de primera línea de tratamiento. Sin embargo, estas drogas predisponen a la presencia de vestibulotoxicidad o cocleototoxicidad, debido a que favorecen producción de radicales libres y apoptosis de las células ciliadas cocleares. Para evitar o disminuir la OTT se ha propuesto el uso de antioxidantes y factores neurotróficos, pero ninguna ha tenido el éxito deseado, porque no se ha encontrado la vía de administración ni dosis ideal que la eviten; por lo que es necesario encontrar otras alternativas para su tratamiento. Los factores neurotróficos son sustancias que han demostrado ser útiles para la sinaptogénesis y crecimiento neuronal; por esta razón, en este trabajo se propone su uso para evaluar sus efectos sobre las células ciliadas y neuronas ganglionares dañadas por la OTT.

HIPÓTESIS.

El BDNF y la NAC son fármacos que inhiben la producción de radicales libres de oxígeno y evitan la apoptosis, entonces la administración de estos en cobayos con OTT inducida por AMK, evitará la producción de ROS y la apoptosis de las células ciliadas de la cóclea y la pérdida de la audición permanente.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto del tratamiento intratimpánico con BDNF embebido en esponja de colágena y de la administración simultáneamente VO de NAC con AMK, sobre los cambios audiológicos, histológicos y apoptóticos en la cóclea de cobayos con OTT inducida por AMK (OTT-AMK).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar los efectos de la aplicación intratimpánica del BDNF y NAC VO como tratamiento otoprotector, sobre los cambios EOApd de cobayos con OTT producida por AMK.
- Valorar los cambios histológicos producidos en la cóclea de cobayos con OTT por AMK, después aplicar BDNF intratimpánicamente y N-acetilcisteína VO como tratamiento otoprotector.
- Evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión de GPx y apoptosis en la cóclea de cobayos con OTT-AMK, después aplicar BDNF intratimpánicamente y N-acetilcisteína VO como tratamiento otoprotector.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se llevó a cabo un estudio experimental, longitudinal y comparativo, que se realizó en la Unidad de trasplante pulmonar experimental del Departamento de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INERICV).

Animales de experimentación.

Se utilizaron 55 cobayos de raza Dunkin-Harley, clínicamente sanos, sin importar sexo, ni edad, con peso 200-250g. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (42) y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (43). Al finalizar el estudio se tomaron los oídos de 5 animales, los cuales iban a ser sometidos a eutanasia por haber cumplido con su vida reproductiva en el bioterio y sus oídos se utilizaron como controles sanos para los estudios de histología e inmunohistoquímica (IHQ) (éstos animales también se manejaron bajo las mismas normas) (42,43).

La muestra se calculó para una población infinita con un intervalo de confianza del 95% (100 individuos por grupo), pero como eran muchos animales, el cálculo se llevó a cabo bajo los criterios de las tres Rs (Reemplazo, Refinamiento y Reducción), obteniéndose un número de 10 animales por grupo.

Los animales no requirieron de condición o característica particular de alojamiento, mantenimiento, alimentación o cuidados veterinarios.

Criterios de inclusión. Se incluyeron cobayos SPF (libres de patógenos específicos) entre 200-250 g, producidos en el bioterio del INERICV, sin alteraciones óticas.

Criterios de exclusión. Los animales con antecedentes de algún procedimiento o enfermedad de oído, fueron excluidos del estudio.

Criterios de eliminación. Todo animal que presentó signos clínicos de cualquier patología que no haya sido provocada por la OTT.

Criterios de terminación.

Aquellos animales que mostraron signos de dolor agudo o crónico, de acuerdo a lo descrito por The Rat Grimace Scale (44) y que no disminuyó con la aplicación de medicamentos, fueron sometidos a eutanasia con sobredosis anestésica utilizando pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México).

Grupos de Estudio

A todos los animales se les administró diariamente AMK (Amikacina, AMSA, Guadalajara, Mexico) intramuscular a dosis de 25 mg/Kg de peso durante 15 días (tiempo suficiente descrito en la literatura para producir OTT) (37) y una vez que quedaron sordos, se les aplicó el tratamiento de la siguiente forma:

Grupo I (n=10): OTT-AMK sin tratamiento.

Grupo II (n=10): OTT-AMK tratados con NAC VO a dosis de 140 mg/kg/24 horas (dosis utilizada en niños con intoxicación por paracetamol) durante 4 semanas, después de haber producido la OTT (AMK-NAC post hipoacusia).

Grupo III (n=10): OTT-AMK tratados simultáneamente con NAC VO a dosis de 140 mg/kg/24 horas durante 4 semanas (AMK-NAC simultánea).

Grupo IV (n=10): OTT-AMK tratados con 6 µl de solución salina fisiológica embebidos en una esponja de colágena porcina (Gelfoam, Pharmacia and Upjohn, NJ, USA) colocado sobre la ventana redonda como dosis única, después de haber producido la OTT (AMK-Gelfoam).

Grupo V (n=10): OTT-AMK tratados con 6µl de una solución de 1 µg/µl de BDNF (PeproTech Inc, AF-450-02, CA, USA.) embebidos en Gelfoam, colocado sobre la ventana redonda como dosis única, después de haber producido la OTT (AMK-BDNF).

Aplicación del tratamiento.

El grupo control o grupo I no recibió ningún tratamiento. En los grupos II y III, la NAC (ACC®, Sandoz, Wolfstatshausen, Alemania) fue diluída en el agua de bebida, la cual se administró *ad libitum*.

En los grupos IV y V, después de haberse provocado la OTT, los animales fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico bajo anestesia general para colocar un cuadro de Gelfoam en la ventana redonda. En el grupo IV únicamente se instilo 6 µl de solución salina, mientras que en el grupo V se embebió el Gelfoam en 6µl de una solución de 1 µg/µl de BDNF (40), para que penetrará en la escala timpánica y

se extendiera por los fluidos cocleares hasta llegar a las células sensoriales, células de soporte y las fibras nerviosas aferentes de los animales con OTT-AMK.

Técnica quirúrgica.

Los animales fueron sometidos a anestesia general, administrando por vía intraperitoneal (IP) una mezcla de 60 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Anesket®, Pisa, Guadalajara, México) con 5 mg/kg de xilazina (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Alemania). También se administró 5 mg/kg vía subcutánea (SC) de meloxicam (Melodex®, Laboratorios Aranda, México, DF, México) para mantener analgesia preoperatoria y enrofloxacin como antibiótico (Baytril®, Bayer, Leverkusen, Alemania) a dosis de 5 mg/kg/SC (37). Durante todo el procedimiento quirúrgico y en la recuperación anestésica se monitorizó la frecuencia cardíaca (FC) frecuencia respiratoria (FR) y saturación de oxígeno (SaO₂) con un monitor para signos vitales (Datascop Passport 5 Lead Monitor®, Mindray Medical International, Shenzhen, China).

Una vez anestesiado el cobayo, se le realizó tricotomía de ambas regiones retroauriculares y se realizó la asepsia del área con una solución yodada. Posteriormente, se infiltró lidocaína de forma local (lidocaína®, Pisa, Guadalajara, México) a dosis 5mg/kg en la región retroauricular de forma bilateral. Se colocó al animal en posición decúbito ventral y utilizando como punto de referencia el proceso angular de la mandíbula, se identificó el hueso temporal, el cual se localiza en la línea ventral inmediatamente por encima. Una vez que se localizó el hueso temporal, se realizó una incisión elíptica de 2cm sobre área de la bula timpánica, sin sobrepasar la pared anterior de conducto auditivo externo. Los pabellones de la

oreja se retrajeron lateralmente y desperiostizo el tejido hasta exponer el hueso temporal, cuidando de no lesionar el nervio facial. Después de identificar el nervio facial, entre la porción mastoidea y la pared posterosuperior del conducto auditivo externo, se identificó la bula timpánica, se realizó una mastoidectomía de 3 mm de diámetro con la punta de una hoja de bisturí; así mismo mediante microcirugía se expuso y visualizó la ventana redonda, y con un pick recto (Sklar Surgical instruments, Pennsylvania, USA), se colocó el gelfoam® (1x1mm) embebido en el BDNF. Finalmente, el defecto de la bula se cerró con la fascia temporal y los tejidos subcutáneos se aproximaron con puntos invertidos con material de sutura no absorbible de poliglactina 910 (Vicryl, Ethicon, New Jersey, USA) de 4-0 (4-0) (45). (Figura 1).

