

# Ototoxicidade induzida pela cisplatina em cobaias: efeito dose-dependente - avaliação funcional

Artigo Original

Artigo recebido em 09/12/06 e  
aprovado em 09/02/07

*Cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs: dose-related effects – a functional evaluation*

Luiz Iha<sup>1</sup>, Cristiane Kasse<sup>1</sup>, Osmar Mesquista Neto<sup>2</sup>, Clemente Ribeiro de Almeida<sup>3</sup>, Oswaldo Laércio Mendonça Cruz<sup>4</sup>

1) Pós-graduando em Otorrinolaringologia da UNIFESP-EPM

2) Professor Assistente do Curso de Fonoaudiologia da FCMSCSP

3) Professor Titular da Faculdade de Medicina de Jundiaí

4) Professor Adjunto da UNIFESP-EPM

Instituição: Escola Paulista de Medicina, Departamento de Otorrinolaringologia

Endereço de correspondência: Rua Diogo de Faria, 139, Vila Clementino, São Paulo.

## RESUMO

A cisplatina é um quimioterápico largamente utilizado para tratamento de tumores sólidos com excelentes resultados, porém, possui muitos efeitos colaterais como a nefrotoxicidade, a supressão medular a neuropatia periférica e a ototoxicidade. Embora haja medidas para evitar as três primeiras, isso não ocorre com a lesão coclear, que não apresenta medidas preventivas e na maioria das vezes é irreversível. Desta forma, existe grande interesse em estudar o seu mecanismo de ototoxicidade. A literatura científica mostra-se discrepante em relação à dose ideal, o tempo de início da lesão, a forma de aplicação (agudo ou crônico) e a metodologia para o estudo ideal sobre a ototoxicidade induzida pela cisplatina em humanos e animais. A falta de mais pesquisas sobre as emissões otoacústicas (exame ideal para avaliar a função das células ciliadas externas) e a sua correlação com a dose ototóxica, induziram a idealização deste projeto. **Objetivo:** Verificarmos a dose e a posologia de administração ideal de cisplatina, com a finalidade de obtermos uma lesão significativa, conseqüentemente viabilizando o seu uso para testes com agentes otoprotetores em cobaias albinas, ratificarmos como métodos funcional ideal, as emissões otoacústica. **Material e Método:** Foram estudadas cobaias albinas fêmeas, com média de 350 a 400 g, num total de 48 animais compondo 4 grupos de estudo de acordo com a dose. Todos os grupos contaram com um animal de controle para cada uma das intervenções. Os grupos de estudo foram divididos nas doses segundo o esquema abaixo: Grupo 1: 9 animais com dose única de 7,5 mg/kg/d, via intraperitoneal. Grupo 2: 9 animais com duas doses de 7,5 mg/kg/d, no primeiro e quinto dia, via intraperitoneal. Grupo 3: 9 animais com 3 doses de 7,5 mg/kg/d no primeiro, quinto dia, e sétimo dia, via intraperitoneal. Grupo 4: 9 animais com doses 6 de 2,5 mg/kg/d no primeiro, segundo, terceiro, quinto, sexto e oitavo dia, via intraperitoneal. A emissão otoacústica por produtos de distorção foi realizada em todos os animais, por ser um exame altamente sensível para lesões em células ciliadas externas provocadas pela

## ABSTRACT

Cisplatin is a chemotherapeutic broadly used for treatment of solid tumors with excellent results, however, it possesses many side effects as the nephrotoxicity, the suppression medullar, the neuropathy and the ototoxicity. Although we have measures to avoid the first three, that doesn't happen with the coclear lesion, that doesn't present preventive measures and most of the time is irreversible. This way, a great interest exists in studying the ototoxicity's mechanism. The scientific literature has shown conflicting evidences in relation to the ideal dose, the time at the beginning of the coclear lesion, the application way (acute or chronic) and the methodology for the ideal study on the ototoxicity induced by the cisplatin in humans or animals. The lack of more researches on the otoacoustic emissions (ideal exam to endorse the function of the outer hair cells) and its correlation with the ototoxic dose induced the idealization of this paper. **Aim:** to verify the dose and the ideal administration dose of cisplatin, with the purpose of obtain a significant lesion, consequently making possible its use for tests with otoproteting agents in albino guinea pigs, to ratify as an ideal functional method, the otoacoustic emissions. **Material and Method:** Female albino guinea pigs were studied, with average from 350 to 400 g, in a total of 48 animals composing 4 study groups in agreement with the dose. All of the groups counted with a control animal for each one of the interventions. The study groups were divided in the following doses: Group 1: 9 animals with one dose of 7,5 mg/kg/d, intraperitoneal. Group 2: 9 animals with two doses of 7,5 mg/kg/d, in the first and fifth day, intraperitoneal. Group 3: 9 animals with 3 doses of 7,5 mg/kg/d in the first, fifth day, and seventh day, intraperitoneal. Group 4: 9 animals with doses 6 of 2,5 mg/kg/d in the first, second, third, fifth, sixth and eighth day, intraperitoneal. The otoacoustic emission by distortion products were accomplished in all the animals, for being an exam highly sensitive for lesions in external hair cells provoked by cisplatin. After the accomplishment of the second otoacoustic emissions, the guinea pigs were sacrificed

