



# Efecto del tratamiento intratimpánico con factor neurotrófico derivado del cerebro y N-acetilcisteína en la producción de glutatión peroxidasa, cambios audiológicos e histológicos en cobayos con ototoxicidad inducida por amikacina

## Effect of intratympanic treatment of brain-derived neurotrophic factor and N-acetyl cysteine on glutathione peroxidase production, audiological and histological changes in guinea pigs with amikacin-induced ototoxicity.

### Correspondencia

J Raúl Olmos Zuñiga  
raolzu@yahoo.com

**Recibido:** 18 de julio 2024

**Aceptado:** 2 de agosto 2024

**Este artículo debe citarse como:** Silva-Armendáriz S, Olmos-Zúñiga JR, Silva-Martínez M, Cristerna-Sánchez L, Rodríguez-Beto L, González-Navarro M, Abreu-Castañeda WN, Carranco-Hernández L, Contreras JB, Gaxiola-Gaxiola M, Romero-Romero L. Efecto del tratamiento intratimpánico con factor neurotrófico derivado del cerebro y N-acetilcisteína en la producción de glutatión peroxidasa, cambios audiológicos e histológicos en cobayos con ototoxicidad inducida por amikacina. *An Orl Mex* 2024; 69 (3): 195-208.

### PARA DESCARGA

<https://doi.org/10.24245/aorl.v69i3.9962>

<https://otorrino.org.mx>

Samantha Silva Armendáriz,<sup>1</sup> J Raúl Olmos Zúñiga,<sup>2</sup> Mariana Silva Martínez,<sup>2</sup> Lisette Cristerna Sánchez,<sup>1</sup> Lizbeth Rodríguez Beto,<sup>1</sup> Mauricio González Navarro,<sup>3</sup> Warenka Nabil Abreu Castañeda,<sup>1</sup> Lizette Carranco Hernández,<sup>1</sup> Javier Benjamín Contreras,<sup>4</sup> Miguel Gaxiola Gaxiola,<sup>5</sup> Laura Romero Romero<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello.

<sup>2</sup> Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental.

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI).

<sup>4</sup> Laboratorio de Morfología.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

<sup>5</sup> Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

## Resumen

**OBJETIVO:** Evaluar el efecto del tratamiento intratimpánico con factor neurotrófico derivado del cerebro embebido en esponja de colágena y de la administración simultánea vía oral de N-acetilcisteína (NAC) con amikacina en el estrés oxidativo mediante la expresión de glutatión peroxidasa, cambios audiológicos e histológicos en la cóclea de cobayos con ototoxicidad por amikacina.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Se incluyeron 55 cobayos, en 50 se produjo ototoxicidad por amikacina, se dividieron en 5 grupos de 10 animales cada uno y se trataron de la siguiente forma: grupo I: sin tratamiento, grupo II: NAC posthipoacusia, grupo III: NAC-amikacina simultánea, grupo IV: solución salina y grupo V: factor neurotrófico derivado del cerebro. Los animales se evaluaron por 4 semanas con emisiones otoacústicas por productos de distorsión. Histológicamente se evaluó la integridad coclear e inmunohistoquímicamente la producción de glutatión peroxidasa. El protocolo se llevó a cabo del 1 de enero de 2022 al 31 de enero de 2023.

**RESULTADOS:** Ningún animal revirtió la hipoacusia. En términos histológicos, los grupos I, II, III y IV mostraron pérdida severa de las células ciliadas y en el grupo V la pérdida fue leve. La producción de glutatión peroxidasa del grupo I fue severa, moderada en el II, III y IV y leve en el V.

**CONCLUSIONES:** La administración simultánea y posthipoacusia de NAC y la aplicación intratimpánica de factor neurotrófico derivado del cerebro no evitan la producción de glutatión peroxidasa en cobayos con ototoxicidad inducida por amikacina, pero sí la disminuyen.

**PALABRAS CLAVE:** Ototoxicidad; amikacina; factor neurotrófico derivado del cerebro; N-acetilcisteína; glutatión peroxidasa; hipoacusia.

## Abstract

**OBJECTIVE:** To evaluate the effect of intratympanic treatment with brain-derived neurotrophic factor embedded in collagen sponge and simultaneous oral administration of N-acetylcysteine (NAC) with amikacin on oxidative stress through glutathione peroxidase expression, audiological and histological changes in the cochlea of guinea pigs with ototoxicity caused by amikacin.

**MATERIALS AND METHODS:** Fifty-five guinea pigs were included, in 50 ototoxicity occurred due to amikacin, they were divided into 5 groups of 10 animals each and were treated as follows: group I: without treatment, group II: post-hearing NAC, group III: simultaneous NAC-amikacin, group IV: saline solution and group V: brain-derived neurotrophic factor. The animals were evaluated for 4 weeks with otoacoustic emissions by distortion products. Cochlear integrity was evaluated histologically and glutathione peroxidase production was evaluated immunohistochemically. Study was done from January 1st, 2022 to January 31, 2023.

**RESULTS:** None of the animal reverted hearing loss. Histologically, groups I, II, III and IV showed severe loss of hair cells and mild in group V. In group I glutathione peroxidase production was severe; moderate in II, III and IV, and mild in V.

**CONCLUSIONS:** Simultaneous and post-hearing loss treatment for NAC and intratympanic application of brain-derived neurotrophic factor do not prevent glutathione peroxidase production in guinea pigs with ototoxicity caused by amikacin, but they decrease it.

**KEYWORDS:** Ototoxicity; Amikacin; Brain-derived neurotrophic factor; N-acetylcysteine; Glutathione peroxidase; Hearing loss.

