



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
“DR. ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA
ADMINISTRACIÓN DE N ACETIL-CISTEÍNA SOBRE
CAMBIOS AUDIOMÉTRICOS E HISTOLÓGICOS EN
COBAYOS TRATADOS CON DOSIS ELEVADAS DE
AMIKACINA”**

T E S I S

QUE PRESENTA LA:

DRA. WARENKA NABIL ABREU CASTAÑEDA

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

TUTOR DE TESIS:
DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ

ASESORES DE TESIS:
M. EN C. J. RAÚL OLMOS ZUÑIGA
DR. MIGUEL GAXIOLA GAXIOLA

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
“DR. ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE N
ACETIL-CISTEÍNA SOBRE CAMBIOS AUDIOMÉTRICOS E
HISTOLÓGICOS EN COBAYOS TRATADOS CON DOSIS
ELEVADAS DE AMIKACINA”**

DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ GARCÍA
Director de Enseñanza

DRA. MARGARITA FERNÁNDEZ VEGA
Subdirectora de Enseñanza

DRA. MARÍA DEL CARMEN CANO SALAS
Jefa del Departamento de Formación de Posgrado

DR. ARMANDO R. CASTORENA MALDONADO
Profesor titular del curso de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello INER y
Jefe del Departamento de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello INER

DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ
Tutor de Tesis

M. en C. JUAN RAUL OLMOS ZUÑIGA
Asesor de Tesis

DR. MIGUEL GAXIOLA GAXIOLA
Asesor de Tesis

Esta tesis fue realizada en:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, "Ismael Cosío Villegas" (INER).

Investigadores asociados:

M en C Juan Raúl Olmos Zuñiga Investigador en Ciencias Médicas "D"
Departamento de Cirugía Experimental INER

Dr. Rogelio Jasso Victoria Investigador en Ciencias Médicas "D" Departamento de
Cirugía Experimental INER

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

Dra. Lisette Carranco Hernández
Departamento de Audiología

Dra. María Prieto Escobio
Departamento de Audiología

Técnico en Audiología María Gabriela Esquivel González

Médico Veterinario Zootecnista Mariana Silva Martínez

INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Anatomía y fisiología del oído interno	2
Ototoxicidad	4
Aminoglucósidos	5
Química de los aminoglucósidos.....	6
Farmacocinética	6
Efecto posantibiótico de los aminoglucósidos.....	7
Farmacodinamia.....	8
Fisiopatología de la ototoxicidad producida por aminoglucósidos.....	8
Tratamientos para disminuir la ototoxicidad producida por los aminoglucósidos .	10
Emisiones otoacústicas	12
N-acetilcisteína.....	13
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	19
Animales de experimentación	19
Grupos de estudio	21
Tratamiento	21
Evaluación.....	21
RESULTADOS	25

Hallazgos audiométricos	25
Hallazgos microscópicos	32
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46

Evaluación del efecto de la administración de N acetil-cisteína sobre cambios audiométricos e histológicos en cobayos tratados con dosis elevadas de amikacina (AMK).

RESUMEN

INTRODUCCION. La ototoxicidad (OTT) por aminoglucósidos (AMG) es un problema frecuente y se presenta porque estos promueven la liberación de radicales libres oxígeno (RLO), que dañan permanentemente la cóclea. En el INERICV se utilizan en pacientes con tuberculosis y se ha observado hipoacusia asociada a ototoxicidad, por lo que hay que aplicar tratamientos que la disminuyan o eviten. La N acetil-cisteína (NAC) es un agente antioxidante, utilizado para el tratamiento de diversas patologías en las que se liberan RLO; pero su utilidad para evitar la ototoxicidad por AMG no se ha evaluado y se puede pensar que podría ser una alternativa para disminuirla. **OBJETIVO.** Evaluación del efecto de la administración de N acetil-cisteína sobre cambios audiométricos e histológicos en cobayos tratados con dosis elevadas de amikacina (AMK). **MATERIAL Y METODOS.** En 16 cobayos se produjo ototoxicidad con AMK y recibieron el siguiente tratamiento: Grupo I (n=8): OTT por AMK sin tratamiento y Grupo II (n=8): OTT por AMK-NAC. Todos los animales se evaluaron con emisiones otoacústicas por productos de distorsión (EOApd) y por microscopía los cambios cocleares. **RESULTADOS.** Todos los animales mostraron hipoacusia a los 15 días post administración de AMK. Al final del estudio en los 2 grupos se observaron cambios en la integridad de la estría vascular, membrana tectoria, membrana vestibular, pérdida de las células ciliadas externas y ganglionares. **CONCLUSION.** La NAC, no evita la ototoxicidad en cobayos tratados con AMK, ni la pérdida de la audición y cambios en la morfología coclear; sin embargo los animales tratados con esta requieren de menor intensidad de estímulo para generar la emisión otoacústica.

Palabras clave: Ototoxicidad (OTT), Aminoglucósidos (AMG), Amikacina (AMK), emisiones otoacústicas por productos de distorsión (EOApd), cambios microscópicos cocleares.

INTRODUCCIÓN

Anatomía y fisiología del oído interno

El sonido viaja a través del canal auditivo externo y se dirige a la membrana timpánica, y es entonces transmitido, vía la cadena de huesecillos del oído medio, hacia el oído interno en donde los órganos sensitivos residen.

El oído interno contiene seis tipos de epitelio sensitivo separados. Cinco de ellos (2 máculas y 3 crestas) son parte del sistema vestibular, quienes controlan el balance. El epitelio auditivo está localizado en la cóclea.

La cóclea es un tubo curvado, 30 mm de longitud, dividido en 3 conductos paralelos: la escala vestibular, la escala timpánica y la escala media. La escala timpánica y la escala vestibular, están conectados en el ápex coclear, contienen perilinfa, un medio similar al líquido cefalorraquídeo. En la escala media está el epitelio auditivo, comúnmente conocido como órgano de Corti. La escala media contiene endolinfa, un fluido que es rico en iones de potasio K^+ . Como consecuencia, el potencial eléctrico es 80-90 mV más alto que en la perilinfa. Esta diferencia de potenciales eléctricos entre perilinfa y endolinfa es llamado potencial endococlear, y es esencial para la función coclear. En orden de mantener el potencial endococlear, los iones de K^+ , son bombeados hacia la escala media por células de la estría vascular, localizadas en la pared lateral del ducto coclear.

El órgano de Corti es un delgado epitelio compuesto de células sensitivas y de soporte. Las células sensitivas son llamadas células ciliadas, porque éstas tienen un ramillete apical de esterocilios. Hay 3,500 células ciliadas internas organizadas en una sola fila y 12,000 células ciliadas externas distribuidas en tres filas paralelas. Las células ciliadas internas son los receptores sensitivos primarios,

proporcionando entrada aferente al sistema nervioso central. En contraste, las células ciliadas externas, son responsables de la discriminación de frecuencias y amplificación de señal. Las células ciliadas internas y externas están organizadas tonotópicamente, con los extremos basales y apicales de la cóclea detectando y decodificando sonidos en frecuencias altas y bajas, respectivamente.

Los esterocilios de las células ciliadas están conectadas por uniones cortas extracelulares que mantienen la integridad del ramillete y por uniones en la punta que son especializados que conectan las puntas de los esterocilios más cortos al cuerpo de los esterocilios vecinos. La deflexión del sonido inducida de los ramilletes de células ciliadas aumenta o disminuye el estrés en las uniones de la punta y regula la entrada de un pequeño número de canales de iones mecano sensitivo en la membrana esterociliar. Estos canales regulan el potencial eléctrico a través de las membranas plasmáticas de las células ciliadas internas y externas al controlar el flujo de iones K^+ y Ca^{2+} dentro de las células. En las células ciliadas internas, estos cambios eléctricos inducen la liberación de neurotransmisores, iniciando la cascada de señales que proceden a lo largo del nervio auditivo al rombencéfalo y por último a la corteza auditiva por las vías auditivas centrales. En las células ciliadas externas, la membrana plasmática contiene una formación semicristalina de una proteína llamada prestina, quién altera su conformación en respuesta a cambios en el potencial de membrana. Cambios conformacionales simultáneos en cientos de miles de moléculas de prestina conducen a cambios significativos en la longitud de las células (acortamiento y alargamiento) que sigue ciclo por ciclo el estímulo sónico. Los cambios en la longitud de las células ciliadas externas aumenta 100 veces el pico de amplitud de las vibraciones en el órgano

de Corti, aumentando la sensibilidad auditiva de 40-60 dB. Los cambios inducidos eléctricamente en la longitud de las células ciliadas externas se conoce como electromotilidad de las células ciliadas externas, y la amplificación que resulta del movimiento de la partición coclear es conocida como amplificación coclear.

Ototoxicidad

Los aminoglucósidos son antibióticos que por la evolución de los procesos infecciosos y de las bacterias que los ocasionan son usados todavía frecuentemente en la práctica clínica para tratar enfermedades como la tuberculosis, así como las producidas por bacterias aeróbicas gram negativas (endocarditis bacteriana, infecciones del tracto urinario, neumonía). Sin embargo; en países desarrollados el uso de este tipo de fármacos ha disminuido principalmente porque producen ototoxicidad en el 10% de los casos (3,4).

La ototoxicidad es una lesión de la cóclea y/o del vestíbulo provocada por la administración de fármacos o sustancias químicas, lo cual da lugar a la presencia de hipoacusia neurosensorial y alteración del equilibrio (generalmente acompañados de síntomas como acúfeno, vértigo, náuseas y vómitos, alteración del comportamiento, así como alteraciones hematológicas (anemia y trombocitopenia) y de la visión (5). Los aminoglucósidos tienen una toxicidad coclear o vestibular selectiva, dentro de los fármacos cocleotóxicos se encuentran la amikacina, kanamicina y neomicina; mientras que los vestibulotóxicos son la gentamicina, tobramicina y el sulfato de estreptomicina (4,6).

Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos que han sido utilizados por más de 40 años. Su actividad antibacteriana es fundamentalmente contra bacilos gram negativos aerobios y micobacterias.

Efectos adversos

El espectro terapéutico de los aminoglucósidos es muy amplio, sin embargo, debido a su potencial nefrotóxico y ototóxico su uso es limitado. Es importante mencionar que el daño causado por la ototoxicidad es permanente cuando los pacientes son nefrópatas.

La incidencia de estas reacciones adversas, está directamente relacionada con la dosis diaria y la duración del tratamiento. Se ha descrito una relación entre el tiempo de duración de la administración del medicamento (mayor de 2 semanas) y la aparición de ototoxicidad. También se ha mencionado que la administración conjunta de ácido etacrínico, furosemide, vancomicina o anfotericina B aumenta el riesgo de ototoxicidad.

Se ha observado que tanto la ototoxicidad, nefrotoxicidad y el bloqueo de la placa neuromuscular están relacionados con la edad avanzada del paciente, tiempo de duración de la administración (< 60 min), vía de administración IV, así como el intervalo de tiempo entre las dosis (< 24 h), principalmente en pacientes con daño renal o hepático subyacente, o que reciben agentes que potencian los efectos tóxicos del aminoglucósido, tales como anfotericina B, furosemide, clindamicina, vancomicina, quimioterapia y agentes de contraste radiográficos, entre otros (7).

Química de los aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son producidos por los actinomicetos (bacterias) de *Streptomyces* ssp (tobramicina, kanamicina, metilmicina etc) y *Mycromonospora* ssp (amikacina, gentamicina, estreptomina, neomicina, etc.). Estos son compuestos que contienen un azúcar aminado ligado a un anillo aminociclitol por enlaces glucosídicos. Todos son policationes y sus propiedades farmacocinéticas dependen en gran parte de su polaridad. Su estructura molecular no se altera por congelamiento ni por calentamiento a 100°C por más de cuatro horas o cambios en el pH de la solución de 3 a 12 por varias horas. Su actividad óptima es a un pH de 6 a 8.3; sin embargo su actividad antimicrobiana se favorece en medios con pH alcalino y se reduce en medios con pH ácido, que son factores comunes en los sitios de infección (como pueden ser los abscesos).

Farmacocinética

Los aminoglucósidos se absorben rápidamente por vía intramuscular o subcutánea. Por vía intravenosa deben administrarse en infusiones que duren de 30 a 60 minutos hasta completar la administración total de la dosis, debido a que el aumento súbito de la concentración plasmática del aminoglucósido incrementa el riesgo de bloqueo de la placa neuromuscular. Al ser administrados por esta vía, el pico máximo de concentración se obtiene aproximadamente 30 minutos después del fin de la infusión.

En condiciones fisiológicas normales, tienen baja actividad en líquido cefalorraquídeo, compartimentos oculares y próstata, así como en los líquidos

pleural y sinovial. Sólo atraviesan la barrera hematoencefálica, si las meninges se encuentran inflamadas.

La administración de una monodosis diaria intravenosa de gentamicina es igualmente efectiva y menos nefrotóxica que la administración de tres dosis del mismo medicamento por la misma vía. No hay diferencia significativa en la producción de ototoxicidad entre los dos regímenes. Todos los aminoglucósidos tienen una vida media prolongada y se han encontrado en orina de 48-200 horas después de suspender un régimen de dosis múltiples, aún cuando en suero los niveles son indetectables. Se excretan en un 98% por filtración glomerular, 1% por secreción tubular y < 1% en heces y saliva. A pesar de ser poco absorbidos por vía oral o rectal (< 1%), en pacientes con falla renal pueden acumularse y alcanzar niveles tóxicos en sangre.