cisplatina. Após a realização do último exame de emissões otoacústicas as cobaias foram sacrificadas por injeção intracardíaca com cloridrato de quetamina e xilasina, e seus ossos temporais removidos. **Resultados:** Os grupos responderam de maneira diferente, com emissões diminuindo em alguns regimes e as condições clínicas deteriorando de caso. O grupo de 7,5 mg/kg/d em dose única não alcançou resultados funcionais e teve boa condição clínica. Já o grupo de três doses de 7,5 mg/kg/d foi o que obteve melhor resultado funcional, mas sofreu clinicamente. **Conclusões:** O uso de protocolo de ototoxicidade com cisplatina em três doses de 7,5 mg/kg/d pode ser útil para alcançar resposta funcional na cóclea de cobaias.

**Descritores:** cisplatina, ototoxicidade, cobaias, modelo

by intracardiac injection with ketamine and xilasine, and their temporary bones removed. **Results:** The groups answered in different ways, being the small doses not sufficient to reach functional loss and the three doses regimen being very aggressive to the animal health. **Conclusion:** The three dose regimen of 7,5 mg/kg/d can obtain adequate functional loss in the otoacoustic emission in guinea pigs.

**Keywords:** cisplatin, ototoxicity, guinea pigs, model

## INTRODUÇÃO

A cisplatina é um quimioterápico largamente utilizado para tratamento de tumores sólidos com excelentes resultados, porém, possui muitos efeitos colaterais como a ototoxicidade, a nefrotoxicidade, a supressão medular e a neuropatia periférica<sup>1,2</sup>. A combinação de hiperhidratação e de administração de manitol diminuiu acentuadamente os efeitos nefrotóxicos, assim como os outros efeitos colaterais, ao administrar a medicação em doses fracionadas. A lesão coclear, entretanto, não apresenta medidas preventivas e na maioria das vezes é irreversível. Desta forma, existe um grande interesse em se estudar o mecanismo de ototoxicidade<sup>3,4,5,6,7,8</sup> para viabilizarmos um medicamento otoprotetor que não interfira no efeito citotóxico da cisplatina.

A cisplatina atinge o órgão de Corti, iniciando a sua ação deletéria pelas células de sustentação, seguida pelas células ciliadas externas, principalmente nos giros médio e basal, e posteriormente estria vascular e nervo auditivo, com exclusividade, poupando o vestibulo<sup>7</sup>.

### Relação dose e efeito ototóxico em cobaias:

A relação entre a dose total administrada nas cobaias parece ser importante para definir o grau de lesão funcional. Nakai (1982)<sup>8</sup> pesquisou cobaias albinas, aplicando doses de cisplatina de 2mg/kg/d, via intramuscular, por cinco dias; doses de quatro mg/kg/d por quatro dias e 2 mg/kg/d por oito dias. A alteração eletrofisiológica foi vista somente nos dois últimos grupos, indicando a relação entre a dose acumulativa maior e maior ototoxicidade. Assim como Konishi et al (1983)<sup>9</sup> estudando cobaias pigmentadas com doses de 1,5 mg/kg/d, via intraperitoneal, por cinco dias, em 5 semanas,

comprovou uma alteração no limiar eletrofisiológico somente no segundo ao terceiro dia da segunda semana.

Laurell & Engstrom (1989)<sup>10</sup> publicaram como a mínima dose de cisplatina acumulativa necessária para ototoxicidade em cobaias entre 8 a 12 mg/kg, em dose aguda, seguindo a sugestão dos autores anteriores. Após dois anos, porém, o mesmo autor publica um artigo afirmando que a dose necessária para atingirmos o efeito tóxico na cóclea, corresponde a dose acumulada de 31 a 68 mg/kg, ao aplicarmos doses de 1 mg/kg/dia, sem explicar o porque da administração em doses seriadas e não mais em dose aguda<sup>11</sup>. Esta variabilidade de dose final e a metodologia utilizada de injetar doses baixas são questionáveis, pois trabalhos recentes indicam uma recuperação parcial das células ciliadas externas a partir da quarta semana, quando a dose utilizada é baixa e por longo tempo.

