

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DISTÚRBIOS DA  
COMUNICAÇÃO HUMANA**

**HISTOLOGIA, FUNÇÃO COCLEAR E  
GENOTOXICIDADE EM COBAIAS TRATADAS COM  
CISPLATINA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Cacinelis Marion de Franceschi  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania Tochetto  
Co-orientador: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

# **HISTOLOGIA, FUNÇÃO COCLEAR E GENOTOXICIDADE EM COBAIAS TRATADAS COM CISPLATINA**

por :

**Cacinelis Marion de Franceschi**

Dissertação que será apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração Audição e Equilíbrio, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana**.

**Orientador: Prof. Dra. Tania Tochetto**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira**

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação  
Humana**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**HISTOLOGIA, FUNÇÃO COCLEAR E GENOTOXICIDADE EM  
COBAIAS TRATADAS COM CISPLATINA**

elaborada por  
Cacinelí Marion de Franceschi

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Tania Maria Tochetto, Dr.<sup>a</sup>**  
(Presidente/Orientador)

**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr.<sup>a</sup>**

**Sônia Maria Bortholuzzi, Dr.<sup>a</sup>**

Santa Maria, 02 de março de 2011.

F815h Franceschi, Cacineli Marion  
Histologia, função coclear e genotoxicidade em cobaias tratadas com  
cisplatina /  
por Cacineli Marion Franceschi. – 2011.  
101 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Tania Tochetto  
Coorientador: Aron Ferreira da Silveira  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de  
Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da  
Comunicação  
Humana, RS, 2011

1. Genotoxicidade 2. Ototoxicidade 3. Cisplatina 4. Histologia 5. Cóclea  
I. Tochetto, Tânia II. Silveira, Aron Ferreira da III. Título.

CDU 616.28-008

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109  
Biblioteca Central UFSM

---

© 2011

Todos os direitos autorais reservados a Cacineli Marion de Franceschi. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor. Endereço: Rua Caetano José Rigon, 466, Sobradinho – RS, CEP: 96900-000, Fones: (55)81189891. Endereço eletrônico: cacimf@gmail.com.

---

## DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me abençoou com tudo que necessitei. A todos que colaboraram para a realização deste trabalho. Dedico principalmente aos meus pais, Remar e Neusa, que sempre me permitiram sonhar e assim alimentaram meu **cérebro** e meu **coração**, ao Fábio, que cuida muito bem de ambos, e à Tania que sempre os orientou.”*

## AGRADECIMENTOS

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”* (Chico Xavier)

À Deus, que sempre rodeou a minha vida de anjos de carne e osso que me ajudaram a superar todos os empecilhos.

À minha Família, essenciais na minha vida sempre:

Mãe Neusa, por ser sempre minha força, por sempre ter um colo nos momentos de tristeza, por ser minha inspiração... *“Hei mãe, por mais que a gente cresça, há sempre alguma coisa que a gente não consegue entender...”* (Engenheiros do Hawaii).

Pai Remar, por sempre me incentivar a buscar meus desejos, por me apoiar nas escolhas, sempre. *“Pai! Me perdoa essa insegurança, que eu não sou mais aquela criança, que um dia morrendo de medo, nos teus braços você fez segredo, nos teus passos você foi mais eu...”* (Fábio Jr.).

Irmã Raquel, nem sempre nossa convivência foi um mar de rosas, mas sempre que necessitamos uma da outra, nas verdadeiras dificuldades estávamos juntas. Nunca esqueça que eu sempre estarei aqui. *“Eu levo o seu coração comigo (eu o levo no meu coração) eu nunca estou sem ele (a qualquer lugar que eu vá, você vai comigo, e o que quer que faça, eu faço por você)...”* (E.E. Cummings).

Muito obrigada por sempre me darem força, por sempre me apoiarem, por estarem sempre ao meu lado, nos momentos de alegria e nos de tristeza. Faltam palavras para expressar o enorme carinho, gratidão e amor por vocês! Amo vocês!

Vô Miro (*in memoriam*) e vó Pupa agradeço eternamente os momentos felizes que passei ao lado de vocês! Muito obrigada por tudo, sempre! Amo vocês!

Ao meu namorado, Fábio, que chegou inesperadamente na minha vida e desde então sempre se fez presente, secando minhas lágrimas, me apoiando diariamente, fazendo seus os meus sonhos. Obrigada por alegrar a minha vida e ser mais que um namorado, ser também um grande amigo de todas horas, por ser minha razão quando me sobra emoção, por ser o meu amor e proporcionar momentos maravilhosos ao teu lado! Te amo mais!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania Tochetto, por sempre estar ao meu lado mesmo nas horas mais complicadas desta pesquisa. Por ser mais do que uma orientadora durante esses quatro anos de trabalho conjunto, por ser a luz nos momentos de escuridão, ser a calma nos momentos de desespero, ser a força que muitas vezes me inspirou a seguir em frente e não desistir. Não existem palavras capazes de traduzir o enorme carinho e admiração que sinto por você. Obrigada por tudo!

Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira, pela co-orientação e ensinamentos. Muito obrigada!

À Dr<sup>a</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz e Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Bortholuzzi por aceitarem o convite para ser banca e pelas correções e sugestões que contribuem com este trabalho.

Ao serviço de Farmácia do Hospital Universitário de Santa Maria, pela disponibilidade em auxiliar na preparação e manuseio das seringas de cisplatina. Muito Obrigada!

À Stela e Vera que me acolheram e gentilmente colaboraram de forma importantíssima na realização desta pesquisa. Muitíssimo obrigada!

Biotério Central UFSM pelos cuidados com as cobaias. Muito Obrigada!

Histotécnico do laboratório de Histologia e Embriologia da UFSM (Sérgio Oliveira Silveira) por preparar as lâminas e pacientemente me explicar passo a passo de cada técnica. Muito Obrigada!

Laboratório de Biogenômica e todos os bolsistas de iniciação científica, mestrandos, doutorandos e professores pelos auxílios e pela prontidão em dirimir dúvidas.

À Farmacêutica Taís Algarve, pela gentil disposição ao auxiliar e ensinar a execução do teste cometa, pelas horas agradáveis que passamos no laboratório (e fora dele). Muito Obrigada!

À Biomédica Mara Fantinel pelo auxílio no tratamento e manejo das cobaias durante a pesquisa. Por tão gentilmente dispor do seu tempo para me ajudar, certamente não encontrei apenas uma colega de mestrado e laboratório, mas uma AMIGA que poderá contar comigo sempre que precisar. Fostes um destes anjos sem asas que Deus colocou na minha vida. Obrigada por tudo!

À acadêmica de fonoaudiologia Graciele de Brito Escobar (outro anjo sem asas) que se fez presente nos momentos mais complicados desta pesquisa, fazendo com que os problemas se tornassem menos penosos com seu jeito alegre e seu espírito iluminado. Obrigada por tudo!

À colega Fga. Tainara Milbradt Weich, que tão carinhosamente considero minha mana mais nova, obrigada por sempre estar disposta a ajudar, por sempre estar presente e ser muito mais que uma colega, por ser uma amiga. Muito obrigada!

Às amigas do grupo de pesquisa Letícia, Dayane, Siméia e Carla, pelo apoio e compreensão, por tornarem os dias mais alegres! Nunca esquecerei de vocês manas!

À ATFON 2008, Ana Clara, Brunah, Daila, Eliana, Fernanda, Giséli, Larissa, Luana, Marileda, Marina, Patrícia, Paula, Roberta, Tais, Vanessa F., Vanessa K. e Valquíria, minhas queridas colegas e eternas amigas, obrigada por fazerem parte da minha vida. *“Foi pouco tempo mais valeu, vivi cada segundo, quero o tempo que passou...”* (Cidadão Quem). Saudades de todas!

À minha família alegretense emprestada, Flademir e Sandra, meus sogros, Élen e Elene, minhas cunhadas, Nico e Angelita, quase cunhados, Fernanda colega fonoaudióloga e agora prima, Cora, Simone, Elora e a todos os que não foram citados aqui, mas não menos importantes, meu muito obrigada por me tratarem sempre com enorme carinho fazendo os passeios por Alegrete sempre muito felizes! Adoro todos vocês!

Ao Braian meu irmão emprestado, meu amigo de todas as horas (até uma estrela já me deu). Não foi acaso que te conheci e certamente nossos laços de amizade serão pra toda a vida! Muito obrigada por todos os momentos felizes ao teu lado! *"...Quando olhares o céu de noite, (porque habitarei uma delas e estarei rindo), então será como se todas as estrelas te rissem! E tu terás estrelas que sabem sorrir! Assim, tu te sentirás contente por me teres conhecido. Tu serás sempre meu amigo (basta olhar para o céu e estarei lá)..."* (Antoine de Saint-Exupéry).

Ao Gustavo, meu anjo da guarda, meu dindo, obrigada pela amizade sincera, pela preocupação, pela ajuda de sempre, pelos ajustes no kinder, pela compreensão, são estes pequenos gestos que te fazem tão especial Gu. Tens um lugar enorme no meu coração gringo!

Às amigas Ana Amélia, Carol, Dani, Flávia, Gabi, Greici, Nina, Rô e Sara, algumas amigas de infância, outras já de Santa Maria, mas todas igualmente importantes e especiais na minha vida.

À amiga Ana Loide Gil, pelo tanto que me ensinou, mostrando que sempre somos capazes de nos superar. Pra mim és um grande exemplo de luta, de garra, de que quando se acredita nos sonhos eles se realizam. Te admiro muito pela pessoa sincera e cheia de luz que és. Saudades angolana...

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da UFSM, pelos ensinamentos, apoio e compreensão.

À Universidade Federal de Santa Maria, por ter propiciado o curso de mestrado com excelente conceito.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao tempo que estive em Santa Maria, que me fez amadurecer, aos laços de amizade criados aqui e que jamais serão esquecidos, à todos os amigos que não foram citados aqui, mas são igualmente especiais pra mim, pois dividiram momentos únicos e especiais comigo... Certamente fui muito feliz aqui, fiz muitos amigos e apenas uma palavra é capaz de traduzir meus sentimentos neste momento: SAUDADE...

*“Importa mais o que se pretende. O que se pretende depende da gente. O que se consegue depende das circunstâncias.”*

Locchi

**RESUMO**  
**Dissertação de Mestrado**  
**Programa de Pós-Graduação Distúrbios da Comunicação Humana**  
**Universidade Federal de Santa Maria**

**HISTOLOGIA, FUNÇÃO COCLEAR E GENOTOXICIDADE EM COBAIAS**  
**TRATADAS COM CISPLATINA**

AUTORA: CACINELI MARION DE FRANCESCHI

ORIENTADORA: TANIA TOCHETTO

CO-ORIENTADOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de março de 2010.

