

Ototoxicidade e otoproteção: relato de estudo experimental

MAIARA SANTOS GONÇALVES



**Ototoxicidade
e otoproteção:
relato de estudo
experimental**





Reitora

Carmen Lúcia de Lima Helfer

Vice-Reitor

Rafael Frederico Henn

Pró-Reitor de Graduação

Elenor José Schneider

Pró-Reitora de Pesquisa

e Pós-Graduação

Andréia Rosane de Moura Valim

Pró-Reitor de Administração

Dorivaldo Brites de Oliveira

Pró-Reitor de Planejamento

e Desenvolvimento Institucional

Marcelino Hoppe

Pró-Reitor de Extensão

e Relações Comunitárias

Angelo Hoff

EDITORA DA UNISC

Editora

Helga Haas

COMISSÃO EDITORIAL

Helga Haas - Presidente

Andréia Rosane de Moura Valim

Carlos Renê Ayres

Cristiane Davina Redin Freitas

Hugo Thamir Rodrigues

Marcus Vinicius Castro Witczak

Mozart Linhares da Silva

Rudimar Serpa de Abreu



Avenida Independência, 2293
Fones: (51) 3717-7461 e 3717-7462
96815-900 - Santa Cruz do Sul - RS
E-mail: editora@unisc.br - www.unisc.br/edunisc

Maiara Santos Gonçalves

**Ototoxicidade
e otoproteção:
relato de estudo
experimental**



Santa Cruz do Sul
EDUNISC
2019

© *Copyright*: da autora
1ª edição 2019

Direitos reservados desta edição:
Universidade de Santa Cruz do Sul

Editoração: Clarice Agnes, Caroline Fagundes Pieczarka
Capa: Denis Ricardo Puhl (Assessoria de Comunicação e Marketing da UNISC)

G635o	Gonçalves, Maiara Santos Ototoxicidade e otoproteção [recurso eletrônico] : relato de estudo experimental / Maiara Santos Gonçalves. -1. ed. - Santa Cruz do Sul : EDUNISC, 2019. Dados eletrônicos. Texto eletrônico. Modo de acesso: www.unisc.br/edunisc Inclui bibliografia. ISBN: 978-85-7578-501-0 1. Otologia. 2. Otologia - Pesquisa. 3. Audiologia. I. Título. CDD: 617.8
-------	---

Bibliotecária responsável: Muriel Thürmer – CRB10/1558



AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da UFSM.

À equipe que possibilitou a realização deste estudo experimental, atuando com *expertise* em todas as fases do seu desenvolvimento:

Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira, do Departamento de Morfologia da UFSM; orientador deste estudo;

Prof. Dr. Miguel Angelo Hyppolito, do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP-USP, co-orientador deste estudo;

Adriana de Andrade Batista Muraschima, bióloga, e Maria Rossato, técnica de laboratório, do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP-USP, técnicas d laboratório.

Às equipes dos Laboratórios de Microscopia Eletrônica, Microscopia Confocal e Neurobiologia da Audição da FMRP – USP.

À equipe do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP – USP.



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	aldeído 4-hidroxinonenal
Apaf-1	fator ativador da protease na apoptose 1
Bax	bcl-2 homologus antagonist bcl-x
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovine Serum Albumine (Albumina de soro bovino)
CASPASE	cysteine-aspartic-acid-proteases
CAT	catalase
CCE	célula ciliada externa
CCI	célula ciliada interna
CDDP	<i>Cis</i> -diaminodicloroplatina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dB	decibel
dBNA	Decibel em Nível de Audição
DL	dose letal
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EOAPD	Emissões Otoacústicas Produto de Distorção
ERO	espécie reativa de oxigênio
et al.	E colaboradores
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
g	Gramas
GSH	glutathiona reduzida
GSH-Px	glutathiona peroxidase
GSH-R	glutathiona redutase
h	hora
Hz	Hertz
Kg	Kilograma
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
ml	Mililitros
ms	Milissegundos
NAC	N-acetilcisteína



NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase
$O_2^{\cdot-}$	Radical superóxido
°C	Graus Celsius
OH \cdot	radical hidroxila
PBS	phosphate buffered saline
PEATE	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
®	Marca registrada
s	Segundos
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SOD	superóxido dismutase
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRP	Transient Receptor Potencial
TRPV1	Transient Receptor Potencial Vanilloid 1
USP	Universidade de São Paulo



SUMÁRIO

PREFÁCIO	
Aron Ferreira da Silveira.....	10
APRESENTAÇÃO.....	11
1 ASPECTOS TEÓRICOS.....	14
1.1 Efeitos clínicos da ototoxicidade da cisplatina.....	14
1.2 Mecanismo de ação da cisplatina.....	15
1.3 Apoptose: a morte celular provocada pelas EROs na cóclea.....	18
1.4 Otoproteção da N-acetilcisteína e o papel da enzima glutathione peroxidase.....	21
1.5 Parâmetros das Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção (EOAPD) e do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) em modelo animal.....	23
2 ASPECTOS METODOLÓGICOS DO ESTUDO.....	27
2.1 A população estudada.....	27
2.2 Os fármacos e anticorpos utilizados.....	28
2.3 Os grupos estudados.....	29
2.4 Descrição dos procedimentos utilizados para a coleta de dados.....	31
2.4.1 Reflexo de Preyer.....	31
2.4.2 Avaliação Fisiológica da audição por Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção (EOAPD).....	31
2.4.3 Avaliação eletrofisiológica da audição por Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE).....	32
2.4.4 Análise anatômica das células ciliadas externas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	33
2.4.5 Preparação histológica.....	34
2.4.6 Imunofluorescência.....	36
2.4.7 Microscopia Confocal.....	36
2.5 Logística dos experimentos.....	36
2.5.1 Experimento A.....	36
2.5.2 Experimento B.....	37
2.5.3 Fluxograma - Experimento A.....	38
2.5.4 Fluxograma - Experimento B.....	39
2.6 Metodologia estatística empregada.....	40
3 RESULTADOS ENCONTRADOS.....	41



3.1 Resultados do experimento A.....	41
3.1.1 Avaliação do comportamento clínico.....	41
3.1.2 Avaliação funcional da audição.....	42
3.1.2.1 Emissões otoacústicas evocadas produto de distorção - EOAPD.....	42
3.1.2.2 Potencial evocado auditivo de tronco encefálico - PEATE.....	48
3.2 Resultados do experimento B.....	51
3.2.1 Avaliação do comportamento clínico.....	52
3.2.2 Avaliação funcional da audição.....	53
3.2.2.1 Potencial evocado auditivo de tronco encefálico - PEATE.....	53
3.2.3 Avaliação anatômica das células ciliadas externas - Microscopia eletrônica de varredura.....	57
3.2.4 Avaliação da enzima glutathiona peroxidase - Imunofluorescência.....	60
4 DISCORRENDO SOBRE OS RESULTADOS.....	68
4.1 Resultados clínicos.....	68
4.2 Avaliação funcional da audição.....	70
4.3 Avaliação anatômica das CCE.....	73
4.4 Imunofluorescência.....	74
4.4.1 Otoproteção da NAC e enzima GSH-Px.....	74
5 DESFECHO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78



PREFÁCIO

Esta obra é originada de uma tese de doutorado e traz o relato de uma pesquisa experimental desenvolvida na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS) em conjunto com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP-SP). É destinada aos profissionais que atuam no campo da pesquisa otológica experimental, além daqueles que têm interesse na área da Audiologia.

O eixo do estudo está na ototoxicidade da cisplatina em ratos, sendo utilizados exames que avaliam a integridade anatômica e funcional das células ciliadas externas, a função da via auditiva e a expressão da enzima glutathiona peroxidase. Os resultados encontrados apontam para a necessidade de uma reflexão sobre as doses de cisplatina utilizadas com a finalidade de provocar a lesão celular para a investigação da ação de otoprotetores. Ainda, verificou-se um interessante resultado sobre a expressão da enzima glutathiona peroxidase nas células ciliadas externas através de imunofluorescência, até então desconhecido no cenário acadêmico.

Os detalhes metodológicos da pesquisa, assim como dos exames utilizados, estão expostos com clareza, permitindo a sua reprodutibilidade em outros estudos.

Aron Ferreira da Silveira
Médico Veterinário
Doutor em Medicina Veterinária
Professor Titular do Departamento de Morfologia
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS).



APRESENTAÇÃO

O regime terapêutico baseado em cisplatina é considerado padrão ouro para o tratamento de uma variedade de tumores sólidos. Os seus efeitos colaterais são variados e dependem da dose praticada, porém, a ototoxicidade tem elevada incidência e se manifesta clinicamente com perda auditiva neurosensorial, bilateral e irreversível. A presença da cisplatina no tecido coclear deflagra uma série de eventos nocivos, havendo principalmente uma sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) que causam lesões estruturais e funcionais às células. Tais lesões, quando não reparadas pelo sistema de defesa, despertam a via de morte celular por apoptose.

Outros efeitos colaterais incluem a nefrotoxicidade, a neurotoxicidade, a toxicidade no trato gastrointestinal e na medula óssea (mielossupressão) (McKEAGE, 1995; GARCÍA-BERROCAL *et al.*, 2007).

No sistema auditivo, existem mecanismos distintos pelos quais a cisplatina provoca lesão e desperta a via de morte celular. O mais discutido atualmente refere-se à geração de radicais livres, mais especificamente as espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam lesões e podem conduzir a célula à morte por apoptose.

Radical livres são átomos, moléculas ou íons que contém um ou mais elétrons não emparelhados na órbita mais externa, sendo este estado químico extremamente instável e reativo (EVANS; HALLIWELL, 1999). Apesar de apresentarem um papel biológico fundamental, estes radicais possuem também um potente efeito oxidante, subtraindo elétrons de outras moléculas que com eles interagem e as convertendo em outros radicais livres, propagando a cadeia de danos através de um efeito cascata. É o chamado estresse oxidativo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

As células, incluindo as da cóclea, apresentam um sistema antioxidante endógeno composto pela glutathiona e as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GSH-R) (RYBAK *et al.*, 2009). Quando não controladas por este sistema de defesa, as EROS provocam alterações na membrana plasmática, nas proteínas e no DNA (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). Já na década de 1980, Pierson e Gray citavam que a cóclea contém níveis significativos de SOD, CAT, GSH-Px e glutathiona S-transferase, o que sugere que esta estrutura da orelha interna, assim como todos os tecidos do corpo humano, requer proteção antioxidante (PIERSON; GRAY, 1982).

A cisplatina acumulada no tecido coclear integra-se ao DNA e causa disfunção na síntese de proteínas e enzimas. Com este acúmulo, há um aumento de EROS associado a um sistema antioxidante prejudicado (RYBAK *et al.*, 2000). Dessa forma,



este agente antineoplásico age na célula reduzindo os níveis de enzimas antioxidantes endógenas e ativando a cascata apoptótica.

Histologicamente, os danos causados pela cisplatina podem ser observados em todas as estruturas do labirinto membranoso, incluindo as células ciliadas externas (CCEs), células ciliadas internas (CCIs), células de sustentação, estria vascular, gânglio espiral, ligamento espiral e limbo espiral (FREITAS *et al.*, 2009).

Clinicamente, a ototoxicidade se manifesta com perda auditiva neurosensorial, bilateral, irreversível e com zumbido associado, comprometendo primeiramente as altas frequências e progredindo para as baixas (CASARES *et al.*, 2012). A incidência de perda auditiva nas altas frequências foi observada em 50% de crianças (STAVROULAKI *et al.*, 2001) e em 100% de adultos (GARCIA; IÓRIO; PETRILLI, 2003) tratados com cisplatina.

Frente à ototoxicidade da cisplatina, o grande desafio tem sido descobrir e viabilizar uma substância com ação otoprotetora que não interfira no seu efeito citotóxico nas células tumorais. Estudos investigam esta ação em algumas substâncias, obtendo resultados positivos e promissores. Como exemplo, cita-se a D-metionina (CAMPBELL *et al.*, 1996), a fosfomicina (JORDAN; SCHWADE; TRUELSON, 1999), o tiosulfato de sódio (MULDOON *et al.*, 2000), o extrato de Ginkgo Biloba (HYPPOLITO *et al.*, 2003; HUANG; WHITWORTH; RYBAK, 2007), a vitamina E (KALKANIS; WHITWORTH; RYBAK, 2004), a amifostina (HYPPOLITO *et al.*, 2005), o alopurinol (LYNCH *et al.*, 2005), o licopeno (ÖZKIRIS *et al.*, 2013), a N-acetilcisteína (FEGHALI; LIU; VAN DE WATER, 2001; FETONI *et al.*, 2009; RIGA *et al.*, 2013), entre outros.

Dentre estes diversos otoprotetores já estudados, a N-acetilcisteína (NAC) foi selecionada para este estudo pelo seu potencial efeito antioxidante (FEGHALI *et al.*, 2001; Dickey *et al.*, 2004; RYBAK *et al.*, 2009; RIGA *et al.*, 2013). *In vitro*, a NAC inibiu a apoptose induzida pela cisplatina através da via de sinalização da caspase (WU; MULDOON; NEUWELT, 2005), e evidenciou proteção contra a ototoxicidade em ratos (DICKEY *et al.*, 2004) e humanos (RIGA *et al.*, 2013).

A NAC possui ação antioxidante e é precursora na síntese da glutatona intracelular, a qual atua como um “sequestrador” endógeno de radicais livres. Clinicamente, a NAC é utilizada como um agente mucolítico para desobstruir as vias aéreas e também como um antídoto contra a intoxicação por paracetamol (HOLDINESS, 1991). É um medicamento de larga aplicação clínica em humanos, de fácil acesso e baixo custo.

A glutatona (GSH, L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina), potencialmente sintetizada pela NAC, é um tripeptídeo presente em todas as células dos mamíferos (LEHNINGER, 2002), atuando direta ou indiretamente em diversos processos celulares, além de ser



o substrato da enzima glutationa peroxidase (GSH-Px), a qual faz parte do sistema antioxidante enzimático (MEISTER; ANDERSON, 1983).

Na orelha interna, a glutationa evidenciou proteção contra a ação citotóxica da gentamicina (GARETZ; ALTSCHULER; SCHACHT, 1994). Na década de 70 já se conhecia o seu importante papel em diversos processos celulares, incluindo detoxificação de xenobióticos e proteção contra EROs (JAKOBY, 1978; MEISTER; ANDERSON, 1983).

A NAC foi selecionada para o protocolo deste estudo por apresentar propriedades antioxidantes, combatendo a formação excessiva de radicais livres intracelulares ou motivando a produção de antioxidantes endógenos, como a enzima GSH-Px. Como o evento inicial que desperta as lesões e a consequente morte celular por apoptose é o estresse oxidativo, esta enzima age numa etapa precoce deste processo, no momento em que existe a tentativa de redução do grau da lesão por meio de mecanismos de neutralização dos radicais livres. Quando o estímulo nocivo se torna constante ou muito importante, a célula cruza o limiar de lesão reversível e se programa para morrer.

Apesar de ter sido encontrada vasta literatura sobre os efeitos otoprotetores da NAC, não foram encontrados estudos sobre a ação da NAC nas células ciliadas externas da cóclea por meio da combinação de avaliação da função auditiva, avaliação anatômica das CCEs e expressão da enzima GSH-Px.

Acredita-se que haja uma contribuição para o esclarecimento dos eventos de ototoxicidade da cisplatina e otoproteção da NAC, incentivando outros estudos clínicos deste otoprotetor em humanos e auxiliando a tomada de medidas preventivas à ototoxicidade durante o tratamento quimioterápico com cisplatina.

Maiara Santos Gonçalves
Doutora em Distúrbios da Comunicação Humana pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).



1 ASPECTOS TEÓRICOS

Neste capítulo estão expostos os trabalhos científicos que foram consultados para embasar os princípios desta obra e que também nortearem a discussão dos resultados. Compuseram esta revisão livros clássicos da área e artigos científicos publicados em periódicos nacionais e internacionais.

Ressalta-se que foi respeitada a nomenclatura utilizada pelo autor do trabalho e optou-se por ordenar as citações conforme o encadeamento de ideias.

1.1 Efeitos clínicos da ototoxicidade da cisplatina

A cisplatina (*Cis*-diaminodicloroplatina II-CDDP) é um agente quimioterápico usado no tratamento de tumores sólidos como o ovariano, o testicular, o pulmonar, o cervical e os de cabeça e pescoço (RYBAK *et al.*, 2009). É frequentemente usada em adultos e crianças pela sua eficiente ação antineoplásica, porém provoca reações colaterais como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade no trato gastrointestinal, na medula óssea (mielossupressão) e ototoxicidade (McKEAGE, 1995; GARCÍA-BERROCAL *et al.*, 2007).

A nefrotoxicidade pode ser diminuída com a hiper-hidratação, assim como os outros efeitos colaterais podem ser amenizados com doses fracionadas da medicação (ILHA *et al.*, 2007). No entanto, inexitem tratamentos clínicos comprovadamente eficazes para a prevenção ou controle da ototoxicidade (RYBAK *et al.*, 2009), embora terapias com uso de antioxidantes tenham se mostrado benéficas em modelos animais (RYBAK; KELLY, 2003) e em humanos (RIGA *et al.*, 2013).

Os danos ao sistema auditivo acontecem tanto com doses agudas elevadas como com doses cumulativas. A perda auditiva é do tipo neurossensorial, bilateral, irreversível e com zumbido associado (CASARES *et al.*, 2012). Em função do arranjo tonotópico da cóclea, as altas frequências são afetadas primeiro (DICKEY *et al.*, 2005; CASARES *et al.*, 2012), uma vez que os danos às células ciliadas externas (CCEs) progridem da base para o ápice da cóclea e da terceira para a primeira fileira destas células (KAMIMURA *et al.*, 1999; KALKANIS; WHITWORTH; RYBAK, 2004; HYPOLITO *et al.*, 2003; 2005), em seguida o dano acomete as células ciliadas internas (CCI) (HYPOLITO *et al.*, 2003; 2005). No Entanto, as lesões não se limitam às células ciliadas, também acometem as células de sustentação, estria vascular, gânglio espiral, ligamento espiral, limbo espiral (FREITAS *et al.*, 2009b) e membrana vestibular de Reissner (CARDINAAL *et al.*, 2000).

Alguns fatores podem interferir na variabilidade e severidade da ototoxicidade provocada pela cisplatina, como idade do paciente, função renal, interação com



outras substâncias como antibiótico aminoglicosídeo e diuréticos, existência prévia de perda auditiva, duração e forma de infusão da cisplatina, além da dosagem cumulativa (SIMON *et al.*, 2002).

Considerando a dose de cisplatina utilizada, Van Ruijven *et al.* (2005) não observaram ototoxicidade na estria vascular de cobaias com a dose de 2mg/Kg/dia durante quatro, seis ou oito dias consecutivos, administrada com injeção intraperitoneal. Por outro lado, tanto dose única de 16 mg/Kg de cisplatina por infusão intraperitoneal (RYBAK *et al.*, 1999), como 8 mg/Kg/dia durante três dias por injeção intraperitoneal (FREITAS, 2006; YAZICI *et al.*, 2012) causaram danos às CCEs e à estria vascular. Dickey *et al.* (2004) consideram que a cisplatina aplicada via intra arterial causa ototoxicidade em doses baixas.

Com o objetivo de verificar a dose e a posologia de administração ideal de cisplatina para a obtenção de lesão coclear significativa, Ilha *et al.* (2007) estudaram 48 cobaias albinas fêmeas divididas em quatro grupos, assim organizados: grupo 1: dose única de 7,5 mg/kg; grupo 2: duas doses de 7,5 mg/kg/dia, no primeiro e quinto dia; grupo 3: 3 doses de 7,5 mg/kg/dia no primeiro, quinto e sexto dia; grupo 4: doses de 2,5 mg/kg/dia no primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto e sexto dia. Todas as doses foram aplicada via intraperitoneal. Os animais foram submetidos ao exame de EOAPD durante o tratamento com cisplatina e, depois de eutanasiados, tiveram suas cócleas analisadas por MEV. Os autores encontraram 70% de lesão nas células ciliadas externas no primeiro e segundo giros com a administração de 7,5 mg/kg/dia no primeiro, quinto e sexto dias. Ainda, esta administração, além de produzir maior perda de função auditiva, mostrou repercussões clínicas que não limitaram a manutenção dos animais por períodos de até 21 dias. Este regime de administração foi utilizado em estudo posterior com otoprotetores por Kasse *et al.* (2008).

Comparando as doses de 16 mg/Kg e 24 mg/Kg de cisplatina em ratos, Freitas (2006) identificou significativa maior marcação de apoptose na cóclea com a primeira dose. As estruturas analisadas foram as células ciliadas externas e internas, células de sustentação, estria vascular, ligamento espiral, limbo espiral e gânglio espiral.

1.2 Mecanismo de ação da cisplatina

O mecanismo de ação antitumoral da cisplatina envolve sua absorção pelas células cancerígenas e reação com alvos intracelulares (RYBAK, 2007). As quebras do DNA causadas pela cisplatina alteram a função da fita de DNA impedindo a replicação, induzindo a parada do ciclo celular em G2, inibindo a transcrição do RNA e promovendo a morte celular, principalmente através da apoptose. Porém, quando expostas a altas concentrações de cisplatina, a célula pode morrer por necrose (WANG; LIPPARD, 2005; CASARES *et al.*, 2012). Dessa forma, a ototoxicidade causada pela cisplatina envolve perda de células ciliadas da cóclea via necrose,



apoptose, ou por uma combinação de ambas. A necrose acontece em regiões do órgão de Corti que sofreram danos mais intensos. As características histológicas da necrose envolvem inchaço mitocondrial e nuclear, dissolução de organelas celulares e lise de células sensoriais cocleares afetadas com degradação desregulada do DNA. Ao contrário da apoptose, este tipo de morte celular acontece de forma muito rápida, sendo, portanto, difícil de ser revertida por meio do tratamento com otoprotetores (ESHLAGHI; BUBLIK; VAN DER WATER, 2006).

Por outro lado, a apoptose pode ser desencadeada pela formação de radicais livres intracelulares que conduzem a célula a um estado de estresse oxidativo, com peroxidação lipídica da membrana plasmática e alteração de enzimas e proteínas estruturais (CASARES *et al.*, 2012). Este tipo de morte celular é caracterizado pela sua auto regulação, sendo um processo mais lento e programado (RUBIN *et al.*, 2006).

Radicais livres são átomos, moléculas ou íons que contém um ou mais elétrons não emparelhados na órbita mais externa, sendo este estado químico extremamente instável e reativo. Os radicais livres possuem um potente efeito oxidante, subtraindo elétrons de outras moléculas que com eles interagem e as convertendo em outros radicais livres, propagando a cadeia de danos através de um efeito cascata, que é o chamado estresse oxidativo (EVANS; HALLIWELL, 1999).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são um tipo de radical livre derivado do oxigênio cujo papel no dano celular é bem conhecido. Eles são produzidos normalmente na célula durante a respiração mitocondrial e geração de energia, porém são degradados e removidos pelo sistema de defesa celular. Quando a produção de EROs aumenta ou o sistema de defesa não é efetivo, há um excesso destas espécies radiculares, levando a uma condição de estresse oxidativo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Além de serem formados pelo metabolismo celular normal (respiração mitocondrial), as EROs são produzidas por fontes exógenas como radiação solar, agentes químicos e metais pesados (OSTHOFF *et al.*, 1997). Já em 1982, Freeman e Capo referiram que os radicais livres podem ser formados por alguma disfunção biológica como processos inflamatórios, radiação, agentes quimioterápicos e por alguns antibióticos. São exemplos de EROs: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (HALLIWELL, 2001).

Para combater as EROs e manter os sistema oxidativo equilibrado, as células apresentam um sistema antioxidante endógeno. Este sistema é composto por enzimas com papel detoxificador que agem antes que ocorra a lesão celular, são elas: glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Com a função de reparar a lesão já causada pelas EROs, o sistema de defesa é formado por ácido ascórbico, glutathiona redutase (GSH-R),



glutathione peroxidase (GSH-Px), além de outros (ROSS e MOLDEUS, 1991). O sistema antioxidante da cóclea inclui a glutathione e as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione reductase (GSH-R) (RYBAK *et al.*, 2009).

Uma vez geradas e não controladas pelo sistema antioxidante, as EROs podem reagir com uma diversidade de componentes celulares causando alterações como peroxidação aléido lipídica das membranas, modificações oxidativas das proteínas e lesões ao DNA (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Na cóclea, a cisplatina acumula-se no tecido, integra-se no DNA e provoca disfunção na síntese de proteínas e em especial nas enzimas antioxidantes. Como a cóclea está numa posição anatômica isolada e é praticamente um sistema fechado, é incapaz de expulsar a toxina acumulada na mesma proporção e rapidez em que é gerada. Dessa forma, há uma sobrecarga de EROs associada a um sistema antioxidante prejudicado (RYBAK *et al.*, 2000). Esta condição provoca um aumento da peroxidação lipídica iniciando eventos que culminam com a apoptose de células ciliadas, células de sustentação, da estria vascular e do nervo auditivo (CAMPBELL; KALKANIS; GLATZ, 2000).

Estudos *in vitro* mostram que a exposição do neuroepitélio coclear à cisplatina produz espécies oxidantes e depleção da glutathione nas células ciliadas, seguido de morte destas (RAMÍREZ-CAMACHO *et al.*, 2004). A interação entre a glutathione e a cisplatina ocorre através da formação de complexos, ou seja, os íons de platina que entram na célula se unem à glutathione presente no citoplasma. A formação deste complexo limita a quantidade de droga disponível para a ligação ao DNA. Portanto, a depleção de glutathione mitocondrial deixa o DNA desprotegido contra o dano pela cisplatina (GARRIDO; PÉREZ-MARTOS; FARO *et al.*, 2008).

A degeneração da estria vascular está entre os primeiros eventos causados pela cisplatina na cóclea (LEE *et al.*, 2004), havendo um prejuízo na absorção e secreção de potássio na endolinfa e um comprometimento da homeostase metabólica das células ciliadas externas e internas, que sofrem lesões estruturais e funcionais (CASARES *et al.*, 2012).

A extensão e o grau das alterações histológicas e funcionais do sistema auditivo estão relacionados à dose de cisplatina administrada (DEVARAJAN; SAVOCA; CASTANEDA, 2002; RYBAK *et al.*, 2009). Em concentrações pequenas, a cisplatina promove apoptose, já em doses maiores pode levar à necrose celular, podendo esses dois mecanismos serem um *continuum* (DEVARAJAN; SAVOCA; CASTANEDA, 2002).

A morte celular por apoptose, que é benéfica em se tratando de uma neoplasia, é a base para a compreensão da toxicidade da cisplatina em tecidos sãos, como o tecido coclear (VAN RUJVEN *et al.*, 2005a).



A isoforma NOX3 do complexo enzimático NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase) é exclusivamente encontrada na orelha interna e parece contribuir significativamente para a geração de EROs na cóclea (MUKHERJEA *et al.*, 2008).

Em culturas organotípicas, quando é ativada pela cisplatina, a isoforma NOX3 da NADPH oxidase produz radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (RYBAK, 2007). O excesso desta ERO no tecido coclear pode reagir com óxido nítrico para gerar peroxinitrito e inativar proteínas (LEE *et al.*, 2004); formar radical hidroxila (OH^{\cdot}) na sua forma livre, na qual a interação com ferro reage com ácidos graxos insaturados na bicamada lipídica da membrana celular para gerar aldeído 4-hidroxinonenal (4-HNE), que é altamente tóxico e pode levar à morte celular. O aumento do 4-HNE está associado com o aumento do influxo de cálcio para as CCEs, levando à apoptose (IKEDA; SUNOSE; TAKASAKA, 1993). O ânion superóxido também pode inativar enzimas antioxidantes (PIGEOLET *et al.*, 1990) e causar migração da proteína Bax (pró-apoptótica) para o citoplasma, o que provoca a liberação do citocromo c da mitocôndria lesada e consequente ativação das caspases 9 e 3 (RYBAK *et al.*, 2009).