## ANTECEDENTES

La ototoxicidad por fármacos es la disfunción auditiva, vestibular o ambas, temporal o permanente, causada por un medicamento, que daña las células sensoriales del oído y las fibras nerviosas, lo que ocasiona pérdida auditiva neurosensorial y trastornos vestibulares que producen hipoacusia neurosensorial, acúfeno o desequilibrio.<sup>1,2</sup>

Los aminoglucósidos son antibióticos prescritos como tratamiento de primera línea en diversas enfermedades y forman parte de esquemas de tratamiento contra padecimientos resistentes a múltiples fármacos,<sup>3</sup> pero pueden ocasionar nefrotoxicidad u ototoxicidad.<sup>2</sup>

En el oído, los aminoglucósidos pueden provocar vestibulotoxicidad, cocleotoxicidad (o ambas).<sup>3,4,5</sup> La estreptomina, gentamicina, tobramicina y netilmicina producen vestibulotoxicidad, mareos, oscilopsia, vértigo, ataxia y nistagmo hasta en un 60% de los casos.<sup>3,5</sup> La neomicina, la amikacina (AMK), la kanamicina y la dihidroestreptomina<sup>3,4</sup> provocan cocleotoxicidad hasta en el 63% de los casos, que se manifiesta por acúfeno, plenitud ótica, alteraciones en la discriminación e hipoacusia que puede tener diferentes grados de severidad, ser progresiva y permanente.<sup>3,4,5</sup>

El mecanismo por el cual los aminoglucósidos producen ototoxicidad después de ser administrados por vía sistémica o tópica consiste en que al ingresar al oído interno promueven estrés oxidativo, peroxidación lipídica que ocasiona daño principalmente de las células ciliadas externas y, en menor grado, de las células ciliadas internas.<sup>6</sup> Para evitar o disminuir la ototoxicidad por aminoglucósidos se han propuesto varias estrategias otoprotectoras, como reducir la absorción del medicamento e interferir con los mecanismos de citotoxicidad inducida por los aminoglucósidos mediante el bloqueo de la peroxidación lipídica<sup>7</sup> y la administración de fármacos,<sup>8-11</sup> pero no han sido exitosos, lo que hace necesario buscar otros fármacos que eviten y disminuyan la ototoxicidad por aminoglucósidos.<sup>11</sup>

También se ha intentado mantener la supervivencia de las células cocleares con la aplicación de factores neurotróficos que intervienen en el desarrollo coclear y disminuyen la formación de radicales libres de oxígeno (ROS);<sup>12</sup> sin embargo, no se ha establecido la técnica de aplicación y dosis adecuada para ser administrada en la ototoxicidad inducida por amikacina.

### **N-acetilcisteína (NAC)**

La NAC es un derivado del aminoácido cisteína con un grupo acetilo unido al nitrógeno que actúa como eliminador de ROS<sup>13</sup> porque es un precursor de la biosíntesis de glutatión y glutatión peroxidasa intracelular, que son antioxidantes no enzimáticos y durante el estrés oxidativo reducen el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos a agua o alcohol,<sup>14,15</sup> por lo que se ha administrado para contrarrestar enfermedades neurodegenerativas,<sup>13</sup> proteger contra la muerte neuronal inducida por el estrés oxidativo<sup>15</sup> y como tratamiento experimental de la hipoacusia posterior a la ototoxicidad inducida por amikacina.<sup>16</sup> Sin embargo, no se ha probado su administración simultánea con este aminoglucósido, ni se han descrito los cambios en la expresión de glutatión peroxidasa en la cóclea cuando se administra de forma simultánea con la amikacina.

### **Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)**

El factor neurotrófico derivado del cerebro es un miembro de la familia de factores de crecimiento de las neurotrofinas que tiene un peso molecular de 13 kDa y su forma activa es secretada por las dendritas postsinápticas. Éste participa en la neurogénesis ótica durante la maduración de las neuronas, guiando la diferenciación y especialización de éstas a células ciliadas.<sup>17</sup> También se ha observado que regula la supervivencia celular, proliferación y destino de los precursores neuronales, así como el crecimiento de axones y dendritas mediante la estimulación de los receptores TrkB (tirosina cinasa tipo B o receptor asociado con tropomiosina cinasa).

En la bibliografía se ha reportado su administración como tratamiento prometedor de trastornos neurodegenerativos, como la pérdida auditiva y visual.<sup>18</sup> También se ha descrito que su administración en la ototoxicidad por cisplatino previene el daño de las neuronas auditivas, células ciliadas y la degeneración del ganglio espiral.<sup>17</sup> Sin embargo, debido al tamaño de su molécula, la barrera hematococlear (que tiene una estructura comparable a la barrera hematoencefálica) impide que las moléculas de mayor tamaño (como el factor neurotrófico derivado del cerebro) salgan de la circulación y lleguen a las células objetivo, por lo que se han establecido varias estrategias propuestas para la administración local del factor neurotrófico derivado del cerebro, pero ninguna ha sido efectiva al 100% debido a que tiene una vida media corta, farmacocinética deficiente, no se ha encontrado el método ideal para la administración sostenida de éste directamente en la cóclea y tampoco se ha tenido un control preciso de la dosis, lo cual, para algunos investigadores, sigue siendo un desafío.<sup>18</sup>

Con base en lo anterior puede pensarse que administrar de forma intratimpánica el factor neurotrófico derivado del cerebro o la administración de NAC vía oral de manera simultánea a la amikacina evitará la producción de glutatión peroxidasa, hipoacusia permanente y daño de las células cocleares en cobayos con ototoxicidad producida por este aminoglucósido.

El objetivo de este artículo fue evaluar el efecto del tratamiento intratimpánico con factor neurotrófico derivado del cerebro embebido en una esponja de colágena y de la administración simultánea vía oral de NAC con amikacina en el estrés oxidativo mediante la expresión de glutatión peroxidasa y en los cambios audiológicos e histológicos en la cóclea de cobayos con ototoxicidad inducida por amikacina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio experimental, longitudinal y comparativo, efectuado en la Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental del Departamento de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INERICV), Ciudad de México. El estudio se llevó a cabo del 1 de enero de 2022 al 31 de enero de 2023.