O presente trabalho tem como objetivo verificar a influência da cisplatina sobre a cóclea e o ácido desoxirribonucleico (DNA) de cobaias. Estudo experimental executado com 12 cobaias (*Cavia porcellus*). O critério de inclusão de cobaias na amostra foi a presença de reflexo de Preyer (contração do pavilhão auricular frente a estímulo sonoro) e emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPDs). As cobaias foram divididas em dois grupos: **Grupo controle (GC)** - composto de seis cobaias, às quais foi administrada solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% por seis dias consecutivos; **Grupo estudo (GE)** - composto por seis cobaias, às quais foi administrada cisplatina em seis doses consecutivas de 3mg/kg/dia via intraperitoneal. Vinte e quatro horas após a última aplicação de cisplatina as cobaias foram sacrificadas, foi coletada amostra sanguínea para realização do Ensaio Cometa, e as cócleas foram removidas para análise histológica. Ao comparar-se as cobaias do GE antes e após a administração de cisplatina verificou-se redução estatisticamente significativa da amplitude das EOAPDs principalmente nas frequências de 1000Hz à 3998Hz. Após a administração de cisplatina constatou-se que a amplitude das EOAPDs nas frequências de 2830Hz e 5657Hz, das cobaias do GE, sofreram redução estatisticamente significativa quando comparado com as cobaias do GC. Após a administração de cisplatina não foram detectados danos genotóxicos identificáveis no Ensaio Cometa, a análise histológica mostrou alterações no órgão de Corti e gânglio espiral. A cisplatina provoca alterações na função e morfologia coclear, no entanto não foi detectado dano genotóxico.

**Palavras chave:** Ototoxicidade; Genotoxicidade; Cisplatina; Cobaias; Histologia; Cóclea.

## ABSTRACT

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana  
Universidade Federal de Santa Maria

### *HISTOLOGY, COCHLEAR FUNCTION AND GENOTOXICITY IN GUINEA PIG TREATED WITH CISPLATIN*

AUTORA: CACINELI MARION DE FRANCESCHI

ORIENTADORA: TANIA TOCHETTO

CO-ORIENTADOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de março de 2010.

The present work aims to investigate the cisplatin influence on the cochlea and the deoxyribonucleic acid (DNA) of guinea pigs. An experimental study was executed with 12 guinea pigs (*Cavia porcellus*). The inclusion criterion for guinea pigs in the sample was the presence of Preyer's reflex (contraction of the pinna when facing sound stimulus) and distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs). Guinea pigs were divided into two groups: Control Group (CG) - composed by six guinea pigs, to which it was administrated physiological solution of sodium chloride 0.9% during six consecutive days; Study Group (SG) - composed by six guinea pigs to which it was administrated cisplatin in six consecutive doses of 3mg/kg/day intraperitoneally. Twenty-four hours after the last cisplatin injection, guinea pigs were sacrificed, the blood sample was collected to perform the Comet Essay, and the cochleas were removed to histological analysis. When comparing the SG guinea pigs before and after the cisplatin administration, it was verified a statistically significant reduction of the amplitude of DPOAEs, mainly in the frequencies of 1000Hz to 3998Hz. After the cisplatin administration, it was certified that the amplitude of the DPOAEs frequencies of 2830Hz and 5657Hz from the SG guinea pigs suffered a statistically significant reduction compared to the CG guinea pigs. After the Cisplatin administration there were not detected any identifiable DNA changes in the Comet essay, the histological analysis showed alterations in the organ of Corti and in the spiral ganglion. Cisplatin causes alterations in the function and cochlear morphology, however, any damage to the DNA was detected.

**Key words:** Ototoxicity; Genotoxicity; Cisplatin; Guinea pig; Histology; Cochlea.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Molécula da cisplatina. Um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos amônia.....	24
Figura 2 - Classificação dos danos ao DNA. ....	36
Figura 3 - Classificação do dano ao DNA das cobaias analisadas (FRONZA, 2010). ....	40
Figura 4 - Amplitude das EOAPDs no grupo controle e grupo estudo antes do início da administração cisplatina.....	49
Figura 5 - Amplitude das EOAPDs no grupo controle e grupo estudo após a administração de cisplatina. ....	51
Figura 6 - Estrutura microscópica da cóclea de cobaia do grupo controle em corte da base ao ápice. ....	52
Figura 7 - Estria vascular sem alterações em cobaia do grupo controle.....	53
Figura 8 - Estria vascular sem vacuolização em cobaia do grupo controle. ....	54
Figura 9 - Início do ramo coclear com aspecto normal e sem desmielinização em cobaia do grupo controle. ....	55
Figura 10 - Membrana de vestibular sem vacuolização, íntegra e retilínea em cobaia do grupo controle. ....	56
Figura 11 - Membrana vestibular sem vacuolização, íntegra e retilínea, em cobaia do grupo controle. ....	57
Figura 12 - Microcitoarquitetura do órgão de Corti em cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. ....	58
Figura 13 - Ausência completa do órgão de Corti na espira média da cóclea de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos.....	59
Figura 14 - Alterações generalizadas nas células da estria vascular, sem definição da organização celular e aspecto da membrana vestibular de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos . ....	60
Figura 15 - Aspecto dos neurônios do gânglio espiral de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. ....	61
Figura 16 - Classificação do dano ao DNA das cobaias analisadas (FRONZA, 2010). ....	72
Figura 17 - Índice de dano ao DNA por grupo. ....	75
Figura 18 - Estrutura microscópica da cóclea de cobaia do GC em corte da base ao ápice, demonstra as espiras, o modíolo no centro, dentro do qual encontram-se os neurônios do gânglios espirais. Aumento de 4x. ....	76
Figura 19 - Estria vascular com aspecto normal sem alterações em cobaia do GC. Aumento 40x.....	77

Figura 20 - Estria vascular sem vacuolização em cobaia do GC. Aumento 40x. .....	78
Figura 21 - Início do ramo coclear demonstrando aspecto normal e sem desmielinização em cobaia do GC. Aumento 10x. ....	79
Figura 22 - Membrana de vestibular sem vacuolização, íntegra e retilínea em cobaia do GC. Aumento 40x. ....	80
Figura 23 - Membrana de vestibular sem vacuolização, íntegra e retilínea, em cobaia do GC. Aumento 10x. ....	81
Figura 24 - Extensa perda da microcitoarquitetura normal do órgão de Corti, células ciliadas externas e internas sem definição. Ausência de membrana tectória em cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. Aumento 40x. ....	82
Figura 25 - Ausência completa do órgão de Corti em espira média da cóclea de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. Aumento 40x. ....	83
Figura 26 - Alterações generalizadas nas células da estria vascular, sem definição da organização celular e aspecto da membrana vestibular de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. Aumento 40x. .....	84
Figura 27 - Aspecto dos neurônios do gânglio espiral de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. Aumento 40x. ....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amplitude das EOAPDs no grupo controle pré e pós administração de solução fisiológica. ....	50
Tabela 2. Amplitude das EOAPDs do grupo estudo antes e após a administração de cisplatina. ....	50
Tabela 3. Índice de dano ao DNA no grupo controle e no grupo estudo.....	74

## LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EOAPD	Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção
RNA	Ácido ribonucléico
%	Por cento
mg/kg	Miligrama por quilograma
Hz	Hertz
mg/m <sup>2</sup>	Miligrama por metro quadrado
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
EOAs	Emissões Otoacústicas
dB NPS	Decibel nível de pressão sonora
f1	Frequência mais baixa
f2	Frequência mais alta
L1	Intensidade f1
L2	Intensidade f2
GC	Grupo controle
GE	Grupo estudo
dBNA	Decibel Nível de Audição
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
ID	Índice de dano ao DNA
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
IHS	Intelligent Hearing Systems®
EPIs	Equipamento de proteção individual
µL	Microlitro
pH	Potencial hidrogeniônico
°C	Grau Celsius
V	Volt
ml	Mililitro
mA	Microampere

## LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO 1 - .....	99
APÊNDICE 1 - .....	100

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	<b>14</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>16</b>
<b>LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>17</b>
<b>LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES</b> .....	<b>18</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2. Cisplatina:</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3. Ototoxicidade:</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4. Ototoxicidade da cisplatina:</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5. Genotoxicidade e Estresse oxidativo:</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6. Emissões otoacústicas:</b> .....	<b>29</b>
<b>2.7. Experimentos com cobaias:</b> .....	<b>30</b>
<b>2.8. Ensaio Cometa:</b> .....	<b>34</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1. Delineamento da pesquisa</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2. Análise estatística:</b> .....	<b>41</b>
<b>4 ARTIGO DE PESQUISA</b> .....	<b>43</b>
<b>Ototoxicidade da cisplatina: histologia e função coclear em cobaias</b> .....	<b>43</b>
Resumo OK .....	43
Introdução.....	45
Material e Método .....	46
Delineamento da pesquisa: .....	46
Resultados.....	48
Discussão .....	61
Conclusão.....	64
Referências Bibliográficas .....	64
<b>5 ARTIGO DE PESQUISA</b> .....	<b>67</b>
<b>Efeitos da cisplatina em cobaias: histologia coclear e genotoxicidade</b> .....	<b>67</b>
Resumo OK .....	67
Introdução.....	69
Material e Método .....	69
<b>Análise estatística:</b> .....	<b>73</b>
Resultados.....	73
Discussão .....	85

Conclusão.....	88
Referências Bibliográficas .....	88
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO – 1.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE – 1.....</b>	<b>100</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Ototóxicos são substâncias que causam dano funcional ou lesão celular na orelha interna, principalmente na cóclea, canais semicirculares e VII par craniano. Neurotóxicos são agentes que alteram a função vestibular e/ou auditiva agindo nos neurônios da via auditiva periférica e central (JOHNSON, 1993).

Segundo HYPOLITO e OLIVEIRA (2005) diferentes substâncias podem acarretar perda auditiva por lesão coclear, entre elas os antineoplásicos, antibióticos, diuréticos, antiinflamatórios não esteroidais, antihipertensivos, desinfetantes. Entre os antineoplásicos com potencial ototóxico destaca-se a cisplatina, que será objeto de estudo do presente trabalho.

A cisplatina é um quimioterápico utilizado em adultos e crianças na terapia do câncer avançado. Seus efeitos colaterais são irreversíveis e não podem ser evitados. A toxicidade da cisplatina é encontrada nos rins, sistema nervoso central ou periférico, intestino, medula óssea e também lesões no órgão de Corti da cóclea (HYPOLITO E OLIVEIRA, 2005).

Estudos mostram que 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 (SERGI *et al.*, 2003).

Mc ALPINE e JOHNSTONE (1990) verificaram que durante a administração de cisplatina ocorre um bloqueio nos canais iônicos das células ciliadas externas (CCE), impedindo a transdução do estímulo e causando perda auditiva. Concluíram que a estria vascular, não é o sítio primário de ototoxicidade da cisplatina.

Segundo HYPOLITO e OLIVEIRA (2005) a cisplatina provoca danos à cóclea. Compromete principalmente as células ciliadas externas, lesando inicialmente as células da espira basal da cóclea.