Além da peroxidação lipídica da membrana plasmática e dos efeitos no tecido coclear acima citados, as EROs podem também ativar e aumentar a expressão do TRPV1 (MUKHERJEA *et al.*, 2008). O receptor de potencial transiente V1, ou TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) é uma proteína membro da família de canais iônicos TRP (*Transient Receptor Potential*) expressa principalmente em neurônios de pequeno diâmetro (CATERINA *et al.*, 1997), além de tecidos não neuronais como o órgão de Corti (ZHENG *et al.*, 2003). O aumento da expressão do TRPV1 contribui para a morte celular pelo aumento (e consequente sobrecarga) do influxo de cálcio na célula através destes canais e ativação das caspases (CASARES *et al.*, 2012; MUKHERJEA *et al.*, 2008).

1.3 Apoptose: a morte celular provocada pelas EROs na cóclea

O órgão de Corti é um epitélio sensorial formado por um arranjo altamente ordenado de células sensoriais ciliadas e células não sensoriais de suporte. As células ciliadas estão conectadas diretamente aos neurônios primários no gânglio espiral e não têm capacidade de regeneração, portanto a perda destas células resulta em perda auditiva permanente (POIRRIER *et al.*, 2010).

A apoptose é uma via de morte induzida por um programa celular altamente regulado (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). É um tipo de morte celular programada ou “suicídio” celular e pode ser despertada em diversas situações fisiológicas, por exemplo, quando ocorre em células que não têm mais utilidade, durante a embriogênese, ou um mecanismo de autodefesa, quando células infectadas por patógenos ou com alterações genéticas se autodestroem (RUBIN *et al.*, 2006).



A apoptose das células da cóclea pode ser motivada pela formação de complexos entre a cisplatina e o DNA da célula lesada, impedindo a progressão normal do ciclo celular (DEVARAJAN *et al.*, 2002). Ainda, o estresse oxidativo induzido pela droga desencadeia uma cascata de reações intracelulares que culmina na apoptose (RAVI; SOMANI; RYBAK, 1995).

As teorias sobre a gênese do estresse oxidativo pela cisplatina incluem o dano ao DNA, a interferência com o sistema de defesa antioxidante da glutathione ou o aumento da peroxidação de lipídios, o que leva a um aumento na entrada de cálcio e apoptose das células da cóclea (GARCÍA-BERROCAL *et al.*, 2007).

As características morfológicas e bioquímicas da apoptose envolvem fragmentação nuclear, condensação da cromatina, encolhimento celular, “borbulhamento” da superfície celular com manutenção da integridade da membrana, formação de corpos apoptóticos e proteólise (degradação de proteínas por enzimas). Os restos da célula são fagocitados por células vizinhas ou por macrófagos (HUANG *et al.*, 2000).

Há alguns anos as proteases intracelulares específicas pertencentes à família das caspases são investigadas como efetoras cruciais da apoptose (ADAMS; CORY, 1998).

As caspases (cysteine-aspartic-acid-proteases) são proteases baseadas em cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico (STRASSER; O’CONNOR; DIXIT, 2000) e são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios (pró-caspase) (HENGARTNER, 2000). A família das caspases pode ser dividida funcionalmente em caspases iniciadoras e caspases efetoras, dependendo da ordem em que são ativadas durante a apoptose. As iniciadoras incluem as caspases 8 e 9; as efetoras incluem as caspases 3, 6 e 7, dentre outras (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

As pró-caspases são ativadas em caspases por clivagem proteolítica quando a célula recebe um sinal de morte (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). Uma vez ativadas, atuam em um efeito cascata, ou seja, as caspases iniciadoras ativam as caspases efetoras que, por sua vez, atuam na fragmentação do DNA (SHARIFIA *et al.*, 2009).

O processo apoptótico pode ser desencadeado por duas vias, uma extrínseca (citoplasmática) e outra intrínseca (mitocondrial), ambas convergentes para a ativação das caspases efetoras (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Além disso, tais vias podem ser classificadas de acordo com o tipo de pró-caspase que é ativada. Na via extrínseca, a ativação da pró-caspase 8 (iniciadora) resulta da sinalização do receptor de morte celular, como Fas e TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1). Por outro lado, na via intrínseca, a ativação da pró-caspase 9 (iniciadora) é dependente principalmente da via de sinalização mitocondrial regulada por membros da família Bcl-2 (HARRIS; THOMPSON, 2000). A família Bcl-2 é composta por 25 membros anti e



pró-apoptóticos (BORNER, 2003). Essas proteínas estão localizadas no lado externo da membrana mitocondrial, no envelope nuclear e no retículo endoplasmático das células (LORO; VINTERMYR; JOHANNESSEN, 2003).

A ativação dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como Bax, pode desencadear uma sequência de eventos que levam a alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial com liberação de citocromo c (proteína ativadora de caspase) para o citoplasma, que se liga a outra proteína: o fator ativador da protease na apoptose 1 (Apaf-1), formando um complexo proteico – apoptossomo - que irá ativar a pró-caspase 9 (GOLDSTEIN *et al.*, 2000). Uma vez ativadas, ambas as caspases 8 e 9 participam de uma cascata de eventos que culmina na ativação da caspase 3, que cliva vários substratos resultando em fragmentação do DNA e alterações morfológicas celulares características de apoptose (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). Em contrapartida, a proteína Bcl-2, membro anti-apoptótico da família Bcl-2, favorece a sobrevivência celular impedindo o escape do citocromo c para o citoplasma, possivelmente pela formação de heterodímeros com moléculas pró-apoptóticas, como a Bax (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999), impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial externa e, assim, inibindo a apoptose (TAYLOR *et al.*, 2008).

A diminuição da transcrição da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e o aumento da transcrição da pró-apoptótica Bax são mediados pelo gene p53. Este é um gene supressor de tumor que é acumulado na célula quando o DNA é danificado, causando a suspensão do ciclo celular na fase G1 (produção de enzimas necessárias para a produção de DNA, outras proteínas e RNA) e proporcionando o reparo do DNA. Porém, se este reparo falhar, o p53 desencadeia a apoptose estimulando a transcrição de proteínas pró-apoptóticas e diminuindo a transcrição de proteínas anti-apoptóticas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A disfunção mitocondrial que deflagra o processo apoptótico pela via intrínseca pode ser causada por sinais de estresse intracelular resultante de lesão do DNA, toxinas, estresse oxidativo, entre outros (PARONLIN; REASON, 2001).

Devarajan *et al.* (2002) confirmaram o envolvimento das vias extrínseca e intrínseca na apoptose induzida pela cisplatina em modelo de células auditivas cultivadas *in vitro*. Também Liu *et al.* (1998) e Cheng *et al.* (2005) demonstraram o papel da apoptose como mecanismo de morte celular pela cisplatina. Alam *et al.* (2000) identificaram células apoptóticas em todas as estruturas da cóclea após a administração de cisplatina, incluindo células ciliadas externas e internas, células de sustentação, gânglio coclear, estria vascular e ligamento espiral. O aumento da expressão da proteína Bax e diminuição da Bcl-2 encontrado no estudo sugere a importância da família de proteínas Bcl-2 no controle da apoptose em consequência da cisplatina.



1.4 Otoproteção da N-acetilcisteína e o papel da enzima glutathiona peroxidase

A irreversibilidade da perda auditiva causada pela exposição à cisplatina despertou o interesse de pesquisadores no sentido de viabilizar uma droga que, administrada concomitantemente à cisplatina, causasse um efeito protetor nas células da orelha interna.

As células apresentam defesa antioxidante contra os radicais livres, incluindo enzimas de detoxificação e varredores exógenos de radicais livres, como as vitaminas. As principais enzimas que convertem os radicais livres em moléculas menos reativas são a superóxido dismutase, catalase e GSH-Px (STRAYER; RUBIN, 2012).

Os otoprotetores exógenos, incluindo antioxidantes contendo tiol (compostos que contém enxofre), agem de forma precoce limpando os radicais livres e impedindo o início da via de morte celular. São exemplos: tiosulfato de sódio, D- ou L-metionina, dietilditiocarbamato, ácido metilbenzoico, ácido lipoico, N-acetilcisteína, trioponina, glutathiona ester e amifostina (RYBAK; WHITWORTH, 2005). Rybak *et al.* (2009) referem que a alta afinidade do enxofre com a platina constitui a base para os compostos contendo tiol serem amplamente utilizados em pesquisas envolvendo a toxicidade da cisplatina.

O mecanismo de ação dos otoprotetores pode ser por meio da interação direta com a cisplatina; deslocamento da platina do seu sítio tóxico; prevenção da interação entre a platina e a enzima superóxido dismutase e impedimento da formação de radicais livres intracelulares (SMOORENBURG *et al.*, 1999). Alguns otoprotetores são incompatíveis com a cisplatina uma vez que reduzem o seu potencial antineoplásico. Dickey *et al.* (2005) sugerem que a via e o momento de administração do quimioterápico e do otoprotetor devem ser diferentes na tentativa de manter a eficácia antitumoral.

Em contato com a cisplatina, as CCEs são submetidas a um estresse oxidativo gerado pelo excesso de EROs intracelular, os quais interagem com os fosfolípidos da membrana destas células, causando peroxidação aldeído lipídica. Portanto, para que ocorra a otoproteção deve haver a prevenção da formação de oxigênio reativo ou a neutralização dos produtos tóxicos da peroxidação aldeído lipídica, ou ainda um bloqueio aos danos às células sensoriais que levam à apoptose (HUANG *et al.*, 2000).

Desde o estudo de Feghali *et al.* (2001), o efeito otoprotetor da NAC foi evidenciado em células ciliadas e neuronais (*in vitro*). Este medicamento é um agente mucolítico bem conhecido que é utilizado no tratamento de bronquite crônica e também como um antídoto contra a intoxicação por paracetamol (HOLDINESS, 1991).

A NAC é um tiol de baixo peso molecular que, por si só, possui ação antioxidante (WEIBROUM *et al.*, 2000), mas também é precursora na síntese da glutathiona intracelular, a qual atua como um “sequestrador” endógeno de radicais livres (OKADA



et al., 1997). Esta enzima está presente no citoplasma e na mitocôndria da célula (STRAYER; RUBIN, 2012).

Por não cruzar a barreira hematoencefálica, acredita-se que a NAC não interfira na eficácia do tratamento de tumores do sistema nervoso central (MULDOON *et al.*, 2000). *In vitro*, a NAC bloqueia a apoptose provocada pela cisplatina (WU; MULDOON; NEUWELT, 2005) e essa proteção química pode ser obtida sem interferência no efeito antitumoral (MULDOON *et al.*, 2000; NEUWELT *et al.*, 2004). O mecanismo de proteção da NAC pode ser devido à ligação direta com a molécula de platina, produzindo um complexo inativo (DICKEY *et al.*, 2004).

[...] a estrutura de sua molécula permite-lhe, além disso, atravessar facilmente as membranas celulares. No interior da célula, a acetilcisteína é desacetilada, ficando assim disponível a L-cisteína, aminoácido indispensável para a síntese da glutatona (GSH). A GSH é um tripeptídeo extremamente reativo que se encontra difundido por igual nos diversos tecidos dos organismos animais e é essencial para a manutenção da capacidade funcional e da integridade da morfologia celular, pois é o mecanismo mais importante de defesa intracelular contra os radicais oxidantes (tanto exógenos como endógenos) e contra numerosas substâncias citotóxicas. A acetilcisteína exerce um papel de importância fundamental na manutenção de níveis apropriados de GSH, contribuindo para a proteção das células contra agentes nocivos que, através da espoliação da GSH, exerceriam integralmente sua ação citotóxica (ACETILCISTEÍNA-EMS, 2013. Bula de remédio).

A glutatona é um tripeptídeo presente em todas as células dos mamíferos e apresenta um papel importante em diversos processos celulares, incluindo a detoxificação de xenobióticos e proteção contra EROs (MEISTER; ANDERSON, 1983).

A glutatona desempenha um papel crítico de manter os grupos tióis das proteínas em um estado reduzido e capazes de se ligar à cisplatina, e de proteger contra o estresse oxidativo através da desintoxicação dos oxidantes. A glutatona pode anular toxinas exógenas como a cisplatina através da formação de complexos. Os íons de platina que entram na célula se unem preferencialmente à glutatona e à metalotioneína¹, ambos presentes em concentração milimolar no citoplasma. A formação destes complexos limita a quantidade de droga disponível para a ligação ao DNA. Portanto, a depleção de glutatona mitocondrial deixa o DNA desprotegido contra o dano pela cisplatina (GARRIDO *et al.*, 2008).

¹ Metalotioneína é uma proteína de baixo peso molecular presente no citoplasma do córtex renal e fígado. É rica em resíduos de cisteína e faz ligações seletivas a metais pesados (DEMACHKI; BACCHI, 1998).



Além de ter função otoprotetora, a NAC previne a perda de peso causada pela cisplatina, possivelmente pela redução na toxicidade do trato gastrointestinal (DICKEY *et al.*, 2004).

Em ratos tratados com cisplatina, a ototoxicidade está associada à diminuição da atividade da enzima GSH-Px e glutathiona redutase, e aumento na atividade da enzima superóxido dismutase e catalase, sugerindo haver um aumento da geração de EROs cóclea com o sistema antioxidante prejudicado (RAVI; SOMANI; RYBAK, 1995; RYBAK; WHITWORTH; SOMANI, 1999).

Na cóclea, os diferentes tipos de células não compartilham da mesma vulnerabilidade às lesões causadas pelas EROs. Duas particularidades estão relacionadas aos danos causados pela cisplatina: primeiro, as CCEs da base da cóclea são intrinsecamente mais suscetíveis aos danos causados pelos radicais livres do que as CCEs do ápice; segundo, as células de sustentação têm considerável maior capacidade de sobrevivência do que as células sensoriais. Segundo Sha *et al.* (2001), os níveis de glutathiona são mais elevados nas CCEs do ápice da cóclea comparados às CCEs da base, o que sugere uma suscetibilidade diferencial à ação das EROs. Em 1996, Usami *et al.* já citavam que o mecanismo de proteção promovido por antioxidantes celulares endógenos como a glutathiona e enzimas como a superóxido dismutase ou GSH-Px, fornecem uma defesa primária contra os radicais livres e que este mecanismo de proteção pode ser distribuído diferentemente entre as células da cóclea.

1.5 Parâmetros das Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorsão (EOAPD) e do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) em modelo animal

O termo ‘emissões otoacústicas’ é utilizado para descrever os sons captados no conduto auditivo externo e que são gerados pela atividade fisiológica da cóclea. Sua presença no meato acústico é a evidência da transmissão retrógrada da energia vibracional da cóclea para a orelha externa (KEMP, 1978; KEMP, 1980).

As emissões otoacústicas (EOAs) são respostas de frequências específicas e geradas somente em bandas de frequências nas quais as células ciliadas externas da cóclea estão normais ou próximas do normal, simultaneamente fornecendo informações sobre diferentes partes da cóclea. (SOUSA *et al.*, 2008).

Foram primeiramente observadas por Kemp em 1978, que as definiu como a liberação de energia sonora na cóclea que se propaga na orelha média até alcançar o meato acústico externo. É um teste não invasivo que pode detectar precocemente



alterações funcionais da audição decorrentes de agentes ototóxicos. Esta relação se constitui porque as drogas ototóxicas exercem seus efeitos nocivos sobre as CCEs, e as emissões otoacústicas são dependentes da integridade das CCEs (HALL, 2000).

As EOAs são tradicionalmente classificadas conforme a ocorrência de estimulação externa, sendo denominadas espontâneas (EOAE) quando são captadas na ausência de estimulação; transientes (EOAT) quando são respostas obtidas a partir de breve estimulação da cóclea utilizando-se cliques ou *toneburst*; e produto de distorção (EOAPD), cujas respostas captadas representam sinais sonoros de fraca intensidade após a estimulação por dois tons puros (f_1 e f_2) (DURANTE, 2011).

Garcia, Lório e Petrilli (2003) referem que o teste de EOAPD é a forma mais eficaz de monitoramento auditivo em pacientes sob tratamento quimioterápico quando a audiometria tonal liminar não pode ser realizada.

Em modelos animais, em especial, as EOAPD são utilizadas como método de avaliação funcional da audição, pois possibilitam avaliar frequências agudas até 8 KHz, enquanto as emissões otoacústicas transientes (EOAT) avaliam somente até 4-5 KHz (SISTO *et al.*, 2007). Em ratos Wistar, estão presentes nas frequências entre 1 e 6 KHz (LOPEZ-GONZALEZ *et al.*, 2000), entre 3 e 8 KHz (YAZICI *et al.*, 2012), e entre 1,5 e 12 KHz (ÖZKIRIS *et al.*, 2013).

As EOAPD são evocadas por dois tons puros apresentados simultaneamente, e isso se baseia no fato de que a cóclea funciona como um sistema não linear, ou seja, quando dois tons puros são percebidos, ocorre a produção de outros tons ou produtos de distorção com frequências que não estavam no estímulo utilizado para evocá-las (SOUSA *et al.*, 2008).

Os estímulos utilizados para evocar as EOAPD são chamados de frequências primárias f_1 e f_2 , com f_1 mais baixa e f_2 mais alta ($f_2 > f_1$). A distância entre elas deve ter a razão de $f_2/f_1 = 1,22$ para gerar um produto ideal de distorção. Na clínica, utiliza-se o produto de distorção de frequência $2f_1 - f_2$ por serem as EOA de maior amplitude na cóclea humana. As emissões ocorrem na região de máxima vibração das ondas f_1 e f_2 próximas de f_2 , ou seja, a emissão registrada reflete a condição da cóclea na região próxima a f_2 , sendo esta a frequência de referência para EOAPD-GRAM, que tem como característica a intensidade constante dos estímulos. As intensidades são denominadas L1 e L2 para as frequências primárias f_1 e f_2 , respectivamente (BROWN; KEMP, 1984).

Estes parâmetros também são utilizados em pesquisas com modelos animais (HYPPOLITO *et al.* 2003; ILHA *et al.*, 2007; KASSE *et al.*, 2008; FREITAS, 2006; FREITAS *et al.*, 2009a; FREITAS *et al.*, 2009b).

A análise pode ser feita a partir da relação entre o nível da emissão em relação ao nível de ruído registrado, considerando-se presença de EOAPD quando esta relação sinal/ruído está acima de 6 dB (SOUSA *et al.*, 2008).



A sensibilidade das EOAPD na ototoxicidade por cisplatina em ratos foi avaliada por Freitas *et al.* (2009). Os autores citam que as EOA e os potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE) são os métodos ultimamente mais empregados para estudo da ototoxicidade por cisplatina em roedores.

O PEATE, por sua vez, é um potencial de curta latência amplamente utilizado na prática clínica por apresentar reprodutibilidade e geradores neurais bem definidos (MATAS; MAGLIARO, 2011). É analisado a partir da formação de sete ondas, sendo utilizado geralmente o estímulo clique, cuja energia sonora está mais concentrada na faixa de frequência de 2000 a 4000 Hz (PERSON *et al.*, 2005).

Tendo sua aplicação clínica a partir da década de 80 (HALL, 2000), Moller *et al.* (1981) propuseram a classificação dos sítios geradores das ondas do PEATE em humanos, sendo: onda I na porção distal ao tronco encefálico, onda II na porção proximal ao tronco encefálico, onda III no núcleo coclear, onda IV no complexo olivar superior, onda V no lemnisco lateral, onda VI no colículo inferior e onda VII no corpo geniculado medial. O diagnóstico leva em consideração o valor das latências absolutas e latências interpós das ondas I, III e V, e o limiar eletrofisiológico é obtido a partir do menor valor de intensidade no qual se observa a presença da onda V. Com este método é possível inferir sobre o limiar de audição psicoacústico, uma vez que este é diretamente proporcional ao limiar eletrofisiológico, além disso,

pode-se estabelecer a presença ou ausência de lesões da via auditiva ao nível de tronco encefálico pela análise do tempo de condução do estímulo entre locais mais proximais e distais da via auditiva retrococlear. (FREITAS, 2006).

Em roedores, os prováveis geradores das ondas são: onda I - nervo auditivo, onda II - núcleo coclear, onda III - complexo olivar superior, onda IV - lemnisco lateral e colículo inferior, onda V - corpo geniculado medial e radiações talamocorticais (HENRY, 1979).

Diferentemente do parâmetro em humanos, a pesquisa do limiar eletrofisiológico em ratos leva em consideração a menor intensidade de estímulo em que se evidencia a presença da onda II, já que esta onda é a última a desaparecer com a diminuição do estímulo acústico (FREITAS, 2006).

FREITAS *et al.* (2009a) referem que o PEATE é mais sensível do que as EOAPD na detecção da ototoxicidade por cisplatina em ratos.

Existe variabilidade nos parâmetros de execução deste exame. No quadro a seguir estão expostas as diferenças de parâmetros adotados na pesquisa do PEATE em roedores e em humanos. Foram inseridas pesquisas experimentais cujos animais foram expostos à cisplatina.



Quadro 1 - Comparação dos parâmetros do PEATE utilizados em roedores e humanos.

Parâmetro	Roedores	Humanos
Local dos eletrodos	Implantado (1), subdérmico (2-5), superfície (6)	Superfície (7-9)
Tipo de estímulo / polaridade	Clique não filtrado (1), clique de rarefação (5,6), clique (3), tone burst (2-5)	Clique alternado (7), clique de rarefação (8)
Número de aquisições	512 (1) , 500 a 1000 (3), 1024 (4), 700 (5), 1000 (6)	2048 (7), 2000 (8)
Velocidade de apresentação	10/s (1), 19,3/s (4), 15/s (5), 21,1/s (6)	19/s (7), 19,1/s (8,9)
Janela de análise	12 ms (4), 15ms (5,6)	10ms (8,9)
Filtro (banda passante)	32-3200 Hz (1); 20-5000 Hz (3); 30-1500 Hz (4); 0-3000 Hz (5)	100-3000 Hz (8); 100-1500 Hz (9)
Onda analisada para obtenção do limiar eletrofisiológico	II (1,2,5), III (2)	V (7-9)

Fonte: Elaboração da autora, conforme os seguintes autores:

- (1) AMSALLEM e ANDRIEU-GUITRANCOUT (1985);
- (2) KAMIMURA *et al.* (1999);
- (3) HATZOPOULOS *et al.* (2002);
- (4) DICKEY *et al.* (2004);
- (5) FREITAS (2006);
- (6) ZUCKI (2013);
- (7) ESTEVES *et al.* (2009);
- (8) MATAS, HATAIAMA e GONÇALVES (2011);
- (9) MATAS e MAGLIARO (2011).



2 ASPECTOS METODOLÓGICOS DO ESTUDO

Neste capítulo estão detalhadamente descritas as etapas metodológicas da pesquisa experimental realizada.

Foram realizados dois experimentos, denominados de A e B. Com o primeiro, o objetivo foi analisar o comportamento clínico e a função auditiva dos ratos frente à substância otoprotetora e a uma subdose de cisplatina. Estes animais foram submetidos ao teste de EOAPD e PEATE, antes e depois da administração das drogas. Os animais do segundo experimento foram submetidos a uma dose 2,6 vezes maior de cisplatina para a pesquisa da via de modulação da apoptose, e a uma dose triplicada de NAC para o estudo do mecanismo de otoproteção; além do estudo do comportamento clínico e auditivo funcional.

O manuseio dos animais se deu conforme as normas de ética para pesquisa em modelos animais, com cuidados especiais para a utilização do menor número destes e para manejo da dor e sofrimento. Todos os procedimentos realizados estiveram de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia² em animais entre outras providências, e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA, 2011).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP.

2.1 A população estudada

A população deste estudo foi constituída por ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus* - linhagem Wistar) selecionados do Biotério Central da FMRP-USP, com peso variando entre 240 e 300g, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período claro iniciado às 7h), mantidos em temperatura (19 a 23°C) e umidade (55% + - 15%) controladas e com livre acesso à água e alimento.

Para o experimento A, foram selecionados 19 animais, sendo 15 incluídos em dois grupos experimentais e quatro em dois grupos controles. Para o experimento B, foram selecionados 16 animais, sendo 10 divididos em dois grupos experimentais e seis em dois grupos controles.

² Eutanásia, do grego “eu” – bom - e “thanatos” – morte: constitui-se no modo humanitário de matar o animal, sem dor e com mínimo desconforto. Este termo foi adotado conforme recomendado pelas ‘Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA’ (2013).



Foram incluídos nos experimentos os animais com peso entre 240 e 300 gramas; Reflexo de Preyer presente (JERO; COLING; LALWANI, 2001); presença de EOAPD em todas as frequências estudadas (1000, 2000, 4000 e 8000 Hz) e em ambas as orelhas (somente no experimento A); limiar eletrofisiológico obtido por PEATE de até 25 dB NA em ambas as orelhas.

Foram excluídos da amostra os animais que, à visualização do meato acústico externo, apresentaram sinais de otite externa ou média aguda; cerúmen de difícil remoção; conduto auditivo muito estreito que impedisse a colocação da sonda para a realização dos testes funcionais de EOAPD e PEATE.

2.2 Os fármacos e anticorpos utilizados

A seguir estão descritas as drogas administradas nos animais, bem como os anticorpos utilizados no protocolo de imunofluorescência.

- Cisplatina

- Experimento A: Fauldcispla® solução injetável – Libbs Farmacêutica Ltda.
- Administração: 3mg/Kg/dia
- Experimento B: Tecnoplatin® solução injetável – Eurofarma Laboratórios Ltda.
- Administração: 8mg/Kg/dia

- N-acetilcisteína

- Experimento A: Fluimucil® xarope – Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda.
- Administração: 100mg/Kg/dia
- Experimento B: Acetilcisteína - Laboratório EMS
- Administração 300mg/Kg/dia

Por não terem sido encontrados na literatura pesquisada estudos com administração via oral de NAC em ratos, foi selecionada uma dose que não ultrapassasse à DL50, sendo esta indicada na bula do medicamento:

A acetilcisteína caracteriza-se por uma toxicidade particularmente baixa. Por via oral, a DL50 é superior a 10 g/Kg, tanto no camundongo como no rato.

- Solução salina fisiológica 0,9%

- Cloridrato de Cetamina

- Ketamin® 50mg/ml - Laboratório Cristália



- Cloridrato de Xilasina

- Dopaser® 20mg/ml - Laboratório Hertape Calier

Para a anestesia e analgesia dos animais foi utilizada a combinação de cloridrato de cetamina 10% (Ketamin® 50mg/ml, Laboratório Cristália) e cloridrato de xilazina (Dopaser® 200mg Laboratório Hertape Calier) na proporção de 2:1, respectivamente, via intramuscular, na dose de 10 a 15 ml para cada 100g de peso do animal. Os mesmos foram pesados diariamente para o ajuste das doses.

- Anticorpos para imunofluorescência: Abcam®, importado por Biogen Comercial e Distribuidora Ltda

- anticorpo policlonal de coelho anti glutathione peroxidase 1 (apresentação 100 µg);
- anticorpo secundário policlonal de cabra anti IgG - H&L (Alexa Fluor® 488), diluição 1:1000 (uma unidade do anticorpo diluído em 1000 µL de BSA 1% com PBS 0,1 molar);
- anticorpo secundário policlonal de cabra anti IgG - H&L (Alexa Fluor® 594), diluição 1:250 (uma unidade do anticorpo diluído em 250 µL de BSA 1% com PBS 0,1 molar).

2.3 Os grupos estudados

Os experimentos A e B diferenciaram-se conforme: a) o objetivo de cada estudo, b) o tipo de avaliação a que os animais foram submetidos e c) as doses de cisplatina e NAC utilizadas (Quadro 2).