Efecto posantibiótico (EPA) de los aminoglucósidos

Es el periodo de supresión del crecimiento bacteriano después de interrumpir la exposición a concentraciones del aminoglucósido por encima de la concentración mínima inhibitoria. Su actividad es dosis dependiente, es decir, mientras mayor sea la concentración del aminoglucósido, será más prolongado el efecto posantibiótico. El EPA de los aminoglucósidos permite que éstos sean administrados una sola ocasión cada 24 horas sin perder efectividad antimicrobiana, lo cual disminuye su toxicidad, principalmente sobre las células renales.

Farmacodinamia

Los aminoglucósidos son bactericidas rápidos que actúan directamente sobre el RNA mensajero (mRNA) y los ribosomas. Su manera de actuar es inhibiendo la síntesis proteica bacteriana, al bloquear directamente las subunidades 30S y 50S de los ribosomas e interferir con la unión del mRNA bacteriano. Esto ocasiona fallas en la lectura del código genético y una síntesis proteica anormal y/o disminuida.

Los aminoglucósidos, también alteran la integridad de la membrana citoplasmática bacteriana. Al unirse a los lipopolisacáridos y desplazar el Mg^{2+} y el Ca^{2+} ligados a ellos, forman huecos en la pared celular que provocan alteraciones en el gradiente electroquímico, lo cual conduce a un debilitamiento de la bacteria. Mientras mayor sea el potencial eléctrico transmembrana, mayor será el efecto antimicrobiano de los aminoglucósidos. Se interiorizan en la célula por medio de transporte activo llamado Fase Dependiente de Energía-I (DEP-I). En el citosol, la unión con las subunidades ribosomales se lleva a cabo, nuevamente, por un proceso dependiente de energía llamado Fase Dependiente de Energía-II (DEP-II).

Fisiopatología de la ototoxicidad producida por aminoglucósidos

La vida media de los aminoglucósidos es cinco veces mayor en los líquidos óticos (endolinfa y perilinfa) que en plasma.

Bioquímicamente la ototoxicidad se produce porque los aminoglucósidos al llegar al oído interno generan especies reactivas de oxígeno (radicales libres). La molécula del aminoglucósido no es tóxica por sí sola, pero para producir

ototoxicidad requiere del efecto redox de un ión metálico de transición. La generación de estos radicales libres involucra la formación de un complejo aminoglucósido-hierro que cataliza su producción de ácidos grasos no saturados, promueve la muerte celular apoptótica y necrótica. Otra vía de señalización activada por los aminoglucósidos es a través de la producción de radicales libres mediante la c-Jun N-terminal cinasa (JNK), la cual es una vía que contribuye a la muerte celular programada, apoptosis. De acuerdo con esto, se puede decir que los aminoglucósidos en las células cocleares provocan muerte de las células ciliadas externas en el órgano de Corti y células ciliadas sensitivas tipo I en el órgano vestibular, ocasionando pérdida permanente de las células ciliadas y daño vestibular, (cabe mencionar que las células ciliadas cocleares no se regeneran). Este daño progresa de la base de la cóclea (área en donde se detectan altas frecuencias) hacia el ápex (área en donde se detectan bajas frecuencias), posteriormente hay daño retrógrado al nervio auditivo. El grado de daño celular es directamente proporcional a la dosis del medicamento al que se hayan expuesto las células. La exposición repetida conduce a un daño adicional a estas células, estructuras adyacentes que tiene como resultado la pérdida auditiva. El daño es más significativo en gente de mayor edad debido al menor número de células y al menor número de mecanismos protectores (8).

La incidencia está directamente relacionada con la dosis diaria y la duración del tratamiento. Se ha descrito una relación entre el tiempo de duración de la administración del medicamento (mayor de 2 semanas) y la aparición de ototoxicidad.

La administración conjunta de ácido etacrínico, furosemide, vancomicina o amfotericina B aumenta el riesgo de ototoxicidad.

La ototoxicidad, la nefrotoxicidad y el bloqueo de la placa neuromuscular son los principales efectos adversos de los aminoglucósidos. (7).

Tratamientos para disminuir la ototoxicidad producida por los aminoglucósidos.

Debido a que los aminoglucósidos reaccionan con el hierro y generan radicales libres, para disminuir la ototoxicidad se han utilizado fármacos quelantes como deferoxamina y dihidroxibenzoato para reducir la disponibilidad del hierro, los cuales no interfieren con la eficacia terapéutica de estos antibióticos. También se ha intentado la administración de ácido lipoico, d-metionina, salicilatos y dihidroxibenzoato, aspirina o salicilato de sodio, antagonista de receptores NMDA o neurotrofinas y antagonista de la megalina. Sin embargo ninguno de estos medicamentos ha tenido el éxito deseado por lo que hay que buscar otras drogas que eviten o disminuyan la ototoxicidad producida por los aminoglucósidos (8,9). En la tabla 1 se muestran los principales fármacos utilizados para disminuir la ototoxicidad y su mecanismo de acción.

Medicamentos contra la ototoxicidad	
Sustancia	Mecanismo de acción
Deferoxamina	Quelante de hierro, agente anti radicales libres
Dihidroxibenzoato	Disminuye la disponibilidad del hierro, agente anti radicales libres
Ácido alfa lipoico	Agente anti radicales libres
D-metionina	Aminoácido con propiedades quelantes y antioxidantes
Salicilatos	Agente anti radicales libres
Antagonistas de megalina (receptor endocítico que se expresa predominantemente en células tubulares renales proximales y células sensitivas cocleares).	Antagoniza acción de la megalina
Antagonistas de receptores de NMDA	Antagoniza acción de receptores NMDA
Neurotrofinas	Agente anti radicales libres

Tabla 1. Muestra los medicamentos contra la ototoxicidad y su mecanismo de acción.

Emisiones Otoacústicas

La actividad de las células ciliadas externas puede ser detectada por la prueba de emisiones otoacústicas (EOA) (1), las cuáles pueden ser transientes (EOAt) o por productos de distorsión (EOApd). Estas EOA corresponden a respuestas sonoras generadas por las células ciliadas externas (CCE) del oído en forma espontánea o provocada, pudiendo ser registradas a través de un micrófono ubicado a nivel del conducto auditivo externo (CAE). Un tipo de EOAs provocadas se denominan por producto de distorsión (pd) las cuáles se obtienen en respuesta al presentar dos tonos diferentes (f_1 y f_2 o tonos primarios) en forma simultánea.

Las EOApd corresponden a las distorsiones resultantes del comportamiento no lineal de la cóclea, es una medición simultánea a la presentación de dos tonos puros designados como f_1 y f_2 , en donde siempre $f_1 < f_2$, con intensidades designadas como L_1 y L_2 , respectivamente. La amplitud de los productos de distorsión varía individualmente, sin embargo, la amplitud típica de producto de distorsión reportada para adultos va en el rango de 45 a 75 dB bajo el nivel de equivalencia de los tonos primarios. El registro y obtención de EOApd se relaciona con un umbral auditivo mejor o igual a 50-55 dB HL junto con indemnidad de oído medio y externo. Diversos parámetros técnicos son críticos cuando se registran los productos de distorsión, dentro de éstos se encuentran la frecuencia, relación de frecuencia, nivel de estímulo, y diferencia en el nivel de estímulo. Junto con la relación de frecuencia, es necesaria la diferencia de intensidad de los dos tonos primarios (L_1/L_2), pues también afecta la amplitud (2).

N-acetilcisteína (NAC)

La N-acetil cisteína (NAC) ha sido usada en la práctica clínica por varias décadas como agente mucolítico en el tratamiento de diversos desórdenes como: la intoxicación por paracetamol, cardiotoxicidad inducida por doxorubicina, angina de pecho estable, lesión cardíaca inducida por isquemia-reperfusión, síndrome de distrés respiratorio agudo, bronquitis, toxicidad inducida por quimioterapia, VIH/SIDA, nefropatía inducida por contraste, toxicidad por metales pesados, desórdenes psiquiátricos incluyendo esquizofrenia, desorden bipolar y adicción.

La NAC, es el precursor acetilado del aminoácido L-cisteína y puede administrarse por vía intravenosa, oral o inhalada. Tiene baja toxicidad y está asociada con efectos secundarios leves como náusea, vómito, rinorrea, prurito y taquicardia. La vida media después de la aplicación IV es de 5.6 h, en donde 30% del medicamento es excretado vía renal. En baja biodisponibilidad (<5%) está asociada con su N-deacetilación en la mucosa intestinal y metabolismo de primer contacto en el hígado. El plasma es un medio pro oxidante y por lo tanto las reacciones de intercambio redox entre NAC, las proteínas cistina y cisteína en el plasma producen NAC-cisteína, NAC-NAC y cisteína, el cual puede cruzar la membrana celular epitelial y sostener la síntesis de glutatión (GSH), que es un recurso del grupo tiol en el cuerpo que actúa como antioxidante y está involucrado en numerosos procesos fisiológicos como la detoxificación de xenobióticos electrofílicos, modulación del efecto redox regulando la señal de transducción, regulación de la respuesta inmune, metabolismo de prostaglandinas y leucotrienos, defensa antioxidante, señalización de neurotransmisores y

modulación de proliferación celular. La síntesis de glutatión es regulada a varios niveles y se asocia con la presencia de NAC.

Bioquímica de la NAC

Es un derivado de la cisteína con un grupo acetilo unido a su átomo de nitrógeno y como la mayoría de tioles, puede ser oxidado por una gran variedad de radicales y puede servir como un nucleófilo (donador de un par de electrones). NAC actúa rápidamente con OH, NO₂, CO₃ y radicales tiol, quienes eventualmente conducen a la formación de O₂.

NAC como antioxidante.

La administración de agentes antioxidante exógenos tiene como fin disminuir el estrés oxidativo mediante el bloqueo de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) o sus precursores. También actúan uniéndose a los iones metálicos activos-redox involucrados en la catálisis de la generación de ROS y RNS y sobre regulación de defensas endógenas antioxidantes. La NAC actúa como antioxidante debido a que interactúa en varias vías metabólicas (Figura 1), como la regulación del ciclo celular y la apoptosis, carcinogénesis y progresión de tumores, mutagénesis, transducción de señales y expresión de genes, modulación inmune y funciones mitocondriales.

Efecto de la NAC sobre la regulación del ciclo celular y apoptosis

NAC modula los niveles de varios genes blanco y/o proteínas, debido a que su administración disminuye significativamente los niveles de O_2 , e inhibe las vías apoptóticas. Además protege contra la apoptosis inducida por peroxinitrito, modulando los niveles de O_2 y H_2O_2 , y para alcanzar la protección contra la apoptosis inducida por cocaína realiza una sobrerregulación de enzimas antioxidantes como manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD), Cu/Zn-SOD, glutatión peroxidasa y catalasa. El efecto anti-apoptótico de NAC está relacionado con cambios en varios genes/proteínas, tales como un aumento en la expresión de c-jun y c-fos; y la modulación de los niveles de proteínas del ciclo celular como p53, retinoblastoma y la ciclina dependiente de la cinasa inhibidora de p21. Hay evidencia que ha mostrado que la modulación de apoptosis alcanzada por NAC depende del tipo celular y la especificidad del estímulo.

Posibles rutas de las actividades biológicas de NAC

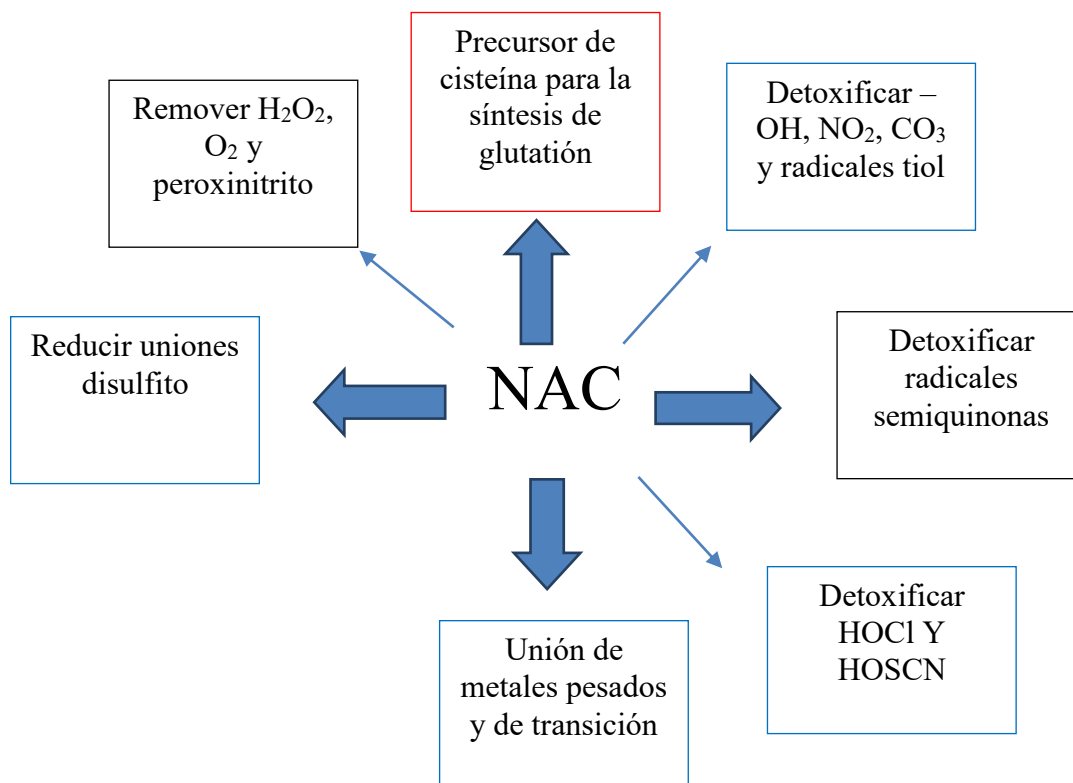


Figura 1. Muestra las rutas posibles de acción de la NAC. Rojo: mayores rutas, Azul: rutas posibles y Negro: rutas insignificantes bajo condiciones fisiológicas Tomada de Samuni Y The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine (10).