RAVI, SOMANI e RYBAK (1995), relatam que o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos de lesão das células ciliadas externas. HYPOLITO e OLIVEIRA (2005) propõem que o mecanismo de ototoxicidade da cisplatina se dá devido à alterações no sistema antioxidante das células ciliadas externas da cóclea.

Para verificar o índice de dano e reparo ao ácido desoxirribonucléico (DNA) é utilizada a técnica do Ensaio Cometa (eletroforese em gel de células individuais). Suas vantagens incluem a simplicidade, rápida realização e a alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (SILVA *et al.*, 2003).

Alguns estudos com cobaias têm mostrado o efeito tóxico da cisplatina. FREITAS *et al.*, (2009) verificaram no grupo de cobaias tratadas com três doses consecutivas de cisplatina (8 mg/kg/dia) houve redução significativa da amplitude das emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPDs) e aumento do limiar eletrofisiológico pelo potencial auditivo de tronco encefálico. Já as cobaias tratadas com dose única de 16 mg/kg não mostraram diminuição na amplitude das EOAPDs, apenas aumento do limiar eletrofisiológico.

A cisplatina é uma droga potencialmente citotóxica capaz de aumentar o estresse oxidativo, que por sua vez interfere na função de diversos órgãos e sistemas corporais. As alterações provocadas pela cisplatina na audição são de conhecimento científico, no entanto, até o momento não foram encontradas relações entre os danos auditivos e os possíveis danos genotóxicos (*in vivo*) causados pela cisplatina.

Conhecer as respostas do DNA aos agentes externos como a cisplatina pode ser de grande importância para o diagnóstico e tratamento das alterações auditivas causadas pela administração deste fármaco.

Devido à semelhança anátomo-fisiológica entre o sistema auditivo periférico de humanos e de cobaias, as pesquisas realizadas com estes animais são importantes para que os achados possam auxiliar e incentivar novas pesquisas nesta área.

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo verificar a influência da cisplatina sobre a cóclea e o DNA de cobaias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.2. Cisplatina:

Segundo WEIJL, CLETON e OSANTO (1997) o uso da cisplatina é limitado em função dos seus efeitos adversos como nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, mielossupressão, efeitos gastrintestinais e mutagênese.

PEREZ (1998) e HO, AU-YEUNG, TO (2003), relatam que apenas 1% das moléculas de cisplatina se ligam ao DNA.

Para GONZALEZ *et al.*, (2001) a ligação entre a cisplatina e o DNA nos núcleos celulares é responsável por suas propriedades antitumorais.

JACKSON (2002) relata que as drogas antineoplásicas são muito utilizadas no tratamento de vários tipos de câncer. A atividade antitumoral dos agentes quimioterápicos é particularmente dependente da sua habilidade em induzir danos mutagênicos e clastogênicos ao DNA, incluindo adutos de base, erros de replicação, quebras de fitas e ligações cruzadas.

De acordo com HARTMANN e LIPP (2003) e MARKMAN (2003) as toxicidades são dose-dependentes, limitando a terapia e a dose máxima tolerada. Para a cisplatina, a dose máxima tolerada está entre 2,5 e 3,0 mg/Kg.

FRANCESCATO *et al.*, (2004), WANG, LIPPARD (2005) e ZHANG *et al.*, (2008) referem que a cisplatina pode ser usada no tratamento de tumores malignos epiteliais, câncer testicular e ovariano avançados, câncer de cabeça e pescoço, bexiga, esôfago e pulmão.

ABU-SURRAH, KETTUNEN (2006) e PANG *et al.*, (2007) mencionam que o sucesso clínico da cisplatina no tratamento do câncer é bem conhecido, mas seu uso tem sido limitado por efeitos colaterais como neuropatia periférica, nefrotoxicidade, ototoxicidade e resistência adquirida e intrínseca.

Segundo SÁNCHEZ-SUÁREZ *et al.*, (2008) o objetivo deste tratamento é destruir as células tumorais mantendo a integridade das células normais. A diferença

entre a quantidade de droga necessária para induzir ação antitumoral bem sucedida e a que produz toxicidade em células normais é pequena.

A cisplatina é um fármaco que possui um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia (Figura 1). Segundo a bula, o medicamento é capaz de inibir a síntese do DNA pela produção de ligações cruzadas intrafitas e interfitas no DNA. As sínteses de proteínas do RNA também são inibidas, porém em menor extensão (FAULDCISPLA).

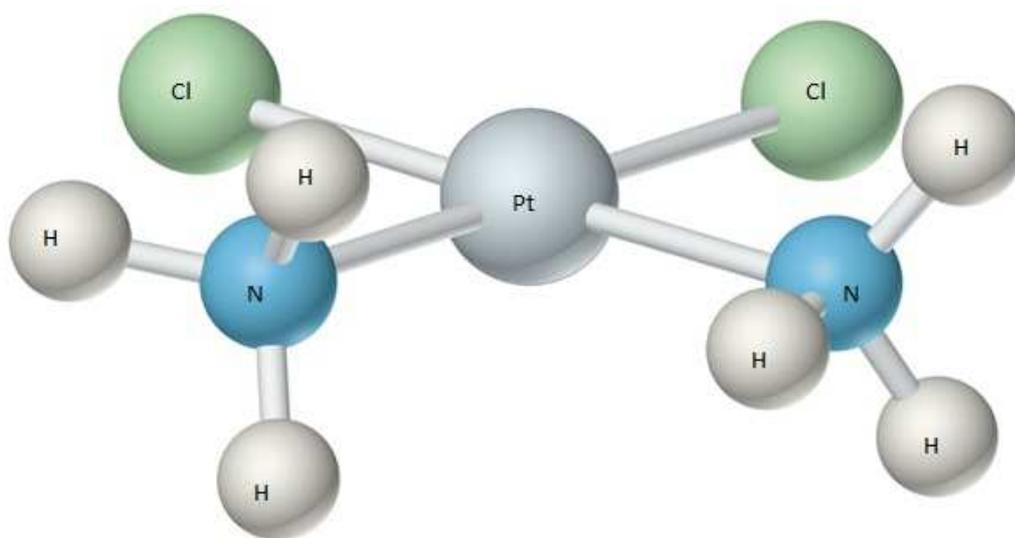


Figura 1 - Molécula da cisplatina. Um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos amônia.

### 2.3. Ototoxicidade:

Conforme definição de JOHNSON (1993) ototóxicos são substâncias químicas ou drogas capazes de causar dano funcional ou lesão celular na orelha interna, principalmente na cóclea, canais semicirculares e VIII par craniano. Neurotóxicos são agentes que alteram a função vestibular e/ou auditiva agindo nos neurônios da via auditiva periférica e central.

Segundo PÉREZ *et al.*, (1998) a ototoxicidade é irreversível pois provoca destruição das células cocleares e/ou vestibulares.

HOPMAN *et al.*, (2002) mencionam que a ototoxicidade refere-se ao prejuízo da orelha interna, lesando as células ciliadas do órgão de Corti, as máculas e cristas do sistema vestibular, o que pode resultar em diversos graus de perda auditiva.

Para ZOCOLI *et al.*, (2003) a ototoxicidade é a alteração da função coclear e/ou vestibular, devido ao uso de drogas com finalidades terapêuticas. A severidade das alterações depende da predisposição individual, dose, duração do tratamento, via de administração, idade, tendência familiar ou dano prévio à orelha interna.

HYPOLITO e OLIVEIRA (2005) definem ototoxicoses como afecções provocadas por drogas medicamentosas de forma iatrogênica, que compromete a função auditiva e/ou vestibular. Caracteriza-se por perda auditiva neurosensorial maior que 25 dBNA em uma ou mais frequências na faixa de 250 a 8000 Hz.

Segundo HYPOLITO e OLIVEIRA (2005) diferentes substâncias podem acarretar perda auditiva por lesão coclear, entre elas estão os antineoplásicos, antibióticos, diuréticos, antiinflamatórios não esteroidais, antihipertensivos, desinfetantes.

Entre os antineoplásicos com potencial ototóxico destaca-se a cisplatina, que será objeto de estudo do presente trabalho.

## **2.4. Ototoxicidade da cisplatina:**

Conforme a bula do medicamento, a ototoxicidade foi observada em cerca de 31% dos pacientes que receberam uma única dose de 50 mg/m<sup>2</sup> de cisplatina que apresentaram tinnitus e/ou perda da audição para os sons de alta frequência variando entre 4.000 a 8.000 Hz. Pode ocorrer ocasionalmente diminuição da capacidade de ouvir tons de conversação normal. Os efeitos ototóxicos podem ser mais graves em crianças. A perda auditiva pode ser unilateral ou bilateral e se torna mais frequente e grave após repetidas doses. Ainda não foram encontradas evidências indicando a reversibilidade da ototoxicidade induzida pela cisplatina. Uma

monitorização cuidadosa, através da audiometria, deve ser feita antes do início do tratamento e antes de cada dose subsequente da droga (FAULDCISPLA).

Mc ALPINE e JOHNSTONE (1990), utilizando a técnica de iontoforese, verificaram que durante a administração de cisplatina ocorre um bloqueio nos canais iônicos das células ciliadas externas, impedindo a transdução do estímulo e causando perda auditiva. Concluíram que a estria vascular, não é o sítio primário de ototoxicidade da cisplatina.

De acordo com SERGI *et al.*, (2003) 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.

ZOCOLI *et al.*, (2003) verificaram que os tratamentos realizados com a cisplatina causam alterações no funcionamento das células ciliadas externas, principalmente nas frequências extremas 1000Hz e 6000Hz.

COSTA e GARCIA (2005) constataram que 2% dos pacientes candidatos a receber prótese auditiva pelo Sistema Único de Saúde (SUS) apresentavam perda auditiva devido à ototoxicidade.

HYPOLITO e OLIVEIRA (2005) relatam que o mecanismo de ototoxicidade da cisplatina se dá devido as alterações no sistema antioxidante das células ciliadas externas da cóclea. Assim, diferentes drogas antioxidantes foram testadas ao longo das duas últimas décadas.

Segundo HYPOLITO e OLIVEIRA (2005) estudos anatômicos demonstram que a cisplatina provoca danos à cóclea tanto com doses agudas elevadas como com doses cumulativas, havendo principalmente o comprometimento das células ciliadas externas com lesão inicial nas células da espira basal da cóclea.

Os mesmos autores descrevem que a cisplatina provoca uma perda auditiva geralmente bilateral, irreversível, com zumbido associado e comprometendo as altas frequências (4.000 Hz a 8.000 Hz).

RADEMAKER-LAKHAI *et al.*, (2006) não observaram diferença significativa entre as orelhas direita e esquerda, as maiores perdas auditivas ficaram nas frequências de 4000 e 8000 Hz.

RYBAK (2007) relata que a cisplatina leva à morte das células ciliadas, que são as células receptoras sensoriais da cóclea.