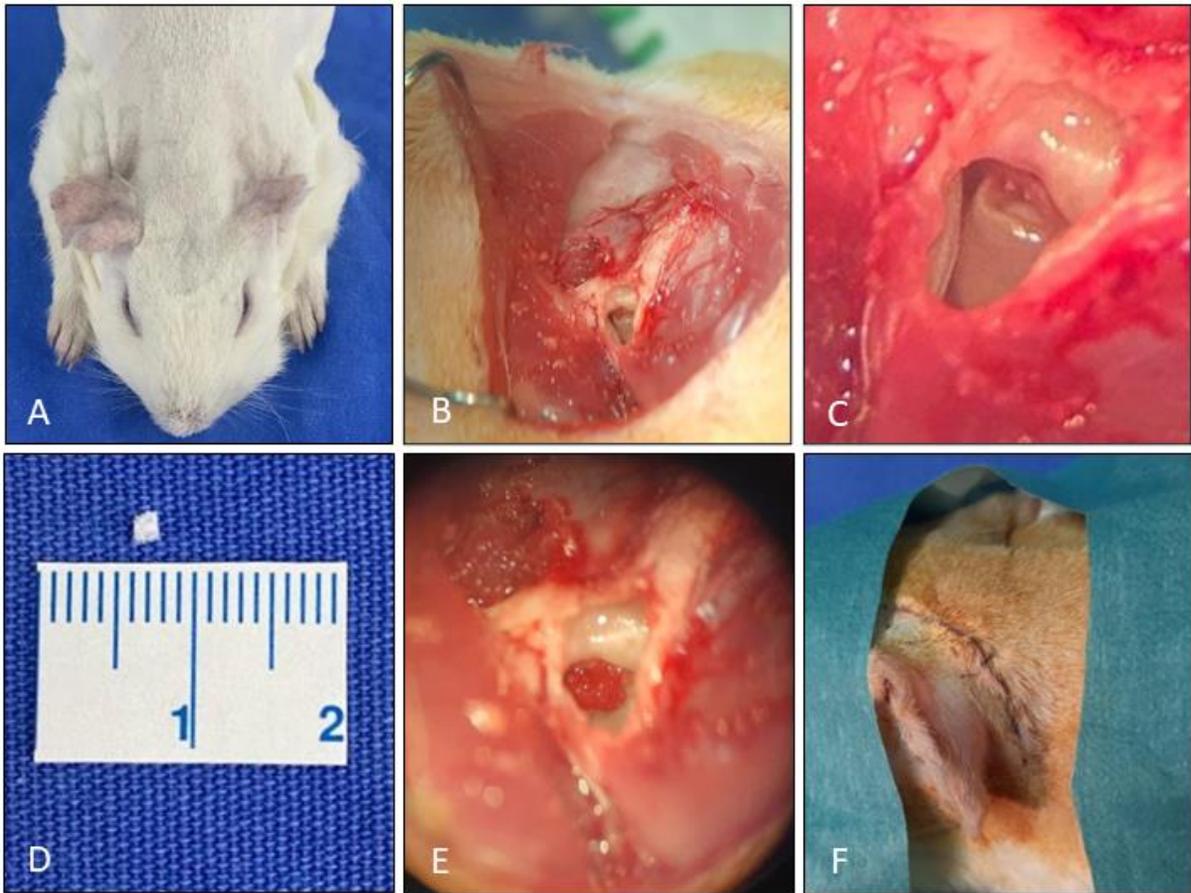


Figura 1. Foto que muestra el procedimiento quirúrgico. A) Cobayo en posición decúbito ventral después de ser infiltrado. B) Incisión de 3x3mm sobre bula timpánica C) Exposición de la ventana redonda. D) Tamaño del gelfoam (1x1mm) embebido en BDNF. E) Aplicación del tratamiento sobre ventana redonda. F) Cierre convencional de incisión retroauricular.

Evaluación.

El estudio tuvo una duración de 6 semanas después de haberse producido la OTT (hipoacusia) e inicio de la aplicación del tratamiento. Durante este tiempo todos los cobayos se evaluaron clínica, audiológica, histológica e inmunohistoquímicamente.

Clínica.

Se evaluó clínicamente la presencia de otitis, otorrea y laberintitis post-aplicación de los tratamientos. Además, se les evaluó la presencia de respuesta al estímulo auditivo, así como la presencia de signos vestibulotoxicidad (principalmente inestabilidad postural).

Valoración Audiológica.

En todos los grupos se llevó a cabo la medición de emisiones otoacústicas por productos de distorsión en ambos oídos (EOApd) para valorar los rangos de audición de los cobayos. Se realizó una medición inicial sin anestesia, previo a la administración de AMK, y posteriormente una medición cada semana hasta producir hipoacusia. Una vez producida la OTT, se administró tratamiento a los cobayos con NAC O BDNF, dependiendo su grupo de estudio, y se realizó nuevamente la medición de las emisiones otoacústicas por productos de distorsión a los 15 y 30 días de tratamiento. Para la evaluación, los cobayos se envolvieron en un campo quirúrgico no estéril, posteriormente, se colocó secuencialmente en cada conducto auditivo externo la sonda de las emisiones cubierta por una oliva auditiva Sanibel pediátrica. La valoración de las EOApd se realizó utilizando dos estímulos de tonos puros, (F1 y F2), manteniendo entre las frecuencias de las mismas una proporción $f2/f1$ de aproximadamente 1,2 y con niveles de intensidad de los dos tonos (L1 y L2) de 65 - 55 dB. A través del DPgrama se representó la amplitud de los productos de distorsión a diferentes frecuencias de F2 y su relación con el ruido. La aparición de los productos de distorsión se circunscribe dentro del rango frecuencial de 500 a 8000 Hz.

Histológica

Concluido el tiempo de estudio los animales fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (100mg/kg) (Anestesal, Pfizer, Estado de México, México) y se obtuvieron los huesos temporales, los cuáles se fijaron durante 24 horas en formaldehído al 10%. Posteriormente se descalcificaron con una solución de ácido fórmico (CH_2O_2) al 5% y ácido clorhídrico (HCl) al 5% durante 72 horas. Una vez descalcificados, las cócleas fueron incluídas en parafina y se les realizaron cortes de tres micras, tiñeron con hematoxilina-eosina y se evaluaron por microscopía de luz.

En el análisis de los hallazgos histológicos, se valoró la continuidad de la estría vascular, integridad de la membrana tectoria, membrana vestibular, células ciliadas externas de la cóclea y densidad de las células ganglionares espirales.

La evaluación de estos cambios histológicos fue realizada mediante una escala nominal (en la que la completa integridad se considerará como un sí y la falta de cualquier segmento como no), mientras que la pérdida de la célula ciliadas externas se evaluará de acuerdo a una escala semicuantitativa en la que cada parámetro evaluado recibirá un porcentaje de acuerdo a la severidad de los cambios histológicos (0-10% ausente, 11-25% leve, 26-50% moderado, 51-100% severo).

Inmunohistoquímica

En este estudio se determinó que la expresión in situ de GPx en la cóclea se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica, para esto a los tejidos incluidos en parafina se les realizaron cortes de tres micras y se montaron en laminillas silanizadas. Las laminillas con los cortes se incubaron durante 30 minutos dentro de una estufa

(Fisher Scientific) mantenida a una temperatura 60°C para eliminar la parafina. (Fisher Scientific). Después, el tejido se rehidrató y clarificó mediante una inmersión seriada en xilol (10 minutos), etanol absoluto (1 minuto), etanol al 90% (1 minuto) y etanol al 70% (1 minuto). Posteriormente, las muestras se trataron con buffer de citratos pH 6, el antígeno se recuperó con calor en baño húmedo (Stable Temp®, Cole Parmer®) a 60°C por 30 minutos, se dejaron enfriar y se lavaron con Tris-Buffered Saline with Tween (TBST) tres veces por cinco minutos. La peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 30% (J.T. Baker, Méx.) diluido (1:9 en H₂O desionizada) durante 15 minutos y se lavó nuevamente en tres tiempos de cinco minutos con TBST. Posteriormente se agregó suero bloqueador (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo del pegado inespecífico y se lavó nuevamente. Una vez que se llevaron a cabo los pasos anteriores las secciones de tejido fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo para GPx (Biorbyt, orb5344, CA, USA) a una concentración de 10µg/ml durante 24 horas a 4°C. Pasado este tiempo se lavaron nuevamente en tres ocasiones con TBST por cinco minutos cada uno y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo biotilnado universal (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame,CA) 10 minutos, se lavó al final en tres tiempos de cinco minutos, posteriormente se utilizó el sistema Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y nuevamente se lavaron como ya se describió, se utilizó 3,3´Diaminobencidina (DAB) (BioCare Medical, USA) como revelador durante cinco minutos, se tiñeron con Hematoxilina (BioCare Medical, CA, USA) y para virar el contraste se utilizó una solución saturada de Carbonato de Litio (Fisher Chemical,

USA). En todos los ensayos se realizaron controles de tejido positivo (riñón de rata), así como controles negativos a los cuales no se les agregó anticuerpo primario.

La cuantificación de la expresión de GPx se realizó empleando el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), desarrollado por el National Institute of Health (NIH) y el plugin IHC Profiler. Se tomaron imágenes de microscopía en formato digital de diez campos aleatorios por laminilla, a través de un microscopio, una cámara fotográfica digital (Hitachi digital), una computadora y el software necesario para capturar las imágenes. Todas las fotografías se tomaron a la vez utilizando el mismo objetivo y la misma intensidad de luz. Una vez que se obtuvieron las imágenes se clasificó a cada imagen en un rango de intensidad del color que se dividió por cuatro zonas dentro de la escala del color de 0-255; alto positivo, positivo, bajo positivo y negativo, asimismo, se determinó el número de píxeles positivos de acuerdo al número de píxeles por zona y el total del número de píxeles por imagen (46) reportando la intensidad del cromógeno en píxeles.