Foi denominado período experimental aquele compreendido entre o primeiro e o último dia de administração das drogas, sendo de cinco dias para o experimento A e de três dias para o B. Os experimentos não foram realizados concomitantemente, sendo o experimento A realizado anteriormente ao B.

Os animais do experimento A realizaram os exames de otoscopia, EOAPD e PEATE 24h antes da primeira dose das drogas e 24h depois da última dose (no sexto dia). A cisplatina foi aplicada em uma subdose na intenção de assegurar a sobrevivência dos animais até o final da pesquisa. Foram aleatoriamente delineados em:



Grupo A

Grupo A1: controle negativo (n=2). Ratos tratados com solução fisiológica 0,9% via intraperitoneal no mesmo volume correspondente à dose de cisplatina (3mg/Kg/dia) durante cinco dias consecutivos.

Grupo A2: controle positivo (n=2). Ratos tratados com 100mg/Kg/dia de NAC via oral por gavagem durante cinco dias consecutivos.

Grupo A3: ototóxico (n=8). Ratos tratados com 3mg/Kg/dia de cisplatina via intraperitoneal durante cinco dias consecutivos.

Grupo A4: ototóxico com otoproteção (n=7). Ratos tratados com 100 mg/Kg/dia de NAC via oral por gavagem, uma hora antes da administração de 3 mg/Kg/dia de cisplatina via intraperitoneal, durante cinco dias consecutivos.

Grupo B

Os animais do experimento B realizaram os exames de otoscopia e PEATE 24 horas antes e 24 horas depois do período de três dias. Os mesmos receberam dose ototóxica de cisplatina e tiveram suas cócleas removidas e analisadas por meio de MEV, além de o tecido coclear ter sido submetido à imunofluorescência para investigação do marcador celular (GSH-Px). Foram aleatoriamente delineados em:

Grupo B1: controle negativo (n=3). Ratos tratados com solução fisiológica 0,9% via intraperitoneal no mesmo volume correspondente à dose de cisplatina (8mg/Kg/dia) durante três dias consecutivos.

Grupo B2: controle positivo (n=3). Ratos tratados com 300 mg/Kg/dia de NAC via oral por gavagem durante três dias consecutivos.

Grupo B3: ototóxico (n=5). Ratos tratados com 8 mg/Kg/dia de cisplatina via intraperitoneal durante três dias consecutivos.

Grupo B4: ototóxico com otoproteção (n=5). Ratos tratados com 300 mg/Kg/dia de NAC via oral por gavagem, uma hora antes da administração via intraperitoneal de 8 mg/Kg/dia de cisplatina, durante três dias consecutivos.



Quadro 2 - Delineamento dos grupos de estudo

Experimento A (período experimental = 5 dias)				Experimento B (período experimental = 3 dias)			
Objetivo							
Avaliar o comportamento clínico e função auditiva com uma subdose de CDDP.				Avaliar o comportamento clínico, a função auditiva, o mecanismo de otoproteção da NAC e a via de modulação da apoptose com uma dose ototóxica de CDDP.			
Avaliações realizadas							
Otoscopia / EOAPD / PEATE				Otoscopia / PEATE / MEV / imunofluorescência			
Divisão dos grupos							
A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
Solução fisiológica (mesmo volume da CDDP)	NAC 100mg	CDDP 3mg	NAC 100mg + CDDP 3mg	Solução fisiológica (mesmo volume da CDDP)	NAC 300mg	CDDP 8mg	NAC 300mg + CDDP 8mg

Fonte: Elaboração da autora.

CDDP = cisplatina (*Cis*-diaminodicloroplatina II); NAC = N-acetilcisteína, EOAPD = emissões otoacústicas evocadas produto de distorção; PEATE = potencial evocado auditivo de tronco encefálico; MEV = microscopia eletrônica de varredura.

2.4 Descrição dos procedimentos utilizados para a coleta de dados

2.4.1 Reflexo de Preyer

O reflexo de Preyer consiste na eliciação da reação de sobressalto em roedores mediante um estímulo sonoro, como o bater de palmas ou a apresentação de um som metálico. Ao apresentar o estímulo, observa-se a reação corporal e a movimentação do pavilhão auricular. A pesquisa deste reflexo é útil na identificação da perda auditiva profunda (JERO; COLING; LALWANI, 2001), à semelhança do reflexo cócleo-palpebral em humanos.

2.4.2 Avaliação fisiológica da audição por Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção (EOAPD)

Para verificar a integridade funcional das CCEs, foram coletadas as EOAPD dos animais do experimento A antes e depois do período experimental de cinco dias. O produto de distorção utilizado para análise foi o que ocorreu na relação de $2f_1-f_2$, na qual existe a razão 1,22 entre as frequências f_2/f_1 .

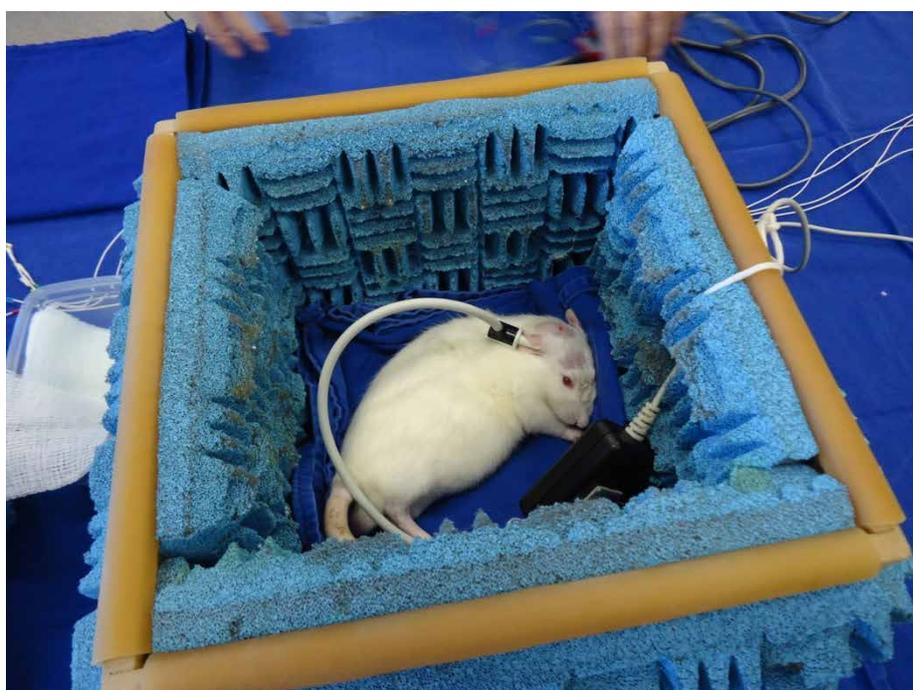


As f2 pesquisadas no *Dp-gram* foram 1105 Hz, 2211 Hz, 4416 Hz e 8837 Hz, com $L1=L2=70$ dBNPS. Para facilitar a leitura, as frequências foram descritas como 1000, 2000, 4000 e 8000 Hz.

A EOAPD foi considerada presente quando a relação sinal-ruído, calculada pela diferença em decibel entre a resposta das EOAPD e o ruído, foi maior do que 6 dB.

Este exame foi realizado no equipamento Smart DPOEA da *Intelligent Hearing Systems* - Miami-Flórida (E.U.A.), em ambiente silencioso e dentro de uma caixa com isolamento acústico (Figura 2).

Figura 1 - Imagem demonstrativa da realização da EOAPD em rato



Fonte: Acervo da autora.

2.4.3 Avaliação eletrofisiológica da audição por Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE)

Para a obtenção do limiar eletrofisiológico por meio do PEATE foi utilizado o equipamento Smart EP 3.86USBez (*Intelligent Hearing Systems*), com eletrodos de superfície e sondas de espuma. A aquisição foi ipsilateral, com tempo de análise de 12 ms e amostra de 1000 promediações, com replicação. O estímulo utilizado foi o *click* de 27.7/s emitido por fones de inserção modelo Ear Tone 3A, na polaridade alternada. Os filtros utilizados tiveram uma banda passante entre 50 e 1500 Hz. Os estímulos foram iniciados em 90 dB NA e diminuídos progressivamente até a menor intensidade de estímulo na qual se evidenciava a onda II. Em roedores, a



onda II apresenta maior robustez sendo, por isso, utilizada para determinar o limiar eletrofisiológico (FREITAS, 2006).

Os eletrodos de superfície foram posicionados no crânio do animal previamente sedado com cloridrato de cetamina e xilasina. Ressalta-se que esta medicação não interfere na obtenção do PEATE, pois este é um potencial exógeno.

Foi realizada tricotomia do crânio, limpeza da pele com esfoliante e aplicação de pasta eletrolítica nos eletrodos, os quais foram posicionados da seguinte maneira: eletrodo ativo na frente, eletrodos de referência no lóbulo direito e esquerdo e eletrodo terra no vértex do crânio (Figura 3).

O critério de alteração auditiva foi determinado pelo aumento significativo do limiar eletrofisiológico entre o pré e pós-tratamento.

Figura 2- Imagem demonstrativa da realização do PEATE em rato



Fonte: Acervo da autora.

2.4.4 Análise anatômica das células ciliadas externas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise anatômica das CCEs do órgão de Corti, uma cóclea de um rato de cada grupo foi preparada para ser analisada ao microscópio eletrônico de varredura. As mesmas foram dissecadas, parcialmente preparadas e fixadas pela base em um porta-espécime cilíndrico de metal com pasta condutiva de carbono (Figura 4). As estruturas foram então cobertas por uma fina camada de ouro de 24 quilates através do processo de evaporação com o equipamento BAL-TEC – SCD 050 – Sputter



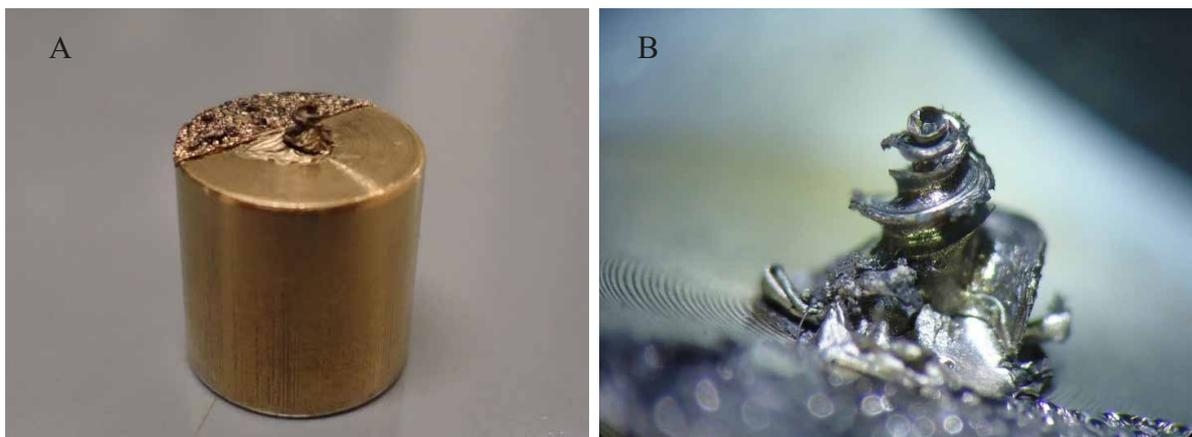
Coater (Balzers, Liechtenstein), tornando-se eletricamente condutivas.

Terminados os processos de preparação das estruturas, as mesmas foram levadas para análise à MEV com o equipamento JEOL Scanning Electron Microscope – JSM 5200, localizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica, FMRP-USP.

Como ratos possuem cóclea com duas voltas e meia, considerou-se como parâmetro da análise anatômica o terço médio da espira basal e da espira 2 (ou espira média). A espira apical foi excluída por apresentar um desarranjo natural do padrão 'W' dos estereocílios das CCEs, o que dificultaria a análise estrutural.

A condição de integridade ou lesão das CCEs foi definida pela análise dos estereocílios das mesmas. Células que apresentaram estereocílios com forma e disposição perfeitas foram consideradas íntegras (normais). Células com estereocílios ausentes, disformes ou em padrão de desarranjo foram consideradas lesadas (HYPPOLITO *et al.*, 2003; 2005).

Figura 3 - A: cóclea de rato fixada pela base em um porta-espécime cilíndrico de metal; B: visualização da cóclea ao microscópio óptico



Fonte: Acervo da autora.

2.4.5 Preparação histológica

A dissecação das cócleas foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental e a preparação histológica do material foi realizada no Laboratório Multiusuário de Histotecnologia, ambos na FMRP-USP.

Logo após a realização do PEATE, com os animais ainda anestesiados, foi aplicada uma dose letal de tiopental (Thionembutal®) e então realizada a decapitação. As bulas timpânicas foram removidas do segmento cefálico com uma tesoura de dissecação colocada posteriormente na coluna cervical, fazendo-se um corte longitudinal e mediano no crânio. Usando as mãos e tendo o conduto auditivo



externo como orientação, as bulas foram localizadas e removidas, expondo-se as cócleas. Com auxílio de microscópio óptico, estas tiveram suas janelas oval e redonda rompidas e seu ápice perfurado para que fosse injetado solução de fixação de glutaraldeído 3% (Figura 5, seta), sendo as mesmas mantidas nesta solução por 24h a 4°C. Então as cócleas receberam banhos de tampão fosfato (phosphate buffered saline - PBS; fosfato de sódio 100 Mm, NaCl 150 Mm, pH 7,4) para limpeza celular e foram submetidas à microdissecção (redução óssea mantendo os limites da cóclea). Depois as amostras foram descalcificadas em solução de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA, Laboratório Merck, Darmstadt, Alemanha) 8%, NaOH 0,55g (Laboratório Merck, Darmstadt, Alemanha) e água destilada 100 ml. Após a descalcificação, o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e álcool absoluto) e recebeu três banhos de 20 minutos de etanol a 100%, deixando-se as estruturas imersas no último banho à temperatura ambiente por 12 horas. Depois de desidratado, o mesmo foi submetido à diafanização com banhos de xilol. Em seguida, para eliminar completamente o xilol e facilitar a infiltração da parafina, o material foi passado em duas trocas de parafina fundida na temperatura de 60°C. Então, foi realizada a inclusão em parafina de maneira orientada, sendo as cócleas posicionadas para serem seccionadas ao micrótomo de forma longitudinal, ou seja, paralelos ao modíolo, numa espessura de 6 micra.

Depois de obtidas as secções seriadas do tecido na profundidade do modíolo (no mínimo três secções de cada cóclea), estas foram dispostas sobre a lâmina de vidro com água destilada em sua superfície. Em seguida, a lâmina foi colocada em platina aquecida para que o tecido pudesse distender e então esta ser levada à estufa aquecida a 60°C. Após, as lâminas foram submetidas ao protocolo de imunofluorescência.

Figura 4 - Bula timpânica de rato com orifício no ápice da cóclea para injeção de solução fixadora (seta)



Fonte: Acervo da autora.



2.4.6 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para marcar a enzima GSH-Px, sendo realizada no Laboratório Multiusuário de Histotecnologia da FMRP-USP

O preparo das lâminas seguiu o seguinte protocolo: 1) dois banhos de 10 minutos de xilol para eliminação da parafina; 2) hidratação com concentrações decrescentes de álcool etílico (álcool absoluto, 95%, 70%, 50%) e água destilada; 3) imersão em tampão citrato pH6 durante uma hora em banho-maria; 4) três banhos de cinco minutos com água destilada; 5) um banho de 30 minutos em tampão fosfato (PBS) e glicina; 6) bloqueio de uma hora em soro albumina bovina (BSA 2%) e Tween 20; 7) incubação *overnight* do anticorpo primário em câmara escura e úmida; 8) cinco banhos de cinco minutos em PBS, com as lâminas protegidas da luz; 9) incubação com anticorpo secundário durante uma hora em câmara escura e úmida; 10) cinco banhos de cinco minutos em PBS, com as lâminas protegidas da luz. Em seguida as lâminas foram cobertas com lamínula e armazenadas em geladeira. No dia seguinte foi dado início à análise ao microscópio confocal.

Para descartar a possibilidade de marcação inespecífica do anticorpo secundário, realizou-se um controle em que não foi incubado o anticorpo primário.

2.4.7 Microscopia Confocal

A análise das secções e aquisição das imagens de microscopia confocal foi realizada com o microscópio confocal Leica SP5 DM4000 B Led e software |Leica LAS - AF Lite, localizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal, FMRP-USP.

2.5 Logística dos experimentos

2.5.1 Experimento A

Primeiramente, no Biotério Central da FMRP-USP, os animais foram selecionados conforme o peso e a presença do reflexo de Preyer. No dia seguinte, depois de mantidos em repouso auditivo por 24 horas, foram submetidos à anestesia e analgesia via intramuscular, à realização da otoscopia e à pesquisa de EOAPD e PEATE. Houve, então, a formação dos grupos, sendo os ratos aleatoriamente separados em gaiolas e marcados com ácido pícrico para diferenciação no seu respectivo grupo.

No dia seguinte foi dado início ao protocolo de administração das drogas e da solução fisiológica. Durante o período experimental de cinco dias, o horário inicial do



experimento e a sequência de procedimentos foram respeitados: primeiramente os animais foram pesados e foi calculada a dose da cisplatina e da NAC. Os primeiros grupos a serem manipulados foram os grupos A2 e A4, que receberam NAC via oral por gavagem. Depois de uma hora, os grupos A3 e A4 receberam a dose de cisplatina via intraperitoneal e, por último, o grupo A1 recebeu a dose de solução fisiológica 0,9% via intraperitoneal.

Vinte e quatro horas depois da última aplicação das drogas e da solução fisiológica, portanto no sexto dia, os animais foram novamente anestesiados e analgésicos, sendo submetidos à otoscopia para excluir aqueles que tivessem adquirido doença de orelha externa e/ou média. Em seguida realizaram novamente os testes auditivos.

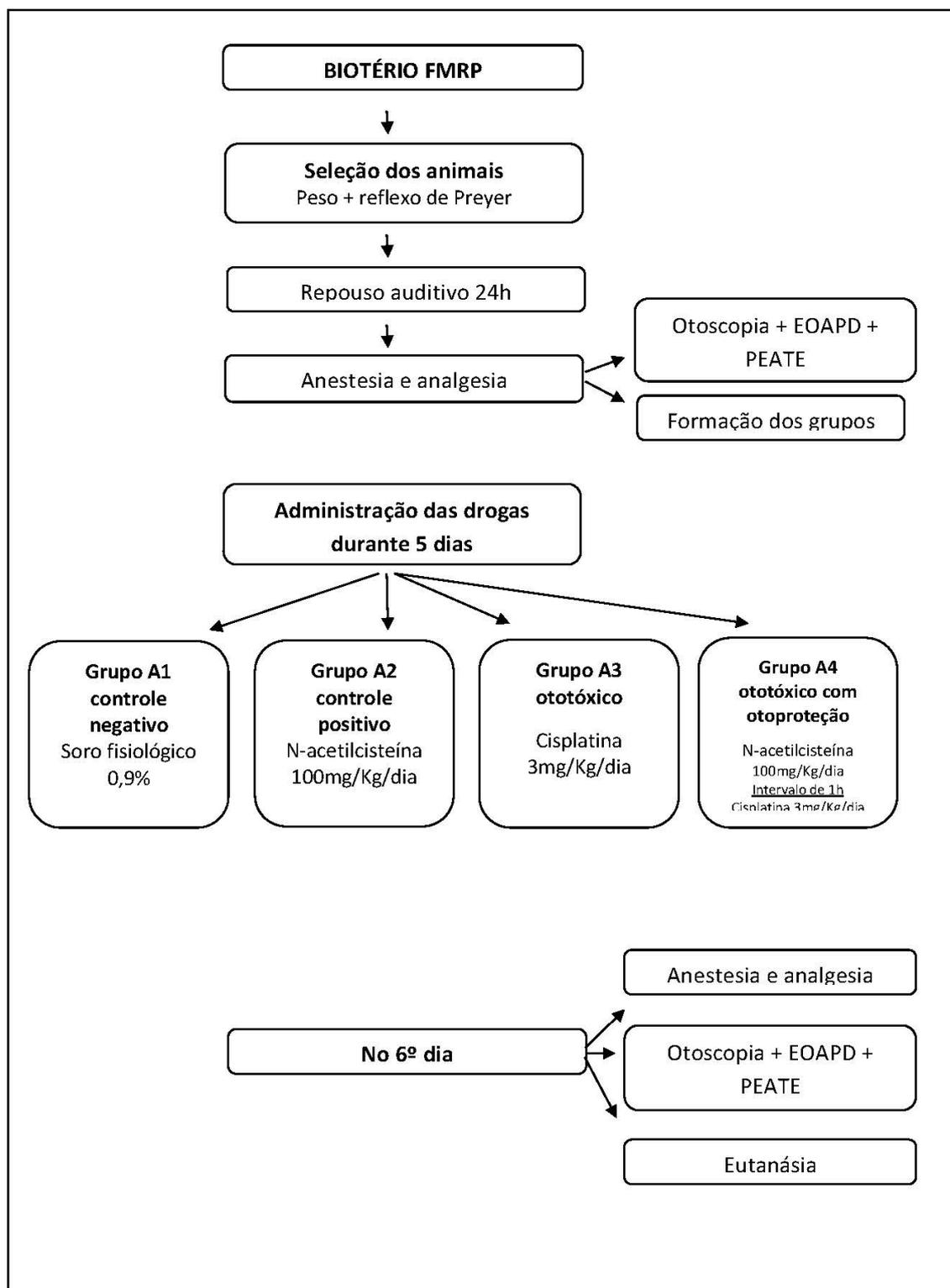
2.5.2 Experimento B

Os procedimentos no experimento B obedeceram à mesma sequência do experimento A. No entanto, a pesquisa da função auditiva foi por meio de PEATE, o período experimental foi de três dias e os animais foram eutanasiados por dose letal de tiopental (Thionembutal®) e decapitados. As bulas timpânicas foram removidas e preparadas para MEV e para imunofluorescência, conforme o protocolo de cada grupo.



2.5.3 Fluxograma – Experimento A

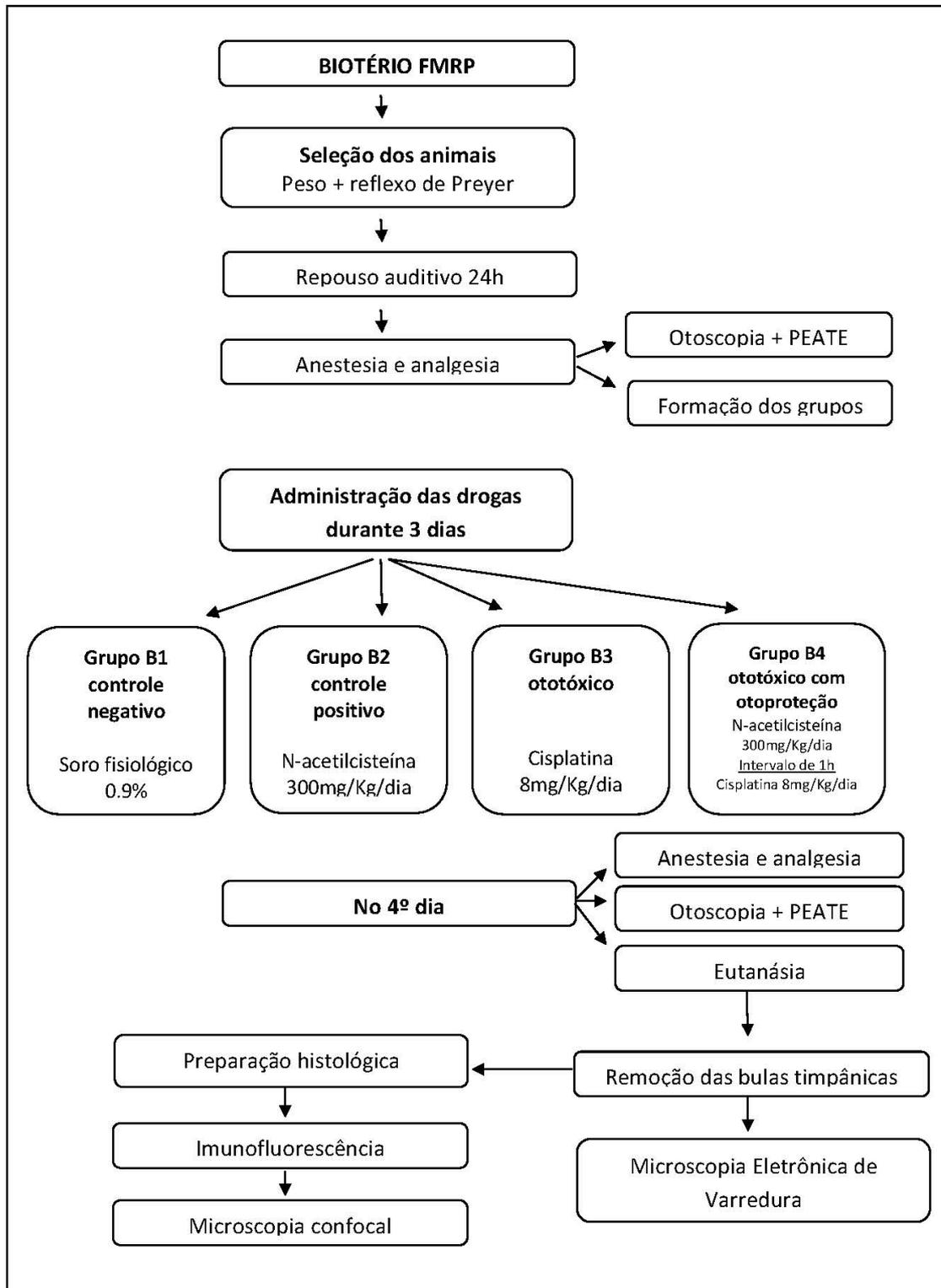
Figura 5 - Fluxograma da sequência de procedimentos realizados no experimento A



Fonte: Elaboração da autora.

2.5.4 Fluxograma – Experimento B

Figura 6 - Fluxograma da sequência de procedimentos realizados no experimento B



Fonte: Elaboração da autora.

2.6 Metodologia estatística empregada

Os resultados das EOAPD e do PEATE dos grupos controles A1, A2, B1 e B2 estão expostos de forma descritiva. Nos grupos experimentais A3 e A4, para comparar as médias da relação sinal-ruído das EOAPD em cada frequência, antes e após o tratamento, foi aplicado o Teste t de Student ou o teste de Wilcoxon, de acordo com a normalidade dos dados. Da mesma forma foi procedido nas análises envolvendo os resultados do limiar eletrofisiológico obtido pelo PEATE.

Para a comparação das médias da relação sinal-ruído das EOAPD entre os quatro grupos do experimento A, foi realizada Análise de Variância (ANOVA).

Na comparação entre os valores do limiar eletrofisiológico pré e pós-tratamento para orelhas diferentes nos grupos A3 e A4, B3 e B4, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney.

Quando houve agrupamento das orelhas direita e esquerda para a comparação entre os quatro grupos do mesmo experimento, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

A análise estatística foi processada pelo software SPSS 16.0 e o critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5% em todas as análises.



3 RESULTADOS ENCONTRADOS

Neste capítulo, primeiramente, estão expostos os resultados do comportamento clínico e avaliação funcional da audição obtida por EOAPD e PEATE, referentes ao experimento A. Em seguida, estão apresentados os resultados do comportamento clínico e dos procedimentos realizados nos animais do experimento B: avaliação funcional da audição por meio de PEATE, avaliação anatômica das CCEs com MEV e imunomarcagem da GSH-Px por imunofluorescência.

O comportamento clínico foi avaliado, principalmente, a partir da variação do peso dos animais.

3.1 Resultados do experimento A

Dos 19 animais incluídos, um foi a óbito antes do final do experimento e outro foi excluído por apresentar otite média. Ambos faziam parte do grupo A3. Dessa forma, os grupos ficaram assim divididos: A1 (n=2); A2 (n=2); A3 (n=6); A4 (n=7).