Schweitzer (1993)<sup>12</sup> pesquisa a dose de 1 mg/kg/d, via subcutânea, por 4,8, 12, 16 dias. A dose acumulativa ideal foi de 16mg/kg, com perda celular máxima de 78%.

Hamers et al<sup>13</sup> através de estudos eletrofisiológicos, encontraram aumento do limiar eletrofisiológico significativo em cobaias albinas tratadas com a dose de 2 mg/kg/d por 8 dias. Stengs et al<sup>14,15</sup> com sequencias de 0,7 a 2 mg/kg/d por 8 dias, sugeriu a dose entre 1,5 a 2 mg/kg/d como sendo a mínima necessária para gerar lesão nas pesquisas com otoprotetores. Cardinaal et al<sup>16</sup> publicam um ensaio com doses progressivas de cisplatina, em uso crônico, com avaliação após dois dias da última injeção. Obtiveram uma lesão máxima de 65% das células ciliadas externas, no giro basal, na dose de 2 mg/kg/d, via intraperitoneal, por oito dias. Sugerem, porém, a dose de 1,5 mg/kg/d para testes com agentes otoprotetores, pois a

dose mais alta seria muito lesiva para cóclea, interferindo no resultado da droga otoprotetora. Recentemente, Ruijven et al<sup>17</sup> ao administrarem a dose de 2mg/kg/d, por 4,6 e 8 dias, via intraperitoneal, detectaram a lesão a partir do sexto dia da administração (dose acumulada de 12 mg/kg/d), mas mais acentuada no oitavo dia (dose acumulada de 16 mg/kg/d), com média de 71,7% das células ciliadas externas afetadas na região basal. Não houve perda de células ciliadas internas. Além do órgão de Corti, Ruijven et al<sup>18</sup> detectam acometimento do gânglio espiral nas cobaias acima.

### **Tempo de início da lesão ototóxica**

O tempo de espera para verificarmos a toxicidade da medicação, de acordo com a dose, gera controvérsias, pois nas doses crônicas e baixas a lesão pode iniciar-se após o sexto dia do início da medicação<sup>14,15,17,19</sup> uma vez que a dose acumulativa é alcançada no último dia.

Nas doses crônicas é necessário um tempo de espera maior para chegar a dose acumulativa ideal, como relata Schweitzer et al<sup>13</sup> ao tratar cobaias albinas e pigmentadas com a dose de 1 mg/kg/d, via subcutânea, por 4,8, 12, 16 semanas. A perda célula foi respectivamente de 1, 11,45 e 78% para os albinos e 1, 3,19 e 54% para os pigmentados. Os autores verificaram o fato das cobaias albinas serem mais sensíveis à medicação com melhor sobrevida, sugerindo este tipo de animal como modelo experimental para a medicação.

No grupo crônico, após um dia até uma semana do término da injeção da medicação, o grau de lesão coclear não se altera<sup>17,20</sup>. Em contrapartida, há degeneração funcional e morfológica em até 24 horas nas doses agudas e altas 3,21. Laurell & Bagger- Sjoback<sup>11</sup> aplicaram uma dose única de cisplatina, via endovenosa de 12.5 mg/kg, em cobaias pigmentadas. A cisplatina causou lesão morfológica na cóclea principalmente nas células ciliadas externas no giro basal, após o segundo dia da aplicação. Saito e Aran<sup>21</sup> detectaram aumento no limiar eletrofisiológico após 24 horas da última dose da droga, em todas frequências, comprovado com lesão celular na microscopia eletrônica. Em compensação, no grupo crônico a alteração foi após nove dias. Ekborn et al<sup>22</sup> detectaram um aumento do limiar eletrofisiológico em 96 horas, após uma dose única de 8 mg/kg.

### **Limite de tempo entre a lesão e a recuperação celular coclear.**

A janela entre o tempo de ocorrer a lesão celular e a recuperação parcial das células ciliadas é muito estreito, entre 4 a 8 semanas, dificultando o uso crônico para comprovação da eficácia dos otoprotetores. Steng et al (1997) através de medições eletrofisiológicas com doses de 1,25 e 1,5 mg/kg/d, via intraperitoneal, por oito dias, acompanharam os animais durante 16 semanas, detectando uma recuperação parcial do limiar auditivo após oito semanas. A justificativa do resultado

relacionou-se ao fato dos animais com maior sobrevida serem os menos afetados pela cisplatina, sem descartar possíveis mecanismos intrínsecos reparadores ativados pela cisplatina, com recuperação parcial das células ciliadas externas. A período do dia em que foi feita a administração, manhã ou tarde, não interferiu no resultado.