Para SLATTERY e WARCHOL (2010) a ototoxicidade é um efeito colateral comum da terapia com a cisplatina e, muitas vezes leva à perda permanente da audição. O tratamento com cisplatina causa apoptose das células ciliadas auditivas e vestibulares. Em aves a morte das células ciliadas da cóclea ocorre em um padrão único, da região distal (baixas frequências) em direção à região proximal (altas frequências). O tratamento com cisplatina provoca mudanças nas células de sustentação da orelha interna e compromete severamente a capacidade de regeneração do ouvido de aves.

## **2.5. Genotoxicidade e Estresse oxidativo:**

Para FLOYD (1991 *apud* SAVI, 2004) as consequências do estresse oxidativo dependem de fatores como o tecido afetado, a magnitude do estresse, a exposição prévia dos sistemas biológicos à acometimento oxidativo e a presença de outro tipo de estresse, fisiológico ou não. Resulta em dano oxidativo ao DNA, morte tecidual ou mutações, que podem levar ao desenvolvimento de câncer ou envelhecimento precoce.

DRÖGE (2002) e FENSTER *et al.*, (2002) expuseram que o estresse oxidativo ocorre quando há aumento na produção de radicais livres ou quando os mecanismos antioxidantes estão prejudicados. Sob condições fisiológicas normais, não há lesão tecidual induzida por radicais livres, pois os antioxidantes agem como um sistema de defesa.

VAN CAMPEN *et al.*, (2002) sugerem que o estresse oxidativo produz lesões cocleares que causam a perda auditiva neurossensorial induzida por ruído ou medicamentos ototóxicos.

Segundo HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999) *apud* FRONZA (2010), as radiações gama e ultravioleta, os medicamentos, a dieta, o cigarro e os poluentes ambientais são fontes exógenas de radicais livres. Embora uma pequena quantidade de radicais livres seja necessária para manutenção da vida, sua produção

excessiva, pode conduzir a diversas formas de dano celular, como o dano ao DNA (genotoxicidade).

MCGREGOR (2000 *apud* FRONZA 2010) afirmou que os agentes genotóxicos alteram as informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre devido exposição a agentes tóxicos que levam à alteração da estrutura, do conteúdo de cromossomos (clastogenicidade) ou da sequência de pares de bases do DNA (mutagenicidade).

WOZNIAK, CZECHOWSKA, BLASIAK (2004) em seu estudo com células *in vitro* constataram que a cisplatina pode induzir fragmentação do DNA e ligações cruzadas ao DNA. Depois da incubação com cisplatina, observaram nucleóides com caudas pequenas e menor quantidade de DNA na cauda, sugeriram que estes efeitos na versão alcalina do Ensaio Cometa podem ser devido a indução de ligações cruzadas e fragmentação do DNA pela cisplatina.

Segundo ALMEIDA *et al.*, (2006) a existência de ligações cruzadas intercadeia promove a diminuição da mobilidade eletroforética do DNA, resultando na diminuição da “cauda” dos nucleóides.

NADIN *et al.*, (2006) também constataram redução na migração do DNA em linfócitos de sangue periférico tratados com cisplatina quando comparado com os linfócitos do grupo controle.

RYBAK, (2007) verificou que os mecanismos ototóxicos da cisplatina envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que provocam a morte celular. Abordagens para a quimioprolaxia incluem a administração de antioxidantes para proteger contra ROS, prevenindo a apoptose e perda auditiva.

SHEIKH-HAMAD (2008) descreveu que a cisplatina além de formar ligações cruzadas com o DNA, inibe certas enzimas, entre elas a glutatona, este fato pode resultar na diminuição da capacidade antioxidante e conseqüente aumento de espécies reativas de oxigênio intracelular.

MENDONÇA *et al.*, (2010) verificaram em seu estudo *in vitro* que a cisplatina não produz danos detectáveis pelo Ensaio Cometa, devido à produção de ligações cruzadas que interferem na migração do DNA.

## 2.6. Emissões otoacústicas:

LONSBURY-MARTIN, MARTIN e TELICHI (2001) verificaram que emissões otoacústicas (EOAs) são sons que decorrem de uma atividade interna à cóclea e são captadas no meato acústico externo. Geradas quando o órgão espiral está próximo à normalidade e são captadas quando o sistema tímpano ossicular está íntegro.

O mesmo autor relata que as EOAs relacionam-se com a micromecânica das células ciliadas externas, fenômeno modulado pelas vias auditivas eferentes por meio do sistema olivococlear. Esse tipo de emissão fornece informações fisiológicas sobre a função coclear e acredita-se que EOAs presentes estão ligadas à integridade das células ciliadas externas.

LONSBURY-MARTIN, MARTIN e TELICHI (2001) descrevem que em orelhas saudáveis há um aumento da movimentação da membrana basilar, eliciada por estímulos sonoros em níveis de estimulação médios e fracos, extremamente restritos a uma região da membrana basilar ao redor do local característico de cada frequência de estímulo.

Também apontam que a cóclea normal processa ativamente os sons, isto é, suas estruturas anatômicas utilizam energia metabólica induzida pelo som para aumentar a vibração da membrana basilar e do órgão de Corti. Esse processo coclear ativo resulta em sensibilidade aumentada e sintonia de frequência precisa da vibração da membrana basilar (LONSBURY-MARTIN, MARTIN e TELICHI, 2001).

Além disso, LONSBURY-MARTIN, MARTIN e TELICHI (2001) afirmam que a ação de amplificador coclear é responsável pela sensibilidade auditiva normal, seletividade de frequência e faixa dinâmica da cóclea.

Para HARRIS & PROBST (1997 *apud* LONSBURY-MARTIN, MARTIN e TELICHI, 2001) algumas formas de perda auditiva resultam de uma redução da ação do amplificador coclear. Se o amplificador coclear está alterado é necessário um estímulo sonoro mais intenso para atingir o limiar de excitação das células ciliadas internas e dos neurônios aferentes, isto é, há uma elevação do limiar de

audibilidade. A elevação máxima do limiar associada com perda completa da ação do amplificador coclear varia de 30 a 55 dB NPS

Segundo LONSBURY-MARTIN, MARTIN e TELICHI (2001) as emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPDs) são eliciadas por um par de tons puros (f1-frequência mais baixa e f2- frequência mais alta) apresentados de modo simultâneo nas intensidades L1 e L2. O produto de distorção mais empregado na prática clínica pode ser descrito pela equação  $2f_1-f_2$ .

MÉNDEZ-RAMÍREZ & ALTAMIRANO-GONZÁLEZ (2006) verificaram que há influência direta da otite média e da disfunção tubária sobre a reprodutibilidade e amplitude das EOAs.

Para SOUSA *et al.*, (2008) as EOAPDs avaliam a cóclea por faixas de frequência, podem ser encontradas nas frequência de 500 a 8000Hz. A principal desvantagem é que não possibilitam seu registro na região de frequência que mostre perda auditiva superior a 50dB NA.

## **2.7. Experimentos com cobaias:**

SAITO e ARAN, (1994) relataram que o modo de administração influencia no resultado da ototoxicidade sendo que a forma aguda causa maiores danos celulares. Verificaram em seu estudo que nas cobaias do grupo agudo (duas aplicações de 7,5 mg/kg, via intramuscular, com intervalo de cinco dias) houve alteração do limiar eletrofisiológico após 24 horas da última dose e lesão de células ciliadas externas. No grupo crônico (dose 1,5 mg/kg/dias por 10 dias), a alteração do limiar ocorreu somente após nove dias, nas frequências agudas e a lesão de células ciliadas externas foi menor em relação ao grupo agudo.

Segundo DE GROOT *et al.*, (1997) a administração crônica de cisplatina pode induzir uma hidropisia endolinfática.

CARDINAAL *et al.*, (2000) realizaram avaliação por microscopia óptica da cóclea de cobaias tratadas com cisplatina por oito dias consecutivos nas doses de 0,7; 1,0; 1,25; 1,5 e 2,0 mg/kg. Analisaram os seguintes dados:

1. Órgão de Corti: perda parcial ou total do células ciliadas externas e células ciliadas internas; células de suporte salientes no espaço Nuel e/ou do túnel de Corti; ausência do túnel de Corti;
2. Estria vascular: vesículas de células marginais; atrofia e edema;
3. Gânglio espiral: atrofia ou perda de células no gânglio espiral e/ou neurônios auditivos;
4. Membrana de vestibular: colapso ou distensão. Determinaram também o grau de distensão da membrana de vestibular.

CARDINAAL *et al.*, (2000) verificaram que a estria vascular tinha uma aparência normal, tanto com a menor dose diária (0,7 mg/kg) como na dose diária mais elevada (2,0 m /kg). As mudanças morfológicas nas células do gânglio espiral consistiram em vacuolização citoplasmática. Concluíram que não foi possível observar mudanças estruturais, ao microscópio de luz óptica, à nível de gânglio espiral, células e neurônios auditivos em nenhum dos grupos experimentais, exceto vacuolização das células do gânglio espiral em animais tratados com uma dose de cisplatina diária de 1,0 e 1,25 mg/kg. A cisplatina exerce um efeito dose-dependente sobre a cóclea. A análise por microscopia óptica mostrou que uma dose diária de cisplatina de 1,5 mg/kg durante 8 dias consecutivos induz a perda grave de células ciliadas externas, em especial no giro basal e médio da cóclea.

JERO *et al.*, (2001 *apud* BAGGIO, 2007) descrevem que um dos métodos utilizados para avaliar a audição em animais é o reflexo de Preyer. Esta técnica envolve a apresentação de um estímulo sonoro alto como bater palmas ou um som metálico, seguida da observação da reação reflexa do animal, movimentação do pavilhão auricular e piscar dos olhos. A observação do reflexo de Preyer é usada principalmente para determinar se a cobaia tem uma resposta auditiva ou não.

HYPOLITO *et al.*, (2003) sugerem o protocolo de três doses de 8 mg/kg/dia, via intraperitoneal, seria capaz de produzir 100% de lesão nas células ciliadas externas (verificada na microscopia eletrônica de varredura) e nas EOAPDs.

HYPOLITO *et al.*, (2003), realizaram estudo para verificar o potencial otoprotetor do extrato de ginkgobiloba aos danos cocleares causados pela cisplatina.

As cobaias foram submetidas à avaliação com EOAPDs pré e pós tratamento. Após o tratamento com cisplatina (8 mg/Kg/dia via intraperitoneal por 8 dias) as cobaias foram sacrificadas e suas cócleas foram analisadas por meio da microscopia eletrônica de varredura. Os autores verificaram que nas cobaias tratadas com cisplatina e extrato de ginkgobiloba houve a manutenção da arquitetura ciliar nas células ciliadas externas em todas as espiras da cóclea, enquanto que no grupo tratado somente com cisplatina, houve desaparecimento das emissões otoacústicas produto de distorção pós tratamento, com desaparecimento dos cílios das células ciliadas externas e distorção na arquitetura dos cílios remanescentes.

HYPOLITO *et al.*, (2003) concluíram que o extrato de Ginkgobiloba tem um efeito protetor para as células ciliadas externas da cóclea contra a agressão pela cisplatina, provavelmente por seu efeito modulador dos sistemas de defesa antioxidantes destas células, impedindo a formação de radicais livres celulares ou favorecendo sua eliminação pela célula exposta ao estresse oxidativo.