Determinación de la apoptosis celular

La determinación de la apoptosis celular se realizó mediante inmunohistoquímica utilizando el método de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end-labeling). El tejido fue fijado y montado de la misma forma que para el análisis inmunohistoquímico. La técnica se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (ApopTag Plus Peroxidase in situ apoptosis detection kit; S7101, EMD Millipore Corporation, CA, USA.) de la siguiente manera. Para desparafinar el tejido las muestras fueron sumergidas en xilol y rehidratadas en concentraciones decrecientes de alcohol (absoluto, 95% y 70%). Posteriormente, se lavaron con buffer de fosfatos (PBS) y

se incubaron a temperatura ambiente con proteinasa K durante 15 min para favorecer la recuperación antigénica. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena, el tejido se trató con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min. Se realizó un nuevo lavado con PBS y posteriormente los cortes histológicos se incubaron a temperatura ambiente con Equilibration Buffer durante 10 seg e inmediatamente después con la enzima TdT (desoxinucleotidil transferasa) a 37°C por 1h para favorecer la unión de los hidroxilos de ADN fragmentados libres de las células apoptóticas. Terminado el tiempo de incubación las muestras fueron lavadas con PBS seguido de la colocación de la solución en tándem de antidigoxigenina, la cual se incubo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después del lavado con PBS se agregó DAB (diaminobencidina) como cromógeno para revelar el color de reacción, para la contra tinción se utilizó hematoxilina (BioCare Medical, CA, USA) y para virar el contraste se utilizó una solución saturada de Carbonato de Litio (Fisher Chemical, USA). El número de células apoptóticas se obtuvo a partir de la fórmula del índice de apoptosis (AI): $AI = (\text{células apoptóticas} / \text{células totales}) \times 100\%$. Los cortes se analizaron en 10 áreas aleatorias con un aumento de 40x.

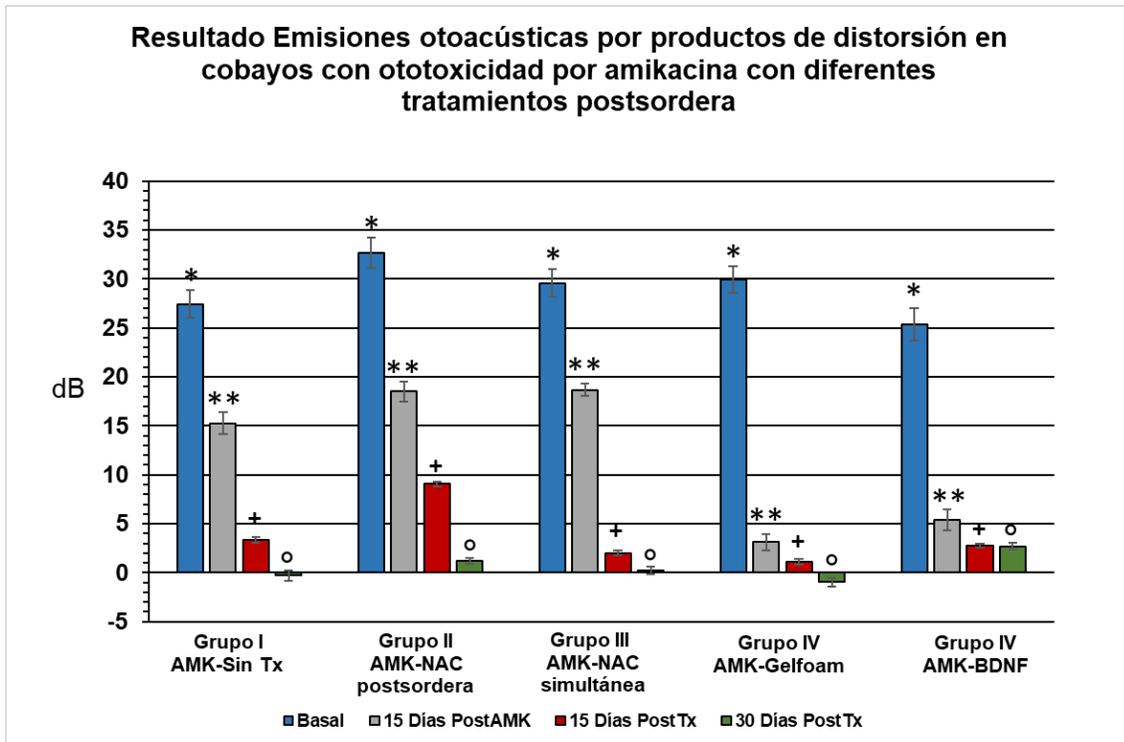
Análisis estadístico

El análisis estadístico de los hallazgos audiológicos se llevó a cabo con la prueba de ANDEVA de medidas repetidas, Dunnett y Tukey. Los hallazgos IHQ con ANDEVA, Dunnett y Tukey; mientras que los histológicos con Kruskall Wallis. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron como significativos.

RESULTADOS.

Todos los animales sobrevivieron al tiempo de estudio sin ninguna complicación clínica aparente más que la sordera.

En todos los casos después de realizar las emisiones otoacústicas por productos de distorsión se observó que los resultados de las frecuencias que escuchaban los cobayos a los 15 días de haberseles administrado la AMK disminuyeron ($p < 0.007$ ANDEVA, Dunnet). Después de haber administrado los tratamientos en todos los grupos de estudio se continuo con la disminución de estos valores en cada medición vs su valor basal y medición previa ($p < 0.001$, ANDEVA MD, Dunnett, Tukey), con excepción del grupo II en el que estos valores disminuyeron de manera severa hasta el final del estudio. Así mismo en el grupo V, los valores mostrados después de haber aplicado el tratamiento se observaron similares a diferencia de los otros grupos de estudio en la que la pérdida de la audición siguió evolucionando en estas mismas mediciones. Aunque la mayor disminución se observó en el grupo IV a los 30 días postratamiento no se observó diferencia significativa en los valores de todos los grupos evaluados al final del estudio. ($p > 0.05$, ANDEVA MD, Dunnett, Tukey). (Gráfica 1).



Gráfica 1. Muestra la disminución en la audición en los cobayos de todos los grupos de estudio post OTT-AMK y después de aplicar los diferentes tratamientos.

Histológicamente, se observó el tejido control sin alteraciones de ninguna de sus estructuras. Al evaluar el órgano de Corti, en todos los animales de los grupos I, II, III y IV, se observó pérdida severa de las células ciliadas externas y leve en el grupo V en comparación con las cócleas sanas ($p < 0.05$ Kruskal Wallis). Así mismo, estas células se observaron hinchadas en el grupo I y con cambios degenerativos en los grupos II y III. Además, todos los grupos mostraron degeneración y pérdida de la continuidad de la estría vascular, pérdida de la integridad de la membrana tectoria la cual en los grupos I, III y V se observó adelgazada y en el grupo II y IV engrosada. También en los grupos I, II, III y IV se apreció pérdida severa de las células del limbo espiral. (Figura 2)