Cardinaal et al<sup>20</sup> também detectaram este fenômeno. A média das células ciliadas externas acometidas foi de 61%, em cobaias albinas com a dose de cisplatina de 1,5 mg/kg/dia por oito dias. Após quatro semanas, esta lesão diminuía para 15% e em 16 semanas, aumentava para 48%. Apesar de sugerirem um mecanismo de recuperação das células lesadas, desconhecem se o fato se deve a novas formações de células ou autoreparação.

### **Administração aguda versus crônica.**

O modo de administração, agudo e crônico, influencia no resultado da ototoxicidade, sendo a forma aguda, a responsável por maiores danos celulares. Fato descrito por Saito e Aran<sup>21</sup> em que o grupo agudo (cobaias pigmentadas com duas injeções, via intramuscular, de 7,5 mg/kg em intervalo de cinco dias) alterou os limiares eletrofisiológicos após cinco dias da primeira injeção no limiar e após 24 horas da última dose, em todas as frequências auditivas. Na microscopia ótica a lesão das células ciliadas externas foi mais pronunciada no giro basal, com células ciliadas internas intactas. Houve vacuolização das células da estria vascular, com degeneração das células marginais e ruptura do espaço endolinfático. Observaram também que o uso do manitol pode influenciar como um otoprotetor.

No grupo crônico (dose de cisplatina de 1,5 mg/kg/dias por 10 dias), a alteração do limiar ocorreu somente após nove dias, nas frequências agudas. Depois de 24 hs da última injeção, somente um animal apresentou diminuição importante do limiar (60 a 80 dB). A maioria perdeu de 10 a 60 dB. A lesão celular foi menor em relação ao grupo agudo.

Concentrou-se nas frequências agudas, sem alteração na estria vascular.

A hipótese dos autores para justificar a razão de diferentes resultados, provavelmente deve-se a farmacocinética da droga, pois na dose aguda, a cisplatina bloqueia reversivelmente os canais de transdução mecânico elétricos, demonstrado in vitro.

Além de bloquear os canais de cálcio da parede lateral das células ciliadas externas reversivelmente. Suspeita-se que a concentração de cisplatina em dose única altera este equilíbrio e a concentração em doses crônicas não seria suficiente para interromper os canais iônicos. Somente o grupo agudo apresenta lesão da estria vascular e desequilíbrio iônico endolinfático.

Possivelmente, o mecanismo nas doses crônicas se deva à lesão por produção de metabólitos (radicais livres) e por isso a lesão ocorreria a longo prazo.

## Via de aplicação.

O modo de aplicação para apresentar um efeito mais intenso sobre a cóclea também é importante e em ordem decrescente, a injeção endovenosa é mais lesiva em relação a intraperitoneal, intramuscular e subcutânea. Ekborn et al (2000) aplicou intravenosamente uma dose única de 8 mg/kg e percebeu alteração no limiar de audiometria de tronco encefálico em 96 horas. Apesar de resultar em um ótimo resultado, o modo de preparo para a aplicação é muito complexo, com alta chance de mortalidade durante o processo, pois é necessário cateterizar as duas jugulares e manter o animal anestesiado por mais de uma hora, para uma infusão lenta. Guneri et al, em 2001, verificou lesão somente após sete dias.

## Controvérsias.

Observa-se em todos os estudos acima que a lesão nas células ciliadas externas máxima atingida não passa de 65% a 71%, com variabilidade interanimal importante, além da dose e do tempo de início da lesão. A alta mortalidade poderia ser uma das justificativas para evitar o uso da medicação agudamente, mas o grau de lesão alcançada, não é suficiente para o nosso estudo sobre otoprotetores.

Por esta razão, realizamos um experimento piloto, na dose de 10 mg/kg/d, via intraperitoneal, que seria a mais lesiva para as células cocleares, semelhante ao artigo de Guneri et al<sup>23</sup>, em 2001, na qual observaram-se alterações importantes na emissão otoacústica transiente evocada, com uma dose não letal e comodidade de aplicação. Não observamos o mesmo grau de lesão relatado pelo autor. A emissão otoacústica manteve-se no limiar de normalidade e na microscopia eletrônica de varredura, detectou-se somente lesão parcial das células ciliadas externa, na região média da cóclea.