En resumen se puede decir que la NAC es un precursor de la L-cisteína y proveedor de grupos sulfhídrico, que posee actividad antioxidante, la cual está dada tanto por efectos directos mediante la estimulación de la vía del glutatión y por la formación de puentes disulfuro (al oxidarse los grupos sulfhídrico), los cuáles actúan reduciendo la producción de radicales libres de oxígeno como el peróxido

de hidrógeno, anión hidroxilo y el ácido hipocloroso. En varios reportes de estudios en modelos experimentales in vitro e in vivo, así como clínicos se ha observado que la administración sistémica de este fármaco tiene actividad inhibitoria sobre las reacciones moleculares y celulares asociados con procesos de oxidorreducción. Estos efectos antioxidantes parecen eficaces tanto en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática como en aquellos con intoxicación con paracetamol y pacientes con cirugía cardíaca.

Además se ha descrito que por su metabolismo, la administración de la NAC vía oral produce mayores niveles de glutatión sistémicos que por vía intravenosa y no inhibe la acción de los antibióticos (11-15).

Con base en lo anterior se puede pensar que la administración vía oral de N-acetil cisteína puede disminuir la producción de radicales libres de O_2 y la ototoxicidad producida por el tratamiento con amikacina.

JUSTIFICACIÓN

La hipoacusia asociada a ototoxicidad por aminoglucósidos como la amikacina es un problema común en los pacientes con tuberculosis multidrogorresistente (MDR) que son tratados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas y es un problema de salud que tiene un rango variable de expresión clínica que va desde incapacidad leve casi indetectable hasta una alteración profunda en la habilidad para desarrollarse en las actividades de la vida diaria o incluso puede llegar a ser incapacitante (que lo llegue a marginar de la sociedad). En 2013 según el Consejo Nacional de la Población se presentaron 21,381 casos de tuberculosis en todas sus formas. En la literatura se ha reportado que el 26%

de estos pacientes sufren de ototoxicidad producida por los aminoglucósidos, los cuales promueven la liberación de radicales libres oxígeno que dañan las estructuras cocleares, producen daño vestibular e hipoacusia. Para tratar de evitarla o disminuirla se han utilizado diversos fármacos pero ninguno ha tenido el éxito deseado; es por lo que en este trabajo se propone utilizar la N- acetil cisteína como antioxidante para evitar la liberación de estos radicales libres de oxígeno y evitar o disminuir la ototoxicidad producida por la amikacina.

HIPÓTESIS.

La N acetil-cisteína es un fármaco antioxidante, entonces la administración de ésta en cobayos a los que se les administraron dosis elevadas de amikacina evitará la presencia de ototoxicidad.

HIPÓTESIS NULA

La administración de N acetil-cisteína en cobayos tratados con dosis elevadas de amikacina no tiene efecto en la modulación de la ototoxicidad.

HIPÓTESIS ALTERNA

La administración de N acetil-cisteína en cobayos tratados con dosis elevadas de amikacina disminuye la ototoxicidad.

OBJETIVO GENERAL

Evaluación del efecto de la administración de N acetil-cisteína sobre cambios audiométricos e histológicos en cobayos tratados con dosis elevadas de amikacina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar los cambios en las emisiones otoacústicas por productos de distorsión para determinar ototoxicidad coclear en cobayos tratados con AMK-NAC.

Evaluar los cambios histológicos de cobayos con ototoxicidad coclear tratados con NAC inducida con AMK.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se realizó un estudio experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo.

Animales de experimentación

Descripción de la población de estudio

Se utilizaron 16 cobayos de raza Dunkin-Harley, clínicamente sanos, sin importar sexo, ni edad, con un peso entre 100-200 g. 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 (16) y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (17). Al finalizar el estudio se tomaron los oídos de 3 animales que habían cumplido con su vida reproductiva y

fueron sometidos a eutanasia, los cuáles se utilizaron como controles sanos (éstos animales se manejaron bajo las mismas normas).

Tamaño de la muestra

La muestra fue calculada para una población finita con un intervalo de confianza del 95% y mediante la ley de Russell.

Criterios de inclusión. Se incluyeron cobayos SPF (libres de patógenos específicos) producidos en el bioterio del INER-ICV, 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 ototoxicidad.

Criterios de terminación. Aquellos animales que hayan mostrado signos de dolor agudo o crónico, de acuerdo a lo descrito por The Rat Grimace Scale (18) y que no disminuyera con la aplicación de medicamentos, serán 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 amikacina (AMK) a dosis de 50 mg/Kg de peso durante 15 días (tiempo suficiente para que se produjera la ototoxicidad) y se les aplicó el tratamiento de la siguiente forma:

Grupo I (n=8): Ototoxicidad con AMK sin tratamiento.

Grupo II (n=8): Ototoxicidad con AMK tratados con NAC vía oral a dosis de 600 mg/kg/24 horas durante 4 semanas.

Tratamiento

La NAC se aplicó diariamente en el agua de bebida a dosis de 600 mg/kg/24 horas durante 4 semanas.

Evaluación

El estudio tuvo duración de 6 semanas posteriores a la aplicación del tratamiento y se evaluaron clínica, audiométrica e histológicamente.

Clínica

A todos los animales se les evaluó la presencia de respuesta al estímulo auditivo, así como la presencia de signos vestibulares de ototoxicidad.

Audiométrica

En ambos grupos sin anestesia se llevó a cabo la medición de emisiones otoacústicas de ambos oídos por productos de distorsión utilizando la prueba de

ototoxicidad con frecuencias que fueron del rango de 1.5 a 10 kHz, para poder valorar los rangos normales de audición que presentaron estos animales y posteriormente se les aplicó el medicamento ototóxico durante 2 semanas. Se realizaron 4 mediciones de EOApd, las cuáles se llevaron a cabo previo a la administración de la AMK, a las 2 semanas postaplicación del medicamento ototóxico y cada semana hasta concluir el tiempo de estudio.

Para realizar este estudio los cobayos fueron envueltos en un campo quirúrgico no estéril, posteriormente se le colocaron en ambos oídos los tapones auditivos pediátricos del equipo Biologic Navigator Pro (Natus Biologic Otoacoustic Emissions de Scout Sport, San Carlos Cal, USA) con un Software basado en Windows® (Scout SPORT, Natus Biologic Otoacoustic Emissions de Scout Sport, San Carlos Cal, USA), (el cual se calibra cada 6 meses) y se registró el resultado de las emisiones (Figura 2). Una vez colocados los tapones auditivos, la valoración de las EOApd se realizó utilizando dos estímulos de tonos puros, F1 y F2, con una relación de $f_1:f_2$ de 1:2 y con niveles de intensidad de los dos tonos (L1 y L2) de 50-70 db, los cuáles fueron establecidos automáticamente por el equipo, de acuerdo a las dimensiones del conducto auditivo externo de cada animal, eran de aproximadamente 70 dB SPL. Las mediciones se realizaron con una amplitud de 1.5-10 kHz de las EOApd y los productos de la distorsión se representaron de acuerdo a los db observados por medición en conjunto y en cada oído, así como las intensidades de L1 y L2 (19).

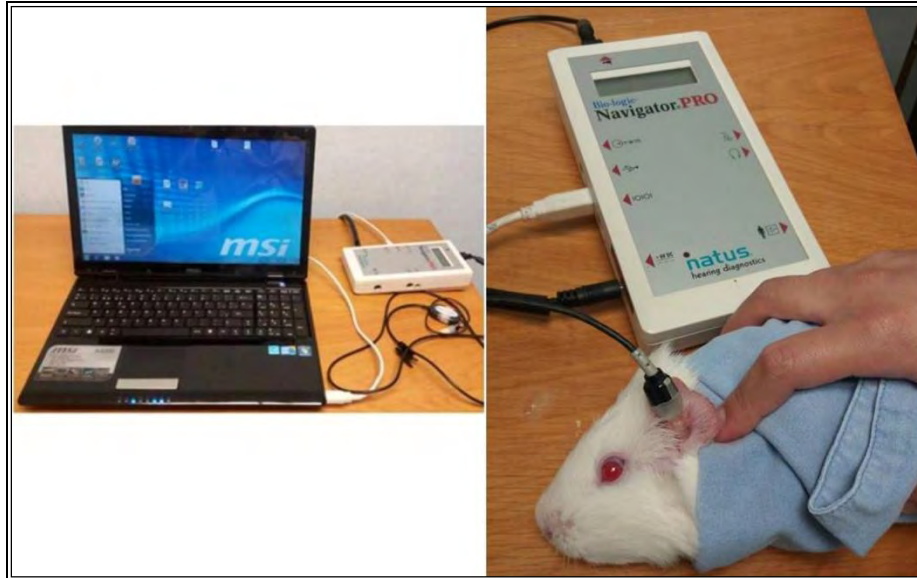


Figura 2. Muestra el equipo utilizado para la realización de las EOApd y la colocación de tapones auditivos pediátricos al cobayo.

Histológica

Concluido el tiempo de estudio los animales se sometieron 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% y posteriormente se descalcificaron con una solución de ácido fórmico (CH_2O_2) al 5% y ácido clorhídrico (HCl) al 5% durante 72 horas, posteriormente se retiraron las cócleas de esa solución, a las cuáles se les realizaron cortes de 3 micras, se 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 consideró como un sí y la falta de cualquier segmento como no), mientras que la pérdida de la células ciliadas externas se evaluó de acuerdo a una escala semicuantitativa en la que cada parámetro evaluado recibió un porcentaje de acuerdo a la severidad de los cambios histológicos (0-10% ausente, 11-25% leve, 26-50% moderado, 51-100% severo).

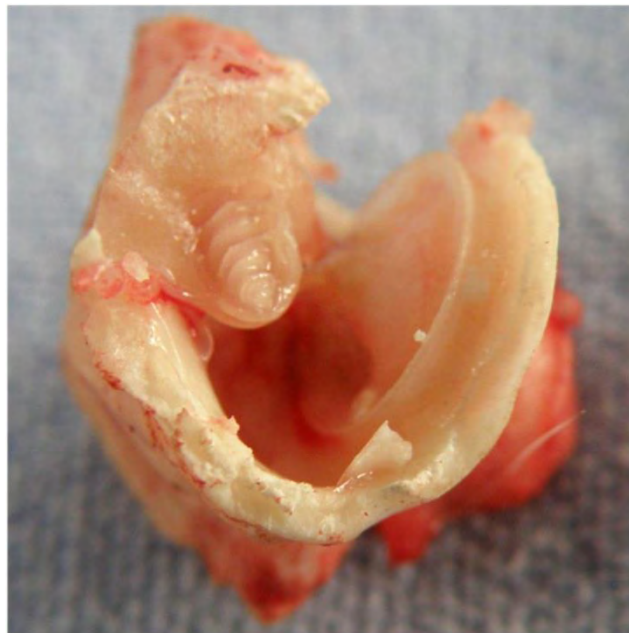


Figura 3. Muestra la manera en la que fue tomada la cóclea para el estudio histológico.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los hallazgos audiométricos se llevó a cabo con la prueba de t student, ANDEVA, Dunnett y Tukey; mientras que para los hallazgos histológicos se realizó mediante Kruskal Wallis. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron como significativos.