3.1.1 Avaliação do comportamento clínico

No decorrer do experimento foram observados sinais de toxicidade sistêmica. Em todos os animais do grupo A3 os sinais foram de queda de pêlos, diarreia e perda de peso. No grupo A4 todos manifestaram perda de peso e dois animais tiveram diarreia. Nos grupos A1 e A2 nenhum destes sinais foi observado.

Tabela 1- Média e desvio padrão do peso (em gramas) em função dos dias nos grupos A1, A2, A3 e A4

Grupos	DIAS					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
A1	Média (DP) 269 (9,90)	Média (DP) 284 (11,31)	Média (DP) 287 (9,90)	Média (DP) 295 (9,90)	Média (DP) 303 (12,73)	Média (DP) 321 (12,72)
A2	Média (DP) 257 (1,41)	Média (DP) 274 (8,49)	Média (DP) 278 (8,49)	Média (DP) 290 (14,14)	Média (DP) 300 (11,31)	Média (DP) 311 (12,73)
A3	Média (DP) 268 (17,20)	Média (DP) 256 (14,64)	Média (DP) 248 (17,52)	Média (DP) 234 (16,30)	Média (DP) 223 (19,74)	Média (DP) 209 (17,82)
A4	Média (DP) 274 (9,93)	Média (DP) 270 (10,16)	Média (DP) 260 (10,80)	Média (DP) 244 (10,80)	Média (DP) 229 (11,00)	Média (DP) 213 (12,37)

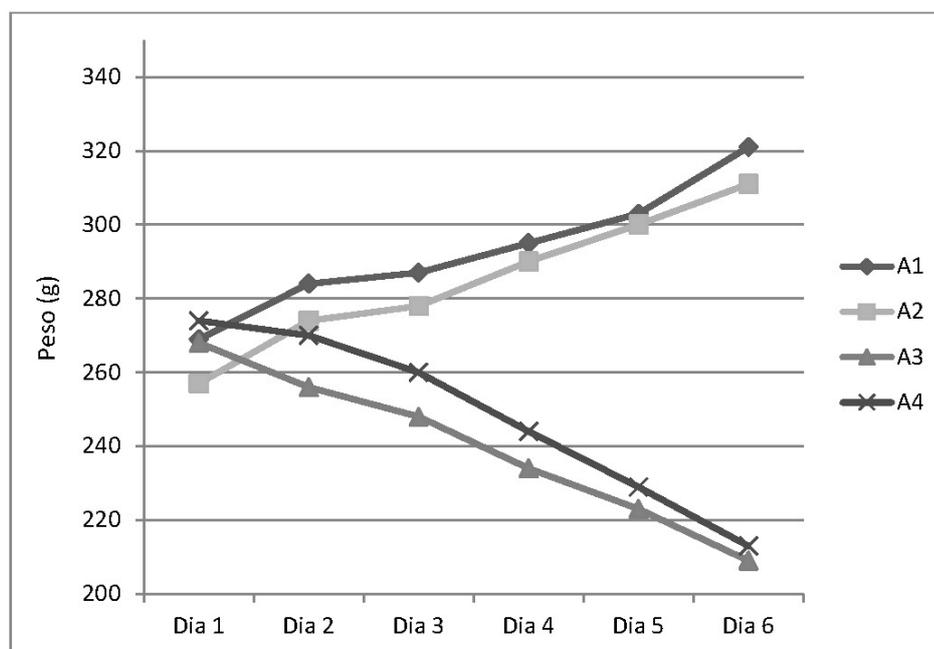
Fonte: Elaboração da autora.

DP – desvio padrão.



Com os resultados da Tabela 1, verificou-se um aumento de peso de 19% nos animais do grupo A1 e de 21% nos animais do grupo A2, entre o primeiro e o sexto dia do experimento. Já os animais dos grupos A3 e A4 tiveram igualmente uma redução no peso de 22%.

Figura 7 - Variação média do peso (em gramas) dos animais dos quatro grupos do experimento A, entre o primeiro e o sexto dia do experimento



Fonte: Elaboração da autora.

3.1.2 Avaliação funcional da audição

3.1.2.1 Emissões otoacústicas evocadas produto de distorção - EOAPD

Todos os animais apresentaram resposta ao exame de EOAPD (Figuras 8, 9, 10 e 11). O traçado do *DP-GRAM* apresentou maior amplitude nas frequências de 1000 e 2000 Hz, diminuindo em 4000 e 8000 Hz, conforme exemplos expostos neste item.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da relação sinal-ruído (em dB) das EOAPD do grupo A1 por frequência e orelha, antes e após o tratamento (n=2)

(continua)

Orelha / Frequência (Hz)	Pré-tratamento Média (DP)	Pós-tratamento Média(DP)
Orelha direita		
1000	62,0 (1,41)	52,0 (16,97)
2000	44,0 (1,41)	45,5 (3,53)
4000	27,0 (1,41)	26,5 (2,12)
8000	27,0 (1,41)	18,5 (13,43)

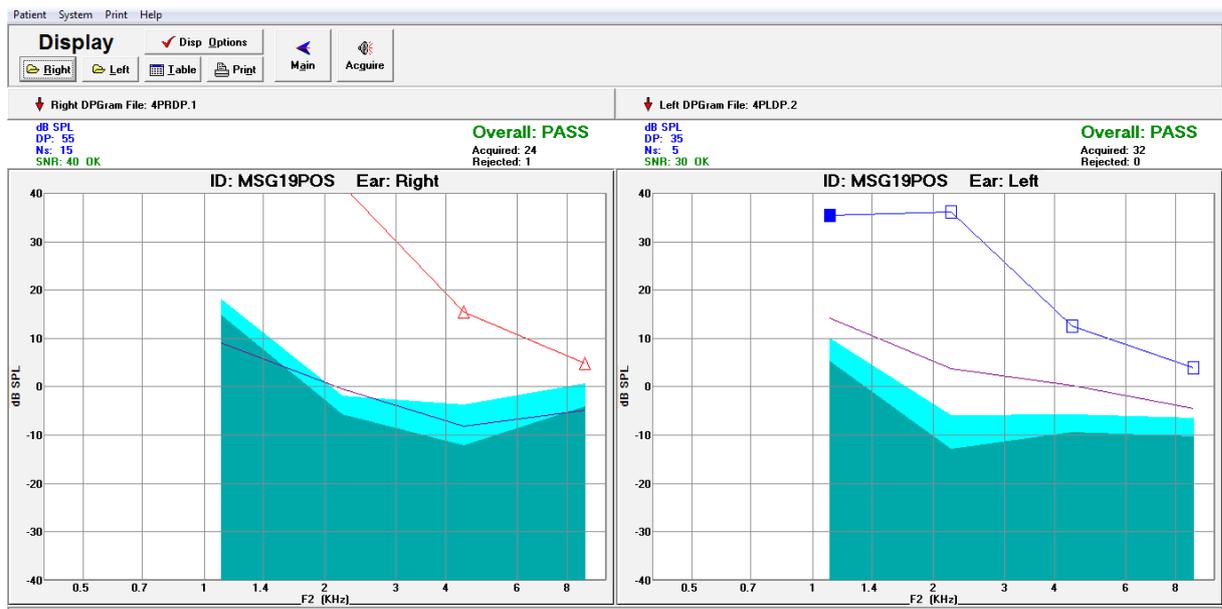
Tabela 2 – Média e desvio padrão da relação sinal-ruído (em dB) das EOAPD do grupo A1 por frequência e orelha, antes e após o tratamento (n=2)
 (conclusão)

Orelha / Frequência (Hz)	Pré-tratamento Média (DP)	Pós-tratamento Média(DP)
Orelha esquerda		
1000	65,5 (0,70)	45,0 (21,21)
2000	43,5 (2,12)	47,0 (2,82)
4000	26,5 (2,12)	23,5 (2,12)
8000	15,5 (4,94)	21,5 (10,60)

Fonte: Elaboração da autora.

DP – desvio padrão.

Figura 8 - Exemplo de resultado de EOAPD de rato do grupo A1. Observa-se presença de resposta em todas as frequências



Fonte: Elaboração da autora.

Tabela 3 – Média e desvio padrão da relação sinal-ruído (em dB) das EOAPD do grupo A2 por frequência e orelha, antes e após o tratamento (n=2)
 (continua)

Orelha / Frequência (Hz)	Pré-tratamento Média (DP)	Pós-tratamento Média
Orelha direita		
1000	62,5 (2,12)	61,5 (2,12)
2000	41,5 (4,94)	44,0 (2,82)
4000	27,0 (7,07)	23,5 (2,12)

Tabela 3 – Média e desvio padrão da relação sinal-ruído (em dB) das EOAPD do grupo A2 por frequência e orelha, antes e após o tratamento (n=2)

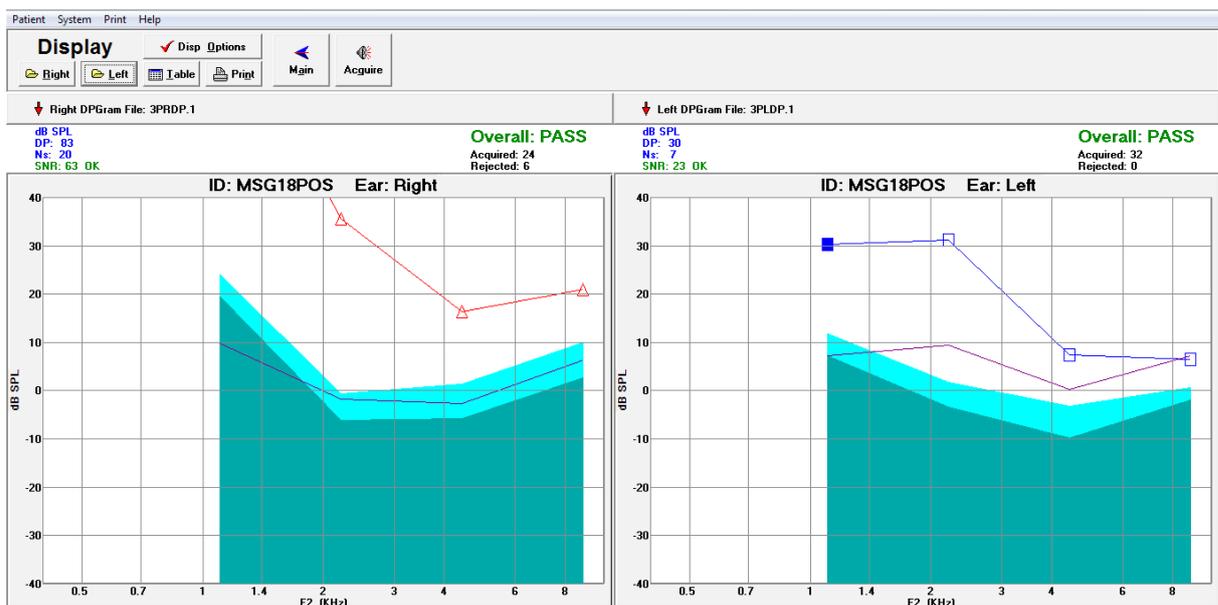
(conclusão)

Orelha / Frequência (Hz)	Pré-tratamento	Pós-tratamento
	Média (DP)	Média
8000	29,0 (16,97)	24,0 (8,48)
Orelha esquerda		
1000	64,5 (0,70)	44,0 (29,69)
2000	38,5 (6,36)	41,0 (8,48)
4000	27,0 (2,82)	16,5 (0,70)
8000	18,0 (2,82)	24,0 (22,62)

Fonte: Elaboração da autora.

DP – desvio padrão.

Figura 9 - Exemplo de resultado de EOAPD de rato do grupo A2. Observa-se presença de resposta em todas as frequências



Fonte: Elaboração da autora.



Tabela 4 – Comparação entre as médias dos valores da relação sinal-ruído (em dB) das EOAPD do grupo A3 por frequência e orelha, antes e após o tratamento (n=6)

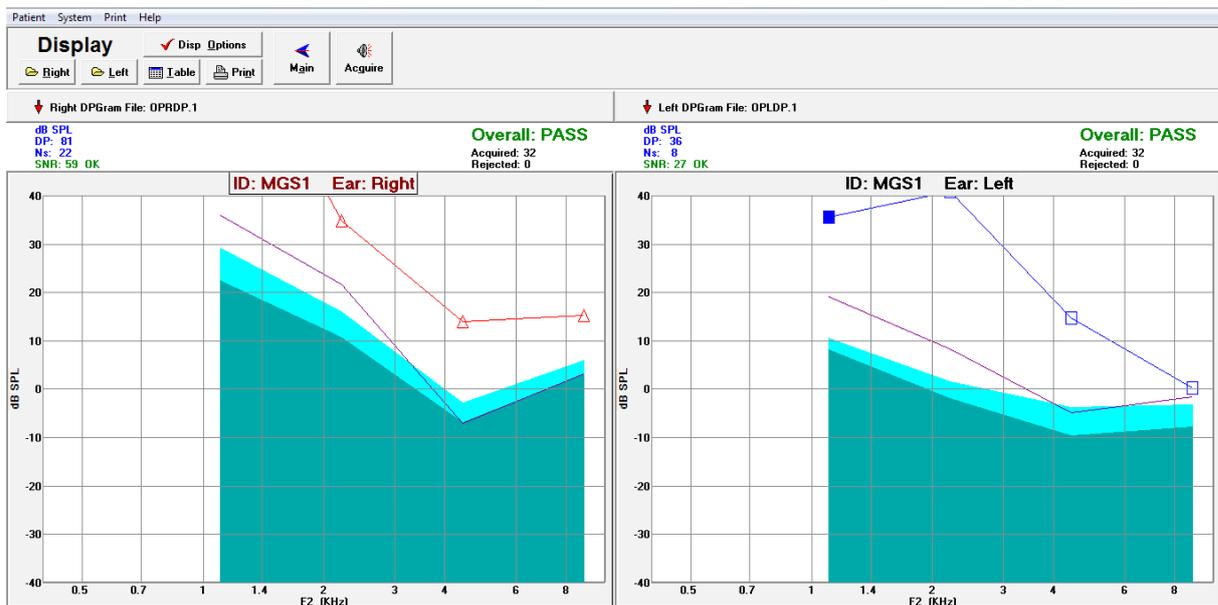
Orelha / Frequência	Pré-tratamento Média (DP)	Pós-tratamento Média (DP)	p-valor
Orelha direita			
1000	48,83 (20,62)	61,67 (3,33)	0,138
2000	31,83 (11,08)	39,83 (6,91)	0,263
4000	22,00 (8,48)	27,83 (5,56)	0,123
8000	29,00 (19,27)	31,00 (18,36)	0,685
Orelha esquerda			
1000	49,33 (16,98)	63,67 (1,51)	0,100
2000	42,33 (4,80)	43,00 (0,89)	0,752
4000	26,17 (3,25)	25,83 (4,71)	0,913
8000	29,33 (15,93)	22,67 (13,88)	0,132

Fonte: Elaboração da autora.

DP – desvio padrão; p-valor obtido pelo teste t de Student.

A Tabela 4 apresenta os resultados da comparação entre as médias dos valores da relação sinal-ruído dos ratos do grupo experimental A3. Observa-se que nenhum dos resultados apresentou diferença significativa entre o pré e o pós-tratamento.

Figura 10 - Exemplo de resultado de EOAPD de rato do grupo A3. Observa-se presença de resposta em todas as frequências



Fonte: Elaboração da autora.



Tabela 5 - Comparação dos valores médios da relação sinal-ruído (em dB) das EOAPD do grupo A4 por frequência, antes e após o tratamento (n=7)

Orelha / Frequência	Pré-tratamento Média (DP)	Pós-tratamento Média (DP)	p-valor
Orelha direita			
1000	38,43 (18,20)	61,14 (4,63)	0,042*
2000	35,57 (4,43)	38,00 (1,91)	0,140 ⁺
4000	22,00 (5,19)	19,29 (4,27)	0,395 ⁺
8000	32,57 (12,80)	25,43 (13,40)	0,071 ⁺
Orelha esquerda			
1000	60,29 (9,39)	61,86 (8,99)	0,735**
2000	40,43 (8,58)	40,57 (5,53)	0,963 ⁺
4000	27,29 (5,22)	23,57 (2,99)	0,236 ⁺
8000	35,29 (11,50)	29,71 (14,94)	0,236**

Fonte: Elaboração da autora.

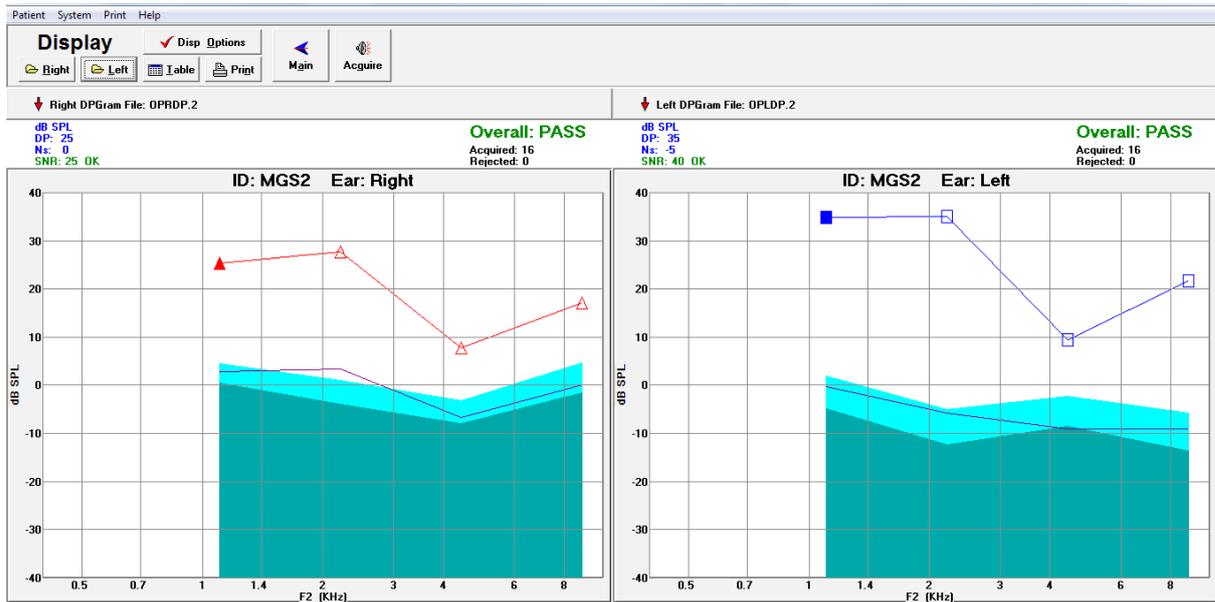
DP – desvio padrão; * significância estatística pelo teste de Wilcoxon; **Teste de Wilcoxon; ⁺ Teste t pareado.

Observa-se na Tabela 5 a existência de diferença estatística significativa entre os valores para a orelha direita na frequência de 1000 ($p=0,042$), quando comparados os momentos antes e depois do tratamento.

A relação sinal-ruído maior do que 6 dB no teste de EOAPD indica presença de resposta, dessa forma, esta diferença estatística observada em nada altera a interpretação do resultado do exame após o tratamento. O que indicaria a ototoxicidade seria a diminuição da relação sinal-ruído, o que ocorreu nas frequências de 4000 e 8000 Hz em ambas as orelhas, porém de forma não significativa estatisticamente.



Figura 11 - Exemplo de resultado de EOAPD de rato do grupo A4. Observa-se presença de resposta em todas as frequências



Fonte: Elaboração da autora.

Tabela 6 - Comparação das médias da relação sinal-ruído (em dB) por frequência obtidas no pré e pós-tratamento nos quatro grupos do experimento A, agrupando-se as orelhas direita e esquerda (n=17)

Frequência (Hz)	A1	A2	A3	A4	p-valor
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	
Pré-tratamento					
1000	63,75 (2,22)	63,50 (1,73)	49,08 (18,01)	49,36 (17,95)	0,230
2000	43,75 (1,50)	40,00 (4,97)	37,08 (9,82)	38,00 (7,03)	0,492
4000	26,75 (1,50)	27,00 (4,39)	24,08 (6,50)	24,64 (5,71)	0,739
8000	21,25 (7,27)	23,50 (11,79)	29,17 (16,86)	33,93 (11,78)	0,307
Pós-tratamento					
1000	48,50 (16,20)	52,27 (19,94)	62,67 (2,67)	61,50 (6,88)	0,039*
2000	46,25 (2,75)	42,50 (5,45)	41,42 (4,98)	39,29 (4,20)	0,069
4000	25,00 (2,45)	20,00 (2,24)	26,83 (5,02)	21,43 (4,18)	0,012*
8000	20,00 (10,03)	24,00 (13,95)	26,83 (16,12)	27,57 (13,82)	0,807

Fonte: Elaboração da autora.

DP – desvio padrão; *significância estatística. Teste de Análise de Variância (ANOVA).

A partir da Tabela 6 observa-se a existência de diferença estatisticamente significativa no pós-tratamento para as frequências de 1000 e 4000 Hz. Na frequência de 1000 Hz, a diferença encontrada está entre os grupos A1 (controle negativo) e



A3 (ototóxico), sendo que o grupo ototóxico tem uma média maior que o grupo controle negativo. Na frequência de 4000 Hz, a diferença está entre os dois grupos experimentais A3 e A4, com o primeiro apresentando valor maior que o segundo. Também aqui a relação sinal-ruído se manteve acima de 6 dB em todas as frequências, não havendo, portanto, indicação de lesão de CCEs.

3.1.2.2 Potencial evocado auditivo de tronco encefálico - PEATE

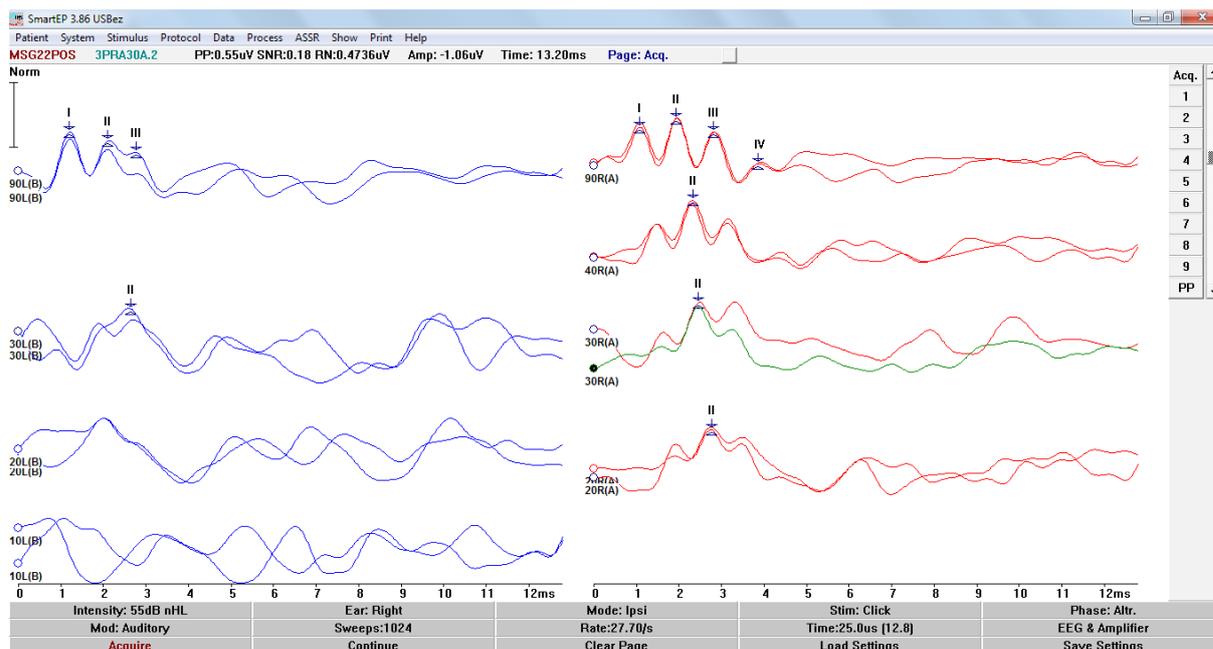
Tabela 7 - Média e desvio padrão do limiar eletrofisiológico (em dBNA) obtidos no pré e pós-tratamento, por orelha, nos grupos A1 (n=2) e A2 (n=2)

Orelha - tratamento	A1	A2
	Média (DP)	Média (DP)
OD – pré	20,00 (0,00)	15,00 (7,07)
OD – pós	30,00 (14,14)	17,5 (10,60)
OE – pré	20,00 (0,00)	22,5 (3,53)
OE – pós	40,00 (14,14)	22,5 (3,53)

Fonte: Elaboração da autora.

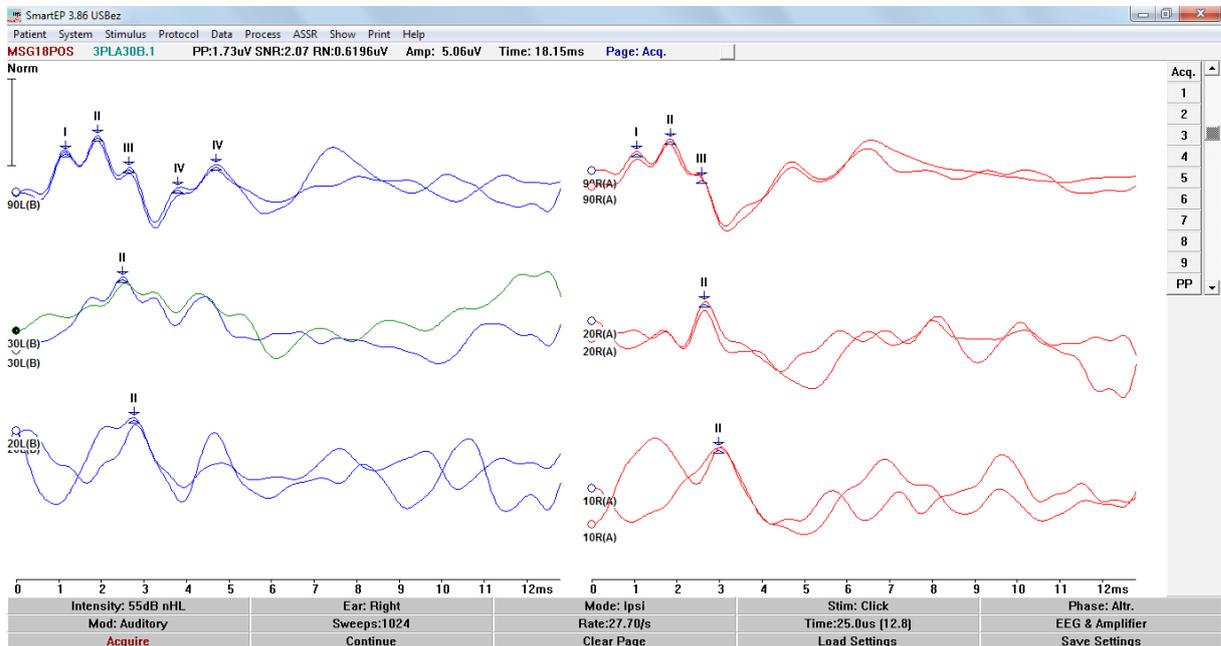
OD – orelha direita; OE – orelha esquerda.

Figura 12 - Exemplo de resultado do PEATE em rato do grupo A1. Limiar eletrofisiológico da onda II na orelha direita em 20 dBNA e na orelha esquerda em 30 dBNA



Fonte: Elaboração da autora.

Figura 13 - Exemplo de resultado do PEATE em rato do grupo A2. Limiar eletrofisiológico da onda II na orelha direita em 10 dBNA e na orelha esquerda em 20 dBNA



Fonte: Elaboração da autora.