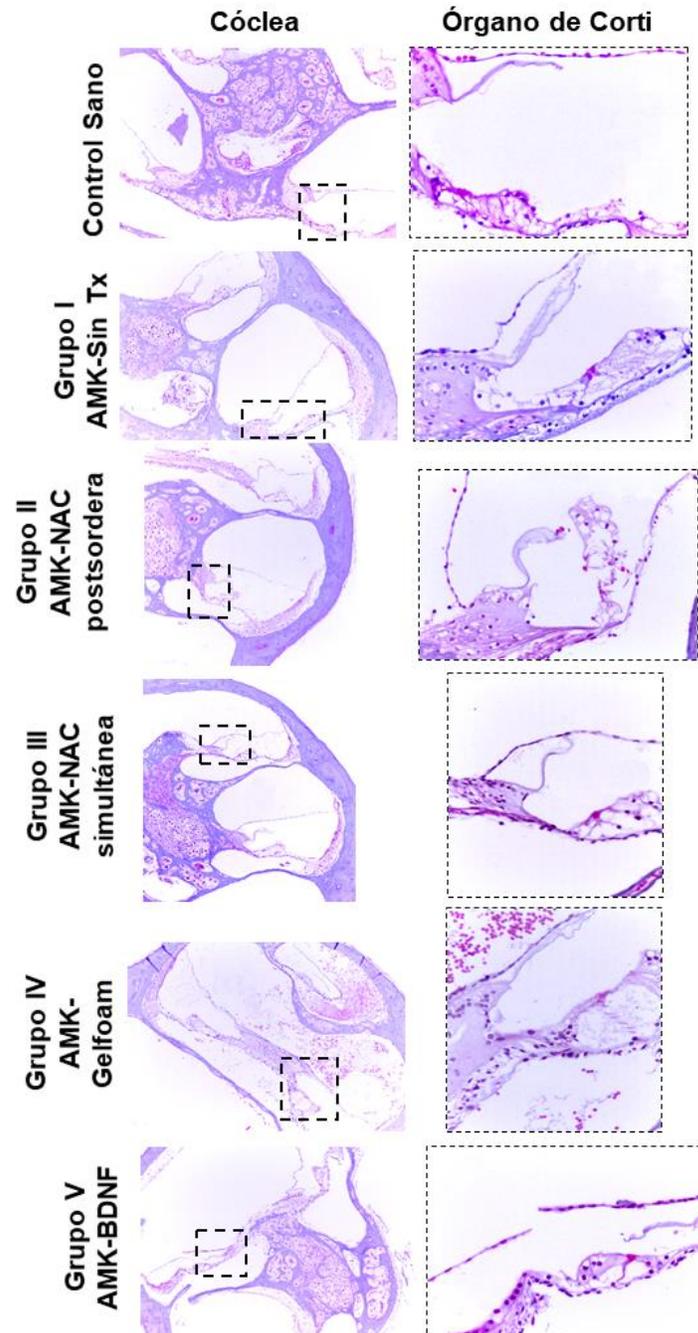
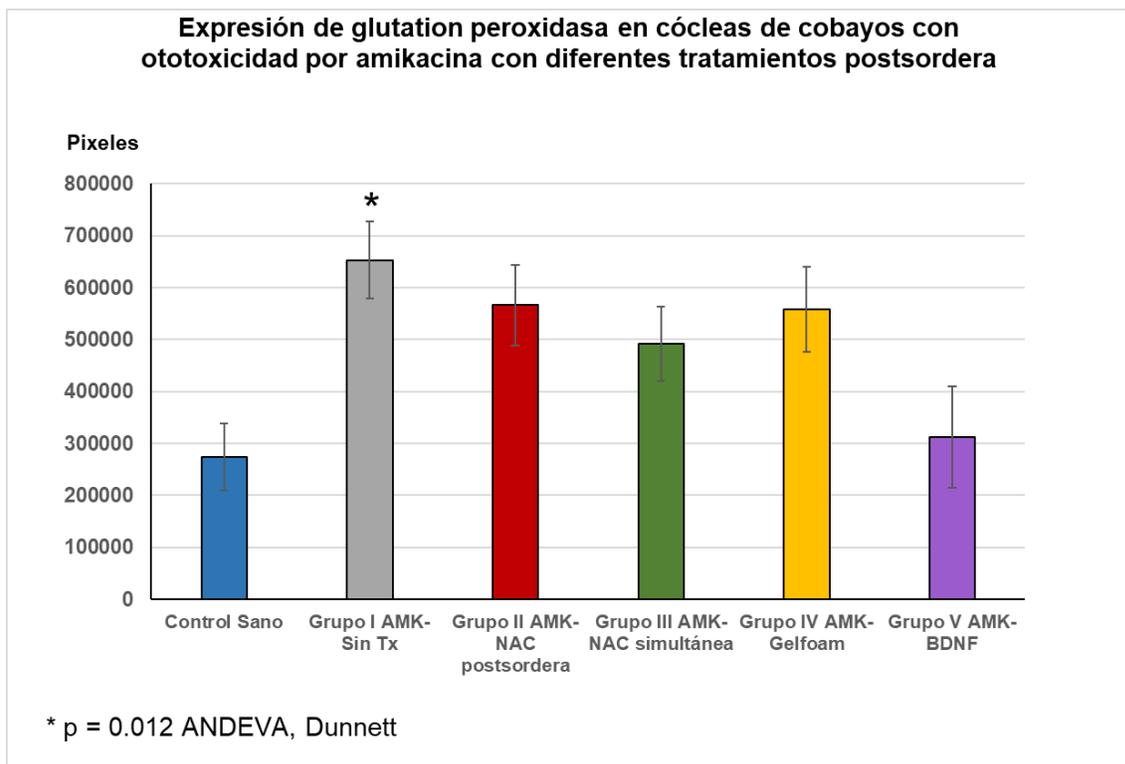


Figura 2. Micrografías que muestran los cambios histológicos en el tejido coclear sano, post-AMK y post-AMK tratados con NAC, Gelfoam y BDNF. Cóclea 10x, Órgano de Corti 40x.

Al valorar mediante IHQ el estrés oxidativo producido por la AMK y la aplicación de los diferentes tratamientos a través de la producción de GPx, se observó que en los

animales esta se incrementa de en todos los grupos de estudio en comparación con los valores de los animales sanos que no recibieron el ototóxico; sin embargo, este incremento fue severo en los animales del grupo I ($p = 0.012$ ANDEVA, Dunnett), moderado en los de los grupos II, III y IV y leve en el grupo V ($p > 0.05$ ANDEVA, Dunnett). Al comparar entre grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$ ANDEVA, Tukey) aunque el grupo tratado con BDNF, mostro menos expresión de esta enzima. (Gráfica 2 y Figura 3)



Gráfica 2. Muestra que ni la NAC, ni el BDNF evitan la expresión de radicales de O_2 después ser utilizadas para revertir la OTT-AMK.

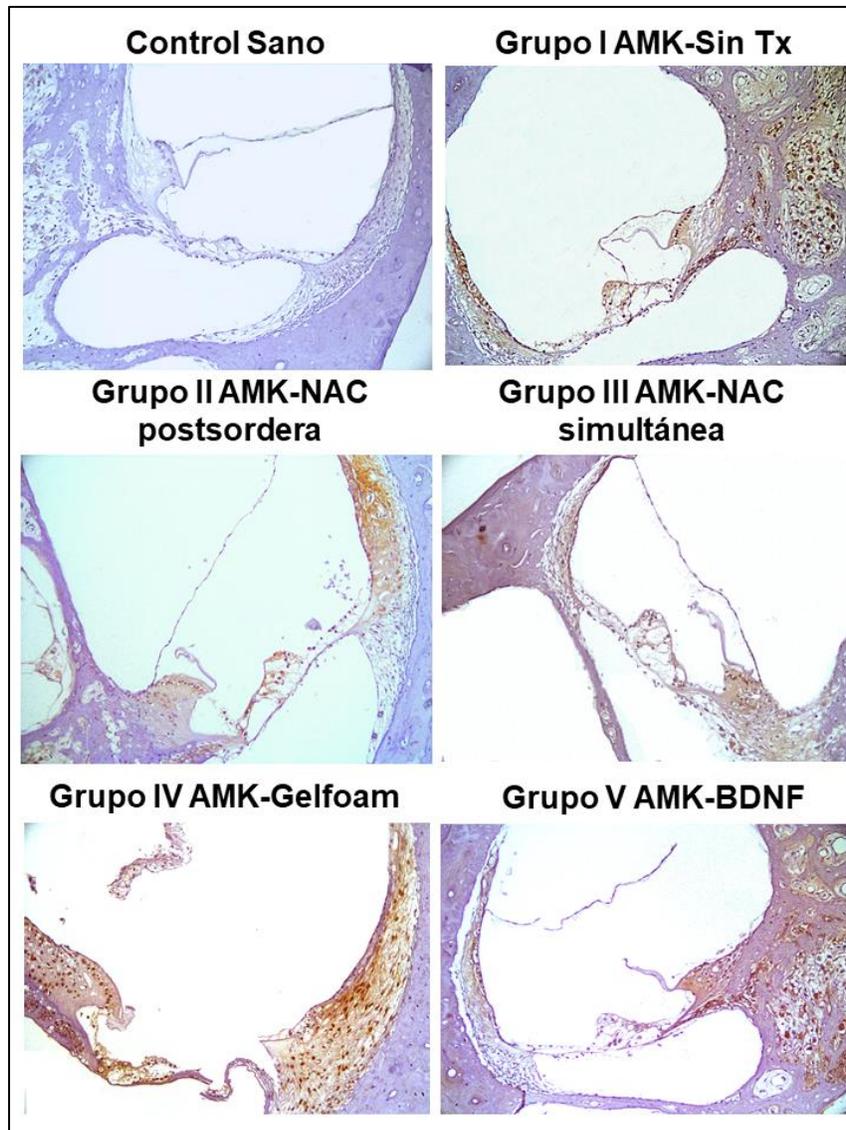
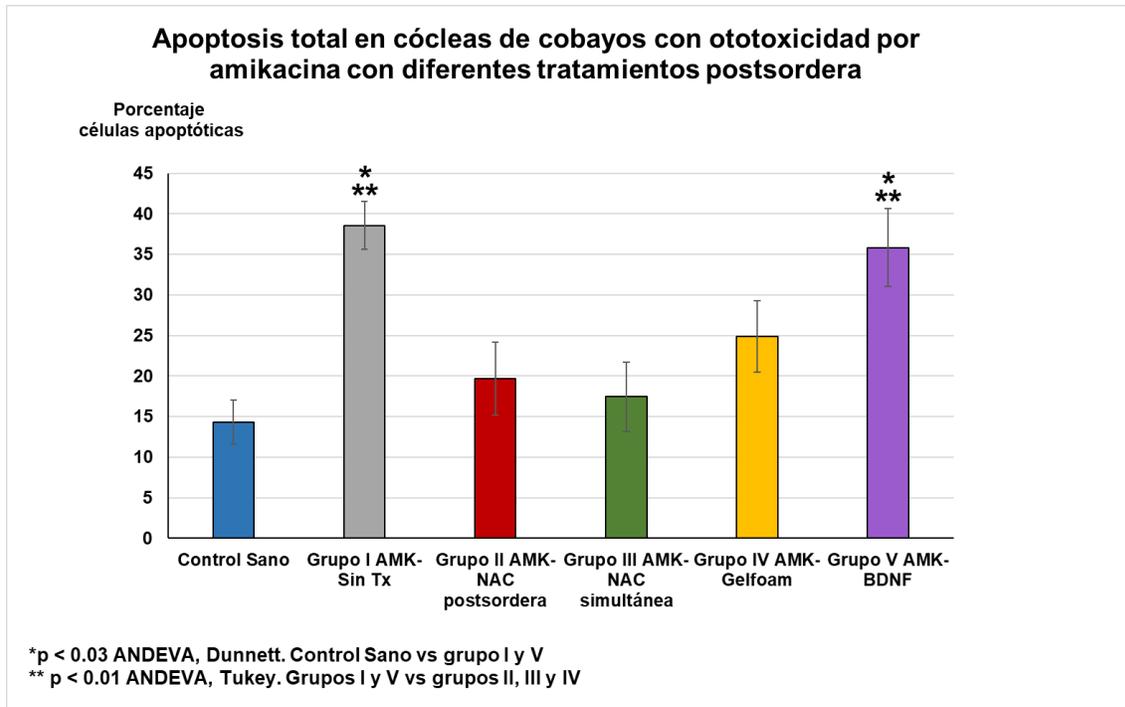