Com a finalidade de alcançarmos lesões celulares acima de 80%, testamos o protocolo de Hipollito et al<sup>24</sup>, sugerindo três doses de 8 mg/kg/d, via intraperitoneal, segundo o qual há 100% de lesão das células ciliadas externas na microscopia eletrônica e nas emissões otoacústicas. Noventa por cento dos animais morreram no terceiro dia da injeção da droga, provavelmente pela alta dose. O único animal sobrevivente até o sétimo dia, teve suas cócleas removidas e examinadas na microscopia eletrônica, comprovando um alto índice de lesão celular. O mesmo autor publicou em 2000, uma série de oito doses de 8 mg/kg/d, com 100% de lesão, porém ao replicarmos o protocolo, ratificamos a observação na literatura, sendo a dose altamente letal (100% dos casos não atingiu o 5º. dia de sobrevivência).

Concluimos, portanto, que a literatura mostra-se discrepante em relação à dose ideal, o tempo de início da lesão, a forma de aplicação (agudo ou crônico) e a metodologia para o estudo ideal sobre a ototoxicidade induzida pela cisplatina. A falta de mais pesquisas sobre as emissões otoacústicas (exame ideal para avaliar a função das células ciliadas externas) e a sua correlação com a dose ototóxica, corroboraram também para a idealização deste projeto.

## OBJETIVO

Verificarmos a dose e a posologia de administração ideal de cisplatina, com a finalidade de obtermos uma lesão significativa, conseqüentemente viabilizando o seu uso para testes com agentes otoprotetores em cobaias albinas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas cobaias albinas fêmeas, com média de 350 a 400 g, num total de 48 animais compondo 4 grupos de estudo de acordo com a dose. Todos os grupos contaram com um animal de controle para cada uma das intervenções.

Os grupos de estudo foram divididos nas doses segundo o esquema abaixo: Grupo 1: 9 animais com dose única de 7,5 mg/kg/d, via intraperitoneal. Grupo 2: 9 animais com duas doses de 7,5 mg/kg/d, no primeiro e quinto dia, via intraperitoneal. Grupo 3: 9 animais com 3 doses de 7,5 mg/kg/d no primeiro, quinto dia, e sexto dia, via intraperitoneal. Grupo 4: 9 animais com doses de 2,5 mg/kg/d no primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto e sexto dia, via intraperitoneal.

### Procedimentos de estudo

Todos os grupos tiveram seus animais avaliados em três diferentes momentos no decorrer do estudo. Os animais foram anestesiados, submetidos a exame de emissões otoacústicas e sacrificados:

#### Grupo 1

Momento 1 - 24 horas após a dose inicial (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle);

Momento 2 - 7 dias após a dose inicial (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle), e; Momento 3 - 14 dias após a dose inicial (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle).

#### Grupo 2

Momento 1 - 48 horas após a segunda dose - 7º. dia (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle);

Momento 2 - 9 dias após a segunda dose - 14º. dia (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle), e;

Momento 3 - 16 dias após a segunda dose - 21º. dia (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle).

#### Grupo 3

Momento 1 - 24 horas após a terceira dose - 7º. dia (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle);

Momento 2 - 7 dias após a terceira dose - 14º. dia (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle), e;

Momento 3 - 14 dias após a terceira dose - 21º. dia (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle).

#### Grupo 4

Momento 1 - 24 horas após a terceira dose - 4º. dia (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle);

Momento 2 - 24 horas após a sexta dose - 7º. dia (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle), e;

Momento 3 - 7 dias após a sexta dose - 13<sup>o</sup>. dia (sacrifício de 3 animais do grupo de estudo e um controle).

O animal de controle para cada momento foi submetido ao mesmo procedimento dos animais de estudo, sendo substituído o volume de administração de cisplatina por igual volume de solução fisiológica intraperitoneal.

## Mensuração funcional

A emissão otoacústica por produtos de distorção foi realizada em todos os animais, por ser um exame altamente sensível para lesões em células ciliadas externas provocadas pela cisplatina<sup>25</sup>.

Analizamos as repostas nas frequências de 500, 1, 2, 3,4 e 8 kHz, com intensidade de f1 e f2 de 70 dB NA. Uma sonda responsável pela emissão dos sons (f1 e f2) foi posicionada na orelha analisada até obtermos a resposta.

## RESULTADOS

Os resultados de cada grupo serão apresentados segundo a obtenção de supressão de emissões otoacústicas no período pós-cisplatina (Tabelas 1 a 4)

**Tabela 1** – Distribuição da repercussão nas Emissões otoacústicas (EOA) e condições clínicas (CC) no grupo1, no momento da eutanásia

Animal	Dia1		Dia7		Dia 14	
	EOA	CC	EOA	CC	EOA	CC
1	-	O	-	-	-	-
2	=	B	=	B	=	M
3	=	B	50%	B	50%	M
4	-	O	-	-	-	-
5	=	B	=	B	=	B
6	-	O	-	-	-	-
7	50%	M	-	O	-	-
8	30%	B	30%	M	30%	B
9	50%	B	50%	B	50%	B

%= porcentagem de diminuição da média de emissões em todas as frequências pesquisadas em relação ao exame inicial.