Se utilizaron 55 cobayos de raza Dunkin-Hartley, elegidos al azar, sin importar el sexo ni la edad, con peso de 250 a 350 gramos. El protocolo (B08-22) fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto y se llevó a cabo de acuerdo con las Especificaciones Mexicanas para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio.<sup>19</sup>

En 50 animales se produjo ototoxicidad mediante la administración diaria de amikacina (amikacina, AMSA, Guadalajara, México) intramuscular a dosis de 25 mg/kg durante 15 días (tiempo suficiente descrito en la bibliografía para producir ototoxicidad)<sup>16</sup> y, una vez que mostraron hipoacusia, se les aplicó el tratamiento de la siguiente forma: grupo I (n = 10): ototoxicidad inducida por amikacina sin tratamiento (AMK-Sin Tx). Grupo II (n = 10): ototoxicidad inducida por amikacina tratados con NAC vía oral a dosis de 140 mg/kg/24 horas (dosis prescrita en niños con intoxicación por paracetamol) durante 4 semanas, después de haber producido la ototoxicidad (AMK-NAC poshipoacusia). Grupo III (n = 10): ototoxicidad inducida por amikacina tratados simultáneamente con NAC vía oral a dosis de 140 mg/kg/24 horas durante 4 semanas (AMK-NAC simultánea). Grupo IV (n = 10): ototoxicidad inducida por amikacina tratados con 6 µL de solución salina fisiológica embebidos en una esponja de colágena porcina (Gelfoam, Pharmacia and Upjohn Company LLC, Kalamazoo, Estados Unidos) colocado sobre la ventana redonda como dosis única, después de haber producido la ototoxicidad (AMK-Gelfoam). Grupo V (n = 10): ototoxicidad inducida por amikacina tratados

con 6  $\mu\text{L}$  de una solución de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de factor neurotrófico derivado del cerebro (PeproTech Inc, AF-450-02, CA, Estados Unidos) embebidos en Gelfoam, colocado sobre la ventana redonda como dosis única, después de haber producido la ototoxicidad (AMK-BDNF).

Al finalizar el estudio se tomaron los oídos de 5 animales sanos que 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 (estos animales también se manejaron bajo las mismas normas).<sup>19</sup>

## Tratamiento

El grupo control o grupo I no recibió ningún tratamiento. En los grupos II y III, 600 mg de NAC (ACC®, Sandoz, Wolfstatshausen, Alemania) se diluyeron en 700 mL de agua que se utilizó como agua de bebida y se administró *ad libitum*.

En los grupos IV y V, después de haberse provocado la ototoxicidad, mediante cirugía se aplicó tópicamente el tratamiento en la ventana redonda embebido en Gelfoam®, en el grupo IV se instilaron 6  $\mu\text{L}$  de solución salina fisiológica y en el V 6  $\mu\text{L}$  de una solución de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de factor neurotrófico derivado del cerebro<sup>18</sup> para que penetrara 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 ototoxicidad inducida por amikacina.

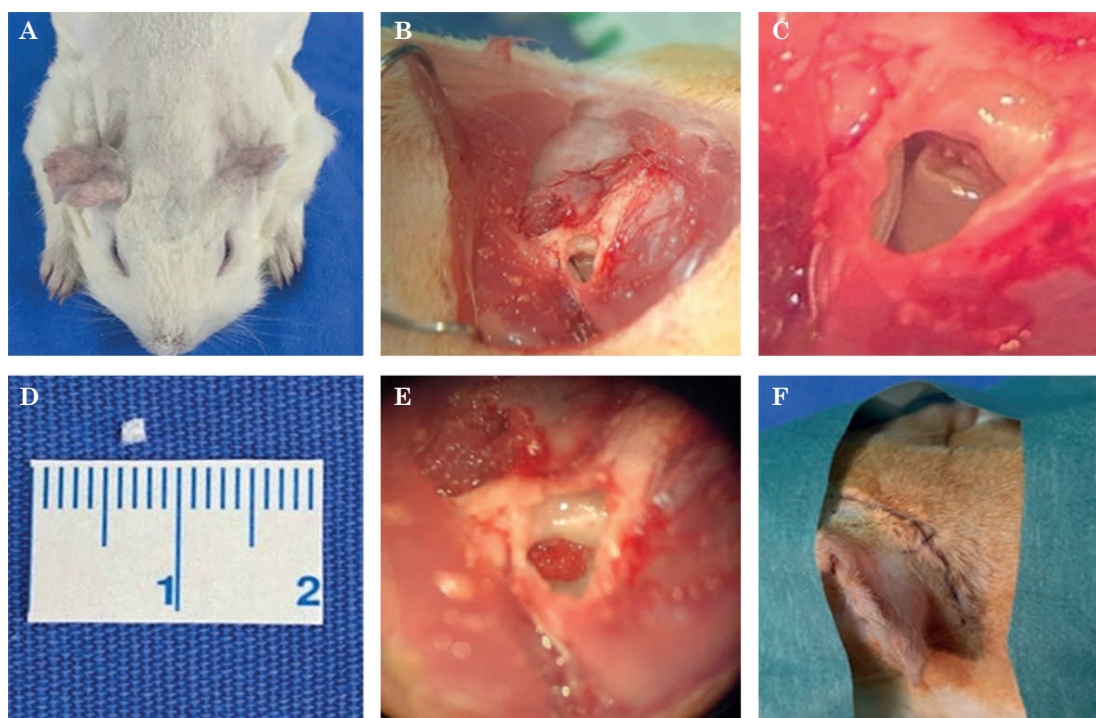
## Técnica quirúrgica

Los animales se sometieron a anestesia general con una mezcla de 75 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Anesket®, Pisa, Guadalajara, México) con 5 mg/kg de xilazina (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Alemania) administrada intraperitonealmente, así como 5 mg/kg vía subcutánea (SC) de meloxicam (Melodex®, Laboratorios Aranda, México, Ciudad de México) para mantener analgesia preoperatoria y enrofloxacin como antibiótico (Baytril®, Bayer, Leverkusen, Alemania) a dosis de 5 mg/kg/SC.<sup>16</sup> Posteriormente, se colocó al animal en decúbito ventral e infiltró lidocaína de forma local (Lidocaína®, Pisa, Guadalajara, México) a dosis 5 mg/kg en la región retroauricular de forma bilateral (**Figura 1A**) y se hizo una incisión elíptica de 2 cm sobre área de la bula timpánica, sin sobrepasar la pared anterior de conducto auditivo externo. Los pabellones de la oreja se retrajeron lateralmente y desperiostizó 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 y se hizo una mastoidectomía de 3 mm (**Figura 1B**).