VAN RUIJVEN *et al.*, (2004) em seu estudo com cobaias tratadas com cisplatina por 4, 6 e 8 dias consecutivos na dose de 2mg/kg/dia, mostram que a perda de células ciliadas externas começou entre o 4º e 6º dia de administração de cisplatina, mas só foi estatisticamente significativa do grupo não tratado após 8 dias de tratamento. A área transversal do estria vascular não diferiram do grupo não tratado, nenhuma hidropisia endolinfática se desenvolveu durante o curso do tratamento. O gânglio espiral celular não diminuiu de densidade. Depois de seis dias, no entanto, houve destacamento da bainha de mielina. O presente estudo confirma que a cisplatina na dose diária de 2 mg/kg, tem um efeito negativo sobre a células ciliadas externas, bem como sobre o gânglio espiral celular. Estes efeitos intracocleares ocorrem simultaneamente. Nesta dose, nenhum efeito histológico na estria vascular pôde ser observado. Todas as cobaias sobreviveram até o fim do experimento.

VAN RUIJVEN *et al.*, (2004) também verificaram que há diferença na susceptibilidade para a cisplatina entre os diferentes fileiras de células ciliadas. As células ciliadas externas são mais vulneráveis do que as internas, uma vez que estas não demonstram qualquer prejuízo, mesmo após 8 dias de administração de cisplatina. A perda células ciliadas externas é mais grave na primeira fileira, seguido pela segunda e terceira. Além disso, a perda de células ciliadas externas é maior no

giro basal, é menos encontrada na região central e quase inexistente na região apical da cóclea.

VAN RUIJVEN *et al.*, (2005) relatam que a ototoxicidade da cisplatina tem pelo menos três alvos principais na cóclea: a estria vascular, o órgão de Corti e do gânglio espiral. Em seu estudo demonstram que a cisplatina com uma dose diária de 2mg/kg afeta pelo menos dois destes sitios: o órgão de Corti (particularmente as células ciliadas externas) e células do ganglio espiral.

VAN RUIJVEN *et al.*, (2005) realizaram um estudo a fim de demonstrar a presença de DNA-platinado nos tecidos cocleares, após administração de cisplatina. O DNA-platinado estava presente no núcleos da maioria das células no órgão de Corti após administração de cisplatina.

IHA *et al.*, (2007) mostraram em seu estudo que a administração de três doses de 7,5 mg/kg/dia no primeiro, quinto e sexto dia, é capaz causar lesões funcionais e morfológicas na cóclea sem ser letal às cobaias.

Em 2009 FREITAS *et al.*, verificaram que no grupo de cobaias tratadas com três doses consecutivas de 8 mg/kg/dia de cisplatina totalizando 24 mg/kg de cisplatina (dose acumulada) houve redução significativa da amplitude das EOAPDs e aumento do limiar eletrofisiológico pelo potencial auditivo de tronco encefálico, e as cobaias tratadas com dose única de 16 mg/kg não mostraram diminuição na amplitude das EOAPDs, apenas aumento do limiar eletrofisiológico.

POIRRIER *et al.*, (2010) realizaram um estudo experimental com ratos e cobaias, utilizando drogas ototóxicas (kanamicina e cisplatina). Verificaram que duas semanas após o início do tratamento com ototóxicos houve uma significativa mudança no limiar auditivo das cobaias avaliadas com potencial evocado de tronco encefálico, enquanto o mesmo não ocorreu com os ratos. As cobaias também mostraram uma drástica redução no número de células ciliadas externas, principalmente na parte basal da cóclea, nenhum rato que recebeu tratamento ototóxico mostrou alterações significantes nas células ciliadas externas. Com estes resultados os autores concluíram que os ratos não são o melhor modelo experimental para ototoxicidade.

## 2.8. Ensaio Cometa:

Conforme SHING *et al.*, (1988), as células submetidas ao Ensaio Cometa são incluídas em gel de agarose e dispostas em fina camada sobre lâminas histológicas. Através de soluções apropriadas, as membranas do núcleo e organelas são rompidas, os componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares são retirados e o material genético restante é submetido à eletroforese. Fragmentos de DNA migram no sentido anodo a partir do núcleo, quanto mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. Após a coloração, as lâminas são observadas em microscópio óptico e o DNA danificado em uma célula individual revela-se com forma similar a um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migraram.

MCKELVEY-MARTIN *et al.*, (1993) descrevem que no Ensaio Cometa as células são embebidas em agarose e esta mistura é colocada sobre uma lâmina, estas células são então lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com sais. Quando o DNA é submetido a uma corrente elétrica, pela eletroforese, os segmentos de DNA livres resultantes de quebras, migram. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Para alguns autores o tamanho da cauda é proporcional ao dano que foi causado.

COLLINS *et al.*, (1997) mostram que a identificação do dano ao DNA pode ser feita de diferentes maneiras, uma forma é medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, outra forma é ordenar visualmente as células em diferentes classes, podendo se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral que uma população de células sofreu. As células “cometa”, coradas com nitrato de prata, foram analisadas em microscópio óptico normal e classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça: classe 0 (ID0): sem cauda (sem dano); classe 1 (ID1): com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2 (ID2): com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3 (ID3): com uma cauda longa superior a duas vezes o

diâmetro da cabeça; e classe 4 (ID4): cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3 (Figura 2).

COLLINS *et al.*, (1997) sugerem que ensaio do cometa é um teste simples, rápido e preciso que tem sido amplamente utilizado em estudo de epidemiologia molecular, no qual o dano ao DNA avaliado é usado como um biomarcador de exposição

De acordo com MIYAMAE *et al.*, (1998) SANCHES-SUÁREZ *et al.*, (2008) o Ensaio Cometa oferece uma oportunidade para correlacionar níveis de danos ao DNA induzidos por terapia com a dose administrada e também para modular a dose reduzindo danos genotóxicos.

Segundo COLLINS (2004) o Ensaio Cometa é utilizado em uma ampla variedade de aplicações incluindo biomonitoramento humano, genotoxicologia, monitoramento ecológico e como uma ferramenta para investigar danos ao DNA e reparo em diferentes tipos celulares, em resposta a uma série de agentes nocivos ao DNA.

VAN RUJVEN *et al.*, (2005) referem que a apoptose (forma ativa de morte celular) das células da orelha interna pode ser desencadeada pela formação de complexos entre a cisplatina e o DNA da célula lesada, impedindo a progressão do ciclo celular.

Para MCKENNA, MCKEOWN, MCKELVEY-MARTIN (2008) o Ensaio Cometa fornece informações valiosas sobre as características intrínsecas do DNA de células individuais e suas respostas a vários fatores externos, tais como radiação, químicos e drogas. Estas informações seriam relevantes no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer.

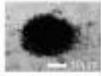
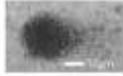
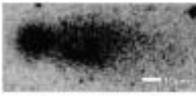
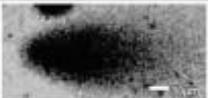
Dano observado	Cabeça/cauda	Classes de dano
	Sem cauda	0
	$\leq 1$	1
	1 - 2	2
	$\geq 2$	3
	Sem cabeça	4

Figura 2 - Classificação dos danos ao DNA.

## 3 MATERIAL E MÉTODO

### 3.1. Delineamento da pesquisa

Estudo experimental no qual foram estudadas 12 cobaias (*Cavia porcellus*), pela facilidade de manipulação e dissecação coclear, além de manutenção simples e resistência à infecções (HIPPOLYTO, 2003; BAGGIO, 2007).

Foram seguidas as diretrizes do Guia para os Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e também os princípios éticos e de biosegurança.

O critério de inclusão de cobaias na amostra foi a presença de reflexo de Preyer (contração do pavilhão auricular frente a estímulo sonoro) e EOAPDs.

Os fármacos utilizadas no estudo foram:

- Cisplatina: pó liofilizado para solução injetável. Preparo: 50 mg do pó liofilizado diluídos em 50 ml de solução salina, constituindo uma concentração final de 1 mg/ml;
- Solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%;
- Halotano.

A cisplatina foi preparada pelas funcionárias do setor de farmácia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Por se tratar de um medicamento citotóxico deve ser manipulada em uma capela de fluxo laminar, com equipamentos de proteção individual (EPIs) como luvas, touca, óculos, máscaras de carbono ativado e avental impermeável. Para a administração nas cobaias, a cisplatina foi transportada em embalagem lacrada e protegida da luz, foram utilizados os EPIs para a segurança dos pesquisadores.

Cada cobaia teve uma ficha com identificação, através de características individuais, de peso e de pelagem para controle durante o experimento (APÊNDICE 1). As fichas foram utilizadas durante todo o experimento para as anotações necessárias.

As cobaias foram divididas em dois grupos:

**Grupo controle (GC)** - composto de seis cobaias, as quais foi administrada solução fisiológica de cloreto de sódio a por seis dias consecutivos;

**Grupo estudo (GE)** - composto por seis cobaias, as quais foi administrada cisplatina em seis doses consecutivas de 3mg/kg/dia via intraperitoneal.

A audição foi avaliada pela ocorrência do reflexo de Preyer e registro das EOAPDs antes do início e 24 horas após o encerramento das aplicações de cisplatina. Para testar o reflexo de Preyer, foi percutido o agogô, campânula grande, com intensidade superior a 90 dB. Para a avaliação das EOAPDs as cobaias foram sedadas com halotano. O registro das EOAPDs foi feito com utilização do aparelho de EOAs modelo SmartEp da marca *Intelligent Hearing Systems®* (IHS). Foram analisadas as EOAPDs nas frequências a partir de 500 Hz a 6000 Hz. Os resultados foram impressos para análise e comparação. O teste de EOAPDs foi realizado seguindo a relação de frequência  $2f(1)-f(2)$  com relação  $f(2)/f(1) = 1,22$ .

O critério de integridade funcional da cóclea foi a presença EOAPDs (HYPPOLITO *et al.*, 2005). As EOAPDs foram avaliadas pela comparação dos valores médios da relação sinal/ruído por frequência no início e fim do experimento, a fim de observar indícios de sofrimento precoce das células ciliadas externas (KASSE *et al.*,2008).

A análise dos danos ao DNA das cobaias foi feita por meio do Ensaio Cometa. Para tal foi realizada coleta de amostra sanguínea, pós administração de cisplatina, para análise e comparação dos danos ao DNA.

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com o método proposto por SINGH *et al.*, (1988) e modificado por COLLINS *et al.*, (1995). Todos os passos foram realizados sem luz direta para prevenir danos adicionais ao DNA.