**Tabela 2** – Distribuição da repercussão nas Emissões otoacústicas (EOA) e condições clínicas (CC) no grupo2, no momento da eutanásia

Animal	Dia7		Dia14		Dia 21	
	EOA	CC	EOA	CC	EOA	CC
1	50%	M	60%	M	60%	M
2	40%	M	40%	M	50%	M
3	30%	B	50%	M	-	O
4	=	B	=	B	70%	M
5	=	B	50%	B	-	O
6	50%	M	50%	B	50%	M
7	-	O	-	O	-	O
8	50%	M	50%	B	-	O
9	70%	B	70%	B	70%	M

%= porcentagem de diminuição da média de emissões em todas as frequências pesquisadas em relação ao exame inicial.

**Tabela 3** – Distribuição da repercussão nas Emissões otoacústicas (EOA) e condições clínicas (CC) no grupo3, no momento da eutanásia

Animal	Dia7		Dia14		Dia 21	
	EOA	CC	EOA	CC	EOA	CC
1	80%	O	80%	M	100%	M
2	-	O	-	O	-	O
3	70%	M	80%	O	80%	M
4	-	O	-	O	-	M
5	50%	M	100%	O	-	O
6	70%	M	90%	M	100%	M
7	-	O	-	O	-	M
8	90%	M	100%	M	100%	M
9	70%	M	70%	M	-	O

%= porcentagem de diminuição da média de emissões em todas as frequências pesquisadas em relação ao exame inicial.

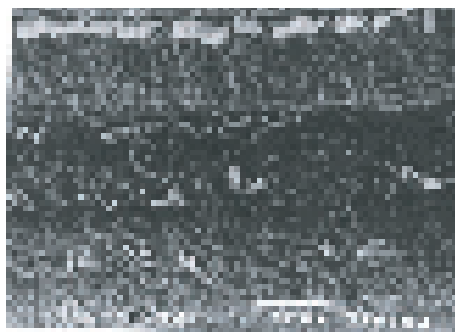
**Tabela 4** – Distribuição da repercussão nas Emissões otoacústicas (EOA) e condições clínicas (CC) no grupo4, no momento da eutanásia

Animal	Dia4		Dia7		Dia 13	
	EOA	CC	EOA	CC	EOA	CC
1	30%	B	50%	M	-	O
2	=	B	20%	B	20%	B
3	50%	B	50%	B	50%	B
4	20%	B	40%	M	-	O
5	30%	B	30%	B	30%	M
6	=	M	40%	B	90%	M
7	=	B	100%	M	-	O
8	=	B	=	B	50%	M
9	=	M	30%	B	-	O

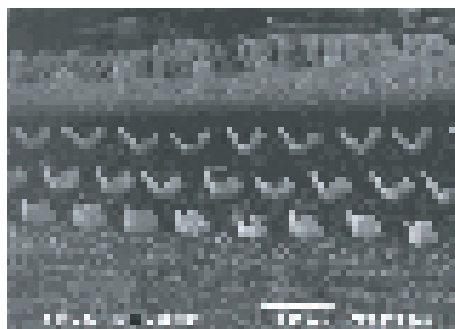
%= porcentagem de diminuição da média de emissões em todas as frequências pesquisadas em relação ao exame inicial.

As cobaias tiveram suas colceas avaliadas por microscopia de varredura e mostraram destruição variável de suas células ciliadas internas.

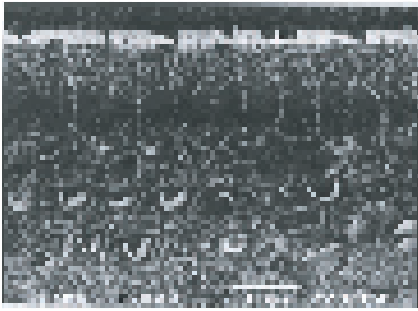
Apresentamos alguns exemplos nas Figuras de 1 a 5.



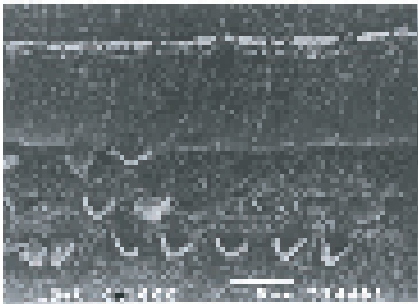
**Figura 1** – Microscopia Eletrônica de varredura mostrando destruição intensa de camada de células ciliadas.