Figura 3. Expresión de GPx sobre el tejido coclear sano, post-AMK y post-tratamiento. En el tejido sano se observa una ausencia de expresión de glutatión peroxidasa. En las cócleas que presentaron sordera y no recibieron tratamiento esta expresión fue severa (color marrón intenso) al igual que las tratadas con Gelfoam, en comparación con los grupos de NAC (post hipoacusia y simultánea) y BDNF en donde se observó una expresión de moderada a severa. 20x

Los estudios de IHQ de las cócleas de los animales que recibieron AMK y los diferentes tratamientos post OTT, mostraron más porcentaje de células apoptóticas

que los de los animales sanos; sin embargo, solo el porcentaje de apoptosis mostrado por los animales de los grupos I y V fue significativo ($p < 0.03$ ANDEVA, Dunnett). Al comparar entre grupos también la apoptosis mostrada por estos grupos fue significativamente mayor que la de los grupos II, III y IV ($p < 0.01$ ANDEVA, Tukey). (Grafica 3).



Gráfica 3. Muestra el porcentaje de células apoptóticas totales en la cóclea de los cobayos con lesión OTT, con y sin tratamiento con otoprotectores.

Al valorar el porcentaje de células apoptóticas por componente de la cóclea, se observó que los animales que recibieron AMK para producir la OTT y no recibieron tratamiento mostraron mayor apoptosis de las células ciliadas del órgano de Corti en comparación con los otros grupos de estudio ($p < 0.001$ ANDEVA, Tukey) y controles sanos ($p < 0.001$ ANDEVA, Dunnett); mientras que todos los grupos que

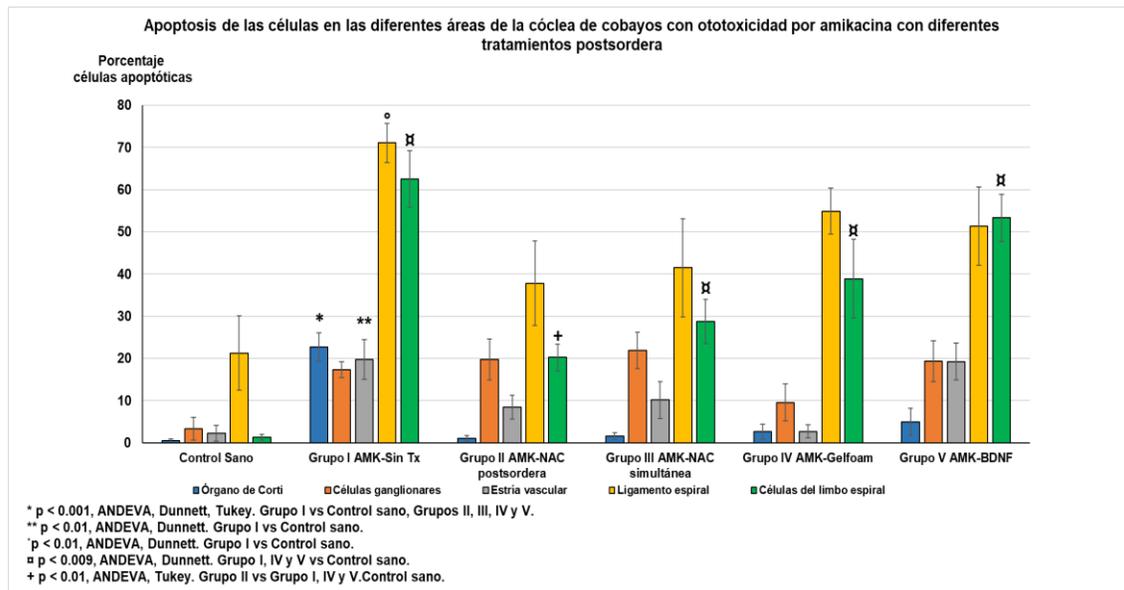
recibieron tratamiento la apoptosis estas células disminuyó casi hasta alcanzar sus valores basales (Gráfica 4 y Figura 3).

Con respecto al porcentaje de apoptosis de las células ganglionares, se observó que en todos los grupos hubo un incremento similar de esta en comparación con los animales sanos; sin embargo, esto no fue significativo entre grupos, ni dentro de cada grupo ($p > 0.05$, ANDEVA) (Gráfica 4 y Figura 3)

Las células de la estría vascular de todos los grupos de estudio también mostró un incremento en el porcentaje de células apoptóticas en comparación con los animales sanos; pero este incremento fue superior en los grupos I y V; aunque solo fue significativo en los animales del grupo I ($p < 0.01$ Andeva, Dunnett). (Gráfica 4 y Figura 3).

En todos los grupos, las células del ligamento espiral incrementaron el porcentaje de apoptosis en comparación con los cobayos sanos, pero este incremento aunque fue superior en los grupos I, IV y V, solo el grupo I mostró diferencia significativa ($p = 0.005$, ANDEVA, Dunnett). Al comparar entre grupos no hubo diferencias estadísticas importantes ($p > 0.05$, ANDEVA, Tukey) (Gráfica 4 y Figura 3).

En todos los grupos, las células del limbo espiral, también incrementaron su porcentaje de apoptosis en comparación con las cócleas sanas. Aunque este incremento fue superior en los grupos I, IV y V ($p = 0.009$, ANDEVA, Dunnett). Al comparar entre grupos, la apoptosis de estos mismos grupos solo fue superior a la del grupo de AMK tratada con NAC postsordera ($p < 0.01$, ANDEVA, Tukey) (Gráfica 4 y Figura 4).



Grafica 4. Muestra el porcentaje de apoptosis de las células cocleares en animales sanos, post hipoacusia, así como después del uso de diferentes tratamientos.

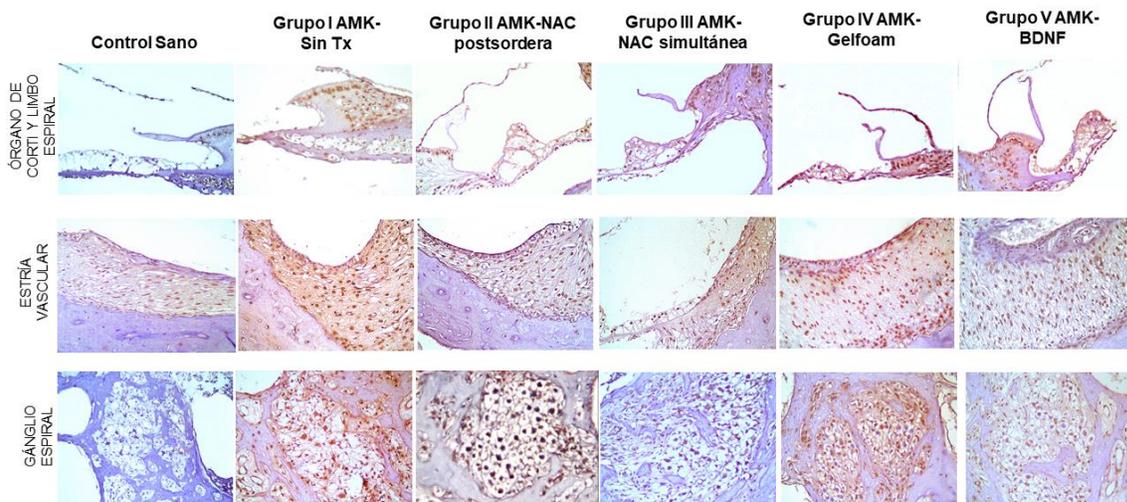


Figura 4. Micrografías representativas de la presencia de células apoptóticas (células color marrón) en las diferentes áreas de la cóclea. En el tejido sano se observa 10% de células apoptóticas del limbo espiral, 20% en las células de sostén

de la estría vascular y 5% en las células del ganglio espiral y el órgano de Corti. Mientras que en las cócleas post OTT-AMK se observa >40% de células apoptóticas en todas sus estructuras al igual que los grupos que recibieron tratamiento para la sordera. (40x).