Mediante microcirugía se expuso y visualizó la ventana redonda (**Figura 1C**), y con un pick recto (Sklar Surgical Instruments, Pennsylvania, Estados Unidos) se colocó el Gelfoam® (1 x 1 mm) embebido en la solución salina fisiológica o factor neurotrófico derivado del cerebro (**Figura 1D y E**). Por último, 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, Nueva Jersey, Estados Unidos) de 4-0. **Figura 1F**

## Evaluación

El estudio tuvo una duración de 6 semanas después de haberse producido la ototoxicidad (hipoacusia) e inicio de la aplicación del tratamiento y todos los animales se evaluaron de la siguiente manera:



**Figura 1**

Técnica quirúrgica. **A.** Cobayo en posición de decúbito ventral después de ser infiltrado. **B.** Incisión de 3 x 3 mm sobre la bula timpánica. **C.** Exposición de la ventana redonda. **D.** Tamaño del Gelfoam (1 x 1 mm) embebido en factor neurotrófico derivado del cerebro. **E.** Aplicación del tratamiento sobre la ventana redonda. **F.** Cierre convencional de la incisión retroauricular.

### *Evaluación clínica*

Los cobayos se sometieron a evaluación clínica diaria una vez iniciada la administración de la amikacina y durante ésta se valoró si había otitis, otorrea y signos de vestibulotoxicidad (principalmente inestabilidad postural o laberintitis) posaplicación de los tratamientos.

### *Evaluación audiológica*

El estudio se efectuó con el equipo Eclipse de Interacoustics a través del módulo DPOAE20, utilizando el protocolo PD-gram extendido con un rango frecuencial de 500 a 8000 Hz. La valoración de las emisiones otoacústicas por productos de distorsión se hizo utilizando dos estímulos de tonos puros ( $f_1$  y  $f_2$ ), de forma que, como consecuencia de la no linealidad coclear, se originó un tercer tono con una frecuencia resultante de la aplicación de la función matemática  $2f_1-f_2$ . El nivel de intensidad para cada estímulo, L1 y L2, fue de 65-55 dB. Las mediciones se hicieron con una amplitud de 500 a 8000 Hz de las emisiones otoacústicas por productos de distorsión y los productos de distorsión se representaron de acuerdo con los dB observados por medición en conjunto y en cada oído, así como los valores de intensidad de L1 y L2. Para la evaluación, los cobayos se envolvieron en un campo quirúrgico no estéril, posteriormente se colocó en cada conducto auditivo externo la sonda de las emisiones cubierta por una oliva auditiva Sanibel pediátrica; las mediciones se hicieron previo a la administración de amikacina, semanalmente hasta que se produjo la hipoacusia, así como 15 y 30 días después de administrar los tratamientos y sin someter a los cobayos a ningún procedimiento anestésico.

### *Evaluación histológica*

Concluido el tiempo de estudio a los animales se les practicó eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg) [Anestosal, Pfizer, Estado de México] y se obtuvieron los huesos temporales, que se fijaron durante 24 horas en formaldehído al 10%. Posteriormente se descalcificaron con una solución de ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 5% y ácido clorhídrico (HCl) al 5% durante 72 horas. Una vez descalcificadas, las cócleas se incluyeron en parafina y se les hicieron cortes de tres micras, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se evaluaron por microscopia de luz.

En el análisis de los hallazgos histológicos se evaluó la continuidad de la estría vascular, la integridad de la membrana tectoria, la membrana vestibular, células ciliadas externas e internas de la cóclea, así como la densidad de las células ganglionares espirales.

Estos cambios histológicos se evaluaron mediante una escala nominal, en la que la completa integridad se considera un sí y la falta de cualquier segmento, un no, mientras que la pérdida de las células ciliadas externas se evaluó de acuerdo con una escala semicuantitativa en la que cada parámetro evaluado recibió un porcentaje según la severidad de los cambios histológicos (0-10% ausente, 11-25% leve, 26-50% moderado, 51-100% severo).

### *Evaluación inmunohistoquímica*

Se determinó el estrés oxidativo a través de la expresión de glutatión peroxidasa mediante inmunohistoquímica en las cócleas incluidas en parafina para el estudio histológico, para esto se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo para glutatión peroxidasa (Biorbyt, orb5344, CA, Estados Unidos) y el sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos). Las muestras se tiñeron con 3,3'-diaminobencidina (BioCare Medical, CA, Estados Unidos) y se contrastaron con hematoxilina CAT (BioCare Medical, CA, Estados Unidos). Después de completar la tinción, se cuantificó la expresión de glutatión peroxidasa en todas las estructuras cocleares con el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) y el complemento IHC Profiler.<sup>20</sup>

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los hallazgos audiométricos se llevó a cabo con análisis de variancia (ANDEVA) y ANDEVA de medidas repetidas (ANDEVA MR), Dunnett y Tukey; mientras que para los hallazgos histológicos se hizo mediante Kruskal-Wallis. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