Tabela 8 - Comparação dos valores médios do limiar eletrofisiológico (em dBNA) obtidos no pré e pós-tratamento, por orelha e entre as orelhas direita e esquerda, no grupo A3 (n=6)

Orelha	Pré-tratamento	Pós-tratamento	p-valor
	Média (DP)	Média (DP)	
OD	21,67 (4,08)	33,33 (5,16)	0,038*+
OE	23,33 (5,16)	31,67 (14,72)	0,102+
p-valor	0,931 ⁺⁺	0,429 ⁺⁺	

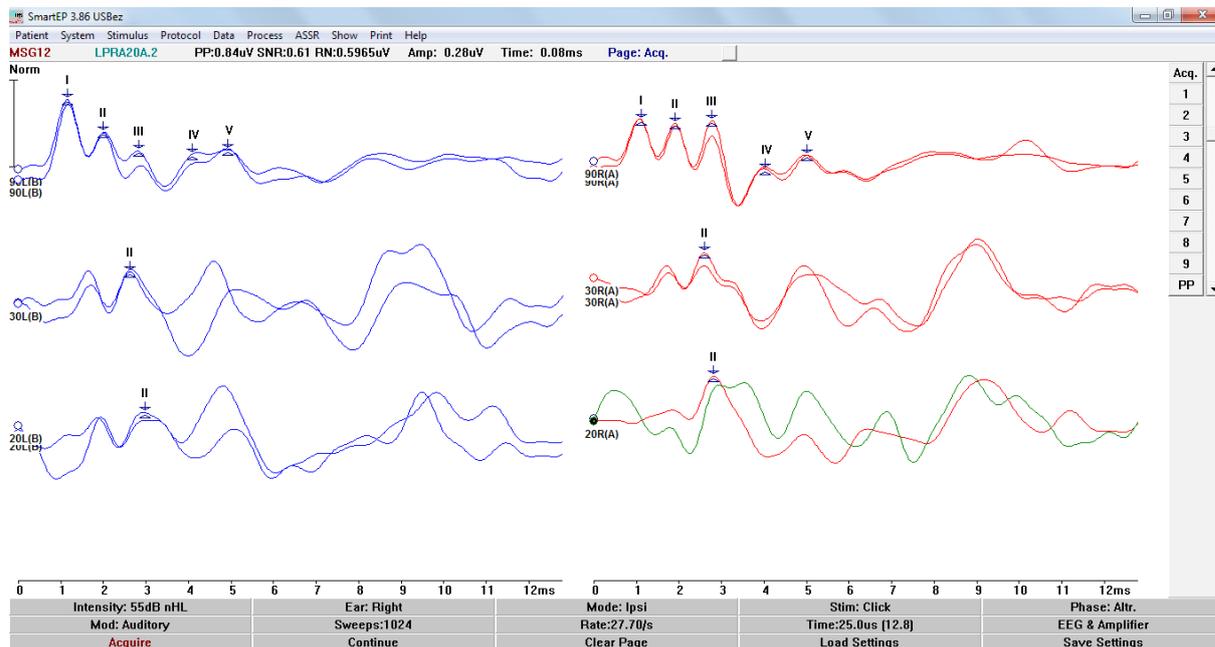
Fonte: Elaboração da autora.

DP – desvio padrão; OD – orelha direita; OE – orelha esquerda; *significância estatística; +p-valor obtido pelo teste de Wilcoxon; ++p-valor obtido pelo teste U de Mann Whitney.

Com a Tabela 8 observa-se que existiu diferença significativa no limiar eletrofisiológico da orelha direita entre o pré e o pós-tratamento, uma vez que o p-valor ($p=0,038$) é menor que o nível de significância de 5%. Na orelha esquerda, houve aumento na média do limiar entre o pré e pós-tratamento, porém de forma não significativa. Isso possivelmente tenha ocorrido devido ao aumento da variabilidade (desvio padrão), sendo necessário, para a comprovação da diferença estatística entre as médias, um maior tamanho amostral.

Na comparação entre as orelhas direita e esquerda, conforme o momento do tratamento, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Figura 14 - Exemplo de resultado do PEATE em rato do grupo A3. Limiar eletrofisiológico da onda II na orelha direita e esquerda em 20 dBNA



Fonte: Elaboração da autora.

Tabela 9 - Comparação dos valores médios do limiar eletrofisiológico (em dBNA) obtidos no pré e pós-tratamento, por orelha e entre as orelhas direita e esquerda, no grupo A4 (n=7)

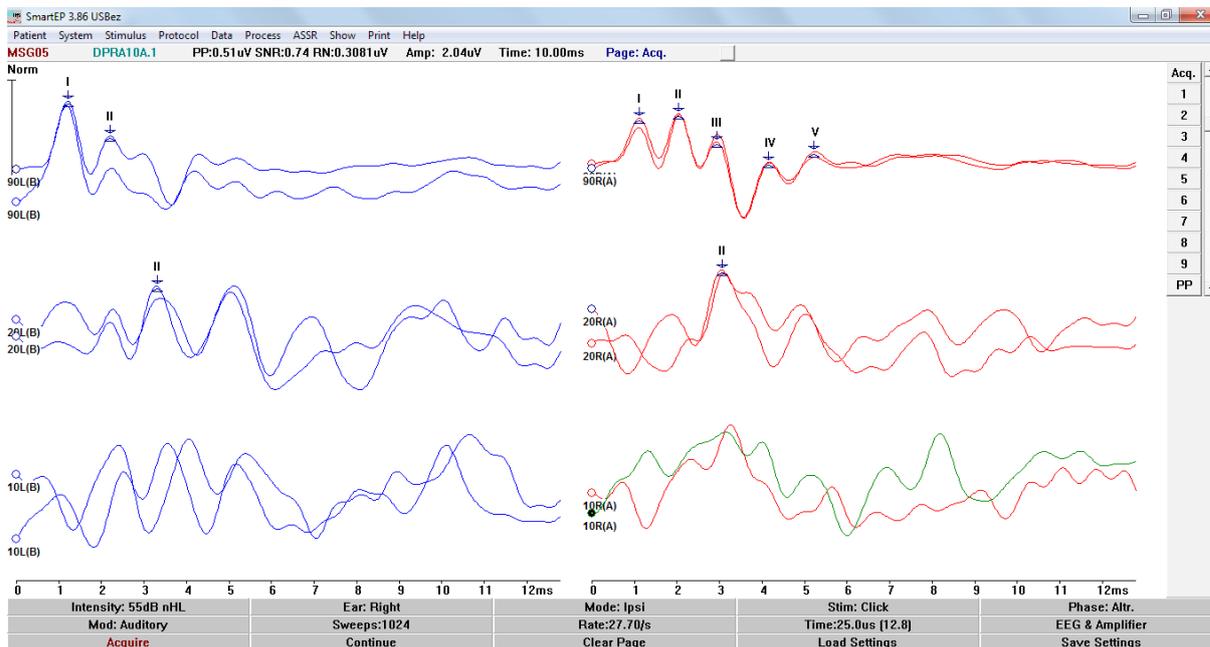
Orelha	Pré-tratamento Média (DP)	Pós-tratamento Média (DP)	p-valor
OD	22,86 (4,88)	26,43 (7,48)	0,094 ⁺
OE	22,14 (6,99)	27,14 (7,56)	0,038* ⁺
p-valor	0,997 ⁺⁺	0,902 ⁺⁺	

Fonte: Elaboração da autora.

DP – desvio padrão; OD – orelha direita; OE – orelha esquerda; *significância estatística; ⁺p-valor obtido pelo teste de Wilcoxon; ⁺⁺p-valor obtido pelo teste U de Mann Whitney.

Na Tabela 9 verifica-se diferença significativa na orelha esquerda entre o pré e o pós-tratamento. Na comparação entre as orelhas não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Figura 15 - Exemplo de resultado do PEATE em rato do grupo A4. Limiar eletrofisiológico da onda II na orelha direita e esquerda em 20 dBNA



Fonte: Elaboração da autora.

Tabela 10 - Comparação dos valores médios do limiar eletrofisiológico (em dBNA) obtidos no pré e pós-tratamento do experimento A, por grupo, agrupando-se as orelhas direita e esquerda

Tratamento	A1	A2	A3	A4	p-valor
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	
PRÉ	20,00 (0,00)	18,75 (6,29)	22,50 (4,52)	22,50 (5,80)	0,587
PÓS	35,00 (12,91)	20,00(7,07)	32,50(10,55)	26,79 (7,23)	0,065

Fonte: Elaboração da autora.

p-valor obtido pelo teste Kruskal-Wallis.

A Tabela 10 expõe os resultados da comparação entre os quatro grupos do experimento A, com o agrupamento das orelhas direita e esquerda. Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos avaliados para o pré e o pós-tratamento.

3.2 Resultados do experimento B

Dos 16 animais incluídos no experimento B, dois foram a óbito depois da terceira dose de cisplatina, sendo um pertencente ao grupo B3 e outro ao grupo B4. Os grupos ficaram assim divididos: B1 (n=3); B2 (n=3); B3 (n=4); B4 (n=4).

3.2.1 Avaliação do comportamento clínico

Também neste experimento foram observados sinais de toxicidade sistêmica de queda de pêlos, diarreia e perda de peso, presentes nos animais dos grupos experimentais B3 e B4.

Tabela 11 - Média e desvio padrão do peso (em gramas) em função dos dias nos grupos B1, B2, B3 e B4

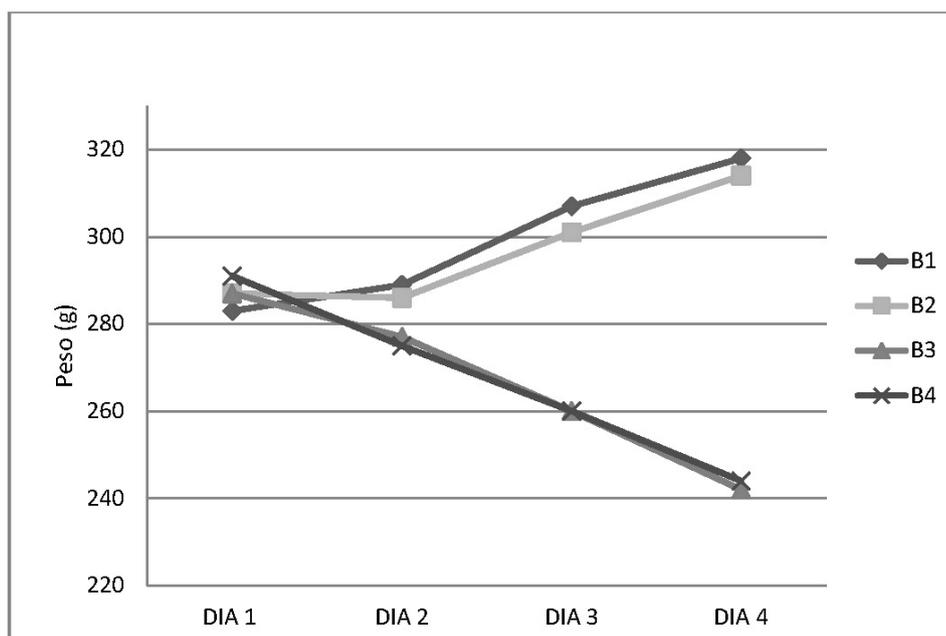
Grupos	DIAS			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
B1	283 (16,29)	289 (17,47)	307 (19,63)	318 (17,44)
B2	287 (11,02)	286 (14,42)	301 (18,04)	314 (21,07)
B3	287 (19,70)	277 (13,11)	260 (10,58)	242 (10,75)
B4	291 (4,43)	275 (8,72)	260 (8,23)	244 (12,75)

Fonte: Elaboração da autora.

DP- desvio padrão.

Entre o primeiro e o quarto dia do experimento, houve um aumento de peso de 12,4% no grupo B1 e de 9,4% no grupo B2. Já para os grupos experimentais B3 e B4 houve uma redução no peso de 16% (Tabela 11).

Figura 16 - Variação média do peso (em gramas) dos animais dos quatro grupos do experimento B, entre o primeiro e o quarto dia do experimento



Fonte: Elaboração da autora.

3.2.2 Avaliação funcional da audição

3.2.2.1 Potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE)

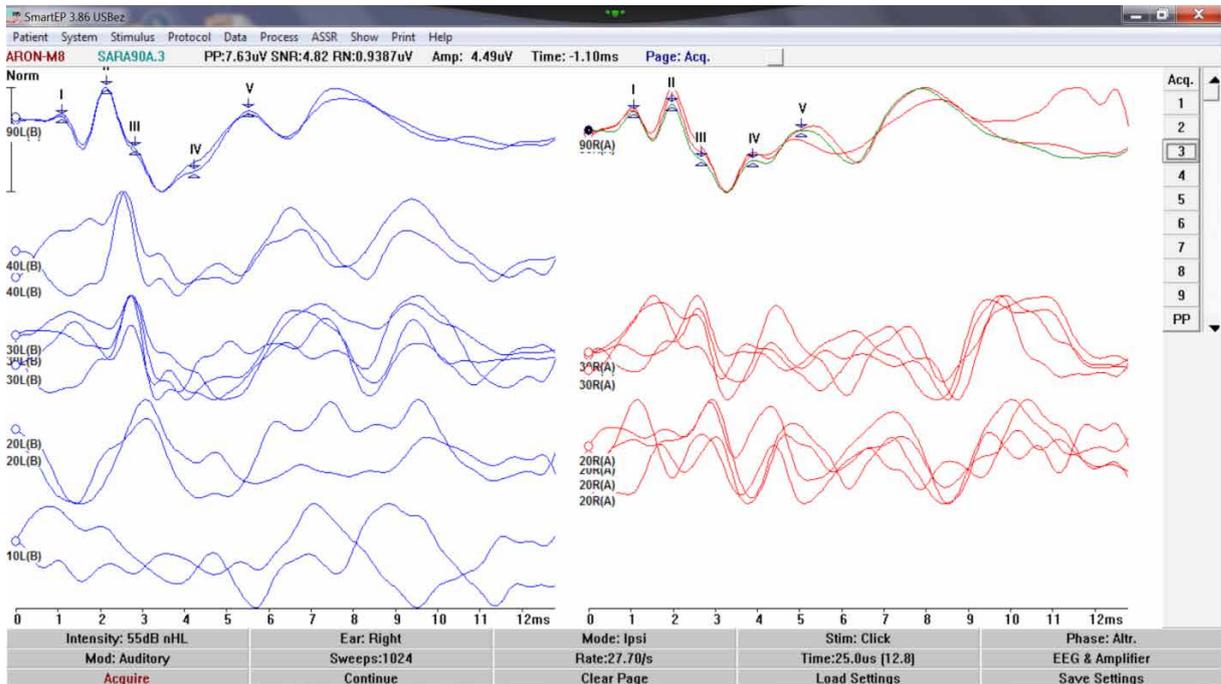
Tabela 12 – Média e desvio padrão do limiar eletrofisiológico (em dBNA) obtidos no pré e pós-tratamento, por orelha, nos grupos B1 (n=3) e B2 (n=3)

Orelha – Momento	B1	B2
	Média (DP)	Média (DP)
OD – pré	20,00 (0,00)	20,00 (0,00)
OD – pós	20,00 (0,00)	23,33 (5,77)
OE – pré	16,66 (5,77)	20,00 (10,00)
OE – pós	13,33 (5,77)	23,33 (5,77)

Fonte: Elaboração da autora.

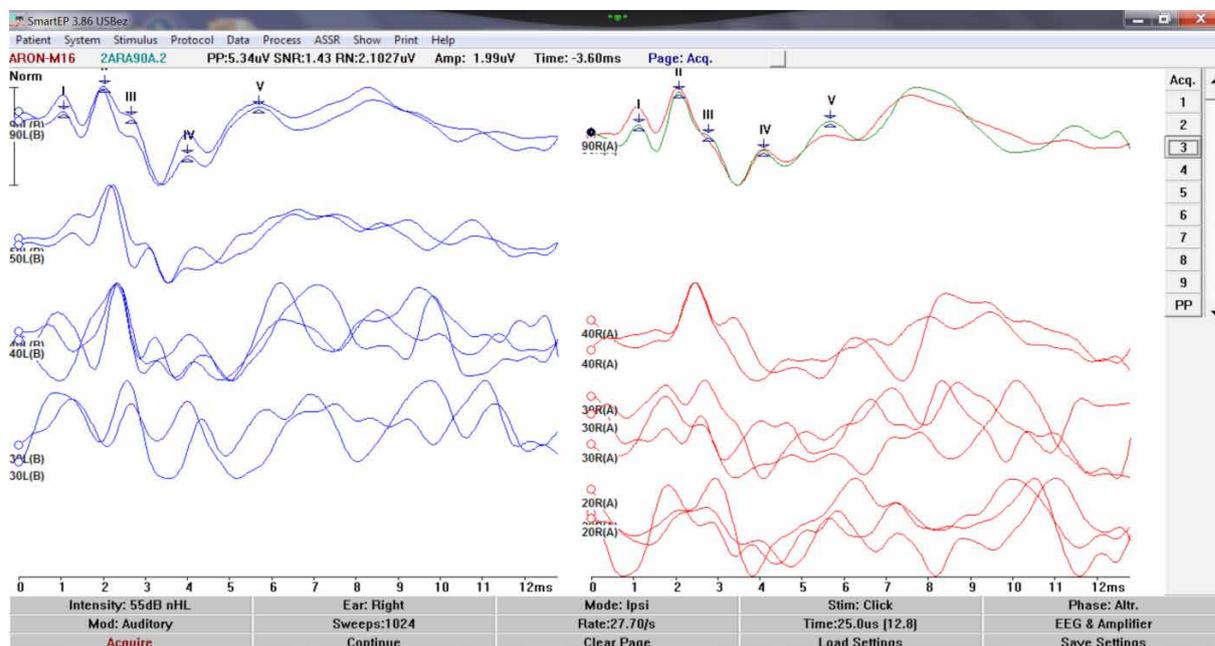
OD – orelha direita; OE – orelha esquerda, DP – desvio padrão.

Figura 17 - Exemplo de resultado do PEATE em rato do grupo B1. Limiar eletrofisiológico da onda II na orelha direita e esquerda em 20 dBNA



Fonte: Elaboração da autora.

Figura 18 - Exemplo de resultado do PEATE em rato do grupo B2. Limiar eletrofisiológico da onda II na orelha direita em 20 dBNA e na orelha esquerda em 30 dBNA



Fonte: Elaboração da autora.

Tabela 13 - Comparação dos valores do limiar eletrofisiológico (em dBNA) obtidos no pré e pós-tratamento em cada orelha e entre as orelhas direita e esquerda, no grupo B3 (n=4)

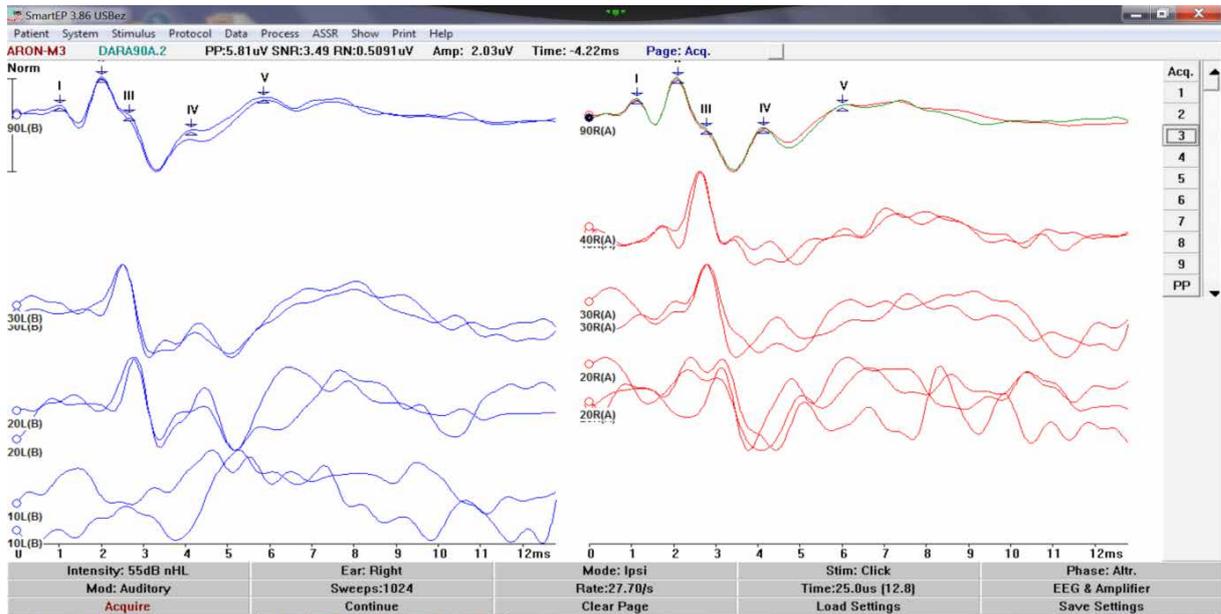
Orelha	Pré-tratamento	Pós-tratamento	p-valor
	Média (DP)	Média (DP)	
OD	20,00 (0,00)	23,75 (4,79)	0,180 ⁺
OE	22,50 (5,0)	23,75 (4,79)	0,317 ⁺
p-valor	0,686^{**}	1,00^{**}	

Fonte: Elaboração da autora.

DP – desvio padrão; OD – orelha direita; OE – orelha esquerda; ⁺p-valor obtido pelo teste de Wilcoxon; ^{**}p-valor obtido pelo teste U de Mann Whitney.

Observa-se que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa tanto na comparação entre o pré e o pós-tratamento de cada orelha, como na comparação entre as orelhas direita e esquerda (Tabela 13).

Figura 19 - Exemplo de resultado do PEATE em rato do grupo B3. Limiar eletrofisiológico da onda II na orelha direita e esquerda em 20 dBNA



Fonte: Elaboração da autora.

Tabela 14 - Comparação dos valores do limiar eletrofisiológico (em dBNA) obtidos no pré e pós-tratamento em cada orelha e entre as orelhas direita e esquerda, no grupo B4 (n=4)

Orelha	Pré-tratamento	Pós-tratamento	p-valor
	Média (DP)	Média (DP)	
OD	17,50 (5,00)	32,50 (5,00)	0,059 ⁺
OE	22,50 (5,00)	30,00 (14,14)	0,180 ⁺
p-valor	0,343^{**}	0,486^{**}	

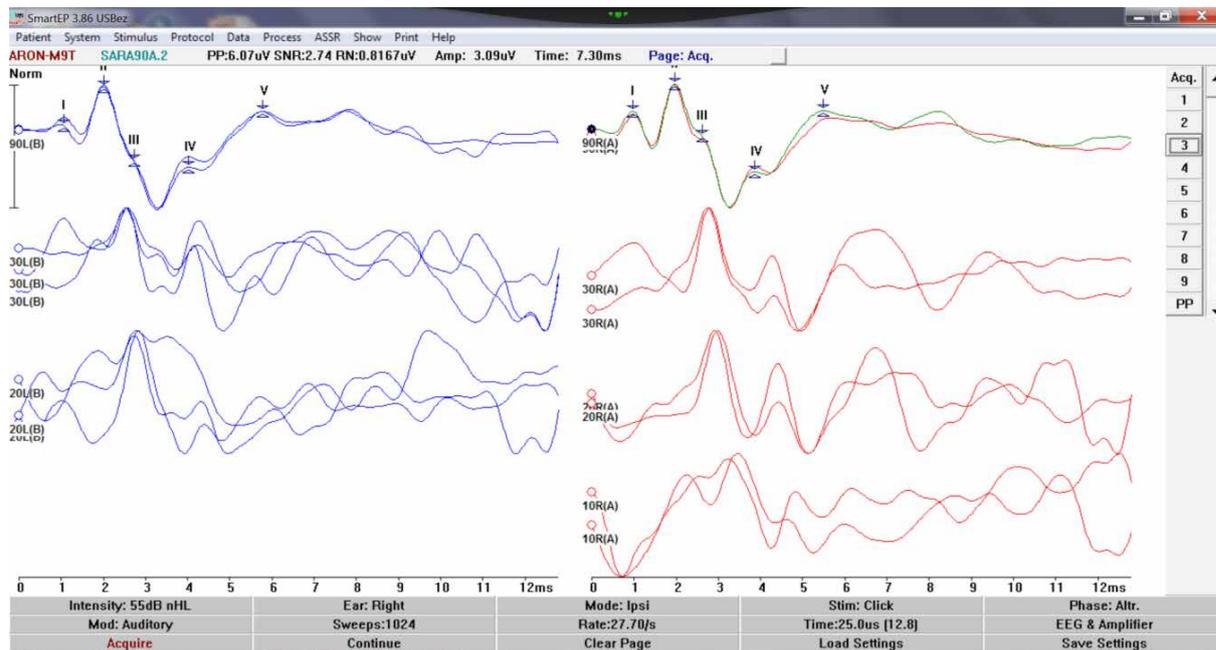
Fonte: Elaboração da autora.

DP – desvio padrão; OD – orelha direita; OE – orelha esquerda; ⁺p-valor obtido pelo teste de Wilcoxon; ^{**}p-valor obtido pelo teste U de Mann Whitney.

Com a Tabela 14 verifica-se que tanto a orelha direita quanto a esquerda não apresentaram aumento significativo no limiar eletrofisiológico após o tratamento. Porém, ressalta-se que a média da orelha direita teve um aumento de 85,7%. Na comparação entre as orelhas também não houve diferença significativa.

Da mesma forma como ocorreu no grupo A3 do experimento A, na orelha esquerda houve aumento na média do limiar entre o pré e pós-tratamento, porém de forma não significativa, possivelmente devido ao aumento da variabilidade. A comprovação da diferença estatística entre as médias necessitaria de uma amostra maior.

Figura 20 - Exemplo de resultado do PEATE em rato do grupo B4. Limiar eletrofisiológico da onda II na orelha direita e esquerda em 20 dBNA



Fonte: Elaboração da autora.

Tabela 15 - Comparação dos valores do limiar eletrofisiológico (em dBNA) obtidos no pré e pós-tratamento do experimento B, por grupo, agrupando-se as orelhas direita e esquerda

Momento	B1	B2	B3	B4	p-valor
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	
PRÉ	18,33 (4,08)	20,00 (6,32)	21,25 (3,54)	20,00 (5,34)	0,726
PÓS	16,67 (5,16)	23,33 (5,16)	23,75 (4,43)	31,25 (9,91)	0,011*

Fonte: Elaboração da autora.

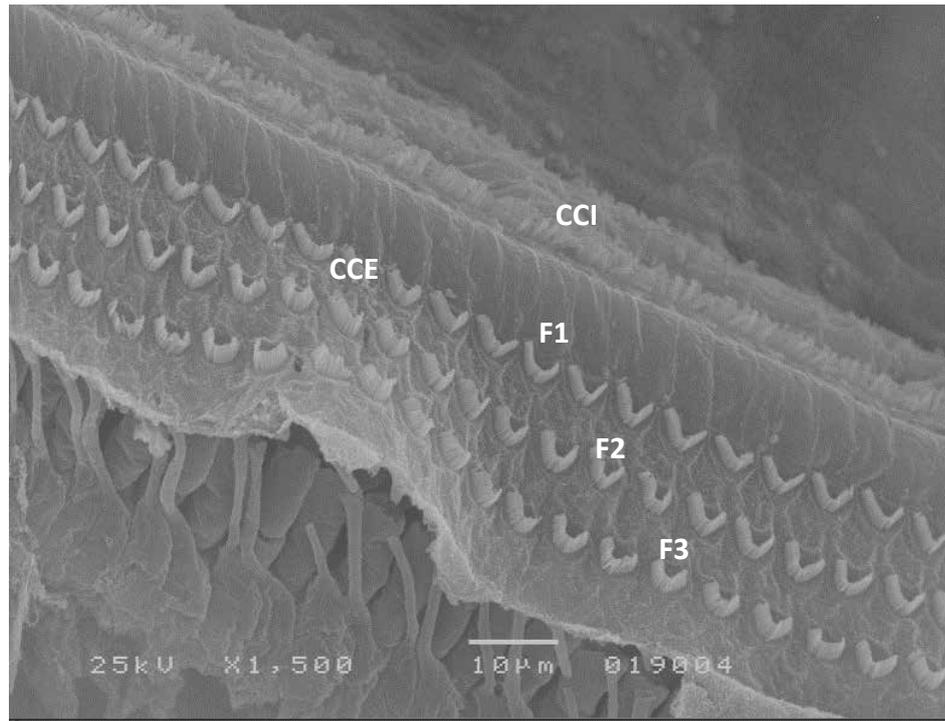
* significância estatística, p-valor obtido pelo teste Kruskal-Wallis.