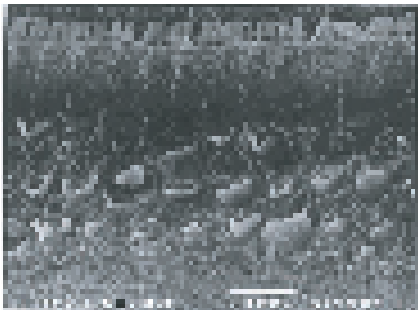
**Figura 2** - Microscopia Eletrônica de varredura mostrando preservação de camada de células ciliadas.



**Figura 3** - Microscopia Eletrônica de varredura mostrando destruição moderada de camada de células ciliadas.



**Figura 4** - Microscopia Eletrônica de varredura mostrando destruição leve de camada de células ciliadas.



**Figura 5** - Microscopia Eletrônica de varredura mostrando destruição leve de camada de células ciliadas.

## DISCUSSÃO

Nós testamos 4 protocolos descritos na literatura, mas não pudemos obter os mesmos resultados relatados, sendo que muitos animais foram perdidos (Saito et al, 1994; Cardinaal et al, 2000; Guneri et al, 2001; Hyppolito et al 2005).

Para induzir ototoxicidade primeiro lançamos mão de um experimento usando uma dose de 7,5mg/kg/dia de cisplatina intraperitonealmente, baseados em estudo de Guneri et al (2001). Os autores encontraram um decréscimo importante das missões transientes, com uma dose única e não letal da droga. De acordo com Ravi et al (1995) a dose total de cisplatina necessária para induzir ototoxicidade foi de 8 to 12 mg/kg. Nós não observamos o mesmo grau de lesões

relatadas pelos autores. As emissões otoacústicas se apresentaram em níveis normais e a microscopia eletrônica detectou apenas lesão parcial das células ciliadas externas, especialmente na segunda volta. Portanto nós aumentamos a dose para duas aplicações de 7.5mg/kg como sugeria Saito et al (1994), que encontrara, com esta dose, extensa lesão de todo o órgão de Corti. Em nossos animais encontramos respostas bastante deficitárias nas emissões e lesões parciais do órgão de Corti. Entretanto, alguns animais ficaram bastante doentes e poucos sobreviveram até o final do estudo. Outro protocolo foi testado usando o fracionamento de dose com 2.5 mg/kg/dia, como sugerido por Cardinaal et al (2000), mas não encontramos o mesmo grau de lesões na cóclea. Hyppolito et al (2003) já havia relatado resultados conflitantes com o uso do fracionamento em 8 doses de 1.5 mg/kg em dias consecutivos. Até o 18º dia, não houve alterações anatômicas.

Em muitos estudos, o máximo de lesão obtido nas células ciliadas externas é de 60-70% , com uma grande variabilidade interindividual, além de uso de doses muito diferentes e diferentes métodos de avaliação dos resultados funcionais e morfológicos (Groot et al. 1997; Stengs et al. 1998; Sockalingam et al. 2000; Cardinaal et al 2000; van Ruijven et al. 2004; van Ruijven et al. 2005). A alta taxa de mortalidade poderia justificar o uso de doses únicas ototóxicas, mas as lesões obtidas não são suficientes para determinar o modelo como confiável.

Tentando obter lesão acima de 70%, nós testamos o protocolo descrito por Hyppolito (2005), com três doses intraperitoneais de 7,5 mg/kg, que seriam supostamente capazes de induzir 100% de lesão das células ciliadas externas. Noventa por cento dos animais morreram logo após a última dose e o único animal sobrevivente por 7 dias apresentou 100% de lesão. O mesmo autor publicou um artigo em 2003, usando 8 doses de 8 mg/kg com 100% de lesão.

Baseados nestes estudos, nós decidimos estabelecer um protocolo original com e doses de 7.5mg/kg/dia administrados no primeiro, quinto e sexto dias e produzimos pelo menos 70% de lesão de células ciliadas externas no primeiro e segundo giros com confirmação pelo teste de emissões e microscopia eletrônica. A tolerância ao tratamento foi semelhante ao de duas doses de 7.5mg/kg/dia.