## **RESULTADOS**

### **Hallazgos clínicos**

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

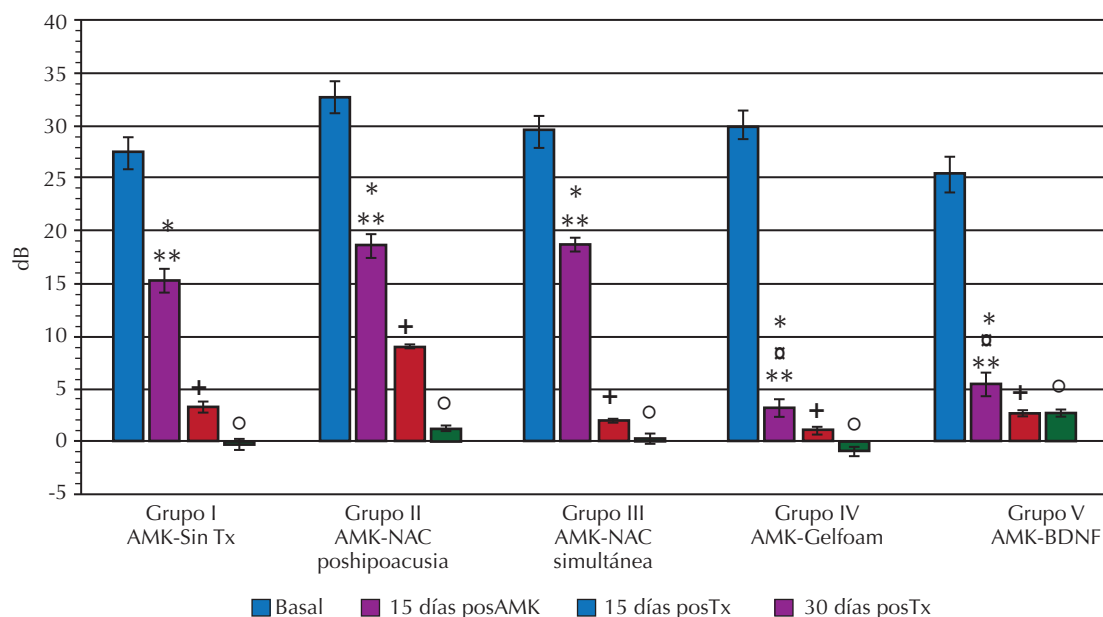
### **Hallazgos audiológicos**

Después de las emisiones otoacústicas por productos de distorsión se observó que, a los 15 días de haber administrado la amikacina, todos los animales mostraron disminución de las frecuencias que escuchaban en comparación con sus valores basales ( $p < 0.005$  ANDEVA MR, Dunnett). Además, esta disminución de la audición fue mayor en los grupos IV y V *vs*

los otros tres grupos de estudio ( $p < 0.005$  ANDEVA MR, Tukey). Después de aplicar los tratamientos en todos los grupos de estudio se continuó con la disminución de estas frecuencias en cada medición en comparación con su valor basal y el valor de la medición previa ( $p < 0.001$ , ANDEVA MD, Dunnett, Tukey). **Figura 2**

### Hallazgos histológicos

En las muestras de los animales sanos que se utilizaron como controles no se observaron alteraciones histológicas en ninguna de sus estructuras (**Figura 3A**). Al evaluar el órgano de Corti, todos los animales de los grupos I, II, III y IV mostraron pérdida severa de las células ciliadas externas ( $p < 0.05$  Kruskal-Wallis) y en el grupo V fue leve. Asimismo, 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 que en los grupos I, III y V se observó adelgazada y en los grupos II y IV engrosada. También en los grupos I, II, III y IV se apreció pérdida severa de las células del limbo espiral. **Figura 3**



**Figura 2**

Disminución de la audición en los cobayos de todos los grupos de estudio posototoxicidad inducida por amikacina y después de aplicar los diferentes tratamientos.

Media  $\pm$  EE.

\*  $p < 0.005$  ANDEVA Dunnett. Basal vs 15 días pos-AMK, 15 y 30 días postratamiento de todos los grupos.

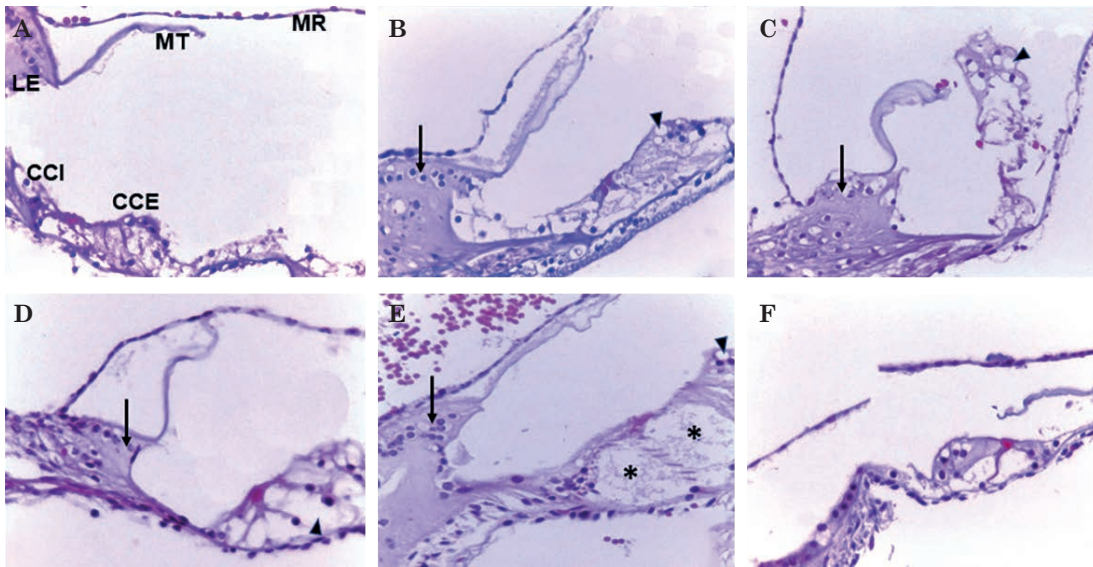
P  $p < 0.005$  ANDEVA Tukey 15 días posamikacina vs basal, grupos I, II y III.

\*\*  $p < 0.007$  ANDEVA Dunnett, 15 días posamikacina vs basal, 15 y 30 días postratamiento de todos los grupos.

t  $p < 0.005$  ANDEVA Dunnett, 15 días postratamiento vs basal, 15 y 30 días postratamiento de todos los grupos.

°  $p < 0.005$  ANDEVA Dunnett, 30 días postratamiento vs basal, 15 días posamikacina, 15 días postratamiento de todos los grupos.





**Figura 3**

Micrografías (H-E 10x) que muestran los cambios histológicos en el tejido coclear sano (A). Posamikacina sin tratamiento (B). Tratados con amikacina-NAC postsordera (C). Amikacina-NAC simultánea (D). Tratados con solución salina fisiológica-Gelfoam (E). Tratados con factor neurotrófico derivado del cerebro-Gelfoam (F).