Com os resultados da Tabela 15 constata-se diferença estatisticamente significativa no pós-tratamento entre o grupo controle negativo (B1) e o grupo experimental B4, sendo os valores do segundo significativamente superiores aos do primeiro.

3.2.3 Avaliação anatômica das células ciliadas externas - Microscopia eletrônica de varredura

Grupo B1 – Controle negativo (soro fisiológico 0,9%)

Figura 21 - Fotomicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura do órgão de Corti de rato do grupo B1, mostrando o terço médio da espira basal



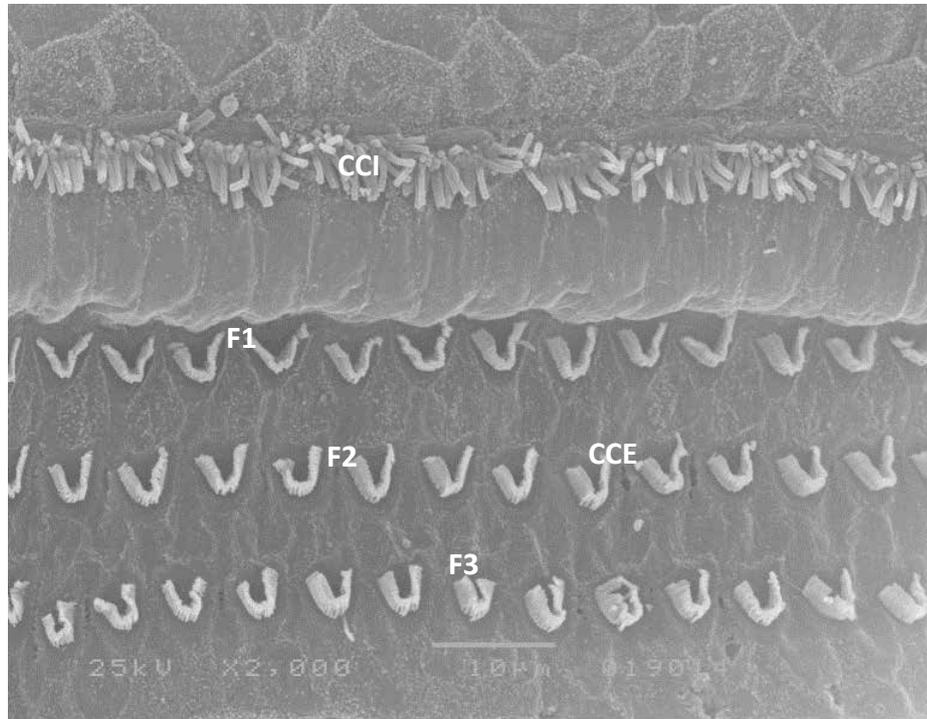
Fonte: Gonçalves, *et al.* No prelo.

CCI: células ciliadas internas (estereocílios); CCE: células ciliadas externas (estereocílios); F1: primeira fileira; F2: segunda fileira; F3: terceira fileira. Observa-se manutenção da arquitetura ciliar nas três fileiras de CCE. Aumento de 1500x.



Grupo B2 – Controle positivo: N-acetilcisteína (300mg/Kg/dia)

Figura 22 - Fotomicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura do órgão de Corti de rato do grupo B2, mostrando o terço médio da espira basal



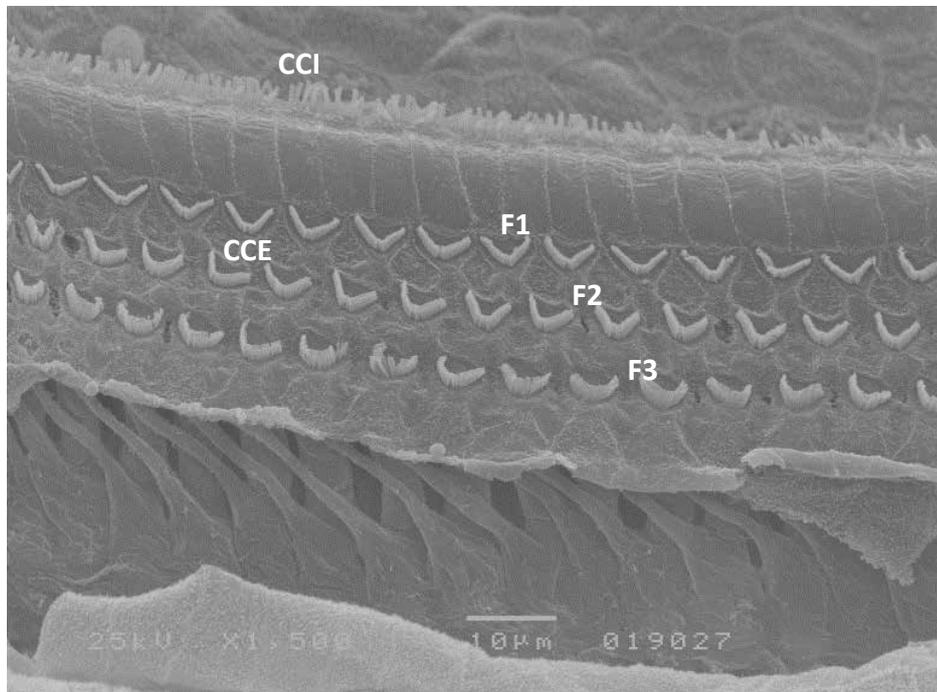
Fonte: Gonçalves, *et al.* No prelo.

CCI: células ciliadas internas (estereocílios); CCE: células ciliadas externas (estereocílios); F1: primeira fileira; F2: segunda fileira; F3: terceira fileira. Observa-se manutenção da arquitetura ciliar nas três fileiras de CCE. Aumento de 2000x.



Grupo B3 – Ototóxico: Cisplatina (8mg/Kg/dia)

Figura 23 - Fotomicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura do órgão de Corti de rato do grupo B3, mostrando o terço médio da espira basal



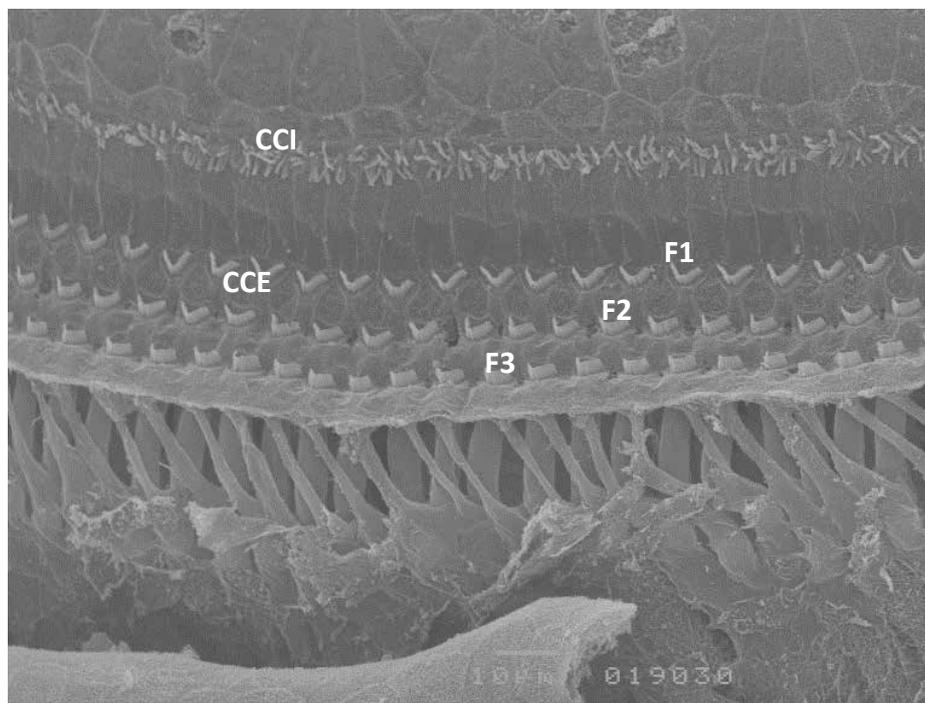
Fonte: Gonçalves, *et al.* No prelo.

CCI: células ciliadas internas (estereocílios); CCE: células ciliadas externas (estereocílios); F1: primeira fileira; F2: segunda fileira; F3: terceira fileira. Observa-se manutenção da arquitetura ciliar nas três fileiras de CCE. Aumento de 1500x.



Grupo B4 – Ototóxico com otoproteção: N-acetilcisteína (300mg/Kg/dia) e cisplatina (8mg/Kg/dia)

Figura 24 - Fotomicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura do órgão de Corti de rato do Grupo B4, mostrando o terço médio da espira basal



Fonte: Gonçalves, *et al.* No prelo.

CCI: células ciliadas internas (estereocílios); CCE: células ciliadas externas (estereocílios); F1: primeira fileira; F2: segunda fileira; F3: terceira fileira; C: corpo celular. Observa-se manutenção da arquitetura ciliar nas três fileiras de CCE. Aumento de 1000x.

3.2.4 Avaliação da enzima glutathione peroxidase - Imunofluorescência

Os resultados da imunofluorescência foram analisados por dois examinadores independentes e estão descritos de forma qualitativa e por grupo, conforme a variável estudada: enzima GSH-Px. A mesma foi revelada utilizando anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor® 488, portanto, a imunomarcagem ocorreu na coloração verde. Para marcar a membrana plasmática foi utilizado anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor® 594, sendo esta visualizada na coloração vermelha, no entanto, imagens exclusivas de membrana plasmática não foram inseridas no estudo. A fluorescência azul indica o núcleo celular marcado com corante DAPI.

O grupo B1 - controle negativo - foi o parâmetro de comparação para os demais grupos. Dessa forma, nos grupos B2, B3 e B4, a avaliação da expressão da GSH-Px foi determinada pelo aumento da intensidade de coloração verde por todo citoplasma da célula. A expressão foi ainda classificada como granular quando a coloração apresentava-se na forma de pontos do neuroepitélio.

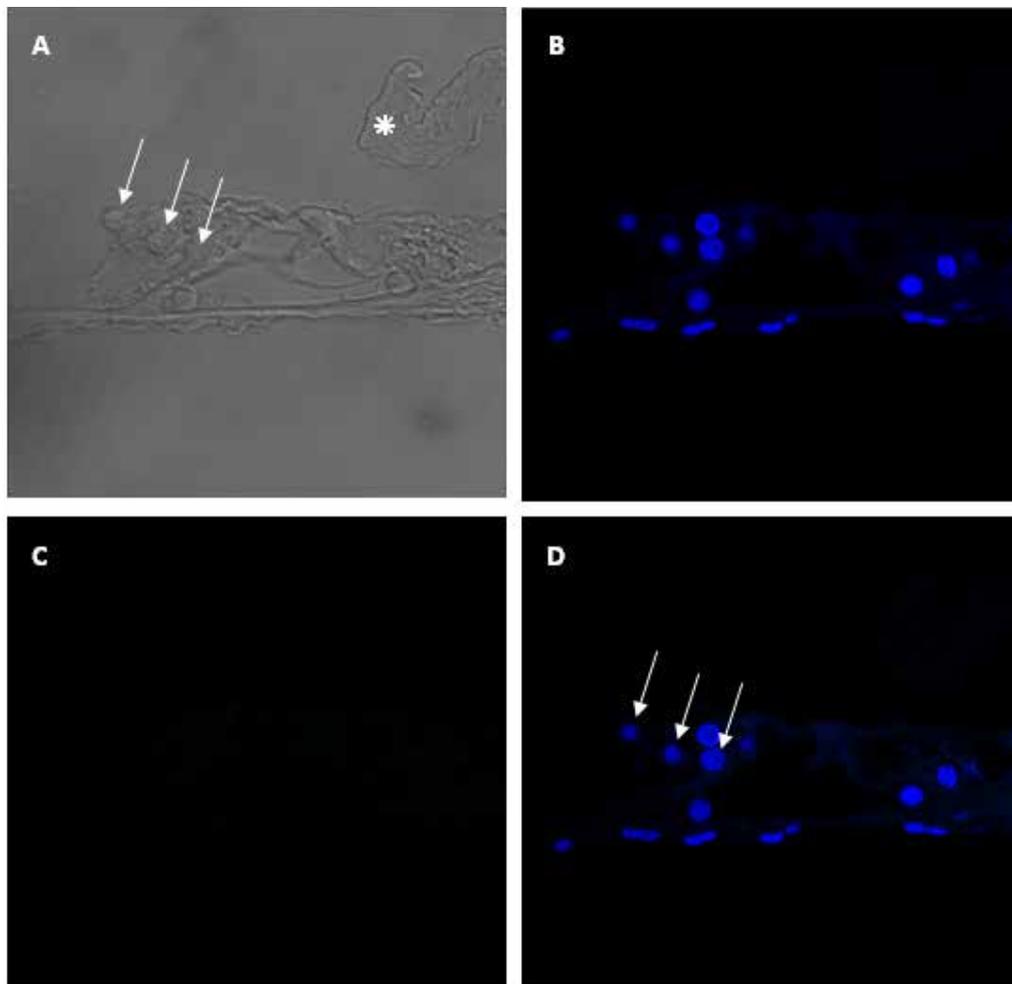


Durante a análise da secção longitudinal do tecido coclear ao microscópio confocal, foi selecionada a espira média para utilizar objetiva de maior aumento e visualizar o órgão de Corti, uma vez que esta se mostrou estruturalmente mais preservada.

Ao final deste capítulo, foi inserida uma composição de imagens com o resultado da imunofluorescência das duas variáveis nos quatro grupos estudados.

Grupo B1 – Controle negativo (soro fisiológico 0,9%)

Figura 25 - Microscopia confocal do ducto coclear de rato do grupo B1, evidenciando o órgão de Corti



Fonte: Acervo da autora.

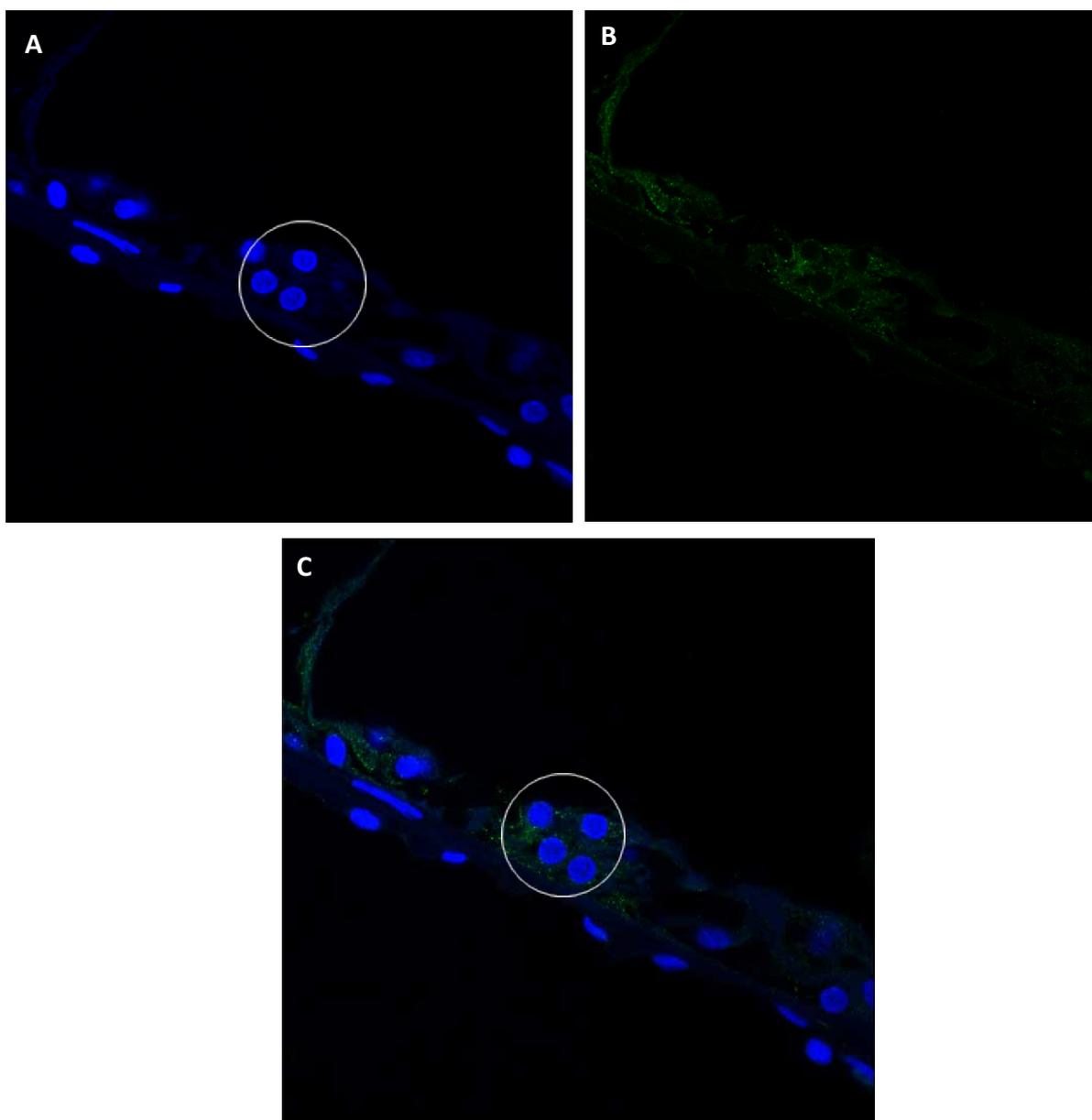
A: imagem em campo claro para orientação visual das células do órgão de Corti; asterisco: membrana tectória retraída; B: núcleos celulares marcados com DAPI (azul); C: células imunomarcadas com anti-glutathione peroxidase revelado com Alexa 488 (verde); D: sobreposição de imagens (B+C); setas: núcleos das CCE (objetiva 63x, zoom 2.0).



Na Figura 25 observa-se a disposição dos núcleos das CCEs (setas). Em 25C existe marcação ausente da enzima GSH-Px. A figura 25D será o parâmetro para a comparação do resultado da imunofluorescência desta enzima com os demais grupos.

Grupo B2 – Controle positivo: N-acetilcisteína (300mg/Kg/dia)

Figura 26 - Microscopia confocal do ducto coclear de rato do grupo B2, evidenciando o órgão de Corti



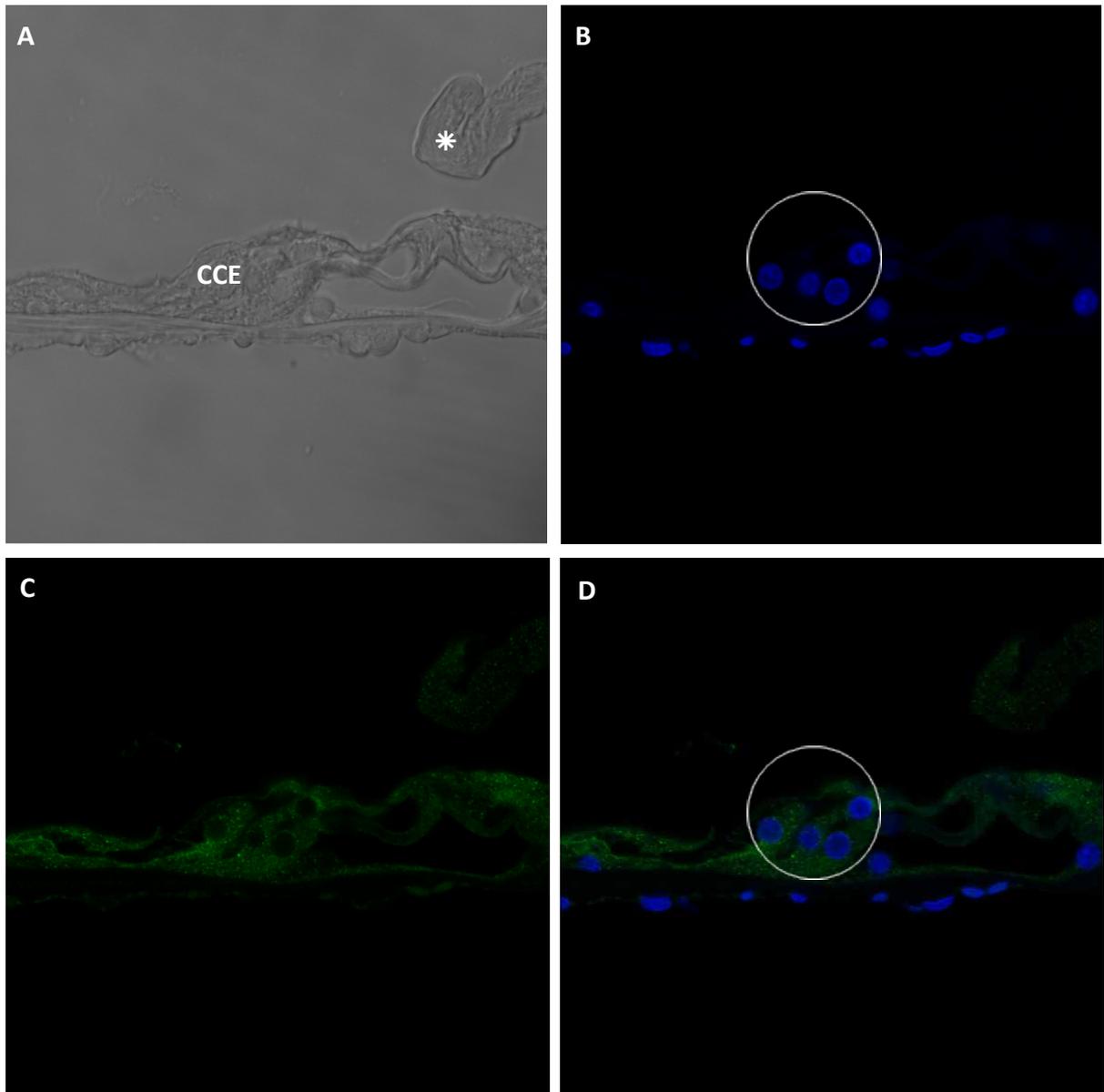
Fonte: Acervo da autora.

A: núcleos celulares marcados com DAPI e círculo indicando os núcleos das CCE (azul); B: células imunomarcadas com anti-glutationa peroxidase revelado com Alexa 488 (verde); C: sobreposição de imagens (A+B) (objetiva 63x, zoom 2.0).

Na Figura 26 verifica-se a ocorrência de marcação granular (pontos verdes intensos) da GSH-PX no citoplasma das CCEs.

Ototóxico: Cisplatina (8mg/Kg/dia)

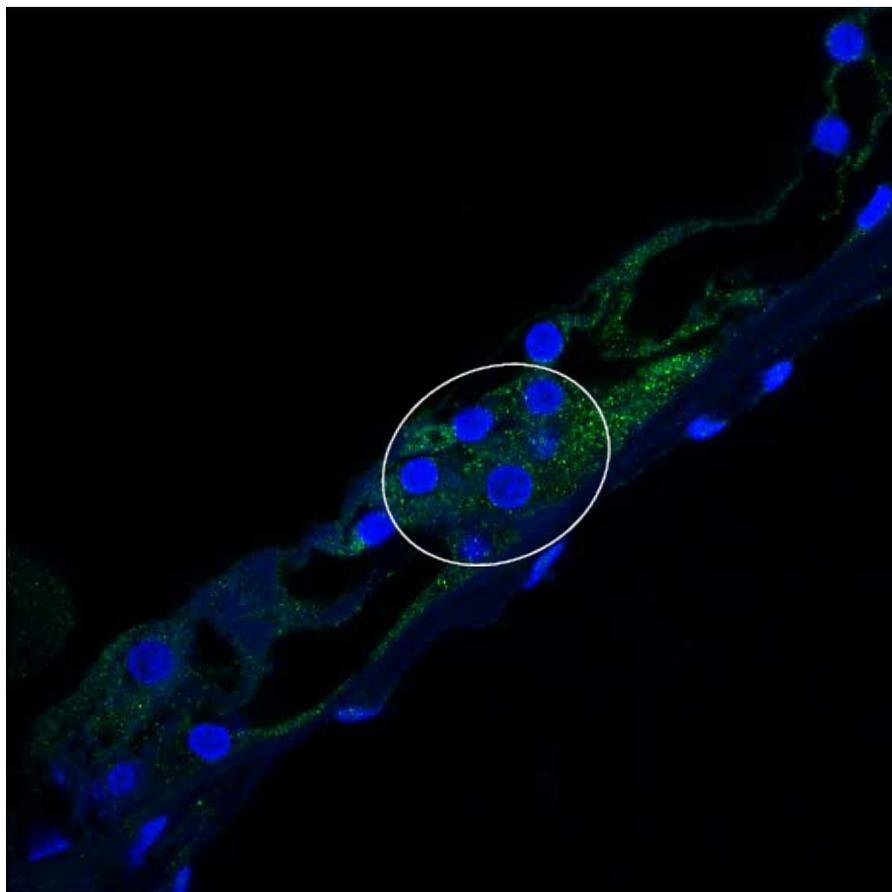
Figura 27 - Microscopia confocal do ducto coclear de rato do grupo B3, evidenciando o órgão de Corti



Fonte: Acervo da autora.

A: imagem em campo claro para orientação visual das células ciliadas externas (CCE); asterisco: membrana tectória retraída; B: núcleos celulares marcados com DAPI (azul); C: células imunomarcadas com anti-glutathione peroxidase revelado com Alexa 488 (verde); D: sobreposição de imagens (B+C); círculo: núcleos das CCE (objetiva 63x, zoom 2.0).