DISCUSIÓN.

Se ha documentado que AG son muy eficaces contra las enfermedades multidrogoresistentes y continúan siendo parte del tratamiento de primera línea en otras enfermedades (9); sin embargo, pueden provocar OTT y degeneración celular de los tejidos cocleares y/o vestibulares, que conduce al deterioro funcional y pérdida auditiva irreversible (8,11,23), debido a que estos promueven la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) en el oído interno, apoptosis de las células ciliadas externas de la cóclea (12,20). Aunque para evitar o disminuir la OTT se han propuesto el uso de antioxidantes para bloquear la producción de ROS (25) y factores neurotróficos para mantener la supervivencia de las células cocleares, no se ha logrado disminuirla o evitarla, por los tiempos y vías de administración de los tratamientos; por esta razón en este estudio se evaluó el efecto del tratamiento intratimpánico con BDNF embebido en esponja de colágena y de la administración simultáneamente VO de NAC con AMK, sobre los cambios audiológicos, histológicos y apoptóticos en la cóclea de cobayos con OTT-AMK.

Nuestros resultados mostraron que en el modelo de OTT por AMK en cobayos, la NAC administrada de manera simultánea o posthipoacusia, así como la aplicación intratimpánica de BDNF embebido en una esponja de colágena, no evitan el incremento en la producción del GPx, apoptosis, deterioro histológico de la cóclea

y la pérdida de la audición, a pesar de que los animales tratados con NAC mostraron menor apoptosis que los tratados con BDNF.

En este estudio se decidió la utilización del BDNF embebido gelfoam, porque al colocarla sobre la ventana redonda favorece que por difusión, el factor neurotrófico alcance niveles elevados en la perilinfa y se ponga en contacto directo con la cóclea como lo describió Ito et al (47), al estudiar los nuevos métodos para la administración de fármacos en el oído interno. También utilizamos este método porque el uso de materiales biodegradables como esta esponja o hidrogeles en conjunto con el BDNF presenta un bajo riesgo de toxicidad celular como lo reportado otros autores (40,48) que ha estudiado las mejores vías para asegurar la entrega de fármacos para el tratamiento de la ceguera y la sordera.

En este estudio, para la identificación temprana y el monitoreo de la ototoxicidad, utilizamos las EOApd, y no las audiometrías de tono puro o de alta frecuencia como lo recomienda la Academia Americana de Audiología, porque los cobayos no interactúan con el audiólogo y no pueden responder (49). Así mismo, nuestros hallazgos audiológicos mostraron que la AMK produjo OTT a los 15 días de haberse administrado, ya que las respuestas de EOApd disminuyeron severamente en todas las frecuencias, lo cual concuerda con lo observado en otro estudio en el que produjeron OTT con AMK (37) y observaron que en este tiempo se produce la hipoacusia. Por otro lado, observamos que ni el BDNF, ni la NAC, evitaron la evolución de la OTT ya que las amplitudes siguieron disminuyendo durante el tiempo que duró el estudio, lo cual coincide con lo observado por varios autores que en ratas produjeron OTT con gentamicina (50), carboplatino (51), así como cisplatino (52) y utilizaron NAC como otoprotector para disminuir la hipoacusia, y

reportaron que con y sin tratamiento después de producirse la OTT la hipoacusia se vuelve más severa. Nuestros resultados tampoco coinciden con los descritos por otros autores que utilizaron BDNF después de producir OTT con AG y aplicaron un hidrogel (47) o gelfoam (48) que contenía BDNF (con 84 μ g y 6 μ g, respectivamente) como único tratamiento y observaron que había una mejoría de los umbrales auditivos posterior a su administración. Así mismo, los resultados de este estudio no concuerdan con lo observado por Blakley et al (29) quienes produjeron la hipoacusia con cisplatino y aplicaron una sola inyección intracoclear de 0.05 μ g BDNF a través de la ventana redonda y reportaron que, a los 30 días posteriores a la aplicación del tratamiento mejora la audición en 11 dB, pero que, aunque se mejoró la audición postratamiento esta no supera la pérdida auditiva inducida por el antineoplásico.

Nuestros hallazgos histológicos concuerdan con lo descrito por varios autores que han estudiado y mencionan que los cambios histológicos producidos por la AMK se caracterizan por la degeneración hidrópica y vacuolar, así como la pérdida de células ciliadas externas del órgano de Corti. Además, la AMK provoca degeneración severa del ligamento espiral y la estría vascular (3,53-55).

En todos los grupos hubo expresión de GPx porque los AG generan la producción de ROS (12) y la GPx es una enzima que se sintetiza de forma endógena en todas las células para protegerse del estrés oxidativo (56,57). Por otro lado, los animales tratados con NAC mostraron más expresión de GPx que el resto de animales que recibieron tratamiento, posiblemente porque actúa como un precursor de la síntesis de glutatión (GSH) y como un estimulador de las enzimas citosólicas involucradas en la regeneración del mismo (35). Para esto, una vez que la NAC ingresa a una

célula, se hidroliza y libera la cisteína, la cual por acción de la c-glutamylcisteína sintetasa y la glutathion sintetasa se produce el GSH, el cual durante el estrés oxidativo por acción de la GPx proporciona un electrón de hidrogeno para la reducción de peróxidos en agua (33,34,36,58,59) . En este estudio los animales tratados con BDNF mostraron menor cantidad de GPx posiblemente porque (60); este más que estimular la producción de GSH suprime la cascada de ROS y NO-ROS mediante la activación de los receptores de tirocinasa, como lo observó Lidian et al (61) al estudiar el papel del BDNF como otoprotector en la pérdida auditiva inducida por toxinas. Sin embargo, también pudo ser originado porque los AG que se encontraban dentro de las células, excedieron sus niveles e inactivaron la capacidad de defensa los antioxidantes como lo reporto Gijalba (62) al estudiar los mecanismos celulares y moleculares de la ototoxicidad por kanamicina y cisplatino y otoprotección con vitaminas antioxidantes y magnesio.

Con respecto a la apoptosis observada en todos los grupos de estudio se debió a que la AMK, se adhiere a las membranas celulares y mitocondriales, promueven la generación de ROS y peroxidación lípidica e incrementa la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo una mayor entrada del fármaco a través de las membranas, en donde forman el aldehído 4-HNE que tiene un papel predominante en la apoptosis (10,63,64). Por otro lado, nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito por Arslan et al (10) quienes estudiaron en cobayos los efectos otoprotectores de la inyección intratimpánica de suero autólogo sobre la OTT inducida por AMK y observaron que las células del tejido conjuntivo del limbo espiral son muy susceptibles a la OTT por AMK, así como que las células ganglionares son menos susceptibles a la OTT inducida por este fármaco. Cabe mencionar que

nuestros resultados también concuerdan con lo observado por Avci et al (63), quienes mencionan que las células ciliadas del órgano de Corti y de la estría vascular muestran un mayor número de células apoptóticas cuando se produce OTT por AMK. Un hallazgo interesante de este estudio, es que encontramos un alto grado de apoptosis en las células del ligamento espiral producido por la OTT por AMK, lo cual no ha sido reportado en la literatura.