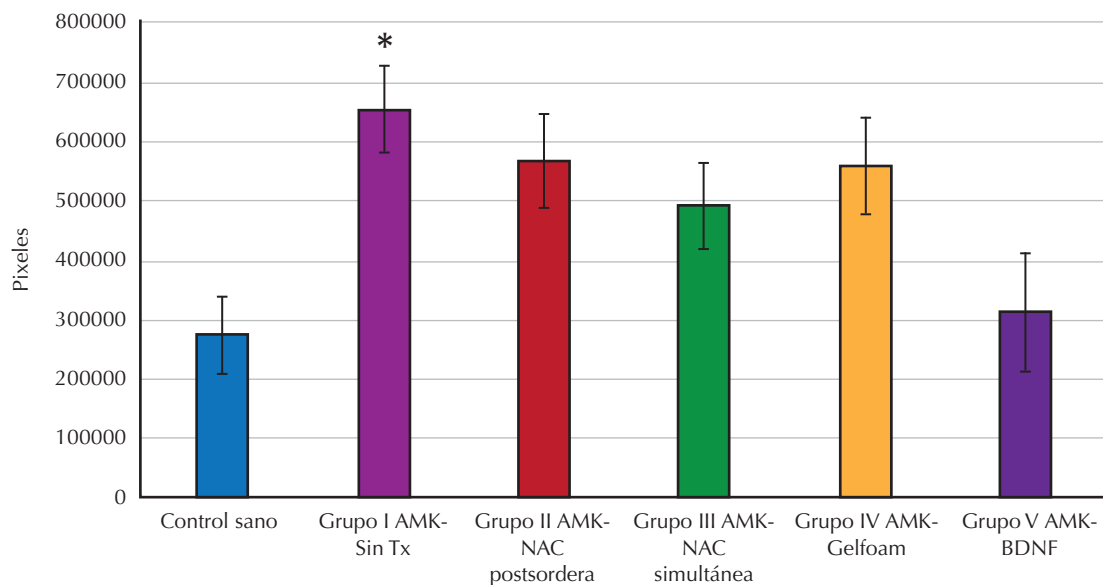
LE: células del limbo espiral; MT: membrana tectoria; MR: membrana de Reissner; CCI: células ciliadas internas; CCE: células ciliadas externas; Flecha: pérdida de células del limbo espiral; cabeza de flecha: pérdida y degeneración de las células ciliadas; \*: edema de las células ciliadas.

### Hallazgos inmunohistoquímicos

Al valorar mediante inmunohistoquímica el estrés oxidativo a través de la producción de glutatión peroxidasa, en todos los animales con ototoxicidad por amikacina con y sin tratamiento se incrementó en comparación con los valores de los animales sanos que no recibieron el ototóxico; sin embargo, este incremento fue mayor 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 factor neurotrófico derivado del cerebro mostró menos expresión de esta enzima. **Figuras 4 y 5**

### DISCUSIÓN

Los aminoglucósidos son antibióticos que producen ototoxicidad irreversible porque predisponen a la formación de especies reactivas de oxígeno generadas en las células ciliadas cocleares del paciente.<sup>1,2</sup> Hasta la fecha, no existe un tratamiento que revierta el daño ototóxico; sin embargo, la investigación continúa tratando de desarrollar nuevas alternativas para minimizar las lesiones ototóxicas mientras se mantiene la eficacia terapéutica de los fármacos, entre éstas están los agentes que prevengan la muerte de las células ciliadas externas como agentes antioxidantes y factores neurotróficos sin buenos resultados, por lo que se requieren más estudios que permitan establecer las dosis adecuadas, esquemas terapéuticos y técnica de aplicación de estos fármacos<sup>8</sup> para administrarse en la ototoxicidad inducida por amikacina.



**Figura 4**

Expresión de glutatión peroxidasa en cócleas de cobayos con ototoxicidad por amikacina con diferentes tratamientos postsordera. Ni la NAC ni el factor neurotrófico derivado del cerebro evitan la expresión de radicales de  $O_2$  después ser utilizadas para revertir la ototoxicidad inducida por amikacina.

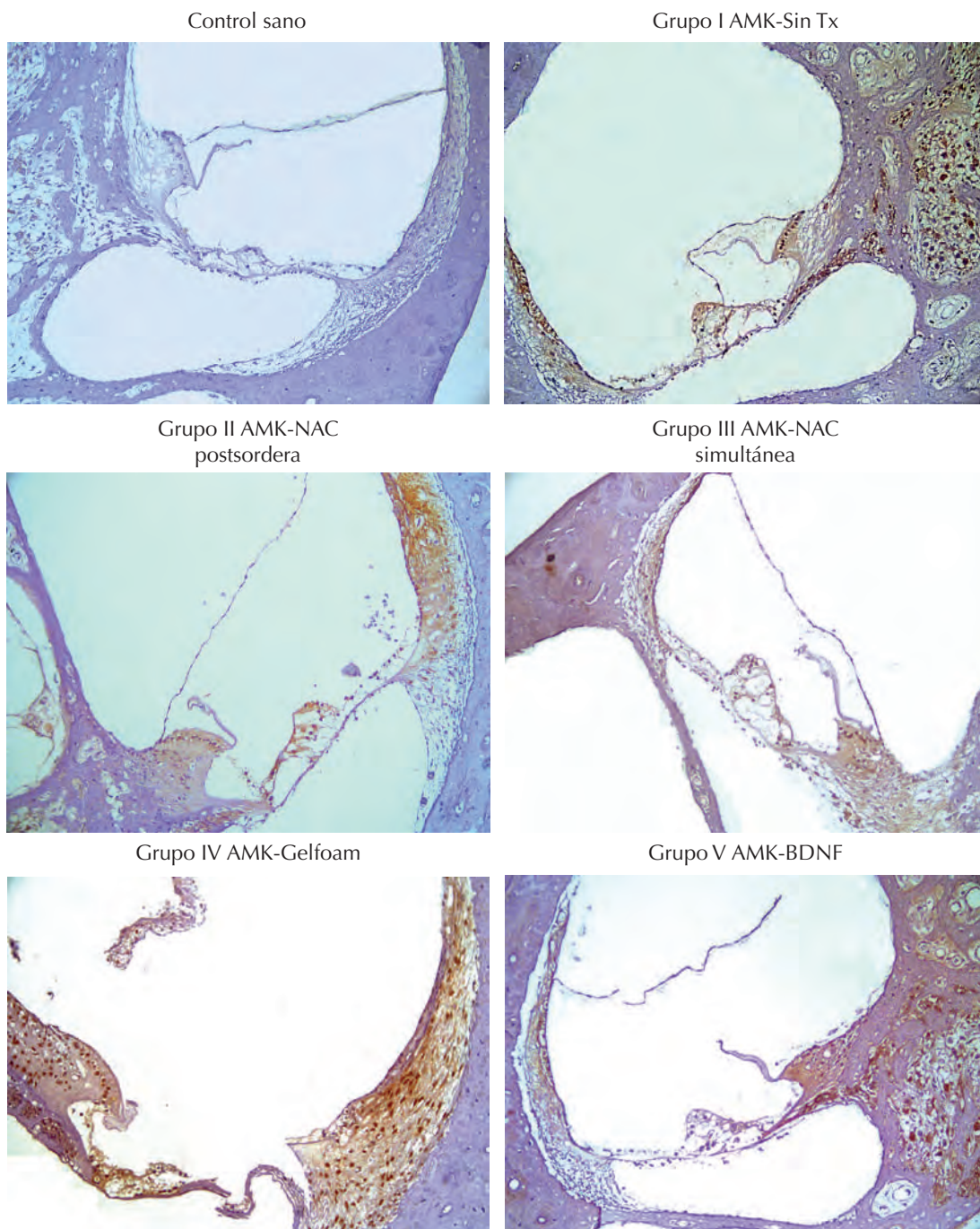
\*  $p = 0.012$  ANDEVA Dunnett.