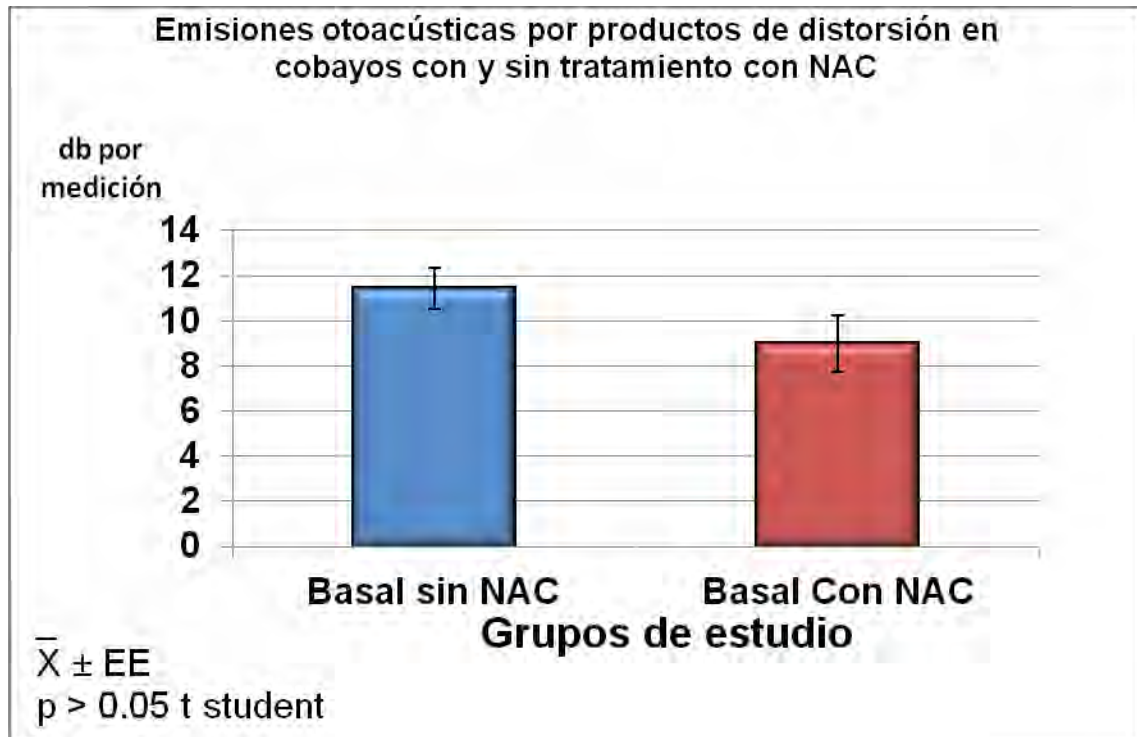
RESULTADOS

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

Hallazgos audiométricos

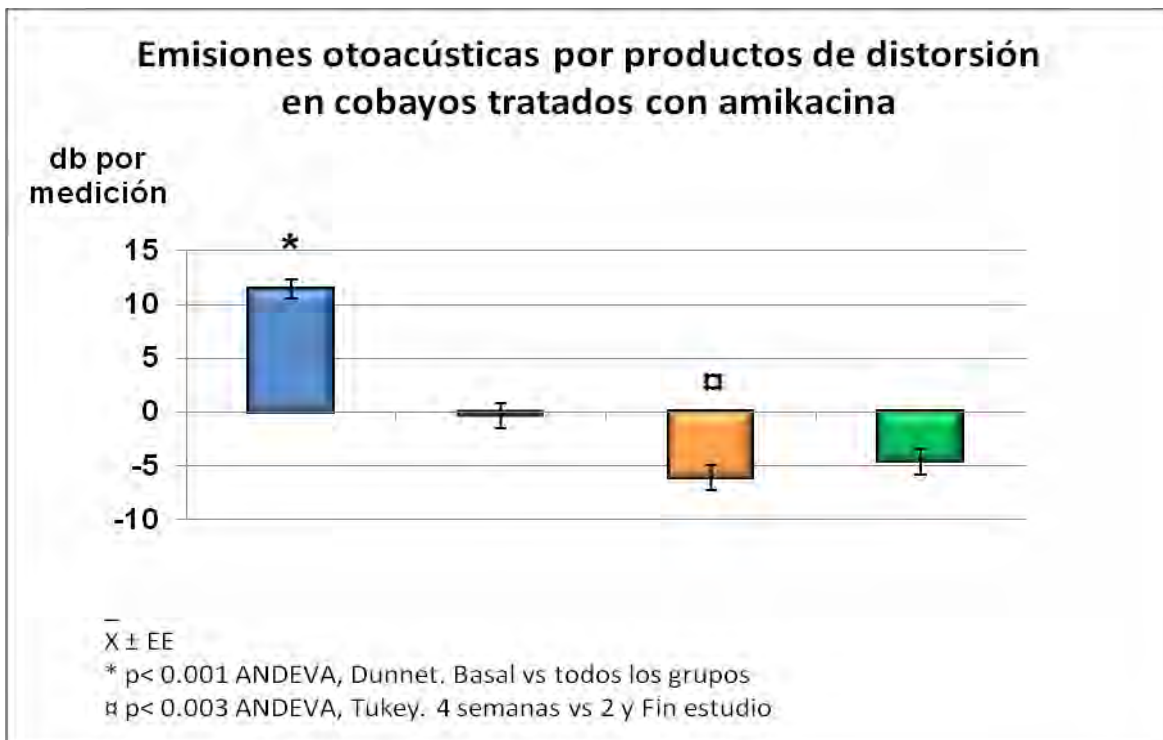
Los valores basales de las EOApd en ambos grupos fueron mayor a 8 dB lo que demuestra que en ambos grupos la audición de todos los cobayos era normal al iniciar el estudio. Aunque se observa que los cobayos del grupo I tenían mejor audición que los cobayos del grupo II.

Al comparar los valores basales entre grupos, no se observaron diferencias significativas (Gráfica 1).

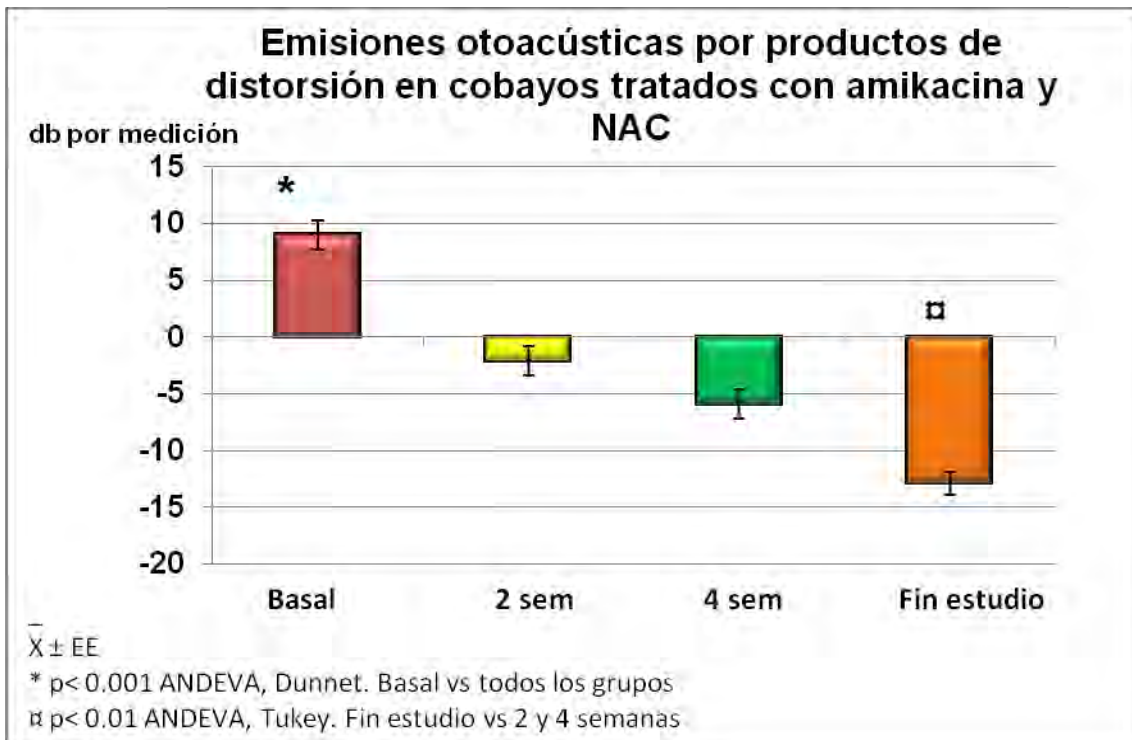


Gráfica 1. Valores basales de audición de grupo I (Basal sin NAC) y grupo II (Basal con NAC).

Al comparar los valores EOApd obtenidos en el grupo I, se observó que estos disminuyen a partir de la segunda semana de haber aplicado el tratamiento con AMK en comparación con sus valores basales (* $p < 0.001$ ANDEVA, Dunnett) y siguen descendiendo hasta finalizar (* $p < 0.001$ ANDEVA, Dunnett); sin embargo la disminución observada a las 4 semanas fue mayor que la de los otros tiempos (α $p < 0.003$ ANDEVA, Tukey) (Gráfica 2). Mientras que en el grupo II, a los 15 días post administración de AMK los animales mostraron hipoacusia vs sus valores basales (Gráfica 3) (* $p < 0.001$ ANDEVA, Dunnett), la cual siguió evolucionando hasta el final del estudio (* $p < 0.001$ ANDEVA, Dunnett), pero la disminución observada al final del estudio fue significativamente mayor que a los 2, 4 y 6 semanas postratamiento (respectivamente) (α $p < 0.01$, ANDEVA, Tukey) (Gráfica 3).



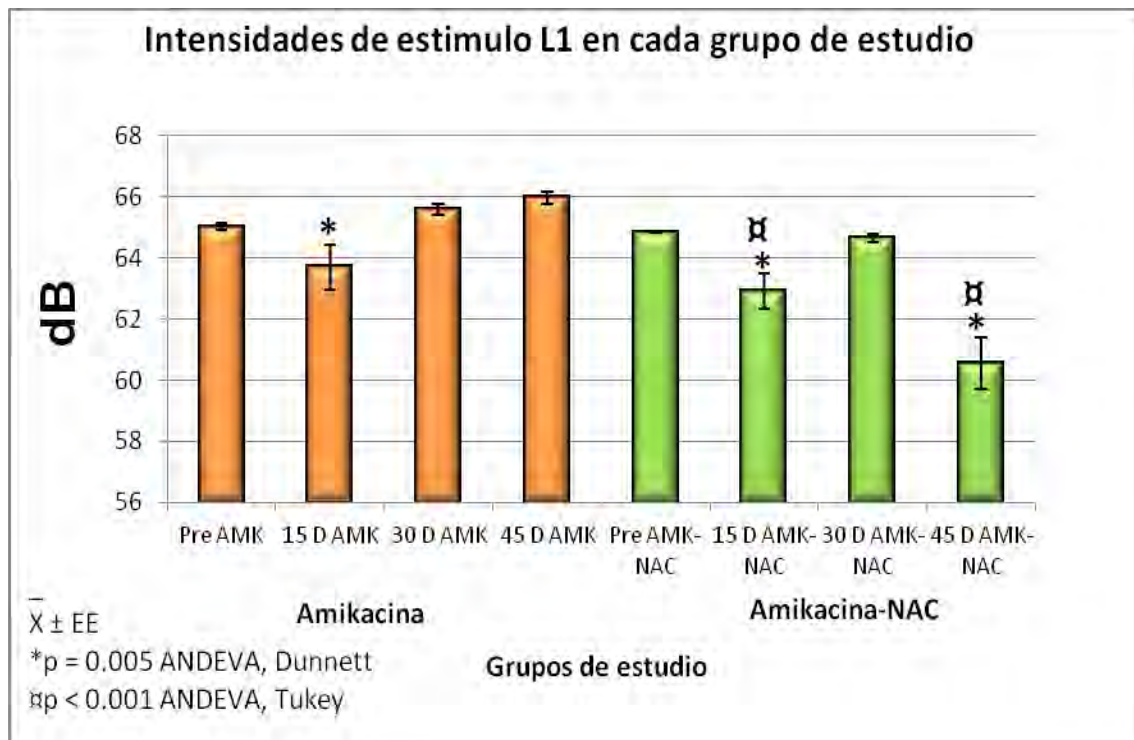
Gráfica 2. Valores de audición en grupo I. Tratados con AMK.



Grafica 3. Valores de audición en grupo II, tratados con AMK Y NAC.