Por otro lado, nuestros hallazgos mostraron que tanto la administración de NAC por VO como la aplicación tópica sobre la ventana redonda de BDNF no evitan la apoptosis de las estructuras de la cóclea y no coinciden con la observación de que la aplicación de NAC disminuye la presencia de células apoptóticas probablemente porque este fármaco reduce la activación de las moléculas proapoptóticas como la MAPK/JNK, NF- κ B, caspasa y proteína quinasa Src, con lo que evita la apoptosis (65). Nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Somdaş quienes en un modelo de ototoxicidad por gentamicina observaron que el número de células apoptóticas fue significativamente menor en los grupos que recibieron NAC (50). Así mismo, Low et. al. (66) evaluaron los efectos protectores de la NAC sobre la apoptosis inducida por radiación en una línea de células cocleares y observaron un menor porcentaje de células apoptóticas en el órgano de Corti, similar a los resultados de nuestro estudio. Además, observamos que las células del ganglio espiral no presentaron un número significativo de células apoptóticas como lo han reportado en otros estudios (67,68). También en este estudio no se evitó por completo la apoptosis porque esta solo tiene efecto durante los primeros 3-5 días de haber iniciado el tratamiento y su efecto se hace menos evidente entre los 14 y 21 días después de iniciado el tratamiento con este antioxidante (3). Por otra parte,

en este estudio los animales tratados con BDNF mostraron menor porcentaje de células apoptóticas posiblemente la administración tópica de BDNF suprime la cascada de ROS, así como NO-ROS mediante la activación de los receptores de tirosinasa y con esto protege a la cóclea de la pérdida de células ciliadas inducida la ototoxicidad (60,61). Por otro lado, nuestros resultados también coinciden con el reporte de Blakley que menciona que la menor apoptosis de las células ciliadas, también puede deberse a que el BDNF se encuentra sobreexpresado de manera natural en el órgano de Corti (29). De la misma manera, en todos los animales la lesión de las células ganglionares fue similar tanto en los grupos que recibieron tratamiento como en el que no lo recibió, posiblemente porque nuestro estudio solo tuvo una duración de 30 días y en la literatura se ha mencionado que solo en la etapa tardía de la OTT se puede presentar pérdida de estas células ganglionares (69). Además, porque la aplicación exógena de factores neurotróficos en la cóclea de animales sordos rescata las células del ganglio espiral (SGC) de la degeneración y apoptosis (70). Con respecto a la menor apoptosis desarrollada en las células del ligamento espiral tanto en los animales tratados con NAC como con BDNF, no existen estudios en los que se reporten que el uso de estos antioxidantes la reviertan.

CONCLUSION.

El tratamiento simultáneo y posthipoacusia de NAC, así como la aplicación intratimpánica y BDNF no evitan la producción de glutatión peroxidasa, apoptosis de las células cócleares en cobayos con OTT-AMK, , pero si la disminuyen. Tampoco revierten la hipoacusia, ni los cambios histológicos que se producen en la cóclea con OTT.

BIBLIOGRAFÍA

1. Goycoolea M. Introduction and general perspective of sensorineural hearing loss. Rev Med Clin Condes. 2016; 27(6) 721-730. doi:10.1016/j.rmclc.2016.11.002.
2. Collazo Lorduy T, Corzón Pereira T, de Vergas Gutiérrez JJ. Capítulo 32: Oído. Evaluación del paciente con hipoacusia. En Libro Virtual de Formación en ORL. Sociedad Española de Otorrinolaringología. 2022; pp:1-7.
3. García-Alcántara F. Combinación de Resveratrol y N-acetilcisteína como prevención de la hipoacusia inducida por Kanamicina y Furosemida en un modelo experimental de ototoxicidad local en ratas wistar. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá España. 2016.
4. Gulya AJ. Chapter 152: Sensorineural hearing loss in adults. In Flint P, Haughey B, Lund V, Robbins K, Thomas KR, Lesperance M, Francis HW. Cummings Otolaryngology. Head and Neck Surgery, Volume 3. 7th Edition. 2020. pp 2311-2322.
5. World Health Organization. Addressing the rising prevalence of hearing loss. World Health Organization. 2018; 1-27. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260336>.
6. Instituto Nacional de Estadística y geografía e Informatica. Discapacidad. En Censo de Población y Vivienda 2020.
7. CEPAL Stat. Tasa de desocupación en Principales cifras de America Latina y el Caribe. 2020.
8. Kros CJ, Steyger PS. Aminoglycoside- and Cisplatin-Induced Ototoxicity: Mechanisms and Otoprotective Strategies. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019; 9 (11): a033548. doi: 10.1101/cshperspect.a033548.

9. Seddon JA, Hesselring AC, Godfrey-Faussett P, Schaaf HS. High treatment success in children treated for multidrug-resistant tuberculosis: an observational cohort study. *Thorax*. 2014; 69(5):458-64. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203900.
10. Arslan E, Orzan E, Santarelli R. Global problem of drug-induced hearing loss. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 884: 1-14. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb00277.x.
11. Wu J, Ye J, Kong W, Zhang S, Zheng Y. Programmed cell death pathways in hearing loss: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. 2020; 53(11): e12915. doi: 10.1111/cpr.12915.
12. Selimoglu E. Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(1): 119-26. doi: 10.2174/138161207779313731.
13. Javadi MR, Abtahi B, Gholami K, Moghadam BS, Tabarsi P, Salamzadeh J. The Incidence of Amikacin Ototoxicity in Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients. *IJPR*. 2011; 10 (4):905-911.
14. Dulong, D.; Mosnier, I.; Bouccara, D. Ototoxicidad farmacológica. *EMC-Otorrinolaringología*. 2013; 42 (1): 1-13. doi:10.1016/S1632-3475(13)64009-6.
15. Bhattacharyya TK, Dayal VS. Potentiation of cochlear hair cell loss by acoustic stimulus and gentamicin in the guinea pig. *Anat Rec*. 1991; 230(1): 136-45. doi: 10.1002/ar.1092300114.
16. Qian Y, Guan MX. Interaction of aminoglycosides with human mitochondrial 12S rRNA carrying the deafness-associated mutation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(11): 4612-8. doi: 10.1128/AAC.00965-08.
17. Darrouzet J, Guilhaume A. Ototoxicity of kanamycin studied day by day. Experimental electron microscopic study. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 1974; 95:601-21.

18. De Groot JC, Meeuwse n F, Ruizendaal WE, Veldman JE. Ultrastructural localization of gentamicin in the cochlea. *Hear Res* 1990; 50: 35-42.
19. Hiel H, Erre JP, Aurousseau C, Bouali R, Dulon D, Aran JM. Gentamicin uptake by cochlear hair cells precedes hearing impairment during chronic treatment. *Audiology* 1993; 32:78-87.
20. Tabuchi K, Nishimura B, Nakamagoe M, Hayashi, K, Nakayama M, Hara A. Ototoxicity: Mechanisms of Cochlear Impairment and its Prevention. *Current Medicinal Chemistry*. 2011; 18 (31): 4866-4871. doi:10.2174/092986711797535254
21. Crundwell G, Gomersall P, Baguley DM. Ototoxicity (cochleotoxicity) classifications: A review. *Int J Audiol*. 2016; 55(2): 65-74. doi: 10.3109/14992027.2015.1094188.
22. Ganesan P, Schmiedge J, Manchaiah V, Swapna S, Dhandayutham S, Kothandaraman PP. Ototoxicity: A Challenge in Diagnosis and Treatment. *J Audiol Otol* 2018;22(2):59-68. doi:10.7874/jao.2017.00360.
23. American Speech-Language-Hearing Association. Guidelines for the audiologic management of individuals receiving cochleotoxic drug therapy. *ASHA*. 1994; 36 (Supl 12): 11–19.
24. Sass K. Sensibilidad y especificidad de la electrocoqueleografía transtimpánica en la enfermedad de Meniere. *Acta Otorrinolaríngol*. 1998;118(2):150-6. doi: 10.1080/00016489850154838.
25. Jiang M, Karasawa T, Steyger PS. Aminoglycoside-Induced Cochleotoxicity: A Review. *Front Cell Neurosci*. 2017; 11: 308. doi: 10.3389/fncel.2017.00308.

26. Fu X, Wan P, Li P, Wang J, Guo S, Zhang Y. et al. Mechanism and prevention of ototoxicity induced by aminoglycosides. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15: 692762. doi:10.3389/fncel.2021.692762.
27. Hammill TL, Campbell KC. Protection for medication induced hearing loss: the state of the science, *International Journal of Audiology.* 2018; 57: (Sup4) S87-S95. doi: 10.1080/14992027.2018.1455114.
28. Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG. Mecanismos de ototoxicidad de aminoglucósidos y objetivos de protección de las células ciliadas. *Int J Otolaryngol.* 2011;2011:937861. doi: 10.1155/2011/937861
29. Blakley BW, Seaman M, Alenezi A. Brain-derived nerve growth factor in the cochlea a reproducibility study. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;49(1):37. doi:10.1186/s40463-020-00432-7.
30. Prabhu A, Sujatha DI, Kanagarajan N, Vijayalakshmi MA, Ninan B. Efecto de la N-acetilcisteína en la atenuación de la lesión de isquemia-reperfusión en pacientes sometidos a bypass coronario con bypass cardiopulmonar. *Anales de Cirugía Vascul.* 2009; 23 (5): 711-718. doi: 10.1016/j.acvsp.2009.11.006.
31. Sabetghadam M, Mazdeh M, Abolfathi P, Mohammadi Y, Mehrpooya M. Evidence for a Beneficial Effect of Oral N-acetylcysteine on Functional Outcomes and Inflammatory Biomarkers in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2020;16:1265-1278. doi.org/10.2147/NDT.S241497.
32. Pedre B, Barayeu U, Ezeriņa D, Dick TP. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H₂S and sulfane sulfur species. *Pharmacol Ther.* 2021 Dec;228:107916. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107916.