Figura 28 - Microscopia confocal do ducto coclear de rato do grupo B3, evidenciando órgão de Corti. Sobreposição de imagens (DAPI + anticorpo anti-glutathione peroxidase revelada com Alexa 488). Círculo indicando os núcleos das CCEs (objetiva 63x, zoom 2.0)



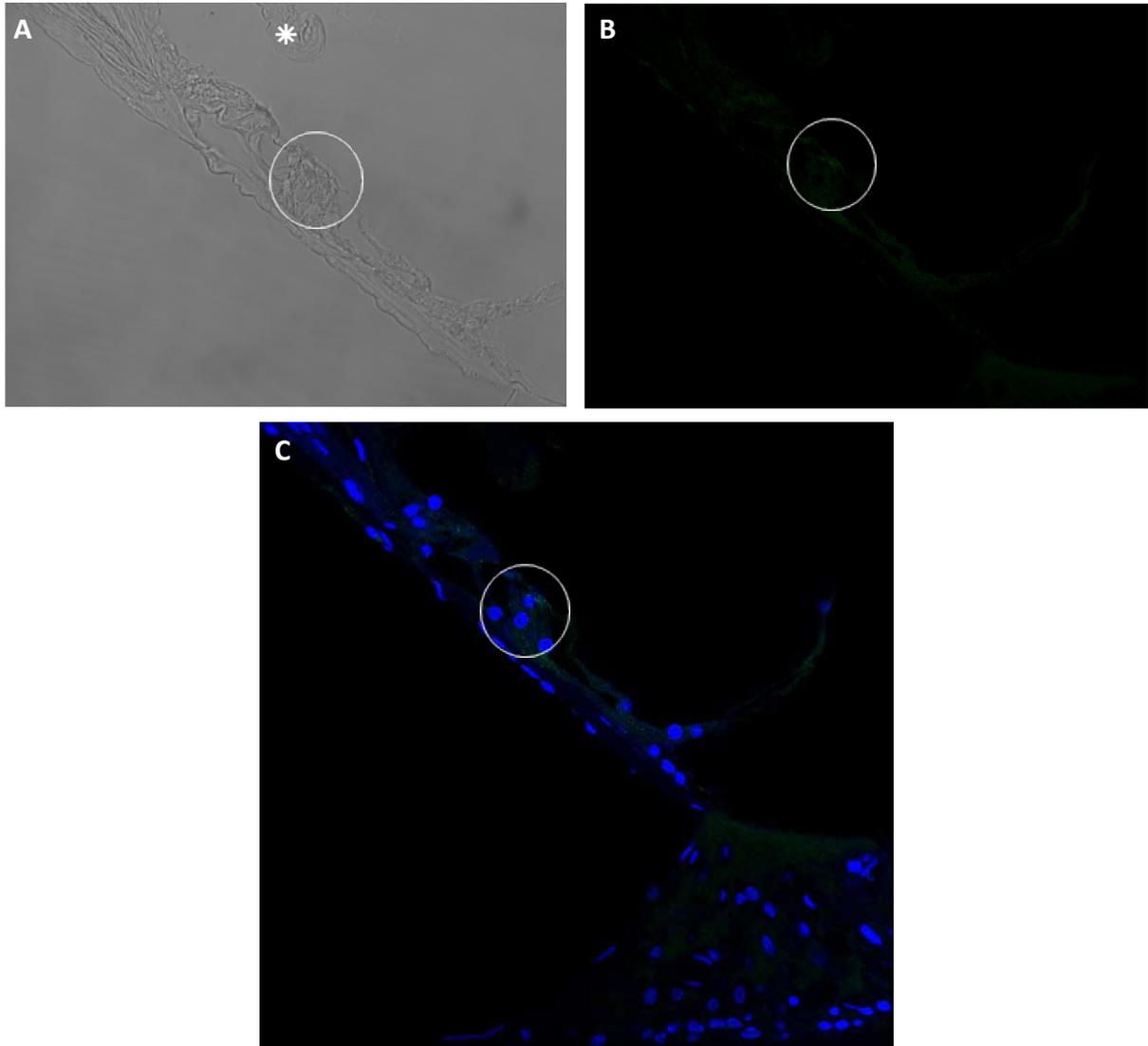
Fonte: Gonçalves, *et al.* No prelo.

As Figuras 27 e 28 mostram a marcação positiva em quantidade e intensidade da coloração verde, indicando a expressão da enzima GSH-Px no citoplasma celular.



Grupo B4 – Ototóxico com otoproteção: N-acetilcisteína (300mg/Kg/dia) e cisplatina (8mg/Kg/dia)

Figura 29 - Microscopia confocal do ducto coclear de rato do grupo B4, evidenciando o órgão de Corti

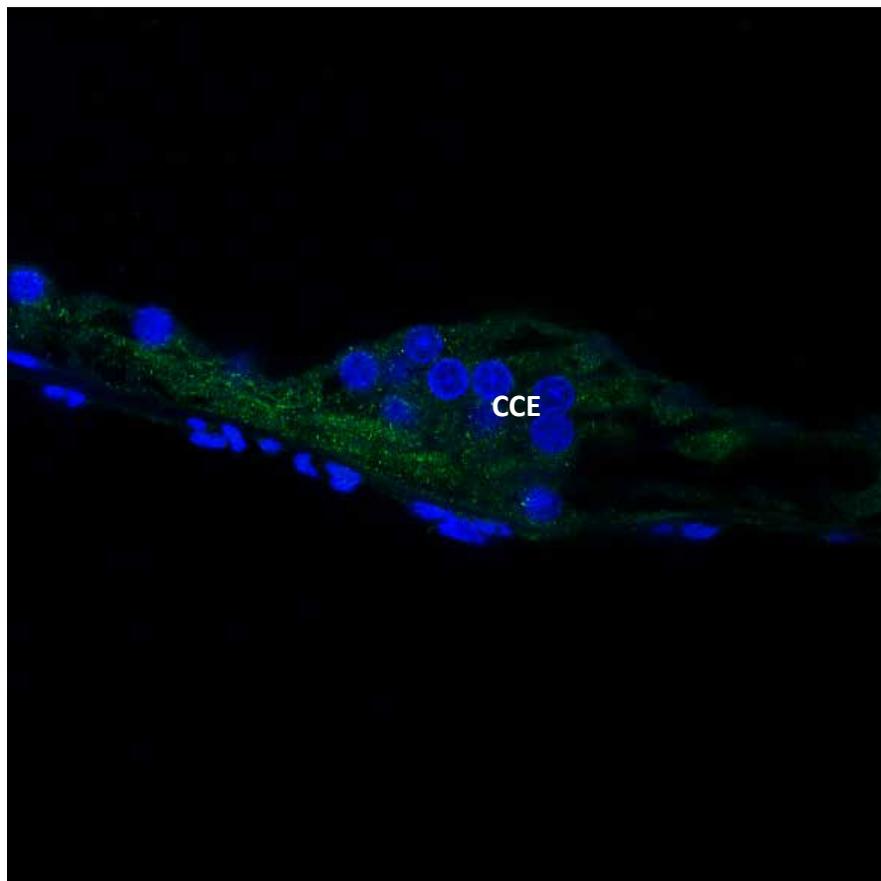


Fonte: Acervo da autora.

A: imagem em campo claro para orientação visual das células do órgão de Corti; círculo: CCE; asterisco: membrana tectória retraída; B: células imunomarcadas com anti-glutathione peroxidase revelado com Alexa 488 (verde); C: sobreposição de imagens (núcleos em azul marcados com DAPI + B) (objetiva 63x).



Figura 30 - Microscopia confocal do ducto coclear de rato do grupo B4, evidenciando o órgão de Corti



Fonte: Gonçalves, *et al.* No prelo.

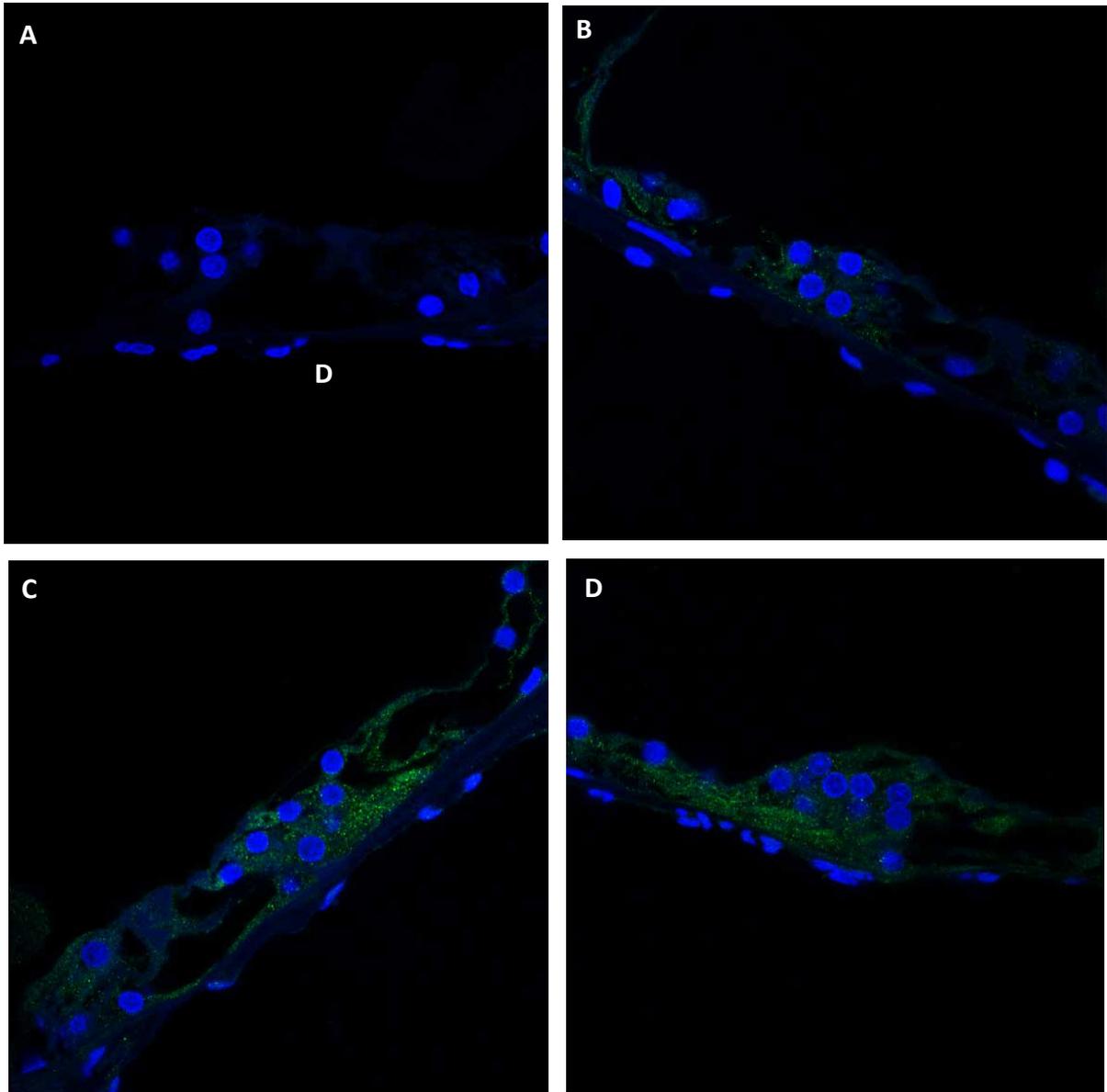
CCE:células ciliadas externas. Sobreposição de imagens (núcleos marcados com DAPI + anticorpo anti-glutathiona peroxidase revelado com Alexa 488) (objetiva 63x, zoom 2.0).

Nas Figuras 29 e 30 observa-se a marcação granular intensa (pontos verdes mais intensos) da GSH-Px no citoplasma celular.



Resultado da imunomarcção da enzima GSH-Px nos quatro grupos do experimento B.

Figura 31 - Composição de imagens do órgão de Corti de ratos dos quatro grupos, referente à imunomarcção da enzima glutathiona peroxidase



Fonte: Gonçalves, *et al.* No prelo.

Sobreposição de imagens: núcleos celulares marcados com DAPI (azul) e células imunomarcadas com anti-glutathiona peroxidase revelada com Alexa 488 (verde); A: grupo B1; B: grupo B2; C: grupo B3; D: grupo B4 (objetiva 63x, zoom 2.0).



4 DISCORRENDO SOBRE OS RESULTADOS

No presente estudo foi analisada a expressão intracelular da enzima GSH-Px, que é um marcador celular para eventos de otoproteção e desempenha um importante papel no sistema de defesa celular combatendo a formação de radicais livres. A análise deste marcador foi comparada com o resultado das avaliações anatômica e funcional.

Este capítulo foi redigido em subitens conforme o assunto a ser discutido, porém, considerando a necessidade de conectar os resultados dos diferentes exames, os conteúdos dos subitens se fundem em diversos momentos.

4.1 Resultados clínicos

Variação de peso, vias administradas e efeitos da dose

Alguns sinais de toxicidade sistêmica foram observados no decorrer da pesquisa, como queda de pêlos, diarreia e perda de peso, estando presentes nos ratos expostos à cisplatina.

O comportamento clínico foi avaliado a partir da variação do peso dos animais, sendo observada semelhança neste comportamento em ambos os experimentos A e B desde o primeiro dia de exposição às drogas. Enquanto os animais dos grupos controles negativo (A1 e B1) e positivo (A2 e B2) começaram a ganhar peso, os animais dos grupos experimentais (A3, A4, B3 e B4) começaram a perder peso.

No grupo A1 o aumento de peso foi de 19% (Tabela 1) e no grupo B1 foi de 12,4% (Tabela 11). Diferença de valores explicada pelo tempo transcorrido em cada experimento, ou seja, os animais do experimento A permanecerem vivos por mais tempo e, conseqüentemente, se alimentaram por mais tempo.

Analisando as variações de peso entre os grupos controles negativo e positivo de cada experimento, concluiu-se que a NAC não interferiu nos resultados clínicos dos animais ao final da pesquisa. Isso porque, embora o grupo A2 tenha aumentado de peso comparado ao grupo A1 (21% e 19%, respectivamente, Tabela 1), este aumento foi discreto e essa situação não ocorreu entre os grupos B2 e B1 (9% e 12%, respectivamente, Tabela 11). Dickey *et al.* (2004) citam que a NAC previne a perda de peso pela redução na toxicidade do trato gastrointestinal, porém este resultado não foi observado nesta pesquisa.

Os grupos ototóxico e ototóxico com otoproteção, em cada experimento, tiveram o mesmo índice de perda de peso, sendo de 22% nos grupos A3 e A4 (Tabela 1) e de



16% nos grupos B3 e B4 (Tabela 11). Também a partir destes resultados considerou-se que a NAC não tenha promovido proteção sistêmica a ponto de atenuar as manifestações clínicas causadas pela a cisplatina.

De forma geral, atribuiu-se as diferenças nas variações de peso entre os animais dos experimentos A e B ao período experimental de cada um.

Freitas (2006) também encontrou redução do peso dos animais expostos à cisplatina em relação ao grupo controle, o que ocorreu a partir do primeiro ou do segundo dia de experimento para as doses cumulativas de 16 mg/Kg e 24mg/Kg. A perda de peso média para a dose de 24 mg/Kg foi em torno de 12% no terceiro dia e 11% no quarto dia, valores semelhantes aos 16% aqui encontrados para a dose de 24mg/Kg (grupo B3). Kamimura *et al.* (1999), após três dias da administração de 16 mg/Kg de cisplatina em ratos, verificaram perda de peso média de 24,5%.

Diferentemente deste estudo, Campbell *et al.* (1996) verificaram que o uso de otoprotetor associado à cisplatina (300 mg/Kg de D-metionina³ associado a 16mg/Kg cisplatina) proporcionou melhores condições clínicas, com significativa menor perda de peso e com os animais visivelmente mais ativos do que aqueles tratados unicamente com cisplatina.

No estudo de Dickey *et al.* (2004), a NAC protegeu parcialmente contra a perda de peso causada pela cisplatina quando aplicada 15 minutos antes desta.

Para se alcançar a ototoxicidade desejada em estudos experimentais com cisplatina, deve-se levar em conta a combinação efetiva entre a via de administração da droga e a dose da mesma, além da aplicação concomitante do otoprotetor. Neste estudo, optou-se por um intervalo de uma hora entre a aplicação da NAC e da cisplatina para evitar a interação imediata entre as drogas. Além disso, conforme indicado pelo fabricante do medicamento (ACETILCISTEÍNA-EMS, 2013), por via oral a NAC é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e inicia sua ação dentro de uma hora após sua administração.

Com relação à via de acesso da cisplatina, optou-se pela injeção intraperitoneal pela facilidade de aplicação e por ser a via utilizada em estudos que comprovaram a toxicidade coclear em ratos (KALKANIS; WHITWORTH; RYBAK, 2004; LYNCH *et al.*, 2005; FREITAS, 2006). A seleção da dose utilizada constituiu um fator determinante para que se pudessem contemplar os objetivos da pesquisa, sendo também feita a partir de estudos consultados (FREITAS, 2006; YAZICI *et al.*, 2012). No entanto, apesar de utilizar metodologia equivalente, respeitando a dose diária e o ciclo de tratamento, não foram evidenciadas lesões nas CCEs na mesma intensidade e importância que os estudos de referência, possivelmente pelo momento precoce em que os animais foram eutanasiados, uma vez que as lesões causadas pela cisplatina

³ D-metionina é um composto sulfurado (que contém enxofre) com afinidade de ligação à cisplatina.



podem acontecer tardiamente à exposição, dentro de horas ou até dias após o tratamento (RYBAK *et al.*, 2009).

O estudo de Dickey *et al.* (2004) apresentou evidências de que o pré-tratamento com 400 mg/Kg de NAC via intravenosa 15 minutos antes de 6 mg/Kg de cisplatina via intra-arterial (carótida externa direita) pode prevenir a ototoxicidade, verificado pelos limiares do PEATE. Resultado semelhante foi encontrado em outros grupos do mesmo estudo que receberam NAC 30 minutos antes e quatro horas depois da cisplatina. Estes achados sugerem maior eficácia do acesso arterial das drogas à cóclea, no entanto, pela necessidade intubação, demanda um preparo laboratorial maior e com maiores recursos do que a via intraperitoneal.

4.2 Avaliação funcional da audição

Diversos estudos obtiveram resultados os quais permitiram afirmar que os testes de EOAPD e PEATE são métodos úteis na identificação de ototoxicidade por cisplatina em modelos animais (RYBAK *et al.*, 1999; 2000; ALAM *et al.*, 2000; DICKEY *et al.*, 2004; LYNCH *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2009a, 2009b; HUANG *et al.*, 2007; HYPPOLITO *et al.*, 2003; 2005; KASSE *et al.*, 2008; PAKSOY *et al.*, 2011; YAZICI *et al.*, 2012; ÖZKIRIS *et al.*; 2013; OZTURK *et al.*, 2013), sendo, por isso, ambos os métodos incluídos na metodologia desta pesquisa. Associado a isso, em humanos, os prejuízos da cisplatina sobre a cóclea são detectados pelas EOAPD antes mesmo da audiometria tonal liminar (OZTURAN *et al.*, 1996).

Quanto ao protocolo de realização das EOAPD, existe pouca variabilidade na aplicação em estudos experimentais. O que variou na literatura consultada foi a intensidade de f1 e f2, que foi fixa a 70 dBNPS para ambas as frequências, como nos estudos em ratos de Freitas (2006), Yazici *et al.* (2012) e Özkiris *et al.* (2013), ou de 65 dBNPS para f1 e 55 dBNPS para f2 nos estudos em cobaias de Hyppolito *et al.* (2005) e Kasse *et al.* (2008). O protocolo aplicado nesta pesquisa atendeu ao critério de manutenção de intensidade fixa a 70 dBNPS para f1 e f2. As f2 pesquisadas no *DP-gram* foram 1105 Hz, 2211 Hz, 4416 Hz e 8837 Hz para uma relação sinal/ruído \geq 6dB.

Com metodologia análoga à aqui aplicada, Freitas *et al.* (2009a) administraram 8 mg/Kg de cisplatina durante três dias consecutivos em ratos Wistar. Dose suficiente para causar diminuição significativa da amplitude das EOAPD em todas as frequências estudadas (3, 4, 6 e 8 KHz) e aumento significativo do limiar médio eletrofisiológico do PEATE, tanto no grupo avaliado no terceiro quanto no quarto dia de experimento. Porém, no mesmo estudo, as EOAPD não foram capazes de identificar ototoxicidade com a dose de 16mg/Kg. Da mesma forma, Yazici *et al.* (2012) encontraram diminuição significativa da amplitude das EOAPD (3, 4, 6 e



8 KHZ) aplicando 8 mg/Kg de cisplatina durante três dias consecutivos em ratos Wistar. Özkiris *et al.* (2013) constataram a eficácia das EOAPD no diagnóstico da ototoxicidade, uma vez que encontraram redução estatisticamente significativa na amplitude das mesmas em todas as frequências testadas (1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10 e 12 KHz) após 15 dias da aplicação de dose única de 12 mg/Kg de cisplatina em ratos Sprague-Dawley. Ressalta-se que, nos estudos citados, o parâmetro de análise das EOAPD foi a amplitude e não a relação sinal-ruído. A análise da relação sinal-ruído foi adotada no presente estudo por ser este o critério de diagnóstico da função coclear.

Ao final do tratamento, não foi verificada diminuição significativa da relação sinal-ruído em nenhum dos dois grupos experimentais A3 e A4 (Tabelas 4 e 5). Este achado permite concluir que não houve alteração funcional das CCEs detectável por EOAPD após o tratamento com cisplatina para a dose e posologia utilizadas.

No que se refere ao limiar eletrofisiológico obtido pelo PEATE em ratos, Hatzopoulos *et al.* (2002) consideram a onda III como a de maior visibilidade. Já Amsallem e Andrieu-Guitrancout (1985), Kamimura *et al.* (1999) e Freitas (2006) tomaram por base a onda II na pesquisa do limiar, uma vez que esta foi a de maior amplitude e a última a desaparecer com a diminuição da intensidade do estímulo sonoro. Em concordância, aqui também a onda II foi a mais robusta e a que evidenciou o limiar eletrofisiológico.

Quanto aos resultados do PEATE nos animais do experimento A, foram encontrados valores estatísticos significativamente mais elevados após o tratamento nos grupos A3 e A4, em uma das orelhas (Tabelas 8 e 9, respectivamente). A partir destes resultados, duas conclusões puderam ser obtidas: a) a ocorrência de ototoxicidade por cisplatina mesmo com administração de uma dose considerada baixa (3mg/Kg/dia), e b) a insuficiente ação da NAC como otoprotetor, já que o grupo A4 apresentou resultado auditivo semelhante ao grupo A3. Ainda, o PEATE foi mais sensível do que as EOAPD para detectar alteração funcional da audição frente à cisplatina, uma vez que não houve redução significativa da relação sinal-ruído das EOAPD depois da exposição à droga, porém houve aumento do limiar eletrofisiológico. Conclusão também obtida no estudo de Freitas *et al.* (2009a).

No experimento B, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos valores do limiar eletrofisiológico por meio de PEATE entre o pré e pós-tratamento em todos os grupos estudados. No entanto, foi verificado um aumento de 85,7% na média dos limiares para a orelha direita no grupo B4 (Tabela 14), o que pode ser explicado pelo aumento da variabilidade nesta orelha (desvio padrão), o que, para sua comprovação, necessitaria de um maior tamanho amostral.

Diferentemente da hipótese de que o grupo B3 teria um aumento no limiar auditivo eletrofisiológico, uma tendência a este resultado foi observada no grupo B4, embora sem diferença estatística significativa. Além do que, com o agrupamento das



orelhas houve um aumento do limiar eletrofisiológico no grupo B4 quando comparado ao grupo B1 (Tabela 15). Este resultado indica que a NAC não interferiu nos limiares eletrofisiológicos auditivos neste experimento, seja pela dose utilizada ou pelo tempo de tratamento padronizado para este experimento.

Resultados diferentes foram encontrados em outros estudos com otoprotetores. Dickey *et al.* (2004) avaliaram o efeito otoprotetor da NAC à ototoxicidade por cisplatina em ratos Long-Evans. Os animais foram tratados com infusão intra-arterial, via carótida externa direita, com 6mg/Kg de cisplatina. A NAC foi administrada via intravenosa na dose de 400 mg/Kg aos 15 e 30 minutos antes da infusão de cisplatina e também 4 horas depois. O PEATE com estímulo *tone burst* nas frequências de 4, 8, 12, 16 e 20 KHz foi realizado antes do tratamento e sete dias depois. O grupo que recebeu NAC 15 minutos antes da cisplatina foi o que apresentou maior otoproteção, com menor perda de audição. Os demais grupos que receberam NAC também apresentaram menor perda de audição quando comparados ao grupo que recebeu apenas cisplatina. Ressaltam-se as diferenças metodológicas com o presente estudo, seja na via de administração das drogas, que pode ter ocasionado uma ação mais direta e imediata sobre o órgão de Corti, e análise pelo PEATE por *tone burst*, com avaliação de frequências mais graves.

Lynch *et al.* (2005) estudaram a otoproteção do Alopurinol⁴, um inibidor da enzima xantina oxidase⁵, e do ebselen⁶ contra a ototoxicidade pela cisplatina (dose única de 16 mg/Kg via intraperitoneal) em ratos Fischer. A associação destes compostos, administrados uma hora antes da cisplatina, ofereceu proteção à cóclea uma vez que promoveu menor aumento dos limiares eletrofisiológicos do PEATE e, histologicamente, houve menor lesão das CCEs e menor edema na estria vascular.

Alguns otoprotetores são incompatíveis com a cisplatina, pois reduzem o seu potencial antineoplásico. Porém, segundo alguns estudos, este não é o caso da NAC (MULDOON *et al.*, 2000; WU, MULDOON; NEUWELT, 2005; NEUWELT *et al.*, 2004, DICKEY *et al.*, 2004). Dickey *et al.* (2005) sugerem que a via e o momento de administração do quimioterápico e do otoprotetor devem ser diferentes na tentativa de manter a eficácia antitumoral. Neste estudo, o objetivo foi de contemplar esta situação para posteriores estudos translacionais em humanos e também de compreender o mecanismo de otoproteção da NAC na via antioxidativa celular. A NAC foi, então, administrada via oral por gavagem uma hora antes da cisplatina via intraperitoneal. Não foi possível constatar a ocorrência de um efeito otoprotetor pela avaliação eletrofisiológica e microanatômica, mostrada pela manutenção da citoarquitetura

4 Alopurinol é uma substância antioxidante, cujo mecanismo consiste na inibição da enzima xantina oxidase e na captura do radical hidroxila.

5 A enzima xantina oxidase é uma das principais enzimas envolvidas na formação de EROs (ANDRADE *et al.*, 2004).

6 Ebselen é um composto sintético análogo à glutathione peroxidase, com propriedades antioxidantes.



ciliar das CCEs à MEV em todos os grupos de estudo (Figuras 21, 22, 23 e 24).

Outra via de administração deste otoprotetor foi testada por Riga *et al.* (2013) em 20 pacientes sob tratamento quimioterápico com cisplatina. A NAC foi aplicada de forma transtimpânica em uma orelha (com a orelha contralateral utilizada como controle) antes da aplicação intravenosa de cisplatina. Dessa forma, a orelha média foi preenchida com NAC e esta atingiu orelha interna por difusão através da janela redonda. Por meio de audiometria tonal, realizada antes e depois do tratamento, foi verificada piora significativa no limiar auditivo da frequência de 8000 Hz nas orelhas controle, ou seja, expostas à cisplatina. Já nas orelhas tratadas com NAC, não foi encontrada esta diferença no limiar auditivo. Assim, os autores concluíram que esta é uma estratégia viável e eficaz de prevenção à ototoxicidade da cisplatina.

Analisando os resultados do PEATE nos dois experimentos A e B, concluiu-se que uma subdose num período mais prolongado (grupos A3 e A4) causou maior alteração funcional do que uma dose alta em menos tempo (grupos B3 e B4), isto é, o tempo foi fator determinante para a ocorrência da ototoxicidade, à semelhança do que foi observado quanto à toxicidade sistêmica.

A dose de 8mg/Kg/dia de cisplatina administrada no experimento B não provocou alteração auditiva significativa detectável ao PEATE, tampouco houve alteração anatômica observável à MEV, já que estes grupos apresentaram manutenção da arquitetura ciliar nas três fileiras de CCEs (Figuras 21, 22, 23 e 24). No entanto, levando-se em consideração o importante prejuízo auditivo encontrado do grupo B4, tanto na análise por orelha (Tabela 14) quanto na análise das orelhas agrupadas (Tabela 15), observou-se que as alterações funcionais se manifestaram antes das alterações anatômicas.

4.3 Avaliação anatômica das CCEs

Os ratos do experimento B tiveram suas cócleas analisadas por MEV para que se pudessem verificar as condições anatômicas das CCEs após o tratamento com cisplatina e NAC. Este método fornece uma fácil visualização do arranjo ciliar, sendo utilizado em diversos estudos sobre a ototoxicidade por cisplatina em roedores (CHURCH *et al.*, 1995; CAMPBELL *et al.*, 1996; KAMIMURA; WHITWORTH; RYBAK, 1999; HYPOLITO *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004; KALKANIS; WHITWORTH; RYBAK, 2004; ILHA *et al.*, 2007; KASSE *et al.*, 2008).