## CONCLUSÃO

O regime de administração de três doses de 7.5mg/kg/dia, no primeiro, quinto e sexto dias em cobaias albinas, produziu maior perda de função auditiva, com repercussões clínicas que não limitam a manutenção dos animais de experimentação por períodos de até 21 dias, em nosso grupo de estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saleh S, El-Demerdash E. Protective effects of L-arginine against cisplatin-induced renal oxidative stress and toxicity: role of nitric oxide. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97(2):91-7, 2005.
2. Schweitzer VG. Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. *Laryngoscope* 103:1-52, 1993.
3. Bowers WJ, Chen X, Guo H, Frisina DR, Federoff HJ, Frisina RD. Neurotrophin-3 transduction
4. Campbell KC, Larsen DL, Meech RP, Rybak LP, Hughes LF. Glutathione ester but not glutathione protects against cisplatin-induced ototoxicity in a rat model. *J Am Acad Audiol*. 2003 Apr;14(3):124-33.
5. Campbell KC, Meech RP, Rybak LP, Hughes LF. The effect of D-methionine on cochlear oxidative state with and without cisplatin administration: mechanisms of otoprotection. *J Am Acad Audiol*. 2003 Apr;14(3):144-56.
6. Minami SB, Sha SH, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res*. 2004 Dec;198(1-2):137-43.
7. Sergi B, Ferraresi A, Troiani D, Paludetti G, Fetoni AR. Cisplatin ototoxicity in the guinea pig: vestibular and cochlear damage. *Hear Res*. 2003 Aug;182(1-2):56-64.
8. Nakai Y, Konishi K, Chang KC, Ohashi K, Morisaki N, Minowa Y, Morimoto A. Ototoxicity of the anticancer drug cisplatin. An experimental study. *Acta Otolaryngol*. 93(3-4):227-32, 1982
9. Konishi T, Gupta BN, Prazma J. Ototoxicity of cis-dichlorodiammine platinum (II) in guinea pigs. *Am J Otolaryngol*. 4(1):18-26, 1983.
- attenuates cisplatin spiral ganglion neuron ototoxicity in the cochlea. *Mol Ther*. 2002 Jul;6(1):12-8.
10. Laurell G, Sjoback DB. The ototoxic effect of cisplatin on guinea pigs in relation to dose. *Hear Res* 38:27-34, 1989.
11. Laurell G, Sjoback DB. Degeneration of the organ of Corti following intravenous administration of cisplatin. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 111:891-98, 1991.
12. Schweitzer VG. Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. *Laryngoscope*. 103(4 Pt 2):1-52, 1993.
13. Hamers FP, Wijnbenga J, Wolters FL, Klis SF, Sluyter S, Smoorenburg GF. Cisplatin ototoxicity involves organ of Corti, stria vascularis and spiral ganglion: modulation by alphaMSH and ORG 2766. *Audiol Neurootol*. 2003 Nov-Dec;8(6):305-15
14. Stengs CHM, Klis SFL, Huizing EH, Smoorenburg GF. Cisplatin ototoxicity. An electrophysiological dose-effect study in albino guinea pigs. *Hear Res* 124:99-107, 1998.
15. Stengs CHM, Klis SFL, Huizing EH, Smoorenburg GF. Cisplatin-induced ototoxicity; electrophysiological evidence of spontaneous recovery in the albino guinea pig. *Hear Res* 111:103-115, 1997.
16. Cardinaal RM, Groot JCMJ, Huizing EH, Veldman JE, Smoorenburg GF. (A) Dose-dependent effect of 8 day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hear Res* 144:135-46, 2000.
17. van Ruijven MW, de Groot JC, Smoorenburg GF. Time sequence of degeneration pattern in the guinea pig cochlea during cisplatin administration. A quantitative histological study. *Hear Res*. 197(1-2):44-54, 2004.
18. van Ruijven MW, de Groot JC, Klis SF, Smoorenburg GF. The cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hear Res*. 205(1-2):241-8, 2005.
19. Klis SFL, O'Leary SJ, Wijnbenga J, Groot JCMJ, Hamers FPT, Smoorenburg GF. Partial recovery of cisplatin-induced hearing loss in the albino guinea pig in relation to cisplatin dose. *Hear Res* 164:138-46, 2002.
20. Cardinaal RM, Groot JCMJ, Huizing EH, Veldman JE, Smoorenburg GF. (B). Cisplatin-induced ototoxicity: Morphological evidence of spontaneous outer hair cell recovery in albino guinea pigs? *Hear Res* 144:147-56, 2000.
21. Ekborn A, Laurell G, Ehrsson H, Miller J. Intracochlear administration of thiourea protects against cisplatin-induced outer hair cell loss in the guinea pig. *Hear Res*. 2003 Jul;181(1-2):109-15.
22. Saito T, Aran JM. Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. *ORL* 56:315-20, 1994.
23. Guneri EA, Serbetcioglu B, Ikiz AO, Guneri A, Ceryan K. TEOAE monitoring of Cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs: the protective effect of vitamin B treatment. *Auris Nasus Larynx*. 2001 Jan;28(1):9-14.
24. Hyppolito MA, Oliveira JA, Rossato M, Holanda F. Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. *Rev Bras Otorrinolagol* 69(4):504-11, 2003.