Para execução da técnica, foram misturados 5 $\mu$ L de amostra (leucócitos) com 90 $\mu$ L de 0,75% agarose em um eppendorf. A solução foi adicionada em uma lâmina pré-coberta com 1% de agarose normal, e coberta por uma lamínula, que permaneceu na geladeira por cinco minutos. Depois, a lamínula foi retirada cuidadosamente e a lâmina colocada em uma cuba com solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH 10,00) por um dia, a 4°C. As lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas com água destilada. Em seguida, foram colocadas em uma cuba horizontal contendo solução de eletroforese (1mM EDTA e 300mM NaOH, pH>13). As lâminas ficaram nessa

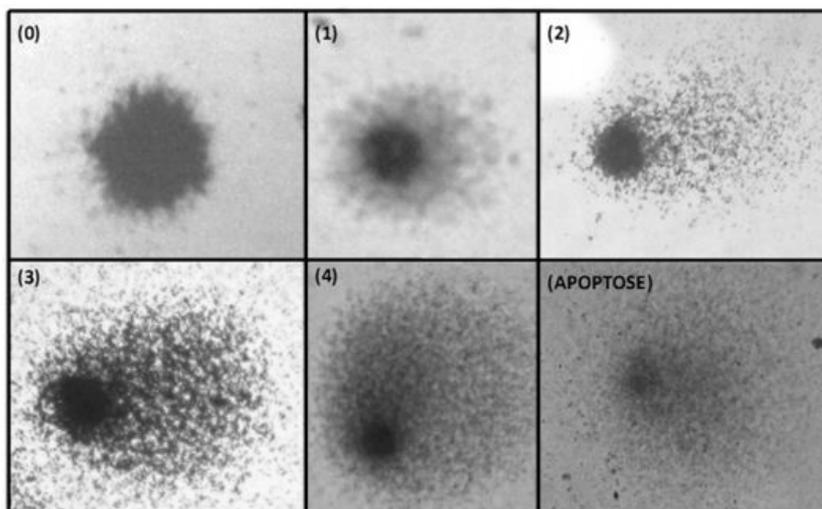
solução por 20 minutos em repouso para permitir o desenovelamento do DNA, e posteriormente foi realizada a eletroforese por 20 minutos a 25V e 300 mA. Após, as lâminas foram colocadas em uma cuba com solução neutralizadora (0,4M Tris-Base, pH 7,5) por cinco minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes com água destilada e secaram pelo período de over-night em temperatura ambiente. Após a secagem as lâminas foram reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução fixadora (15% Ácido Tricloroacético, 5% Glicerol e 5% Sulfato de Zinco) por dez minutos. A seguir, foram lavadas três vezes e secaram em temperatura ambiente. Novamente foram reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução corante por 25 minutos a 37°C. Para preparar a solução corante foram misturados 34ml da Solução B (0,2% Nitrato de Amônio, 0,2% Nitrato de Prata, 0,5% Ácido Tungstosilícico e 0,15% Formaldeído) com 66ml da Solução A (5% Carbonato de Sódio). Depois da coloração, as lâminas foram lavadas por três vezes em água destilada. A coloração foi interrompida colocando as lâminas em solução de Ácido Acético 1%. Após, as lâminas secaram em temperatura ambiente.

Foram feitas duas lâminas para cada cobaia onde foram contados 50 núcleos por lâmina. Ambas as lâminas foram analisadas por dois observadores independentes. Para o índice de dano (ID) foi considerado a média dos danos observados pelos dois analisadores para 100 núcleos por cobaia.

As células “cometa”, coradas com nitrato de prata, foram analisadas em microscópio óptico normal e classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça (Figura 3) (COLLINS *et al.*, 1997):

- Classe 0 (ID0): sem cauda (sem dano);
- Classe 1 (ID1): com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça;
- Classe 2 (ID2): com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça;
- Classe 3 (ID3): com uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça;
- Classe 4 (ID4): cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3;

- Apoptose: ausência de núcleo.



**Figura 3 - Classificação do dano ao DNA das cobaias analisadas (FRONZA, 2010).**

Após a última aplicação de cisplatina Nas cobaias do GE e solução fisiológica de cloreto de sódio nas cobaias do GC, imediatamente após a realização das EOAPD, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% via intramuscular e sacrificados pelo método de decapitação.

Seus ossos temporais foram rapidamente removidos e abertos para a exposição da cóclea, com corte no crânio no sentido longitudinal mediano estendendo-se posteriormente à região vestibulococlear.

Para evitar a destruição das células por autólise, ou bactérias e preservar a morfologia e a composição dos tecidos, as cócleas foram fixadas com formaldeído 4% em solução tamponada (pH 7,5), por cerca de 12 horas. Após a fixação, foi realizada a desidratação, na qual a água é extraída das cócleas pela passagem em banhos de concentração crescente de etanol, de 70% até etanol puro (100%), por cerca de 6 a 24 horas. Em seguida na etapa de clareamento, o etanol foi substituído por um líquido miscível com o meio de inclusão. Para a inclusão em parafina, utilizou-se o xilol para que as peças se tornassem translúcidas, esta etapa durou de 1 a 6 horas. Devido à temperatura o xilol evaporou e os espaços anteriormente

ocupados por ele foi ocupados por parafina. Em seguida colocou-se um pouco de parafina fundida e deixou-se solidificar à temperatura ambiente, formando-se um bloco com a cóclea no seu interior, esta etapa de inclusão, durou cerca de 30 minutos. Após os blocos foram seccionados por meio de uma navalha de aço acoplada ao micrótomo, de onde obteve-se cortes de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de espessura. Foi utilizada a coloração dupla pela hematoxilina e eosina, que corou as lâminas em tons de azul e vermelho (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Foi utilizado o microscópio óptico binocular da marca Olympus modelo CX40 para visualização do material coclear e DNA.

Os resultados da microscopia óptica foram fotografados e analisados.

O projeto foi aprovado pelo Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal da UFSM (ANEXO 1).

### **3.2. Análise estatística:**

A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual determina se a característica estudada da amostra é oriunda de uma população com distribuição normal.

Foi utilizado o teste *T-Student* ao analisar-se as orelhas (direita e esquerda), a média de amplitude das EOAPDs e Ensaio Cometa. Considerou-se como diferença significativa valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0.05$ ).

Para o cálculo do índice de dano (ID) foi utilizada a seguinte fórmula de acordo com CAVALCANTI *et al.*, (2008):

$$\text{ID} = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$$
, onde  $n$  = número núcleos de cada classe analisada. Desta forma o índice de dano para 100 nucleóides pode variar de zero (completamente sem danos  $0 \times 100$ ) a 400 (totalmente danificadas  $100 \times 4$ ).

Utilizou-se o coeficiente de correlação de postos de Spearman, para correlacionar o índice de dano ao DNA. O coeficiente  $\rho$  de Spearman mede a intensidade da relação entre variáveis ordinais, varia entre -1 e 1, quanto mais próximo estiver destes extremos, maior é a associação entre as variáveis. O sinal

negativo da correlação significa que as variáveis variam em sentido contrário, isto é, as categorias mais elevadas de uma variável estão associadas a categorias mais baixas da outra variável, 0,70 (+ ou -) indica uma forte correlação. Considerou-se como correlação significativa ao nível de 0,001.

## 4 ARTIGO DE PESQUISA

### Ototoxicidade da cisplatina: histologia e função coclear em cobaias

#### *Cisplatin Ototoxicity: Histology and cochlear function in guinea pigs*

#### Resumo

**Introdução:** Devido à semelhança anátomo-fisiológica entre o sistema auditivo periférico de humanos e de cobaias, as pesquisas realizadas com estes animais podem contribuir para a prevenção, diagnóstico e tratamento das alterações auditivas causadas pela administração deste fármaco. **Objetivos:** Verificar a influência da cisplatina sobre as emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPDs) e histologia coclear de cobaias. **Material e Método:** Estudo experimental, no qual foram estudadas 12 cobaias (*Cavia porcellus*). O critério de inclusão de cobaias na amostra foi a presença de reflexo de Preyer (contração do pavilhão auricular frente a estímulo sonoro) e EOAPDs. As cobaias foram divididas em dois grupos: **Grupo controle (GC)** - composto de seis cobaias, as quais foi administrada solução fisiológica de cloreto de sódio por seis dias consecutivos; **Grupo estudo (GE)** - composto por seis cobaias, as quais foi administrada cisplatina por seis doses consecutivas de 3mg/kg/dia via intraperitoneal. As cobaias foram avaliadas com EOAPDs antes e 24 horas após a última aplicação de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (GC) e cisplatina (GE). A seguir as cobaias foram sacrificadas e suas cócleas foram removidas para análise histológica. **Resultados:** Ao comparar-se as cobaias do GE antes e após a administração de cisplatina verificou-se redução estatisticamente significativa da amplitude das EOAPDs principalmente nas frequências de 1000Hz à 3998Hz. Após a administração de cisplatina constatou-se que a amplitude das EOAPDs nas frequências de 2830Hz e 5657Hz sofreu redução estatisticamente significativa nas cobaias do GE quando comparado com as cobaias do GC. A análise histológica mostrou alterações no órgão de Corti e gânglio espiral. **Conclusão:** A cisplatina administrada a cobaias na dose de 3mg/kg, por seis dias consecutivos, provoca alterações na amplitude das EOAPDs, principalmente nas frequências médias e agudas, ausência total do órgão de Corti na espira média da cóclea e alteração no gânglio espiral.

**Palavras chave:** Ototoxicidade; Cisplatina; Cobaias; Histologia; Cóclea.

**Introduction:** Due to the anatomy-physiological similarity between the peripheral auditory system of humans and guinea pigs, the researches done with these animals may contribute to the prevention, diagnosis and treatment of hearing disorders caused by the administration of this drug. **Objectives:** To investigate the cisplatin influence on the distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) and to the cochlear histology of guinea pigs. **Material and Methods:** An experimental study in which 12 guinea pigs (*Cavia porcellus*) were studied. The inclusion criterion of guinea pigs in the sample of the test was the presence of Preyer's reflex (contraction of the pinna when facing the sound stimulus) and (DPOAEs). Guinea pigs were divided into two groups: **Control Group (CG)** - composed by six guinea pigs, to which it was administrated physiological solution of sodium chloride during six consecutive days; **Study Group (SG)** - composed by six guinea pigs, to which it was administrated cisplatin during six consecutive doses of 3mg/kg/day intraperitoneally. The guinea pigs were evaluated with DPOAEs before and 24 hours after the last application of the physiological solution of sodium chloride 0.9% (CG) and cisplatin (SG). After that, the guinea pigs were sacrificed and their cochleas were removed to histological analysis. **Results:** When comparing the SG guinea pigs before and after the cisplatin administration, it was verified a statistically significant reduction of the amplitude of DPOAEs, mainly in the frequencies of 1000Hz to 3998Hz. After the cisplatin administration it was certified that the amplitude of the DPOAEs frequencies of 2830Hz and 5657Hz from the SG guinea pigs suffered a statistically significant reduction when compared to the CG guinea pigs. Histological analysis showed alterations in the organ of Corti and spiral ganglion. **Conclusion:** The cisplatin administrated in the guinea pigs at a dose of 3mg/kg during six consecutive days, causes amplitude changes of DPOAEs, especially in mid and high frequencies, total absence of the organ of Corti in the mean spiral cochlea and spiral ganglion changes.