En este estudio se evaluó el efecto del tratamiento intratimpánico con factor neurotrófico derivado del cerebro embebido en esponja de colágena y de la administración simultánea vía oral de NAC con amikacina en el estrés oxidativo mediante la expresión de glutatión peroxidasa y en los cambios audiológicos e histológicos en la cóclea de cobayos con ototoxicidad inducida por amikacina.

Los resultados de este estudio mostraron que, en el modelo de ototoxicidad inducida por amikacina en cobayos, la NAC y el factor neurotrófico derivado del cerebro no evitan el estrés oxidativo ni la pérdida de la audición.

En este estudio se decidió la aplicación del factor neurotrófico derivado del cerebro embebido en Gelfoam porque al colocarlo sobre la ventana redonda favorece que, por difusión, el factor neurotrófico alcance concentraciones elevadas en la perilinfa y se ponga en contacto directo con la cóclea, como lo describieron Ito y su grupo<sup>21</sup> al estudiar 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 factor neurotrófico derivado del cerebro, implica bajo riesgo de toxicidad celular, como lo reportaron otros autores<sup>18,22</sup> que han estudiado las mejores vías para asegurar la entrega de fármacos para el tratamiento de la ceguera y la sordera.

En esta investigación, para la identificación temprana y la vigilancia de la ototoxicidad se utilizaron las emisiones otoacústicas por productos de distorsión 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.<sup>23</sup> Asimismo, estos hallaz-



**Figura 5**

Expresión de glutatión peroxidasa sobre el tejido coclear sano, posamikacina y postratamiento. En el tejido sano se observa ausencia de expresión de glutatión peroxidasa. En las cócleas que mostraron 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 (poshipoacusia y simultánea) y factor neurotrófico derivado del cerebro en los que se observó una expresión moderada a severa. 20x.

gos audiológicos mostraron que la amikacina produjo ototoxicidad a los 15 días de haberse administrado porque las respuestas de emisiones otoacústicas por productos de distorsión disminuyeron severamente en todas las frecuencias, lo que concuerda con lo observado en otro estudio en el que produjeron ototoxicidad con este aminoglucósido<sup>16</sup> y observaron que en este tiempo se produce la hipoacusia.

Se observó que ni el factor neurotrófico derivado del cerebro ni la NAC evitaron la evolución de la ototoxicidad porque las amplitudes siguieron disminuyendo durante el tiempo de estudio, lo que coincide con lo observado por Somdaş y su grupo,<sup>24</sup> quienes produjeron ototoxicidad con gentamicina en ratas y las trataron con NAC como otoprotector, y observaron que con y sin tratamiento después de producirse la ototoxicidad la hipoacusia se vuelve más severa. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con lo descrito por otros autores que aplicaron factor neurotrófico derivado del cerebro después de producir ototoxicidad con aminoglucósidos y aplicaron un hidrogel<sup>21</sup> o Gelfoam<sup>22</sup> que contenía factor neurotrófico derivado del cerebro (con 84 y 6 µg, respectivamente) como único tratamiento y observaron que había mejoría de los umbrales auditivos posterior a su administración.

Los resultados de este estudio no concuerdan con lo observado por Blakley y colaboradores,<sup>12</sup> quienes produjeron la hipoacusia con cisplatino y aplicaron una sola inyección intracoclear de 0.05 µg de factor neurotrófico derivado del cerebro a través de la ventana redonda y reportaron que 30 días después de la aplicación del tratamiento mejoró la audición en 11 dB, pero, aunque se mejoró la audición postratamiento, ésta no supera la pérdida auditiva inducida por el antineoplásico.

Los hallazgos histológicos de este estudio concuerdan con lo descrito por varios autores que mencionan que los cambios histológicos producidos por la amikacina se caracterizan por la degeneración hidrópica y vacuolar, así como por la pérdida de células ciliadas externas del órgano de Corti. Además, la amikacina provoca degeneración severa del ligamento espiral y la estría vascular.<sup>8,25,26</sup>