33. López Alonso M, Miranda M, Hernández J, Castillo C, Benedito JL. Glutathione peroxidase (GSH-Px) in ruminants associated to selenium deficiency pathologies. *Arch Med Vet.* 1997; 29 (2): doi.org/10.4067/S0301-732X1997000200001.
34. Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav.* 2014; 4(2):108-22. doi: 10.1002/brb3.208.
35. Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. *Cerebellum.* 2007; 6(4):308-14. doi:10.1080/14734220601142878.
36. Tardiolo G, Bramanti P, Mazzon E. Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2018 Dec 13;23(12):3305. doi: 10.3390/molecules23123305.
37. Abreu-Castañeda WN. Evaluación del efecto de la administración de N-acetilcisteína sobre cambios audiométricos e histológicos en cobayos tratados con dosis elevadas de amikacina. Tesis Especialidad. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, Noviembre 2016.
38. Nuñez-Castruita A, López-Serna N. Neurogénesis ótica. *Rev Mex Neuroci* 2018; 19 (5): 54-63.
39. Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci.* 2015; 11(6):1164-78. doi: 10.5114/aoms.2015.56342.
40. Khalin I, Alyautdin R, Kocherga G, Bakar MA. Entrega dirigida del factor neurotrófico derivado del cerebro para el tratamiento de la ceguera y la sordera. *Int J Nanomedicina.* 2015; 10:3245-67. doi: 10.2147/IJN.

41. Kaplan DR, Miller FD. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9(2): 213-21. doi: 10.1016/s0955-0674(97)80065-8.
42. Estados Unidos Mexicanos. AFÍA. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Diario Oficial de la Federación* 6 dic, 1999.
43. National Institutes of Health U.S.A. Guía Para el Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002.
44. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain.* 2011; 7:55.
45. Lafond JF, Tenneson K, Émond F, Foucault C, Vogel S, Boubekour H. Evaluation of a model of long-term middle ear catheterization for repeat infusion administration and cochlear hair cell injury in guinea pigs. *Toxicol Pathol.* 2020; 48(4):586-592. doi: 10.1177/0192623320916635.
46. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PlosOne.* 2014; 9; 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0096801.e96801.
47. Ito J, Endo T, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F. A new method for drug application to the inner ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2005;67(5):272–275.

48. Havenith S, Versnel H, Agterberg MJ, de Groot JC, Sedee RJ, Grolman W, Klis SF. Spiral ganglion cell survival after round window membrane application of brain-derived neurotrophic factor using gelfoam as carrier. *Hear Res.* 2011 Feb;272(1-2):168-77. doi: 10.1016/j.heares.2010.10.003.
49. Salt AN, Plontke SK. Principles of local drug delivery to the inner ear. *Audiol Neurootol.* 2009;14(6):350-60. doi: 10.1159/000241892.
50. Somdaş MA, Korkmaz F, Gürgen SG, Sagit M, Akçadağ A. N-acetylcysteine prevents Gentamicin ototoxicity in a rat model. *J Int Adv Otol.* 2015; 11:12-8. doi: 10.5152/iao.2015.650.
51. Okur E, Kilinc M, Yildirim I, Kilic MA, Tolun FI. Effect of N-acetylcysteine on carboplatin-induced ototoxicity and nitric oxide levels in a rat model. *Laryngoscope.* 2007; 117: 2183-2186.
52. Lorito G, Hatzopoulos S, Laurell G, Campbell KC, Petruccelli J, Giordano P, Kochanek K, Sliwa L, Martini A, Skarzynski H. Dose-dependent protection on cisplatin-induced ototoxicity - an electrophysiological study on the effect of three antioxidants in the Sprague-Dawley rat animal model. *Med Sci Monit.* 2011; 17: BR179-186.
53. Kalkandelen S, Selimoğlu E, Erdoğan F, Uçüncü H, Altaş E. Comparative cochlear toxicities of streptomycin, gentamicin, amikacin and netilmicin in guinea-pigs. *J Int Med Res.* 2002; 30(4): 406-412. doi: 10.1177/147323000203000407.
54. Lenoir, M., Daudet, N., Humbert, G., Renard, N., Gallego, M., Pujol, R., ... Vago, P. Morphological and molecular changes in a in Repair of Damaged Inner Ear in Rats. *Int J Stem Cells.* 2015 Nov;8(2):146-54. doi: 10.15283/ijsc.2015.8.2.146. PMID: 26634063; PMCID: PMC4651279.

55. Lenoir, M., Daudet, N., Humbert, G., Renard, N., Gallego, M., Pujol, R., ... Vago, P. Morphological and molecular changes in the inner hair cell region of the rat cochlea after amikacin treatment (1999). *Journal of Neurocytology*, 28(10/11), 925–937. doi:10.1023/a:1007034508547
56. Ramkumar V, Mukherjea D, Dhukhwa A, Rybak LP. Oxidative Stress and Inflammation Caused by Cisplatin Ototoxicity. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Nov 29;10(12):1919. doi: 10.3390/antiox10121919.
57. Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav*. 2014; 4(2):108-22. doi: 10.1002/brb3.208.
58. Chen SD, Wu CL, Hwang WC, Yang DI. More Insight into BDNF against Neurodegeneration: Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy. *Int. J. Mol. Sci*. 2017, 18, 545. <https://doi.org/10.3390/ijms18030545>.
59. Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR. Neurotrophic Factors Attenuate Glutamate-Induced Accumulation of Peroxides, Elevation of Intracellular Ca²⁺ Concentration, and Neurotoxicity and Increase Antioxidant Enzyme Activities in Hippocampal Neurons. *J Neurochem*1995; 65:1740–1751. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65041740.x.
60. Hachem LD, Mothe AJ, Tator CH. Effect of BDNF and Other Potential Survival Factors in Models of In Vitro Oxidative Stress on Adult Spinal Cord–Derived Neural Stem/Progenitor Cells *BioResearch Open Access* 2015 4:1, 146-159.
61. Lidian A, Linder B, Anniko M, Nordang L. BDNF as otoprotectant in toxin-induced hearing loss. *Acta Oto-Laryngologica*. 2012; 133 (1): 4-11. doi:10.3109/00016489.2012.712216.

62. Gijalba Casado A. Mecanismos celulares y moleculares de la ototoxicidad por kanamicina y cisplatino y otoprotección con vitaminas antioxidants y magnesio. Tesis Doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha. Castilla, España 2019.
63. Avcı D, Erkan M, Sönmez MF, Kökoğlu K, Güneş MS, Gündoğdu R, Güleç Ş, Karabulut D. A Prospective Experimental Study on the Protective Effect of Resveratrol against Amikacin-Induced Ototoxicity in Rats. *J Int Adv Otol.* 2016 Dec;12(3):290-297. doi: 10.5152/iao.2016.2617.
64. Tabuchi K, Nishimura B, Nakamagoe M, Hayashi, K, Nakayama M, Hara A. Ototoxicity: Mechanisms of Cochlear Impairment and its Prevention. *Current Medicinal Chemistry.* 2011; 18 (31): 4866-4871. doi:10.2174/092986711797535254.
65. Dawit A. Ejigu, Solomon M. Abay, "N-Acetyl Cysteine as an Adjunct in the Treatment of Tuberculosis", *Tuberculosis Research and Treatment*, vol. 2020, Article ID 5907839, 11 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5907839>.
66. Low, W.-K., Sun, L., Tan, M. G. K., Chua, A. W. C., & Wang, D.-Y. (2008). L-N-Acetylcysteine protects against radiation-induced apoptosis in a cochlear cell line. *Acta Oto-Laryngologica*, 128(4), 440–445. doi:10.1080/00016480701762490.
67. Habybabady RH, Mortazavi SB, Khavanin A, Mirzaei R, Arab MR, Mesbahzadeh B, Hoseini M, Mohammadi M. Protective Effects of N-Acetyl-L-Cysteine on the Density of Spiral Ganglion Cells and Histological Changes Induced by Continuous Noise Exposure in Rats. *Malays J Med Sci.* 2018 Sep;25(5):48-58. doi: 10.21315/mjms2018.25.5.5.
68. Wang W, Li D, Ding X, Zhao Q, Chen J, Tian K, et al. N-acetylcysteine protects inner ear hair cells and spiral ganglion neurons from manganese exposure by

regulating ROS levels. *Toxicology Letters*. 2017; 279 (5): 77-86.
doi:10.1016/j.toxlet.2017.07.903.

69. De la Rosa-Galves A, Jáuregi-Renaud K, Hernández-Goribar M. Aminoglucósidos, su efecto ototóxico. *Gac Méd Méx*. 1998; 134 (6): 705-711.

70. Agterberg MJ, Versnel H, van Dijk LM, de Groot JC, Klis SF. Enhanced survival of spiral ganglion cells after cessation of treatment with brain-derived neurotrophic factor in deafened guinea pigs. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2009 Sep;10(3):355-67.
doi: 10.1007/s10162-009-0170-2.