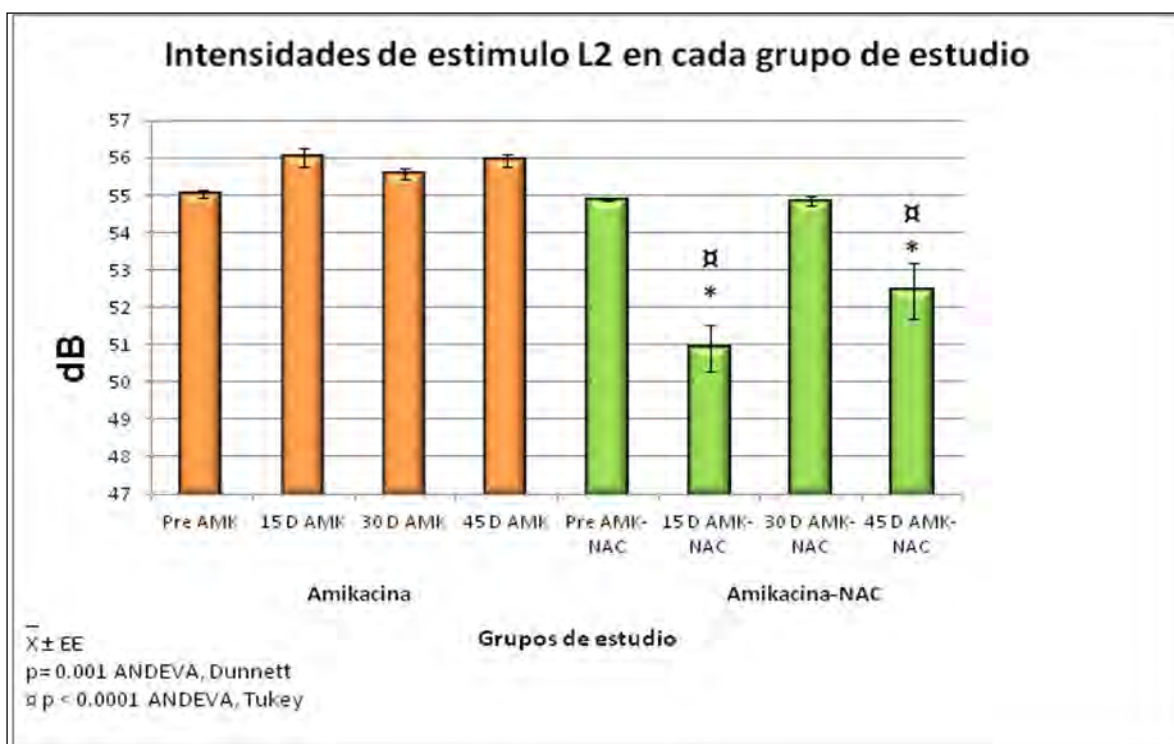
Al valorar los db medidos por EOApd presentados por ambos grupos de estudio posterior a la administración de amikacina, se observó que estos disminuyen en comparación con sus valores basales (* $p < 0.001$ ANDEVA Dunnett) (Gráfica 1). Al comparar entre grupos todas las mediciones del grupo II mostraron mayor disminución que los del grupo I, pero solo las de la 6ta semana post AMK y NAC fueron significativas vs los valores mostrados a los 15 días por el grupo I ($p < 0.001$ ANDEVA, Tukey) (Gráfica 2 y 3).

Al comparar la intensidad de estímulo L1 requerida en los animales estudiados, se observó que en el grupo I, los animales requirieron menor intensidad de estímulo a los 15 días de haberse administrado la AMK vs sus basales (*p = 0.005 ANDEVA, Dunnett); mientras que el grupo II necesitó menos estímulo a los 15 y 45 días del estudio vs sus basales (*p = 0.005 ANDEVA, Dunnett). Al comparar entre grupos se observó que a los 15 y 45 días se requirió un menor estímulo en el grupo II en comparación con los valores obtenidos pretratamiento con AMK a los 30 y 45 días del grupo I, estos valores fueron significativos en comparación con todos los valores del grupo I ($\alpha p < 0.001$ ANDEVA, Tukey) (Gráfica 4).



Gráfica 4. Muestra el menor estímulo L1 requerido por los animales del grupo II.

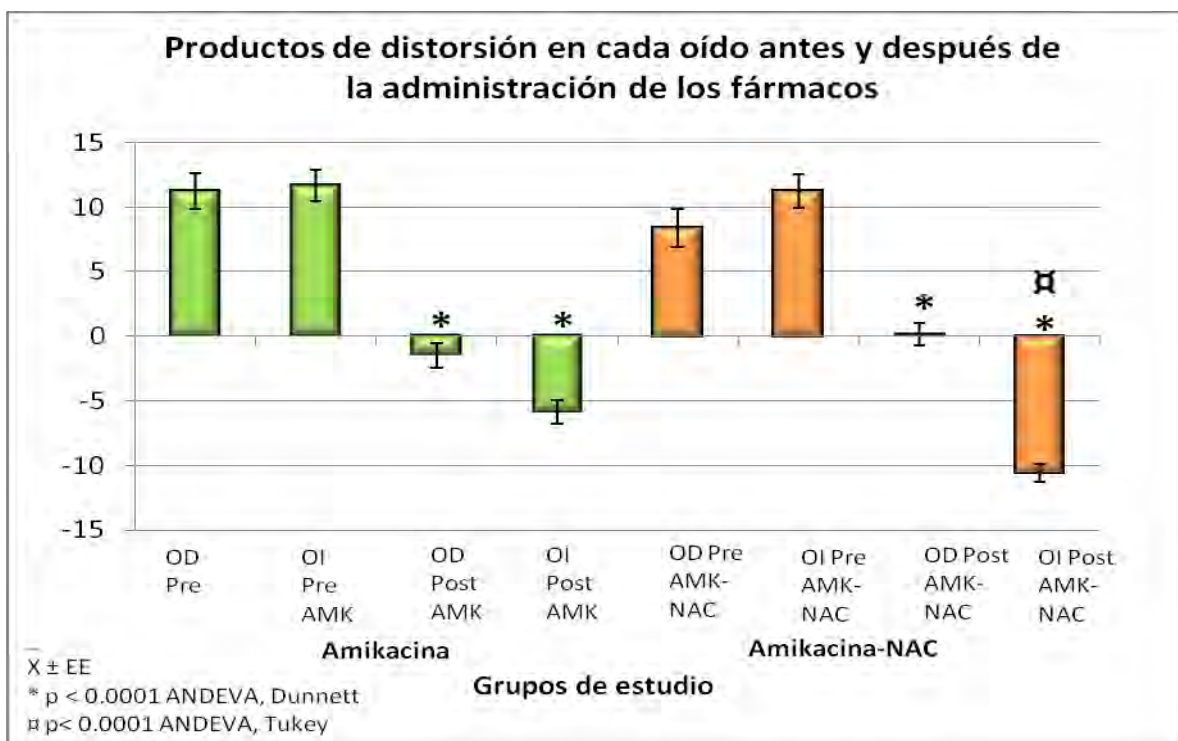
Con respecto a la valoración del L2, al comparar dentro de cada grupo se observó que la intensidad de este estímulo en el grupo I no mostró ninguna diferencia. Mientras que los observados en el grupo II a los 15 y 45 días de la administración de la AMK-NAC fue menor en comparación con sus valores basales (*p= 0.001 ANDEVA, Dunnett) (Gráfica 5). Al comparar entre grupos, estos mismos valores observados a los 15 y 45 días postratamiento fueron muy bajos en comparación con los observados en el grupo I (α p < 0.0001 ANDEVA, Tukey) (Gráfica 6).



Gráfica 5. Se observa la menor intensidad requerida por los animales del grupo II durante el estudio.

En el grupo I el nivel de audición basal fue similar en ambos oídos, sin embargo después de la administración de la AMK esta disminuyó significativamente (p <

0.001 ANDEVA, Dunnett) (Gráfica 6). En el grupo II la audición basal fue menor en el oído derecho sin embargo no fue significativo, pero al compararla con los valores postratamiento, se observó que la disminución en la audición mostrada por el OI fue mayor que la observada en todos los valores de su mismo grupo (*p < =.001 ANDEVA, Dunnett) (Gráfica 6) y los del grupo I (α p < =.001 ANDEVA, Tukey) (Gráfica 6).



Grafica 6. Muestra el mayor deterioro auditivo en el OI postratamiento del grupo de AMK-NAC.

Hallazgos microscópicos

La evaluación microscópica reveló que en las muestras de los controles sanos se observaron normales (Figura 4); sin embargo en los 2 grupos de estudio se

observó pérdida de la continuidad de la estría vascular ($p < 0.005$ Kruskal Wallis, vs sanos) (Gráfica 8) (Figura 5 y 6). Al comparar la integridad de la membrana tectoria, ésta se encontró adelgazada en los 2 grupos de estudio vs los sanos ($p < 0.005$ Kruskal Wallis) (Gráfica 9), así mismo se observó pérdida de la membrana vestibular (Gráfica 10) (Figura 5 y 6), pérdida severa de la células ciliadas externas (Gráfica 11) y disminución de la densidad de las células ganglionares espirales (Figura 5 y 6) (Gráfica 12). Todos estos cambios observados mostraron diferencia significativa vs los oídos sanos ($p < 0.005$ Kruskal wallis). Además un animal del grupo I, mostró una degeneración hialina de la membrana tectoria.

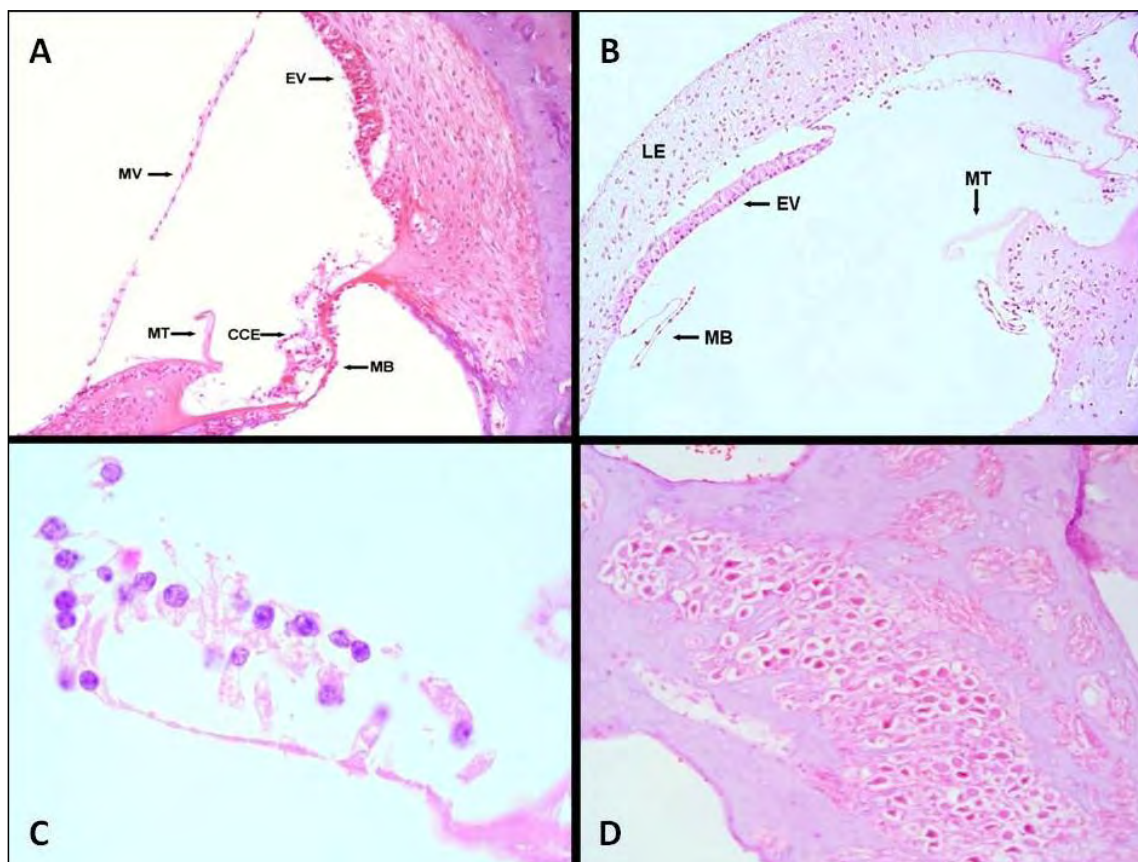


Figura 4. Fotomicrografías que muestran la arquitectura normal de la cóclea: A y B) (MV) membrana vestibular, (EV) estría vascular, (MT) membrana tectoria, (MB)

membrana basilar y (LE) ligamento espiral. H-e 20X. C) Células ciliadas externas H-e 100x, y D) Células ganglionares espirales H-e 20X.

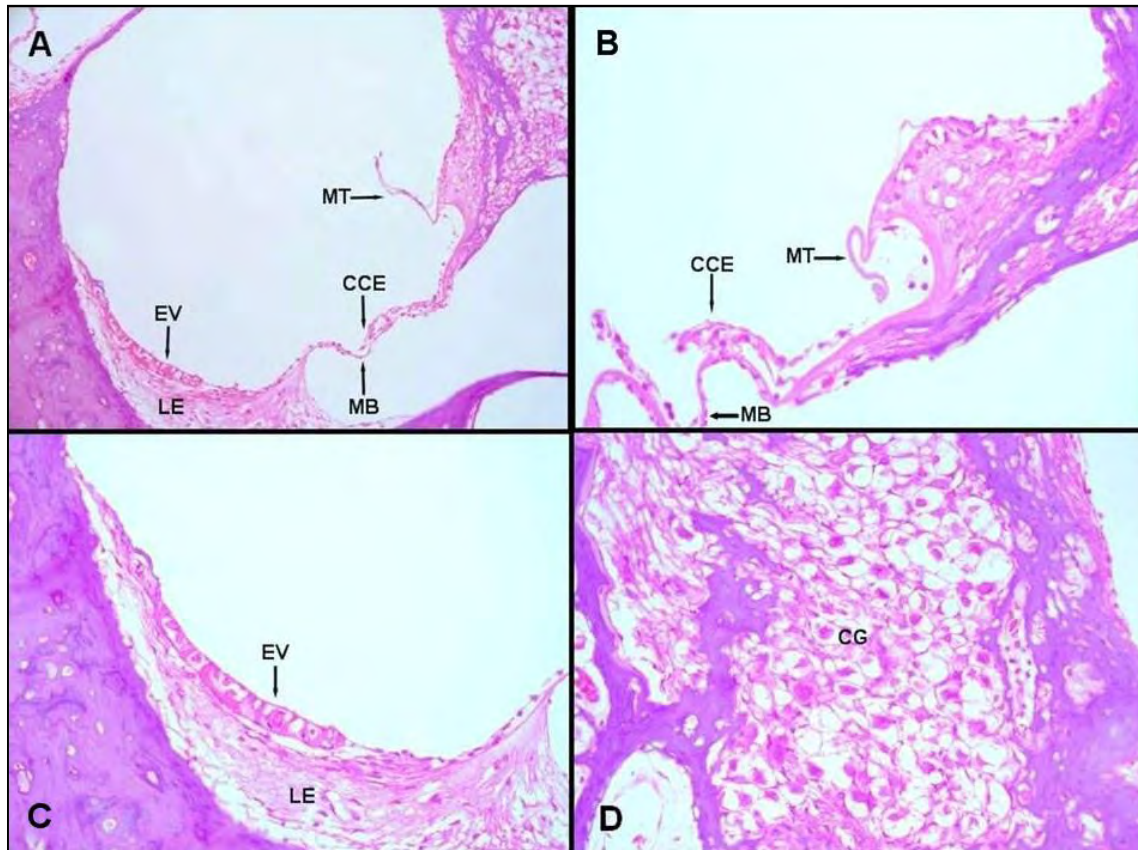


Figura 5. Fotomicrografías que muestran A y B) (MT) adelgazamiento de la membrana tectoria, (CCE) disminución en la cantidad de células ciliadas y (EV) pérdida de la continuidad de la estría vascular. H-e 20x y 40 x. C) (EV) pérdida de la continuidad de la estría vascular y ligamento espiral. . H-e 40X. D) (CG) atrofia de las células ganglionares. H-e 40X.