En todos los grupos hubo expresión de glutatión peroxidasa porque los aminoglucósidos generan la producción de ROS<sup>3</sup> y la glutatión peroxidasa es una enzima que se sintetiza de forma endógena en todas las células para protegerse del estrés oxidativo.<sup>14,27</sup> Por otro lado, los animales tratados con NAC mostraron más expresión de glutatión peroxidasa que el resto de los animales que recibieron tratamiento, posiblemente porque actúa como un precursor de la síntesis de glutatión y como un estimulador de las enzimas citosólicas implicadas en la regeneración del mismo.<sup>15</sup> Para esto, una vez que la NAC ingresa a una célula, se hidroliza y libera la cisteína, que, por acción de la c-glutamylcisteína sintetasa y el glutatión sintetasa, produce el precursor de la biosíntesis de glutatión, el cual, durante el estrés oxidativo por acción de la glutatión peroxidasa, proporciona un electrón de hidrógeno para la reducción de peróxidos en agua.<sup>13,14</sup> Cabe mencionar que en este estudio los animales tratados con factor neurotrófico derivado del cerebro mostraron menor cantidad de glutatión peroxidasa posiblemente porque este factor, más que estimular la producción del precursor de la biosíntesis de glutatión, suprime la cascada de ROS y NO-ROS mediante la activación de los receptores de tirosina cinasa, como lo observaron Hachem y su grupo<sup>28</sup> y Lidian y colaboradores<sup>29</sup> al estudiar el papel del factor neurotrófico derivado del cerebro como otoprotector en la pérdida auditiva inducida por toxinas. Sin embargo, también pudo ser originado porque los aminoglucósidos que estaban dentro de las células excedieron sus concentraciones e inactivaron la capacidad de defensa de los antioxidantes, como lo reportó Gijalba<sup>30</sup> al estudiar los mecanismos celulares

y moleculares de la ototoxicidad producida por kanamicina, así como cisplatino y el efecto de la otoprotección con vitaminas antioxidantes y magnesio.

## CONCLUSIONES

El tratamiento simultáneo y poshipoacusia de NAC, así como la aplicación intratimpánica de factor neurotrófico derivado del cerebro no evitan la producción de glutatión peroxidasa en cobayos con ototoxicidad inducida por amikacina, pero sí la disminuyen. Tampoco revierten la hipoacusia ni los cambios histológicos que se producen en la cóclea con ototoxicidad por amikacina. Se requieren más estudios que prueben la combinación de ambos tratamientos a diferentes dosis, así como la evaluación de otros ROS y apoptosis de las células cocleares.

## REFERENCIAS

1. Maru D, Malky GA. Current practice of ototoxicity management across the United Kingdom (UK). *Int J Audiol* 2018; 57 (Suppl 4): S76-S88. doi: 10.1080/14992027.2018.1460495
2. 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
3. Selimoglu E. Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr Pharm Des* 2007; 13(1): 119-26. doi: 10.2174/138161207779313731
4. Javadi MR, Abtahi B, Gholami K, Moghadam BS, et al. The incidence of amikacin ototoxicity in multidrug-resistant tuberculosis patients. *IJPR* 2011; 10 (4): 905-911.
5. Dulon D, Mosnier I, Bouccara D. Ototoxicidad farmacológica. *EMC-Otorrinolaringología*. 2013; 42 (1): 1-13. doi:10.1016/S1632-3475(13)64009-6
6. Tabuchi K, Nishimura B, Nakamagoe M, Hayashi K, et al. Ototoxicity: Mechanisms of cochlear impairment and its prevention. *Current Med Chem* 2011; 18 (31): 4866-4871. doi:10.2174/092986711797535254
7. Jiang M, Karasawa T, Steyger PS. Aminoglycoside-induced cochleotoxicity: A review. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 308. doi: 10.3389/fncel.2017.00308
8. 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. Alcalá de Henares. España. Universidad de Alcalá. 2016.
9. Fu X, Wan P, Li P, Wang J, et al. Mechanism and prevention of ototoxicity induced by aminoglycosides. *Front Cell Neurosci* 2021; 15: 692762. doi:10.3389/fncel.2021.692762
10. Hammill TL, Campbell KC. Protection for medication induced hearing loss: the state of the science, *Int J Audiol* 2018; 57: (Sup4): S87-S95. doi: 10.1080/14992027.2018.1455114
11. Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Int J Otolaryngol* 2011; 2011: 937861. doi: 10.1155/2011/937861
12. 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
13. Tardiolo G, Bramanti P, Mazzon E. Overview on the effects of N-acetylcysteine in neurodegenerative diseases. *Molecules* 2018; 23 (12): 3305. doi: 10.3390/molecules23123305
14. 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
15. Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. *Cerebellum* 2007; 6 (4): 308-14. doi:10.1080/14734220601142878
16. Abreu-Castañeda WN. Evaluación del efecto de la administración de N-acetil-cisteína sobre cambios audiométricos e histológicos en cobayos tratados con dosis elevadas de amikacina. Tesis Especialidad. Ciudad de México, México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2016.
17. 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
18. Khalin I, Alyautdin R, Kocherga G, Bakar MA. Targeted delivery of brain-derived neurotrophic factor for the treatment of blindness and deafness. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 3245-67. doi: 10.2147/IJN.S77480
19. 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.
20. 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

21. Ito J, Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al. A new method for drug application to the inner ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2005; 67 (5): 272-275. doi: 10.1159/000089407
22. Havenith S, Versnel H, Agterberg MJ, de Groot JC, et al. Spiral ganglion cell survival after round window membrane application of brain-derived neurotrophic factor using gelfoam as carrier. *Hear Res* 2011; 272 (1-2): 168-77. doi: 10.1016/j.heares.2010.10.003
23. Salt AN, Plontke SK. Principles of local drug delivery to the inner ear. *Audiol Neurootol* 2009; 14 (6): 350-60. doi: 10.1159/000241892
24. 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
25. 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
26. Elbana AM, Abdel-Salam S, Morad GM, Omran AA. Role of endogenous bone marrow stem cells mobilization in repair of damaged inner ear in rats. *Int J Stem Cells* 2015; 8 (2): 146-154. doi: 10.15283/ijsc.2015.8.2.146
27. Ramkumar V, Mukherjea D, Dhukhwa A, Rybak LP. Oxidative stress and inflammation caused by cisplatin ototoxicity. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10 (12):1919. doi: 10.3390/antiox10121919
28. 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; 1: 146-159.
29. Lidian A, Linder B, Anniko M, Nordang L. BDNF as otoprotectant in toxin-induced hearing loss. *Acta Otolaryngologica* 2012; 133 (1): 4-11. doi:10.3109/00016489.2012.712216
30. Gijalba Casado A. Mecanismos celulares y moleculares de la ototoxicidad por kanamicina y cisplatino y otoprotección con vitaminas antioxidantes y magnesio. Tesis Doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha. Castilla, España 2019.