Em todas as cócleas analisadas, constatou-se manutenção da arquitetura ciliar nas três fileiras de CCEs, ou seja, os tratamentos administrados neste experimento não causaram danos anatômicos visíveis à MEV.

Não foram encontrados na literatura consultada estudos que abrangessem especificamente a MEV como método de avaliação da otoproteção da NAC à



cisplatina. Dessa forma, outras substâncias otoprotetoras são citadas a seguir.

Utilizando PEATE e MEV como métodos de avaliação da otoproteção da D-metionina à ototoxicidade por cisplatina em ratos Wistar, Campbell *et al.* (1996) encontraram resultados distintos aos desta pesquisa. Foram estudados cinco grupos com cinco animais cada, incluindo o grupo controle tratado com 16 mg/Kg de cisplatina por infusão, um grupo controle não tratado (solução salina), e três grupos que receberam, respectivamente, 75, 150 e 300 mg/Kg de D-metionina por injeção intraperitoneal 30 minutos antes da infusão de cisplatina. A contagem das CCEs foi normal na espira apical, sem diferença entre os grupos. Nas espiras média e basal, somente o grupo controle tratado apresentou alteração significativa quando comparado ao grupo controle não tratado. Dos três grupos que receberam pré-tratamento com D-metionina, a espira basal foi mais prejudicada do que a espira média. O estudo mostrou que 300 mg/Kg de D-metionina administrada 30 minutos antes de 16 mg/Kg de cisplatina forneceu otoproteção completa, indicada pelos resultados histológicos e pelo PEATE.

Kamimura *et al.* (1999) e Kalkanis, Whitworth e Rybak (2004) administraram 16 mg/Kg de cisplatina por infusão intraperitoneal durante 30 minutos em ratos, encontrando um grau severo de lesão na primeira fileira das CCEs da espira basal da cóclea à MEV, assim como Hyppolito *et al.* (2003; 2005) encontraram lesão com ausência de cílios nas três fileiras de CCEs da espira basal e desarranjo ciliar das CCI em cobaias tratadas com 8mg/Kg de cisplatina por oito dias. Huang, Whitworth e Rybak (2007) expuseram ratos Wistar a uma dose de 13 mg/Kg de cisplatina e 200 mg/Kg de extrato de Ginkgo Biloba, administrados separados ou simultaneamente. A observação à MEV mostrou lesão severa nos estereocílios das CCEs da espira basal da cóclea nos ratos tratados com cisplatina, enquanto no grupo tratado com ambas as substâncias, as células permaneceram intactas.

Como visto, a ototoxicidade se manifesta com diferentes doses de cisplatina utilizando-se diferentes vias de administração, sendo identificada por MEV. No entanto, neste estudo, a dose de 8mg/Kg durante três dias consecutivos não foi suficiente para desencadear alteração anatômica nas CCEs.

4.4 Imunofluorescência

4.4.1 Otoproteção da NAC e enzima GSH-Px

A partir do método aqui empregado, verificou-se ausência de imunomarcagem da enzima GSH-Px no grupo controle negativo (B1), o que era presumível já que havia condição de integridade celular. No grupo exclusivo NAC (B2) e, portanto, uma condição também de integridade celular, em uma avaliação qualitativa, observou-se



imunomarcção positiva da GSH-Px com aspecto granular em todas as amostras analisadas, demonstrando a capacidade da NAC em motivar a síntese desta enzima.

A imunomarcção positiva da GSH-Px, verificada qualitativamente pelo aspecto granular em todas as amostras analisadas para os grupos B3 e B4, sugerem que a própria cisplatina desencadeia a expressão dessa enzima antioxidante intracelular, indicando que as CCEs possuem a capacidade para ativar seu sistema antioxidante endógeno.

Ravi, Somani e Rybak (1995) induziram a ototoxicidade em ratos administrando diferentes doses de cisplatina. Comparando com o grupo controle, os autores verificaram que a ototoxicidade da cisplatina estava associada à diminuição da atividade da enzima GSH-Px e glutathione redutase. Também encontraram, três dias após a administração da cisplatina, aumento na atividade da enzima superóxido dismutase e catalase, sugerindo haver um aumento da geração de EROs cóclea, e acúmulo de malaondialdeído, um indicador de peroxidação lipídica.

Rybak, Whitworth e Somani (1999) verificaram diminuição significativa da atividade da GSH-Px no tecido coclear de ratos após o tratamento com cisplatina (16 mg/Kg), o que difere do resultado encontrado no grupo B3 deste estudo com a dose cumulativa de 24 mg/Kg. No entanto, neste mesmo estudo, os animais que receberam diferentes doses do antioxidante ácido alfa lipoico⁷ (25, 50 e 100 mg/Kg) 30 minutos antes da dose de cisplatina, manifestaram aumento significativo da GSH-Px. Assim, é possível inferir que a expressão da GSH-Px pode estar associada à dose de cisplatina empregada no tratamento, podendo o processo de lesão celular estar em um estágio inicial, onde o sistema de defesa endógeno das CCEs ainda atua efetivamente, inclusive possibilitando a reversão espontânea do efeito ototóxico, quando cessado o estímulo com potencial lesivo e dose dependente.

Neste estudo, foram analisadas as CCEs do terço médio da espira basal ou da espira média da cóclea, por ser a região mais preservada de artefatos mecânicos. Por isso, não foi possível fazer um comparativo entre a imunomarcção da GSH-Px destas células com as do ápice da cóclea. O que a literatura aponta é que as CCEs da base da cóclea apresentam menores níveis de glutathione comparados às CCEs do ápice, o que lhes confere maior suscetibilidade aos danos causados pelos radicais livres (SHA *et al.*, 2001).

Estudos sobre otoproteção utilizando a NAC encontraram menor quantidade de radicais livres na orelha interna, o que resultaria em menos apoptose coclear, sendo esta condição a que se tentou provar com a presente pesquisa, com altas doses de cisplatina em um estudo de indução de cocleotoxicidade aguda. Os estudos prévios com NAC não reportam efeitos adversos até mesmo em doses tão altas quanto 2000

⁷ O ácido alfa lipoico é um antioxidante não enzimático de baixo peso molecular (NORDBERG; ARNÉR, 2001).



mg/kg NAC (DICKY *et al.*, 2004; FETONI *et al.*, 2009).

A dose cumulativa de 1750 mg/kg de NAC, administrada antes e após o trauma induzido por um ruído impulsivo, resulta em maior limiar auditivo e maior perda de células ciliadas internas em relação aos animais controle. Do contrário, uma dose de 1050 mg/kg, durante 5 dias consecutivos, resultou em uma proteção significativa contra o ruído impulsivo (Duan *et al.*, 2004). Assim, os estudos mostram que a NAC não é tóxica para a cóclea, mas a dose do medicamento é fundamental para obter o seu efeito protetor.

Os resultados aqui encontrados sugerem a necessidade de atenção crítica aos resultados que são apresentados na literatura, com revisão das doses das drogas utilizadas, tanto para fim de ototoxicidade quanto para a promoção da otoproteção. A dose de cisplatina utilizada para este estudo foi originalmente selecionada considerando o seu potencial ototóxico. Porém, a mesma não foi suficiente para causar lesão anatômica e funcional. O potencial otoprotetor de uma droga pode ser verificado ou identificado em condições de ototoxicidade, caso contrário, se torna inviável compreender a sua ação.

Por outro lado, os resultados obtidos mostraram que, apesar da dose cumulativa total de 24 mg/kg de cisplatina não ter alterado a condição anatômica das CCEs nem a condição funcional da via auditiva, foi capaz de induzir uma resposta celular intrínseca de aumento nos níveis de GSH-Px.



5 DESFECHO

Comparando ambos os experimentos desta pesquisa sob o ponto de vista clínico, os resultados mais ostensivos foram encontrados no experimento A. Os animais dos grupos A3 e A4 foram os que mais perderam peso e os do grupo A2 foram os que mais ganharam peso. Situações vinculadas à diferença de tempo transcorrido em cada experimento (A e B). Ainda, os limiares eletrofisiológicos aumentaram significativamente nos grupos A3 e A4, em pelo menos uma das orelhas.

Considerou-se a hipótese de que a eutanásia dos animais tivesse ocorrido de forma precoce, quando a ototoxicidade ainda estivesse em um estágio inicial. Porém, se o período da pesquisa fosse prolongado, haveria a possibilidade dos animais irem a óbito em decorrência das condições clínicas inerentes ao uso da cisplatina.

No que se refere ao marcador celular elegido para o estudo da otoproteção da NAC, verificou-se expressão da GSH-Px nas CCEs dos animais expostos à cisplatina e/ou à NAC. Este resultado mostra que a célula reagiu à toxicidade da cisplatina lançando mão do seu sistema de defesa antioxidante.

Quanto à ação do otoprotetor, verificou-se que a NAC motiva a síntese da GSH-Px e sua atuação pode ser detectada antes do surgimento da lesão. Porém, a partir da metodologia aplicada, considerou-se que a otoproteção pela NAC não foi confirmada. Depois de triplicar a dose de NAC nos animais do experimento B, ainda assim houve aumento dos limiares eletrofisiológicos no grupo B4. Além disso, como não foi verificada diferença sobressalente na imunomarcagem da GSH-Px entre os grupos B3 e B4 (ototóxico e ototóxico com otoproteção, respectivamente), concluiu-se que a NAC, por si só, não foi suficiente para despertar o mecanismo de defesa intracelular no modelo aplicado.

De forma geral, considerando o tratamento padronizado neste experimento e associando os resultados das diferentes avaliações realizadas, a dose de cisplatina administrada no experimento B não foi tóxica a ponto de provocar alteração funcional e/ou anatômica, no entanto, foi capaz de despertar uma resposta celular intrínseca de defesa, aumentando os níveis de GSH-Px.



REFERÊNCIAS

- ACETILCISTEÍNA: xarope. Responsável técnico Ronoel Caza de Dio. Hortolândia-São Paulo: EMS, 2013. Bula de remédio.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell death. **Science**, v. 281, p. 1233-1236, 1998.
- ALAM, S. A *et al.* Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. **Hear Research**, v. 141, p. 28-38, 2000.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 32, p. 1053-1061, 1999.
- AMSALLEM, P.; ANDRIEU-GUITRANCOUT, J. Experimental study of ototoxicity of cisplatin. **Annales d'oto-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale**, v. 102, p. 365-372, 1985.
- BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 725-731, 2003.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 615-647, 2003.
- BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.
- BROWN, A. M.; KEMP, D. T. Suppressibility of the 2f, - f2 stimulated acoustic emissions in gerbil and man. **Hearing Research**, v.13, p. 29-37, 1984.
- CAMPBELL, K. C.; RYBAK, L. P.; MEECH, R. P.; HUGHES, L. D-methionine provides excellent protection from cisplatin ototoxicity in the rat. **Hearing Research**, v. 102, n. 1-2, p. 90-98, 1996.
- CAMPBELL, K. C. M.; KALKANIS, J.; GLATZ, R. Ototoxicity: mechanisms, protective agents and monitoring. **Current Opinion Otolaryngology Head Neck Surgery**, v. 8, p. 436-440, 2000.
- CARDINAAL, R. M. *et al.* Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon themorphology of the albino guinea pig cochlea. **Hearing Research**, v. 144, p. 135-146, 2000.
- CASARES, C. *et al.* Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal model. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 269, p. 2455-2459, 2012.
- CATERINA, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816–824, 1997.
- CHENG, P. W. *et al.* Correlation of increase activities of Na⁺, K⁺-ATP-ase and Ca²⁺-ATPase with the reversal of cisplatin ototoxicity induced by D-methionine in guinea pigs. **Hear Research**, v. 205, p. 102-109, 2005.
- CHURCH, M. W. *et al.* Kaltenbach JA, Blakley BW, Burgio DL. The comparative effects of thiosulfate of sodium, diethyldithiocarbamate, fosfomycin and WR-2721 on ameliorating cisplatin-induced ototoxicity. **Hear Research**, v. 86, n. 1-2, p. 195-203, 1995.



CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Brasília-DF, 2013. 54 p. Disponível em www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=36

DEMACHKI, S.; BACCHI, C. E. Metalotioneínas e neoplasias humanas. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 34, n. 1, p. 48-54, 1998.

DEVARAJAN, P. *et al.* Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. **Hear Research**, v. 174, n. 1-2, p. 45-54, 2002.

DICKEY, D. T. *et al.* Protection against cisplatin-induced ototoxicity by N-acetylcysteine in a rat model. **Hear Research**, v. 193, n. 1-2, p. 25-30, 2004.

DICKEY, D. T. *et al.* Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 3, p. 1052–1058, 2005.

DUAN, M.; QIU, J.; LAURELL G.; OLOFSSON, A.; COUNTER, S. A.; BORG, E. Dose and time-dependent protection of the antioxidant N-L-acetylcysteine against impulse noise trauma. **Hear Research**, v.192, p. 1-9, 2004.

DURANTE, A. S. Emissões otoacústicas. In: BEVILACQUA, M. C. *et al.* (org.). **Tratado de Audiologia**. São Paulo: Santos Editora, 2011. cap 10, p.145-158.

ESHLAGHI, A. A.; BUBLIK, M.; VAN DER WATER, T. R. Mechanisms of chemotherapeutic-induced hearing loss and otoprotection. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v.3, n.1, p. 125-130, 2006.

ESTEVES, M. C. B. N., *et al.* Estudo das latências das ondas dos potenciais auditivos de tronco encefálico em indivíduos normo-ouvintes. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 3, p. 420-425, 2009.

EVANS, P.; HALLIWELL B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 884, p. 19-40, 1999.

FEGHALI, J. G.; LIU, W.; VAN DE WATER, T. R. L-N-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity. **Laryngoscope**, v. 111, p. 1147-1155, 2001.

FETONI, A. R. *et al.* Protective effects of N-acetylcysteine on noise induced hearing loss in guinea pigs. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 29, p. 70-75, 2009.

FREEMAN, B. A.; CAPO, J. D. Biology of disease: free radical and tissue injury. **Laboratory Investigation**, v.47, p. 412-426, 1982.

FREITAS, M. R. **Caracterização morfofuncional da ototoxicidade por cisplatina em ratos: avaliação do papel da apoptose e da otoproteção por amifostina**. 169f. Tese (Doutorado em cirurgia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FREITAS, M. R. *et al.* Avaliação da sensibilidade das emissões otoacústicas produtos de distorção e dos potenciais auditivos evocados de tronco encefálico na ototoxicidade por cisplatina em ratos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 4, p. 476-484, 2009(a).

FREITAS, M. R. *et al.* O papel da apoptose na ototoxicidade por cisplatina em ratos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 5, p. 745-752, 2009(b).

GARCIA, A. P.; IÓRIO, M. C. M.; PETRILLI, A. S. Monitoramento da audição de pacientes expostos à cisplatina. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 69, p. 215-221, 2003.



GARCÍA-BERROCAL J. R. *et al.* The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 1012-1020, 2007.

GARETZ, S. L.; ALTSCHULER, R. A.; SCHACHT, J. Attenuation of gentamicin ototoxicity by glutathione in the guinea pig in vivo. **Hearing Research**, v. 77, p. 81-87, 1994.

GARRIDO, N. *et al.* Cisplatin-mediated impairment of mitochondrial DNA metabolism inversely correlates with glutathione levels. **Biochemical Journal**, v. 414, p. 93-102, 2008.

GOLDSTEIN, J. C. *et al.* The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. **Nature Cell Biology**, v. 2, p. 156-162, 2000.

GONÇALVES, M. S. *et al.* Otoprotection mechanisms against oxidative stress caused by cisplatin. **International Archives of Otorhinolaryngology**. No prelo.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p.335-343, 2007.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Antioxidants: molecules, medicines and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561-564, 2010.

HALL, J. W. **Handbook of otoacoustic emissions**. 3rd ed. Canada: Singular Thompson Learning, 2000. cap 1, p. 27.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. Encyclopedia of life science. Nature Publishing Group / www.els.net, 2001.

HARRIS, M. H.; THOMPSON, C. B. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. **Cell Death Differentiation**, v. 7, p. 1182-1191, 2000.

HATZOPOULOS, S. *et al.* Ototoxic effects of cisplatin in a Sprague-Dawley rat animal model as revealed by ABR and transiently evoked otoacoustic emission measurements. **Hearing Research**, v. 170, p. 70-82, 2002.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HENRY, K. R. Auditory brainstem volume-conducted responses: origins in laboratory mouse. **Journal of American Auditory Society**, v. 4, n. 5, p 173-178, 1979.

HOLDINESS, M. Clinical pharmacokinetics of N-acetyl-cysteine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 20. p. 123-134, 1991.

HUANG, T. *et al.* Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, p. 259-270, 2000.

HUANG, X.; CRAIG A. WHITWORTH, C. A.; RYBAK, L. P. Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats. **Otology & Neurotology**, v. 28, p. 828-833, 2007.

HYPOLITO, M. A. *et al.* Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 69, n. 4, p. 504-511, 2003.

HYPOLITO, M. A. *et al.* Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e



- microscopia eletrônica de varredura. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 71, n. 3, p. 168-273, 2005.
- IKEDA, K.; SUNOSE, H.; TAKASAKA, T. Effects of free radicals on the intracellular calcium concentration in the isolated hair cell of the guinea pig cochlea. **Acta Otolaryngologica**, v. 113, p. 137-141, 1993.
- ILHA, L.; *et al.* Ototoxicidade induzida pela cisplatina em cobaias: efeito dose-dependente: avaliação funcional. **Acta ORL**, v. 25, n. 2, p. 112-118, 2007.
- JAKOBY, W. B. The glutathione S-transferases: a group of multi-functional detoxification proteins. **Advances in Enzymology**, v. 46, p. 383-414, 1978.
- JERO, J.; COLING, D. E.; LALWANI, A. K. The use of Preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. **Acta Otolaryngologica**, v. 121, n. 5, p. 585-589, 2001.
- JORDAN, J.; SCHWADE, N. D.; TRUELSON, J. M. Fosfomycin does not inhibit the tumoricidal efficacy of cisplatin. **Laryngoscope**, v.109, n. 8, p. 1259-1262, 1999.
- KALKANIS J. G.; WHITWORTH CA; RYBAK, L. P. Vitamin E Reduces Cisplatin Ototoxicity. **Laryngoscope**. v. 114, n. 3, p. 538-542, 2004.
- KAMIMURA, T.; WHITWORTH, C. A.; RYBAK, L. P. Effect of 4-methylthiobenzoic acid on cisplatin-induced ototoxicity in the rat. **Hearing Research**, v. 131, p. 117-127, 1999.
- KASSE, C. A. *et al.* Ototoxicidade e otoproteção. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 4, p. 105-115, 2008.
- KEMP, D. T. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. **Jouranl of the Acoustic Society of America**, v. 64, n. 5, p. 1386-1391, 1978.
- KEMP, D. T. Towards a model for the origin of cochlear echoes. **Hearing Research**, v. 2, p. 533-548, 1980.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Adaptação, dano e morte celular. *In*: ROBBINS e COTRAN: **Patologia: Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.11-48.
- LEE, J. E. *et al.* Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis. **ORL: Journal for Otorhinolaryngology and its Related Specialties**, v. 66, p. 111-118, 2004.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.
- LI, Y.; WOMER, R. B.; SILBER, J. H. Predicting cisplatin ototoxicity in children: influence of age and the cumulative dose. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 2445-2451, 2004.
- LIU, W. *et al.* Caspase inhibitors prevent cisplatin-induced apoptosis of auditory sensory cells. **Neuroreport**, v. 9, n. 11, p. 2609-2614, 1998.
- LORO, L. L.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNESSEN, A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 3, p. 125-138, 2003.
- LYNCH, E. D. *et al.* Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. **Hearing Research**, v. 201, p. 81-89, 2005.
- LOPEZ-GONZALEZ, M. A., *et al.* Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by



melatonin and other antioxidants. **Journal of Pineal Research**, v. 28, n. 2, p. 73-80, 2000.

MATAS, C. G.; MAGLIARO, F. C. L. Introdução aos Potenciais Evocados Auditivos e Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico. *In*: BEVILACQUA, M. C., *et al.* (org.). **Tratado de Audiologia**. Santos: Livraria Santos Editora Ltda, 2011. cap 12, p. 181-196.

MATAS, C. G.; HATAIAMA, N. M.; GONÇALVES, I. C. Estabilidade dos potenciais evocados auditivos em indivíduos adultos com audição normal. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v.16, n.1, p. 37-41, 2011.

McKEAGE, M. J. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. **Drug Safety**, v.13, p. 228-244, 1995.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.

MOLLER, A. R. *et al.* Intracranially recorded responses from the human auditory nerve: new insights into the origin of brain stem evoked potentials (BSEPs). **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 52, n. 1, p. 18-27, 1981.

MUKHERJEA, D. *et al.* Short interfering RNA against Transient Receptor Potential Vanilloid-1 attenuates cisplatin-induced hearing loss in the rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 49, p. 13056-13065, 2008.

MULDOON, L. L. *et al.* Delayed administration of sodium thiosulfate in animal models reduces platinum ototoxicity without reduction of antitumor activity. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 309-315, 2000.

NEUWELT, E. A. *et al.* Bone marrow chemoprotection without compromise of chemotherapy efficacy in a rat brain tumor model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, p. 594-599, 2004.

NORDBERG, J.; ÁRNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p.1287-1312, 2001.

OFÍCIO CIRCULAR nº 002/2009/ Gerência Geral de Toxicologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

OKADA, Y. *et al.* Accumulation of platelets in rat syngeneic lung transplants: a potential factor responsible for preservation-reperfusion injury. **Transplantation**, v. 64, n. 6, p. 801-806, 1997.

OSTHOFF, K. S. *et al.* Oxidative stress and signal transduction. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, p. 336-342, 1997.

ÖZKIRIS, M. *et al.* The effects of lycopene on cisplatin-induced ototoxicity, **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 270, p. 3027-3033, 2013.

OZTURAN O. *et al.* Monitoring of cisplatin ototoxicity by distortion-product otoacoustic emissions. **Auris Nasus Larynx**, v. 23, p. 147-151, 1996.

OZTURK, M., *et al.* Possible protective effect of sertraline against cisplatin-induced ototoxicity: an experimental study. **The ScientificWorld Journal**, p.1-5, 2013.

PAKSOY, M., *et al.* The protective effects of intratympanic dexamethasone and vitamin E on cisplatin-induced ototoxicity are demonstrated in rats. **Medical Oncology**, v. 28, p. 615-621, 2011.



- PARONLIN, M. B.; REASON, I. J. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. **Archives for Gastroenterology**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.
- PERSON, O. C., *et al.* A utilização dos potenciais evocados auditivos como método diagnóstico em medicina. **Arquivos Médicos do ABC**, v. 30, n. 1, p. 5-10, 2005.
- PIERSON, M. G.; GRAY, B.H. Superoxide dismutase activity in cochlea. **Hear Research**, v. 6, p. 141-151, 1982.
- PIGEOLET, E. *et al.* Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radical. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 50, p. 283-297, 1990.
- POIRRIER, A. L., *et al.* Oxidative Stress in the Cochlea: An Update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 31, p. 1-14, 2010.
- RAMÍREZ-CAMACHO, R., *et al.* Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. **Laryngoscope**, v. 114, p. 533-537, 2004.
- RAVI, R.; SOMANI, S.M.; RYBAK, L.P. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. **Pharmacology & Toxicology**, v. 76, p. 386-394, 1995.
- RIGA, M. G.; *et al.* Transtympanic injections of N-acetylcysteine for the prevention of cisplatin-induced ototoxicity: a feasible method with promising efficacy. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 36, p. 1-6, 2013.
- ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGOPELFREY, C. **Membrane lipid oxidation**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.151-70.
- RUBIN, E. *et al.* **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. São Paulo: Guanabara-Koogan, 2006.
- RYBAK, L.; WHITWORTH, C.; SOMANI, S. Application of antioxidants and others agents to prevent cisplatin ototoxicity. **Laryngoscope**, v. 109, p. 1740-1744, 1999.
- RYBAK, L. P. *et al.* Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. **American Journal of Otolaryngology**, v. 21, p. 513-520, 2000.
- RYBAK, L. P.; KELLY, T. Ototoxicity: bioprotective mechanisms. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 11, p. 328-333, 2003.
- RYBAK, L. P.; WHITWORTH, C.A. Ototoxicity: therapeutic opportunities. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 19, p. 1313-1321, 2005.
- RYBAK, L. P. *et al.* Mechanisms of cisplatin induced ototoxicity and prevention. **Hear Research**, v. 226, p. 157-167, 2007.
- RYBAK, L. P. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 15, p. 364-39, 2007.
- RYBAK, L. P. *et al.* Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 219, p. 177-186, 2009.
- SHA, S. H. *et al.* Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. **Hearing Research**, v. 155, p. 1-8, 2001.
- SHARIFIA, A. M. *et al.* Involvement of caspase-8, 9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells. **Neuroscience Letters**, v. 459, p. 47-51, 2009.



- SIMON, T. *et al.* The incidence of hearing impairment after successful treatment of neuroblastoma. **Klinische Padiatrie**, v. 214, n. 4, p. 149-152, 2002.
- SISTO, R.; *et al.* Otoacoustic emission sensitivity to low levels of noise-induced hearing loss. **The Journal of Acoustical Society of America**, v. 122, n. 1, p. 387-401, 2007.
- SOUSA, L. C. A.; *et al.* **Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas. Princípios e aplicações clínicas.** São Paulo: Tecmedd, 2008. 372 p.
- SMOORENBURG, G. F. *et al.* Protection and spontaneous recovery from cisplatin-induced hearing loss. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 884, p. 192-210, 1999.
- STAVROULAKI, P. *et al.* Evoked otoacoustic emissions – an approach for monitoring cisplatin induced ototoxicity in children. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 59, p. 47-57, 2001.
- STRAYER, D. S.; RUBIN, E. Cell adaptation, cell injury and cell death. *In*: RUBIN, R.; STRAUER, D. S. Rubin's **Pathology: clinicopathologic foundations of medicine**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012, cap 01, p. 01-46.
- STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 217-245, 2000.
- TAYLOR, R. C. *et al.* Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.
- THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, p. 1312-1316, 1998.
- USAMI, S.; HJELLE, O. P.; OTTERSEN, O. P. Differential cellular distribution of glutathione - an endogenous antioxidant - in the guinea pig inner ear. **Brain Research**, v. 743, p. 337-340, 1996.
- VAN RUJVEN, M. W. M. *et al.* Immunohistochemical detection of platinated DNA in the cochlea of cisplatin-treated guinea pigs. **Hearing Research**, v. 203, p. 112-121, 2005a.
- VAN RUIJVEN, M. W. M., *et al.* Cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. **Hearing Research**, v. 205, p. 241-248, 2005.
- WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews**, v. 4, p. 307-320, 2005.
- WEIBROUM, A. A. *et al.* N-acetyl-L-cysteine for preventing lung reperfusion injury after liver ischemia-reperfusion. **Transplantation**, v. 69, n. 5, p. 853-859, 2000.
- WU, Y. J.; MULDOON, L. L.; NEUWELT, E. A. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 2, p. 424-431, 2005.
- YAZICI, Z. M. *et al.* Reduction of cisplatin ototoxicity in rats by oral administration of pomegranate extract. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 269, p. 45-52, 2012.
- ZHENG, J. *et al.* Vanilloid receptors in hearing: altered cochlear sensitivity by vanilloids and expression of TRPV1 in the organ of Corti. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, n.



1, p. 444-455, 2003.

ZUCKI, F. **Potencial evocado auditivo de tronco encefálico e análise proteômica em ratos expostos a chumbo e suplementados com ferro.** 174 p. Tese (Doutorado em Ciências)– Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.