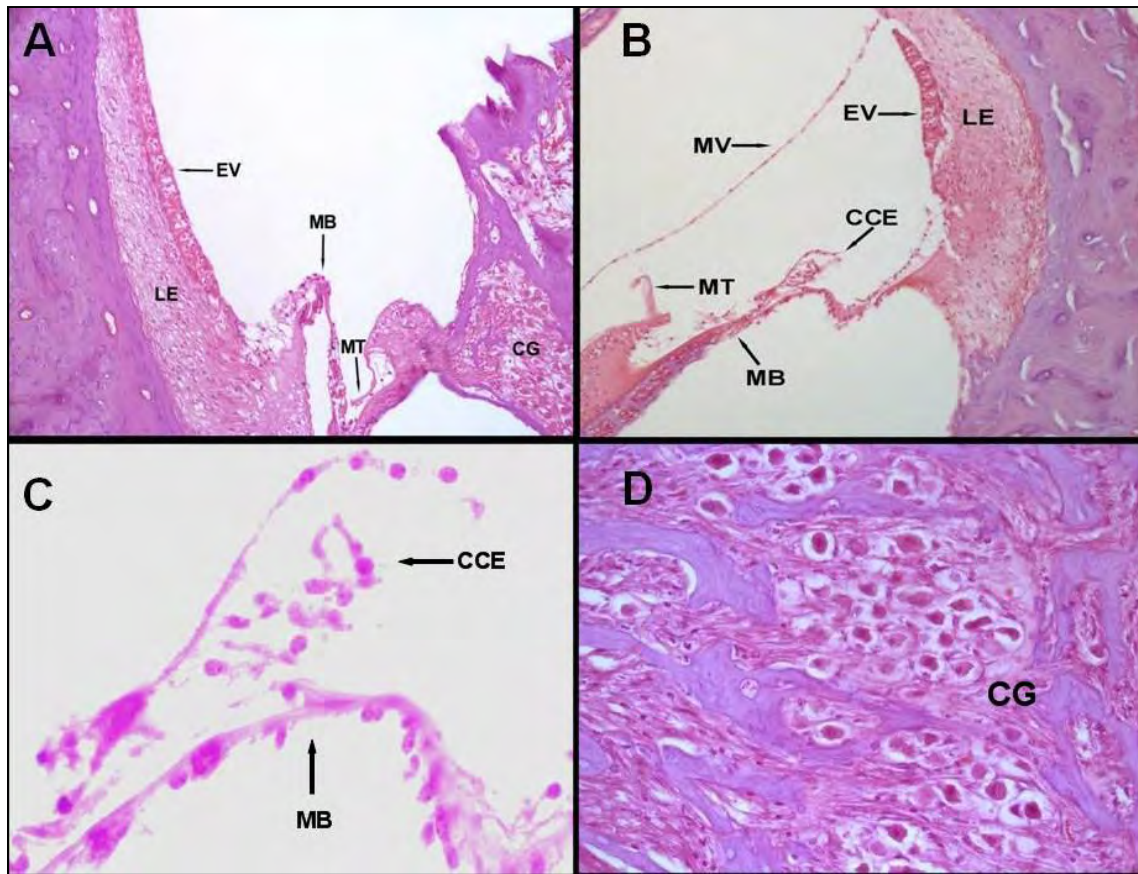
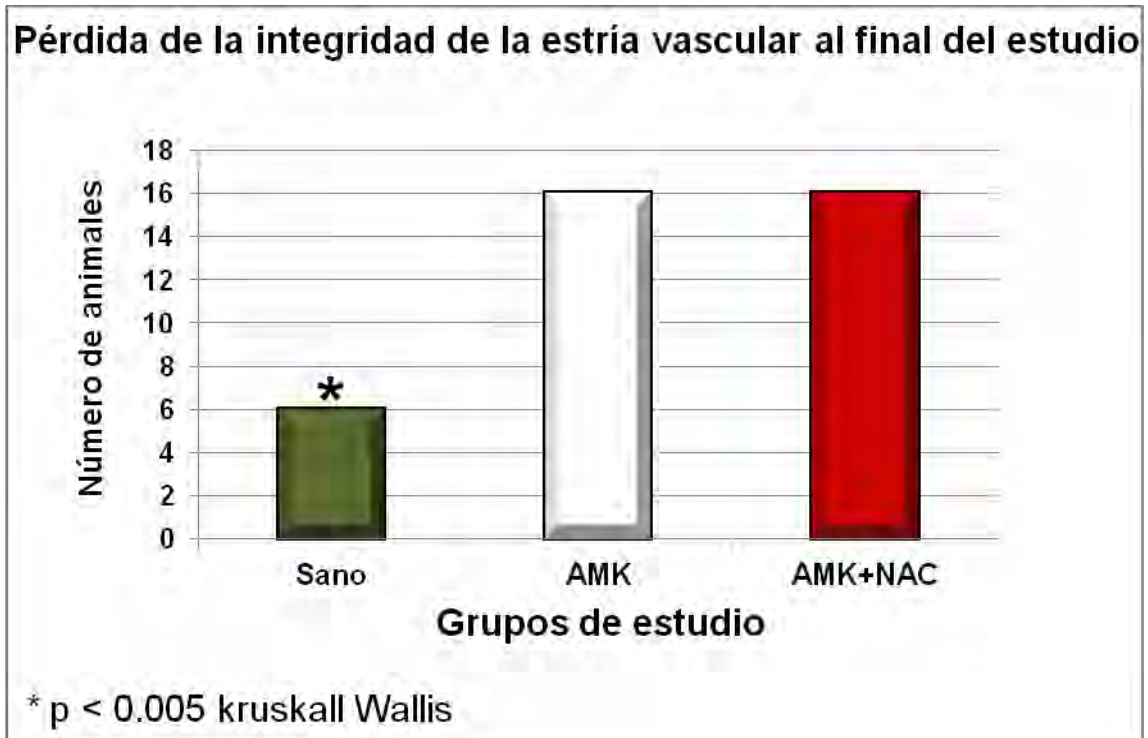
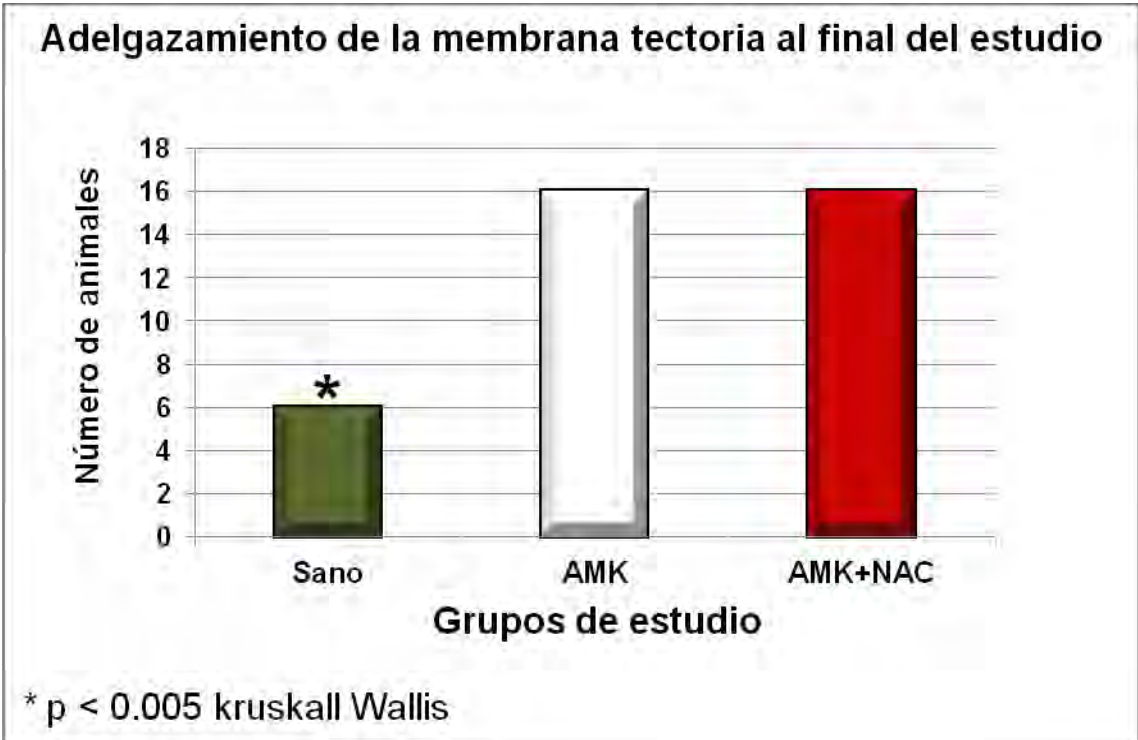


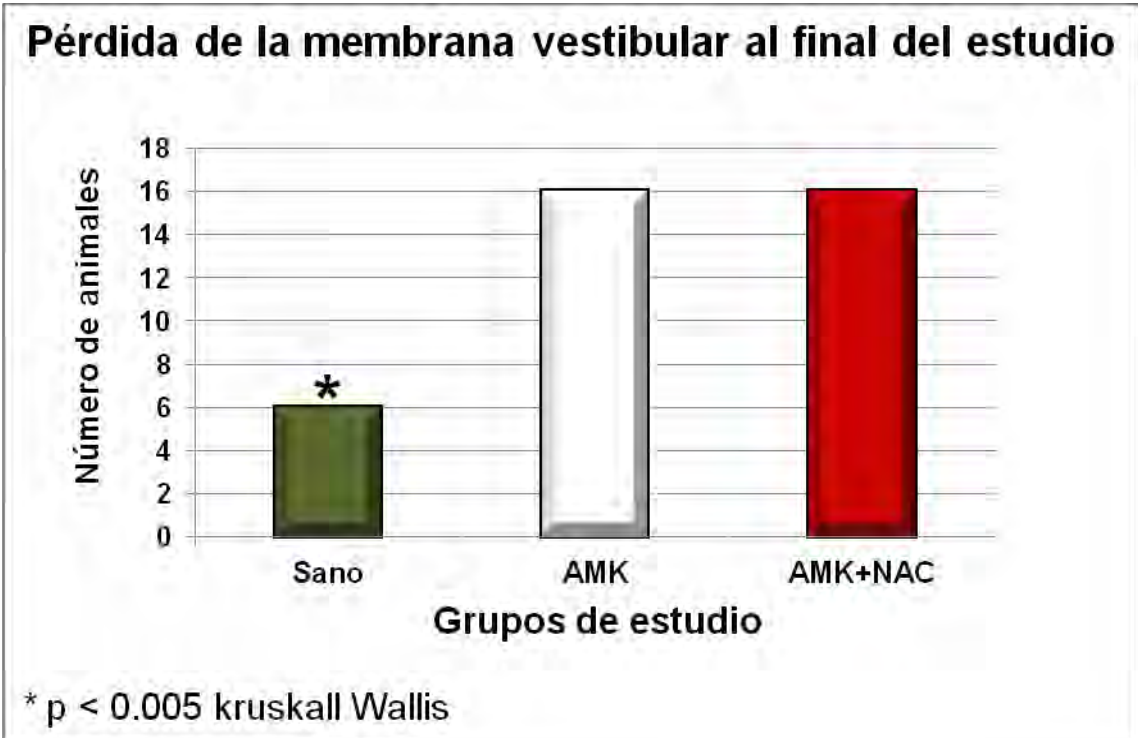
Figura 6. Fotomicrografías que muestran A y B) (MT) adelgazamiento de la membrana tectoria, (CCE) disminución en la cantidad de células ciliadas y (EV) pérdida de la continuidad de la estría vascular. H-e 20x y 10 x. C) (CCE) disminución en la cantidad de células ciliadas. H-e 100X. D) (CG) atrofia de las células ganglionares. H-e 40X.



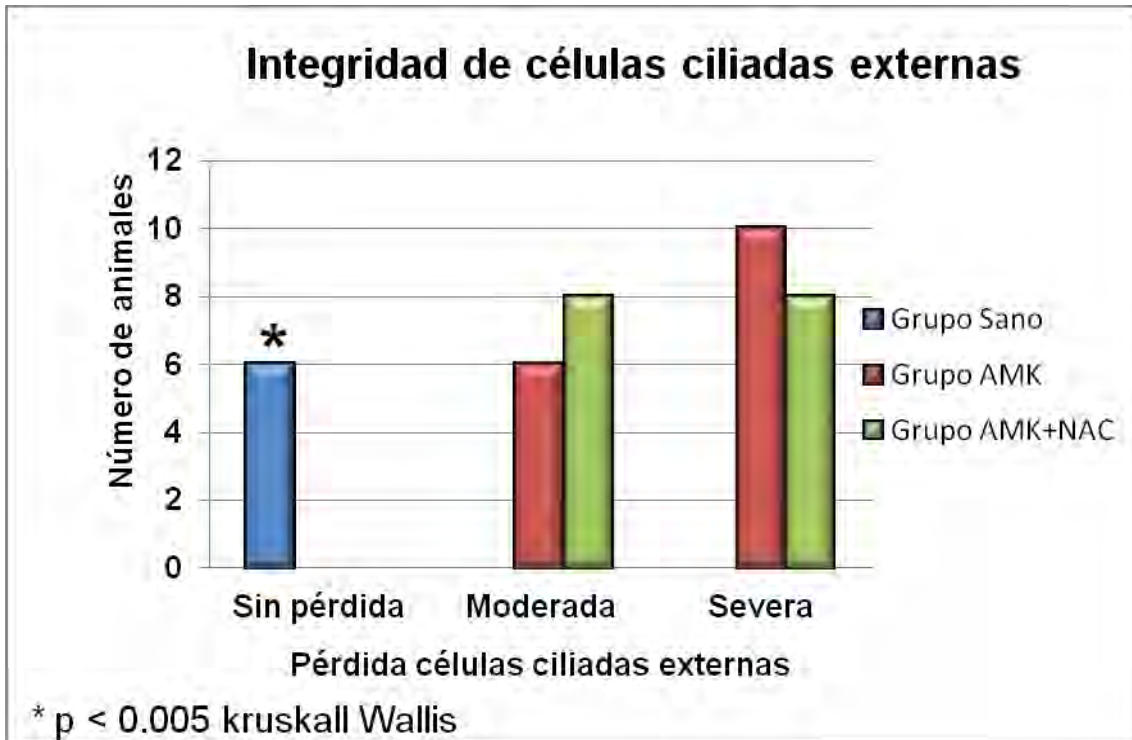
Gráfica 8. Muestra el mayor deterioro de la estría vascular en los tratados con AMK y AMK-NAC en ambos oídos.



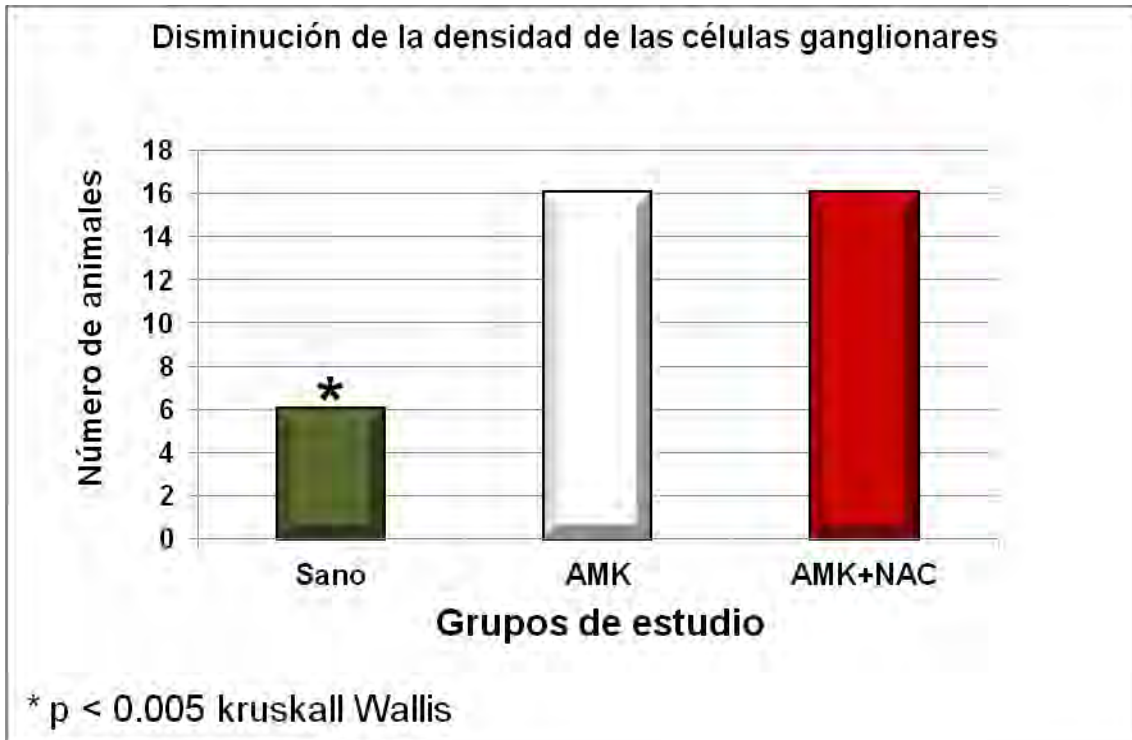
Gráfica 9. Se observa el mayor adelgazamiento de la membrana tectoria en los 2 grupos sometidos a tratamiento en ambos oídos.



Gráfica 10. Número de animales que presentaron pérdida de la membrana vestibular.



Grafica 11. Muestra la mayor cantidad de pérdida de las células ciliadas externas en los grupos que recibieron AMK.



Gráfica 12. Muestra la mayor cantidad de disminución de la densidad de las células ganglionares espirales los grupos que recibieron AMK y AMK+NAC.

DISCUSIÓN

Los aminoglucósidos causan ototoxicidad y pérdida auditiva en ambos oídos, la cual es imposible de recuperar una vez que se presentó. La exposición al antibiótico atenúa primero los sonidos de los tonos más altos y después los sonidos de tonos más bajos (20). Con el uso de estos se ha reportado la pérdida de audición en el 33% de los casos y vestibulopatía en el 15% (20-22).

La amikacina al igual que la gentamicina son antibióticos que producen ototoxicidad y pérdida permanente de la audición (21). Sin embargo, en países en desarrollo como México por su bajo costo y disponibilidad, todavía se utilizan para tratar enfermedades como la tuberculosis, así como las producidas por bacterias

aeróbicas gram negativas (3,4). Estos fármacos ejercen sus efectos ototóxicos principalmente a nivel de la cóclea, vestíbulo y la estría vascular. Dentro de estos medicamentos, los que afectan a la cóclea son la dihidroestreptomicina, kanamicina, neomicina, amikacina, cisplatino, netilmicina y salicilatos. Las que afectan al vestíbulo son la estreptomicina, gentamicina y sisomicina y las que afectan la estría vascular son los diuréticos de asa y el cisplatino (23). Todos estos fármacos provocan un exceso en la producción de radicales libres de oxígeno, inflamación, apoptosis, necrosis y la muerte de las células ciliadas externas en el órgano de Corti y células ciliadas sensitivas tipo I en el órgano vestibular, ocasionando pérdida permanente de las células ciliadas y daño vestibular, (cabe mencionar que las células ciliadas cocleares no se regeneran) (8).

En la literatura se han reportado varios estudios experimentales y clínicos, en los que se ha intentado encontrar un mecanismo para proteger el oído interno de la ototoxicidad ocasionada por ciertos fármacos, pero no se ha encontrado el ideal ya que no evitan la pérdida de la audición ocasionada por estas drogas (23). La NAC actúa como antioxidante y se ha utilizado para el tratamiento de patologías pulmonares, intoxicación por paracetamol y para evitar el daño por isquemia reperusión durante la cirugía cardiovascular ocasionadas por la liberación de radicales libres de O_2 ; sin embargo su utilidad para disminuir o evitar la ototoxicidad por aminoglucósidos no se ha evaluado; por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la administración de la N acetil-cisteína para evitar la ototoxicidad coclear en cobayos.

En este estudio se utilizó al cobayo como modelo experimental, debido a que este es un animal que ha sido utilizado para estudios audiológicos experimentales,

porque las dimensiones de su membrana timpánica y del oído medio son grandes, por lo que es relativamente fácil acceder por el oído externo al oído medio o al oído interno con mínima pérdida de sangre y baja mortalidad. Además las características auditivas e histológicas son similares a las del humano (24).

Con respecto a la dosis utilizada de AMK, en este estudio se observó que con dosis de 50 mg/kg aplicados diariamente vía IM durante 15 días y es tres veces la dosis aplicada en niños, se produce hipoacusia severa la cual es progresiva e irreversible. Sin embargo, estos hallazgos no concuerdan con lo observado por Parravicini L. et al quiénes compararon la ototoxicidad producida por la amikacina, gentamicina, netilmicina y tobramicina en cobayos y observaron que se requerían de 150 mg de esta para producir ototoxicidad (25).

En este estudio las EOApd fueron similares en ambos grupos durante todas las fases evaluadas, en primer lugar porque la AMK ocasionó un daño similar en ambos grupos y porque la NAC no tuvo ningún efecto otoprotector posiblemente porque las dosis altas AMK evitaron que la NAC ejerciera su efecto antioxidante y bloqueara la cascada de producción especies reactivas de oxígeno y la apoptosis de las células de la cóclea (26). Estos hallazgos no concuerdan con lo observado por Somdas et al (21) quiénes evaluaron la utilidad de la NAC para prevenir la ototoxicidad ocasionada por la gentamicina y observaron que los animales que recibieron tratamiento con NAC mantuvieron sus EOApd dentro de parámetros similares a los normales, en comparación con los que no recibieron tratamiento. Nuestros hallazgos tampoco concuerdan con lo observado por Kocyigit et al que también evaluaron el efecto protector de la NAC en pacientes con diálisis peritoneal que recibían como antibioterapia AMK y observaron que ésta si protege

la función coclear debido a que dichos pacientes al ser sometidos a estudios de EOApd conservaron las frecuencias altas (27). Lo observado en este estudio tampoco coincide con lo observado en un estudio experimental en el que se utilizó la aplicación vía transtimpánica de NAC para prevenir la ototoxicidad ocasionada por el cisplatino y al realizar la EOApd encontraron la aplicación tópica del antioxidante conserva moderadamente la audición (28). Por otro lado, nuestros hallazgos tampoco concuerdan con lo observado en pacientes con hemodiálisis que fueron tratados con aminoglucósidos y con aminoglicosidos con NAC y observaron que los tratados con NAC mostraron mayor audición a los tonos de alta frecuencia (29). En nuestro estudio, la NAC no evitó la hipoacusia en el grupo tratado con AMK, posiblemente porque la dosis fue insuficiente, ya que en otros estudios que ha utilizado dosis más altas por diferentes vías y se han observado buenos resultados (27,30,31).

Por otro lado, las diferencias de respuesta de las EOApd ante diferentes intensidades de frecuencia se debe al comportamiento lineal y no lineal de la cóclea, es decir, a la percepción de las diferentes frecuencias en diferentes niveles de la misma (tonotopiedad de la cóclea) (2). En este estudio los cambios en la amplitud de EOApd requirieron menor intensidad de los tonos primarios en el grupo II, posiblemente porque aunque hubo daño coclear, la NAC tuvo alguna tendencia a modular la ototoxicidad y favorecer la audición; sin embargo esto no se ha descrito en la literatura. Nuestros hallazgos concuerdan con lo observado por Somdaş et al (21) quienes en ratas midieron las EOApd después de la aplicación de gentamicina y tratamiento con NAC para evitar la ototoxicidad, observaron que con o sin tratamiento estas disminuyen. Los resultados de este

estudio también coinciden con los observado por Okur et al (32) quienes evaluaron el efecto de la NAC sobre el grado de ototoxicidad producido por el carboplatino en ratas y observaron que las EOApd disminuyen severamente con y sin tratamiento. Lo observado en este estudio también coincide con lo descrito por otros autores que evaluaron el efecto de diferentes dosis de 3 antioxidantes como protectores de la ototoxicidad producida por el cisplatino en ratas y observaron que los animales que recibieron dosis altas de metionina requieren de menor intensidad de estímulo, que los tratados con NAC (33).

En relación a la degeneración en todas las estructuras de la estría vascular observada en este estudio, algunos autores han descrito que los aminoglucósidos producen degeneración en todas las estructuras de la estría vascular y se caracteriza por disminución de los vasos sanguíneos, así como disminución o pérdida de sus tres tipos celulares por vacuolización (34), lo cual coincide con lo observado en nuestros animales. Los resultados de este trabajo también se relacionan con lo observado por Forge et al (35), quienes en cobayos observaron adelgazamiento y atrofia de la estría vascular después de la administración crónica de gentamicina. Nuestros hallazgos no coinciden con lo observado por Hirose et al (36) quienes compararon en ratones el daño que produce la aplicación intraperitoneal de Kanamicina, así como el de la mezcla de kanamicina-furosemida y observaron que la kanamicina por sí sola no produce daños en la estría vascular y ligamento espiral.

Con respecto a pérdida de las células ciliadas externas y disminución de la densidad de las células ganglionares espirales observadas en este estudio, en la literatura se ha descrito que durante la ototoxicidad con aminoglucósidos tanto en

animales como en humanos, las primeras células que se dañan son las células ciliadas (34), así mismo concuerda con lo descrito por ellos, ya que se correlaciona con la degeneración de la estría vascular. Nuestros hallazgos también concuerdan con lo observado por Hinojosa et al (37), quienes valoraron el daño producido en las células ciliadas y las células del ganglio espiral de dos pacientes con ototoxicidad producida por gentamicina y tobramicina, y observaron que estos aminoglucósidos provocan degeneración de la cóclea con disminución de las células ciliadas externas y disminución de la densidad de las células ganglionares espirales. Los resultados de este estudio también concuerdan con lo reportado por Versnel et al (38), quienes administraron kanamicina combinado con furosemida en cobayos para producir ototoxicidad y observaron que el órgano de Corti se colapsó, hubo pérdida de las células ciliadas internas y externas, disminución progresiva de las células ganglionares espirales, así como de la cantidad de fibras nerviosas en la lámina espiral ósea. Así mismo nuestros resultados también concuerdan con lo observado por Fetoni et al (39) quienes evaluaron en cobayos el efecto antioxidante del alfa tocoferol para disminuir el efecto ototóxico de la gentamicina y observaron que los animales que no recibieron este fármaco, mostraron pérdida masiva de las células ciliadas. Además nuestros resultados son semejantes a los descritos por otros autores que evaluaron el uso tópico de diferentes aminoglucósidos y observaron que la gentamicina y amikacina provocan estos mismos daños (40). Nuestros resultados también coinciden con lo descrito por McFadden et al (41) que evaluaron el tiempo en el que la administración de ácido etacrínico en conjunto con la gentamicina, produce pérdida de las células ciliadas y células ganglionares espirales y

observaron que ésta las daña a partir de los 3 días de su administración. Por otro lado nuestros resultados no concuerdan con lo observado por Feghali et al (42), que estudiaron el efecto de la NAC como protector de las células sensitivas auditivas del oído interno provocados por el cisplatino en cultivos celulares y observaron que este si tiene un efecto otoprotector, pero es dosis dependiente.

En la actualidad, existen pocos estudios en los que se describa el daño que sufre la membrana tectoria durante la ototoxicidad por aminoglucósidos, ni con el tratamiento con antioxidantes, sin embargo; en un estudio en el que se estudiaron los hallazgos histológicos producidos por la gentamicina, se reportó que esta se desprende y se observa como un artefacto en la laminilla (43). Nuestros resultados tampoco coinciden con lo descrito en un modelo realizado en primates no humanos en los que se estudió los cambios histopatológicos del oído interno después de la inyección de gentamicina intratimpánica y vestibular, así como la colocación de un electrodo de una prótesis y observaron que la membrana tectoria y demás estructuras de la cóclea no sufren cambios (44). Así mismo no concuerdan con lo observado por Epstein y Cotanche que estudiaron los efectos de la gentamicina en aves y observaron que la membrana tectoria se desprende de la papila basilar (45).

Por otro lado, también existen pocos estudios de los cambios que sufre la membrana vestibular cuando se presenta ototoxicidad por aminoglucósidos; pero se ha reportado que esta se daña en las fases crónicas de la patología, lo cual no coincide con nuestro estudio en los que éste daño se produjo a las cuatro semanas (34). Además nuestros datos tampoco concuerdan con lo observado por Sun et al en el modelo de mono rhesus en los que estudiaron histológicamente los

efectos de la gentamicina y observaron que ninguna de las estructuras cocleares sufre daño (44).

CONCLUSIONES.

Con lo observado en este estudio se puede concluir que la NAC, no evita la ototoxicidad en cobayos tratados con AMK, ni la pérdida de la audición y cambios en la morfología coclear; sin embargo los animales tratados con esta requieren de menor intensidad de estímulo para generar la emisión otoacústica.

REFERENCIAS.

- 1.- Yorgason JG, Fayad JN, Kalinec F. Understanding drug ototoxicity: molecular insights for prevention and clinical management. *Expert Opin Drug Saf.* 2006; 5: 383-399.
- 2.- Pinochet K, Alegría K, Romero M, Cañete O. Effects of varying the intensity of the primary tones on the amplitudes of Distortion Product Otoacoustic Emissions (OAE_{dp}) in patients with normal hearing. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 2012; 72: 235-242.
- 3.- Palomar García V, Abdulghani F, Bodet E, Andreu Mencía L, Palomar Asenjo V. Oxicidad producida por medicamentos: Estado actual, *ORL-DIPS* 2001; 28: 7-11.
- 4.- Da Silva JG, Carvalho I, Corrado AP, De Oliveira JA, Hyppolito MA. Specific Cochlear and Vestibular Toxicity Induced for New Semi Synthetic Aminoglycosides: implications for the Treatment of Meniere's Disease. *Rev Ac Ec ORL.* 2012; 8: 35-40.
- 5.- Mercado M, Burgos R, Muñoz C. Drug-induced ototoxicity. *Rev Otorrinolaringol Cir Cab Cue.* 2007; 67: 167-177.
- 6.- Lancaster JL, Mortimore S, McCormick M, Hart CA. Systemic absorption of gentamicin in the management of active mucosal chronic otitis media. *Clin Otolaryngol.* 1999; 24: 435-439.
- 7.- Rodríguez-Álvarez M, Aminoglucósidos. *Enf Infec y Micro* 2002; 22: 20-30.
- 8.- Rybak LP, Ramkumar V. Ototoxicity. *Kidney Int.* 2007; 72:931-935.

- 9.- Lesniak W, Pecoraro VL, Schacht J. Ternary complexes of gentamicin with iron and lipid catalyze formation of reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol.* 2005; 18: 357-364.
- 10.- Samuni Y, Goldstein S, Dean M. O., Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine, *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (2013) 4117-4129.
- 11.- Mancipe LC, Fernández DC, Fernández DG, Intoxicación por acetaminofen. *Rev Med.* 2010; 18: 221-227.
- 12.- Prabhu A, Sujatha DI, Kanagarajan N, Vijayalakshmi MA, Ninan B, Vellore Ch. Efecto de la N-acetilcisteína en la atenuación de la lesión de isquemia-reperfusión en pacientes sometidos a bypass coronario con bypass cardiopulmonar. *Ann Vasc Surg* 2009; 23: 645-651.
- 13.- Calderón L, Carrasco M, Hernández R, Naranjo R, Lacruz L. Efectos de la N-Acetilcisteína y Metionina en intoxicación aguda con plomo en ratas wistar. *Arch Ven FarmTer.* 2006; 25: 33-38.
- 14.- Gillissen A. Grundlagen der Antiinflammatorischen Wirkung von N-Acetylcystein und Dessen Therapeutische Einsatzmöglichkeiten. *Pneumologie.* 2011; 65: 549-557.
- 15.- Lawrence Villalobos A, Quesada Hernández R. Protocolo de N-Acetilcisteína más hidratación en la prevención de la nefropatía por contraste. *Rev Med Costa Rica y Centroam.* 2007; 579: 63-69.
- 16.- 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.

- 17.- 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.).
- 18.- 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: 55-64.
- 19.- Mostafa BE, Tawfik S, Hefnawi NG, Hassan MA, Ismail FA. The role of deferoxamine in the prevention of gentamicin ototoxicity: a histological and audiological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*. 2007; 127: 234-239.
- 20.- Ruan Q, Ao H, He J, Chen Z, Yu Z, Zhang R, et al. Topographic and quantitative evaluation of gentamicin-induced damage to peripheral innervation of mouse cochleae. *Neurotoxicology* 2014; 40: 86-96.
- 21.- 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
- 22.- Chen Y, Huang WG, Zha DJ, Qiu JH, Wang JL, Sha SH, et al. Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity from the laboratory to the clinic. *Hear Res* 2007; 226: 178-82.
- 23.- García VP, Martínez AF, Agustí EB, Mencía LA, Asenjo VP. Drug-induced ototoxicity: current status. *Acta Otolaryngol*. 2001; 121: 569-572.
- 24.- Arch-Tirado E, Verduzco-Mendoza A, Azuara-Pliego E, Hernández Orozco F, Collado-Corona MA, Utilidad del cobayo como modelo de estudios audiológicos y propuesta de accesos quirúrgicos del oído y cuello. *Cir Ciruj* 2005; 73:339-344.

- 25.- Parravicini L, Arpini A, Bamonte F, Marzanatti M, Ongini E. Comparative ototoxicity of amikacin, gentamicin, netilmicin, and tobramycin in guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982; 65: 222-230.
- 26.- Forge A, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics *Audiol Neurotol.* 2000, 5: 3-22.
- 27.- Kocyigit I, Vural A, Unal A, Sipahioglu MH, Yucel HE, Aydemir S, Yazici C, İlhan Sahin M, Oymak O, Tokgoz B. Preventing amikacin related ototoxicity with N-acetylcysteine in patients undergoing peritoneal dialysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015; 272: 2611-2620.
- 28.- Choe WT, Chinosornvatana N, Chang KW. Prevention of Cisplatin Ototoxicity Using Transtympanic N-Acetylcysteine and Lactate. *Otol Neurotol.* 2004; 25: 910-915.
- 29.- Feldman L, Efrati S, Eviatar E, Abramsohn R, Yarovoy I, Gersch E, Averbukh Z, Weissgarten J. Gentamicin-induced ototoxicity in hemodialysis patients is ameliorated by N-acetylcysteine. *Kidney Int.* 2007; 72: 359-363.
- 30.- Kopke RD, Weisskopf PA, Boone JL, Jackson RL, Wester DC, Hoffer ME, Lambert DC, Charon CC, Ding DL, McBride D. Reduction of noise-induced hearing loss using L-NAC and salicylate in the chinchilla. *Hear Res.* 2000; 149: 138-146.
- 31.- Ohinata Y, Miller JM, Schacht J. Protection from noise-induced lipid peroxidation and hair cell loss in the cochlea. *Brain Res.* 2003; 21; 966:265-273.
- 32.- 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.

- 33.- Lorito G, Hatzopoulos S, Laurell G, Campbell KC, Petrucelli 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.
- 34.- Huizing EH, de Groot JCMJ. Human cochlear pathology in aminoglycoside ototoxicity-A review. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1987; Suppl. 436: 117-125.
- 35.- Forge A, Wright, A, Davies SJ. Analysis of structural changes in the stria vascularis following chronic gentamicin treatment. *Hear Res.* 1987; 31: 253-265.
- 36.- Hirose K, Sato E. Comparative analysis of combination kanamycin-furosemide versus kanamycin alone in the mouse cochlea. *Hear Res.* 2011; 272:108-116. doi: 10.1016/j.heares.2010.10.011. Epub 2010 Oct 31.
- 37.- Hinojosa R, Nelson EG, Lerner SA, Redleaf MI, Schramm DR. Aminoglycoside ototoxicity: A human temporal bone study. *Laryngoscope.* 2001; 111:1797-1805.
- 38.- Versnel H, Agterberg MJ, de Groot JC, Smoorenburg GF, Klis SF. Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res.* 2007; 231:1-12.
- 39.- Fetoni AR, Sergi B, Scarano E, Paludetti G, Ferraresi A, Troiani D. Protective effects of alpha-tocopherol against gentamicin-induced oto-vestibulo toxicity: an experimental study. *Acta Otolaryngol.* 2003; 123: 192-197.
- 40.- 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: 406-412.

- 41.- McFadden SL, Ding D, Jiang H, Salvi RJ. Time course of efferent fiber and spiral ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla. *Brain Res.* 2004; 997: 40-51.
- 42.- Feghali JG, Liu W, Van De Water TR. L-N-Acetyl-Cysteine Protection Against Cisplatin-Induced Auditory Neuronal and Hair Cell Toxicity. *Laryngoscope.* 2001; 111:1147-1155.
- 43.- Keene M, Hawke M, Barber HO, Farkashidy J. Histopathological Findings in Clinical Gentamicin Ototoxicity. *Arch Otolaryngol.* 1982; 108: 65-70.
- 44.- Sun DQ, Lehar M, Dai C, Swarthout L, Lauer AM, Carey JP, Mitchell DE, Cullen KE, Della Santina CC. Histopathologic changes of the inner ear in rhesus monkeys after intratympanic gentamicin injection and vestibular prosthesis electrode array implantation. *JARO.* 2015; 16: 373-387.
- 45.- Epstein JE, Cotanche DA. Secretion of a new basal layer of tectorial membrane following gentamicin-induced hair cell loss. *Hearing Res.* 1995; 90: 31-43.