**Key words:** Ototoxicity; Cisplatin; Guinea pig; Histology; Cochlea.

## Introdução

Ototóxicos são substâncias capazes de causar dano funcional ou lesão celular na cóclea, canais semicirculares e VII par craniano. Neurotóxicos são agentes que alteram a função vestibular e/ou auditiva agindo nos neurônios da via auditiva periférica e central (JOHNSON, 1993).

Segundo HYPOLITO e OLIVEIRA (2005) diferentes substâncias podem acarretar perda auditiva por lesão coclear, entre elas: antineoplásicos, antibióticos, diuréticos, antiinflamatórios não esteroidais, antihipertensivos, desinfetantes.

Entre os antineoplásicos com potencial ototóxico destaca-se a cisplatina, que será objeto de estudo do presente trabalho.

A sua ação deletéria da cisplatina sobre o órgão de Corti inicia pelas células de sustentação, seguida pelas células ciliadas externas, principalmente nos giros médio e basal, e posteriormente estria vascular e nervo auditivo (SERGI *et al.*, 2003).

HYPOLITO e OLIVEIRA (2005) referem que a ototoxicidade da cisplatina deve-se às alterações no sistema antioxidante das células ciliadas externas da cóclea.

Estudos com animais apontam alterações anatômicas e funcionais causadas pela cisplatina na orelha interna, como perda acentuada de células ciliadas externas (SAITO e ARAN, 1994, CARDINAL *et al.*, 2000, HYPOLITO *et al.*, 2003, HYPOLITO *et al.*, 2005), hidrópsia endolinfática (DE GROOT *et al.*, 1997), vacuolização das células do gânglio espiral (CARDINAL *et al.*, 2000), aumento no limiar eletrofisiológico (SAITO e ARAN, 1994) e redução significativa da amplitude das emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPDs) (HYPOLITO *et al.*, 2003, HYPOLITO *et al.*, 2005, FREITAS *et al.*, 2009).

O exame das emissões otoacústicas (EOAs) oferece dados que permitem inferir sobre a condição coclear. A presença de EOAs indica integridade da via auditiva até as células ciliadas externas do órgão de Corti. EOAPDs são geradas pelas células ciliadas externas quando estimuladas por dois tons puros (LONSBURY-MARTIN, MARTIN e TELICHI, 2001).

Cobaias que receberam cisplatina apresentam redução significativa da amplitude das EOAPDs e aumento do limiar eletrofisiológico (FREITAS *et al.*, 2009).

Devido à semelhança anátomo-fisiológica entre o sistema auditivo periférico de humanos e de cobaias, as pesquisas realizadas com estes animais permitem que os achados auxiliem o diagnóstico e tratamento das alterações auditivas causadas pela administração deste fármaco. Sendo assim o presente trabalho tem como objetivo verificar a influência da cisplatina sobre as EOAPDs e histologia coclear de cobaias.

### **Material e Método**

Delineamento da pesquisa:

Estudo experimental no qual foram estudadas 12 cobaias (*Cavia porcellus*), pela facilidade de manipulação e dissecação coclear, além de manutenção simples e resistência à infecções (HIPPOLYTO, 2003; BAGGIO, 2007).

Foram seguidas as diretrizes do Guia para os Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e também os princípios éticos e de biosegurança.

O critério de inclusão de cobaias na amostra foi a presença de reflexo de Preyer (contração do pavilhão auricular frente a estímulo sonoro) e EOAPDs.

Os fármacos utilizadas no estudo foram:

- Cisplatina: concentração de 1 mg/ml;
- Solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%;
- Halotano.

Cada cobaia teve uma ficha com identificação, através de características individuais, de peso e de pelagem para controle durante o experimento (ANEXO 1). As fichas foram utilizadas durante todo o experimento para as anotações necessárias.

As cobaias foram divididas em dois grupos:

**Grupo controle (GC)** - composto de seis cobaias, as quais foi administrada solução fisiológica de cloreto de sódio a por seis dias consecutivos;

**Grupo estudo (GE)** - composto por seis cobaias, as quais foi aplicada com cisplatina em seis doses consecutivas de 3mg/kg/dia via intraperitoneal.

A audição foi avaliada pela ocorrência do reflexo de Preyer e registro das EOAPDs antes do início e 24 horas após o encerramento das aplicações de

cisplatina. Para testar o reflexo de Preyer, foi percutido o agogô, campânula grande, com intensidade superior a 90 dB. Para a avaliação das EOAPDs as cobaias foram sedadas com halotano. O registro das EOAPDs foi feito com utilização do aparelho de EOAs modelo SmartEp da marca *Intelligent Hearing Systems®* (IHS). Foram analisadas as EOAPDs nas frequências a partir de 500 Hz a 6000 Hz. Os resultados foram impressos para análise e comparação. O teste de EOAPDs foi realizado seguindo a relação de frequência  $2f(1)-f(2)$  com relação  $f(2)/f(1) = 1,22$ .

O critério de integridade funcional da cóclea foi a presença EOAPDs (HYPPOLITO *et al.*, 2005). As EOAPDs foram também avaliadas pela comparação dos valores médios das amplitudes da relação sinal/ruído por frequência no início e fim do experimento, a fim de observar indícios de sofrimento precoce das células ciliadas externas (KASSE *et al.*, 2008).

Após a última aplicação de cisplatina no GE e solução fisiológica de cloreto de sódio no GC, imediatamente após a realização das EOAPDs, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% via intramuscular e sacrificados pelo método de decapitação.

Seus ossos temporais foram rapidamente removidos e abertos para a exposição da cóclea, com corte no crânio no sentido longitudinal mediano estendendo-se posteriormente à região vestibulococlear.

Para evitar a destruição das células por autólise, ou bactérias e preservar a morfologia e a composição dos tecidos, as cócleas foram fixadas com formaldeído 4% em solução tamponada (pH 7,5). Após a fixação, foi realizada a desidratação, com banhos de concentração crescente de etanol, de 70% até etanol puro (100%). Para a inclusão em parafina, utilizou-se o xilol para que as peças se tornassem translúcidas. Em seguida colocou-se um pouco de parafina fundida e deixou-se solidificar à temperatura ambiente, formando-se um bloco com a cóclea no seu interior. Após os blocos foram seccionados por meio de uma navalha de aço acoplada ao micrótomo, de onde obteve-se cortes de 6 a 8  $\mu$ m de espessura. Foi utilizada a coloração dupla pela hematoxilina e eosina, que corou as lâminas em tons de azul e vermelho (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Foi utilizado o microscópio óptico binocular da marca Olympus modelo CX40 para visualização do material coclear e DNA.

Os resultados da microscopia óptica foram fotografados e analisados.

O projeto foi aprovado pelo Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal da UFSM (ANEXO 1).

Análise estatística:

A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual determina se a característica estudada da amostra é oriunda de uma população com distribuição normal.

Quando testada a normalidade das variáveis em estudo identificou-se, que todos os dados testados seguiram uma distribuição normal.

Foi utilizado o teste *T-Student* ao analisar-se a média de amplitude das EOAPDs. Considerou-se como diferença significativa valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0.05$ ).

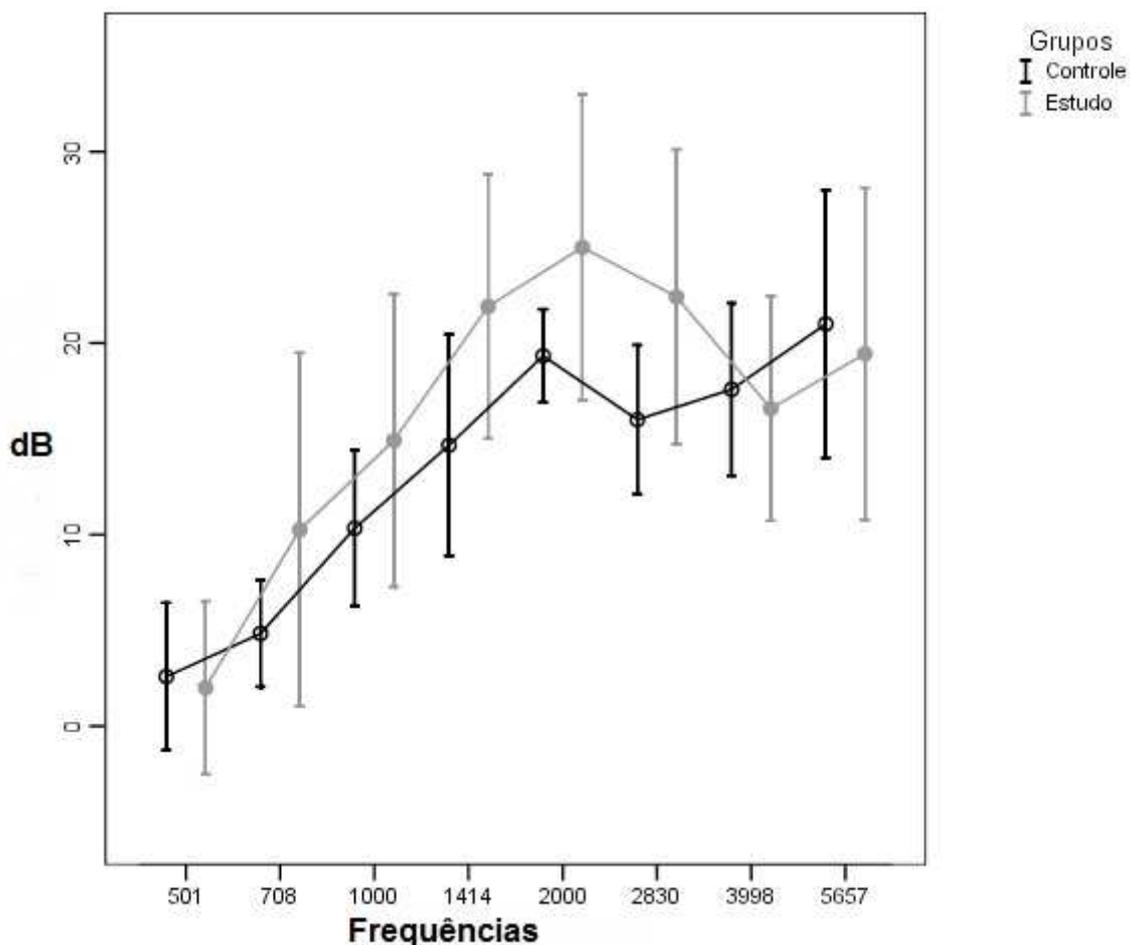
## **Resultados**

As cobaias foram divididas em dois grupos. O grupo controle (GC) constou de seis cobaias, que receberam solução fisiológica de cloreto de sódio a 9%. O grupo estudo (GE) foi formado por seis cobaias que receberam cisplatina.

Quando testada a normalidade das variáveis em estudo identificou-se que todos os dados testados seguiram uma distribuição normal.

Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre o comportamento das orelhas direita e esquerda quando analisadas pelo teste *T-Student*. Assim, os dados obtidos de ambas as orelhas foram estudados em conjunto em cada grupo.

Verificou-se presença do reflexo de Preyer e das EOAPDs em todas as cobaias testadas no GC e GE, antes do início das aplicações de solução fisiológica a 9% e cisplatina, respectivamente (Figura 4).



**Figura 4 - Amplitude das EOAPDs no grupo controle e grupo estudo antes do início da administração cisplatina.**

(p-valor<0,005 ou p-valor menor que 5%)

Após seis dias de administração de cisplatina 3mg/kg, quatro cobaias do GE foram a óbito. Foi possível a remoção das oito cócleas para análise histológica, bem como a coleta de sangue de uma das cobaias para análise do DNA. Restaram duas cobaias (quatro orelhas) nas quais foi possível mensurar as EOAPDs.

Verificou-se elevação na média da amplitude das EOAPDs após a administração de cisplatina, no entanto sem diferença estatisticamente significativa, com exceção da frequência de 2830Hz (Tabela 1).

**Tabela 1 - Amplitude das EOAPDs no grupo controle pré e pós administração de solução fisiológica.**

Frequências	Antes da administração		Após a administração		p-valor
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
501 Hz	2,58	6,06	3,33	6,44	0,7718
708 Hz	4,83	4,38	6,33	8,81	0,6030
1000 Hz	10,33	6,40	12,92	8,71	0,4167
1414 Hz	14,66	9,09	16,08	8,06	0,6903
2000 Hz	19,33	3,82	21,91	10,21	0,4209
2830 Hz	16,00	6,13	27,75	8,79	0,0010*
3998 Hz	17,58	7,08	18,66	5,48	0,6795
5657 Hz	21,00	9,77	26,54	5,00	0,1133

(p-valor<0,005 ou p-valor menor que 5%)

Na tabela 2 foram excluídos os correspondentes a órbito do GE.

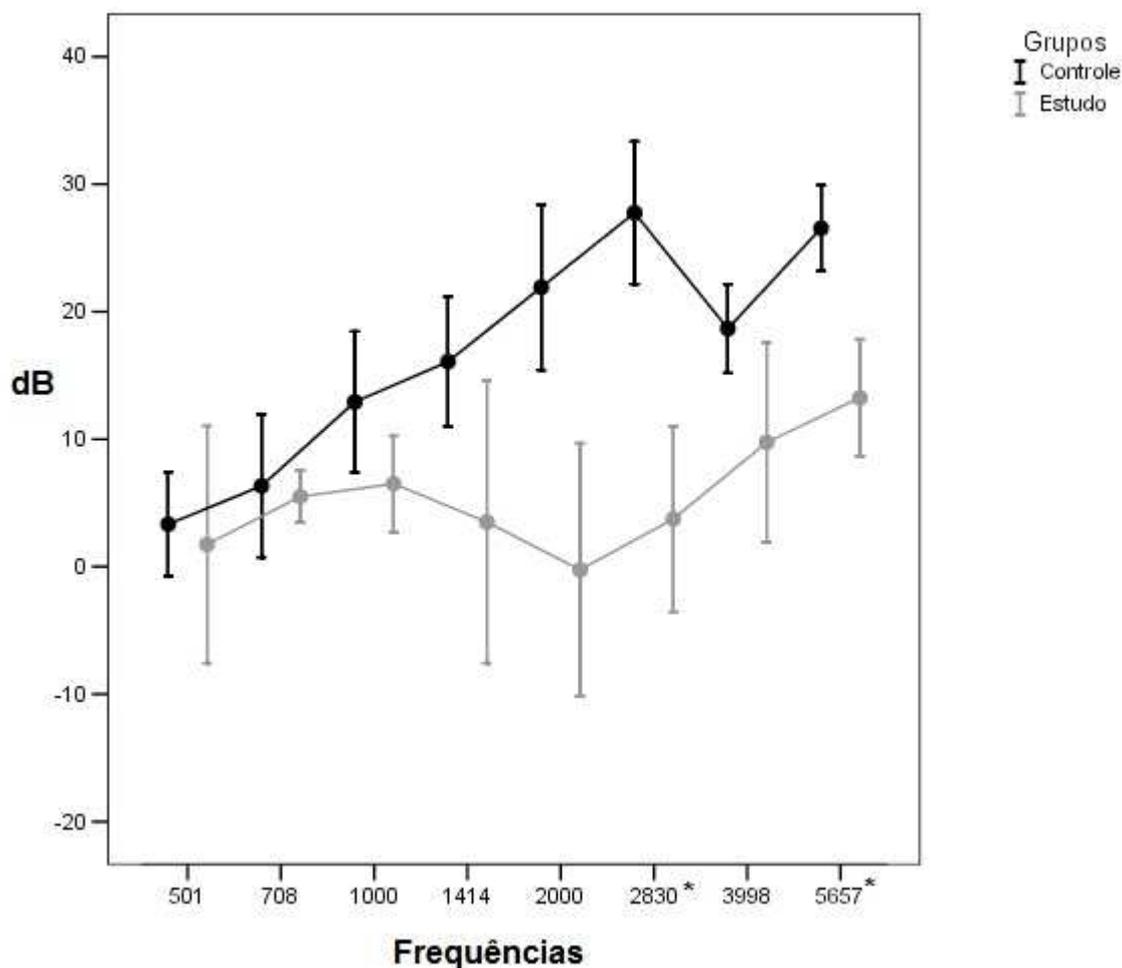
Nas cobaias do GE observou-se decréscimo na média da amplitude das EOAPDs em todas as frequências testadas após a administração de cisplatina, exceto na frequência de 501Hz. Houve diferença estatisticamente significativa na amplitude das EOAPDs nas frequências de 1000 Hz à 3998 Hz. (Tabela 2).

Frequências	Antes da administração		Após a administração		p-valor
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
501 Hz	2,00	7,12	1,75	5,85	0,6030
708 Hz	10,25	14,53	5,50	1,29	0,0802
1000 Hz	14,92	12,04	6,50	2,38	0,0410*
1414 Hz	21,92	10,88	3,50	6,95	0,0055*
2000 Hz	25,00	12,57	-0,25	6,23	0,0081*
2830 Hz	22,42	12,11	3,75	4,57	0,0016*
3998 Hz	16,58	9,22	9,75	4,92	0,0227*
5657 Hz	19,44	11,29	13,25	2,87	0,4413

**Tabela 2. Amplitude das EOAPDs do grupo estudo antes e após a administração de cisplatina.**

\* (p-valor<0,005 ou p-valor menor que 5%)

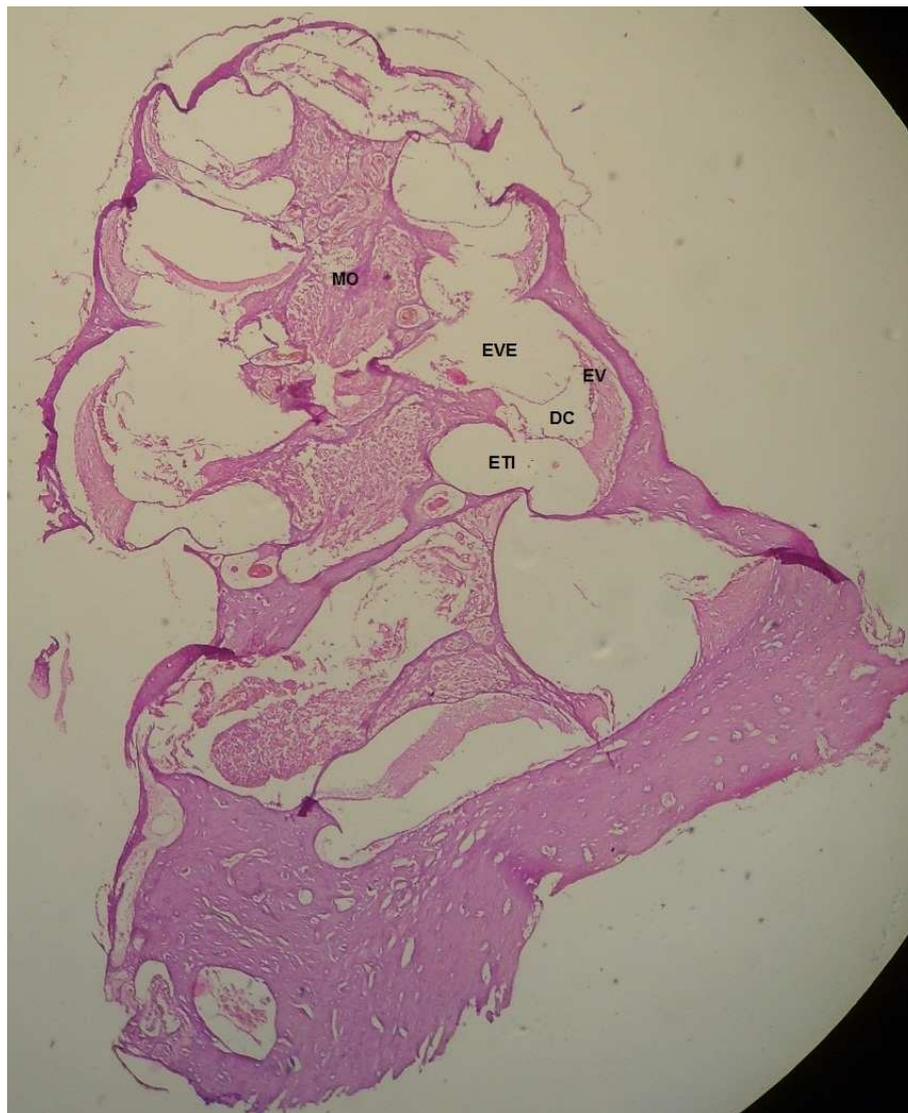
Ao comparar-se as cobaias do GC com as cobaias do GE após a administração de cisplatina, verificou-se diferença estatisticamente significativa nas frequências de 2830Hz e 5657Hz (Figura 5).



**Figura 5 - Amplitude das EOAPDs no grupo controle e grupo estudo após a administração de cisplatina.**

\*(p-valor<0,005 ou p-valor menor que 5%)

Nas cobaias do GC, que receberam com solução fisiológica de cloreto de sódio 9%, a estrutura microscópica da cóclea em corte da base ao ápice, mostrou as espiras e o modíolo ao centro, dentro do qual encontram-se os neurônios do gânglio espiral (Figura 6); a estria vascular sem alterações (Figuras 7 e 8); o ramo coclear com aspecto normal, sem desmielinização (Figura 9); os neurônios do gânglio espiral sem alterações (Figura 10) e a membrana vestibular de aspecto normal, retilínea e sem vacuolização citoplasmática (Figura 10 e Figura 11).



**Figura 6 - Estrutura microscópica da cóclea de cabaia do grupo controle em corte da base ao ápice.**

Aumento de 4x.

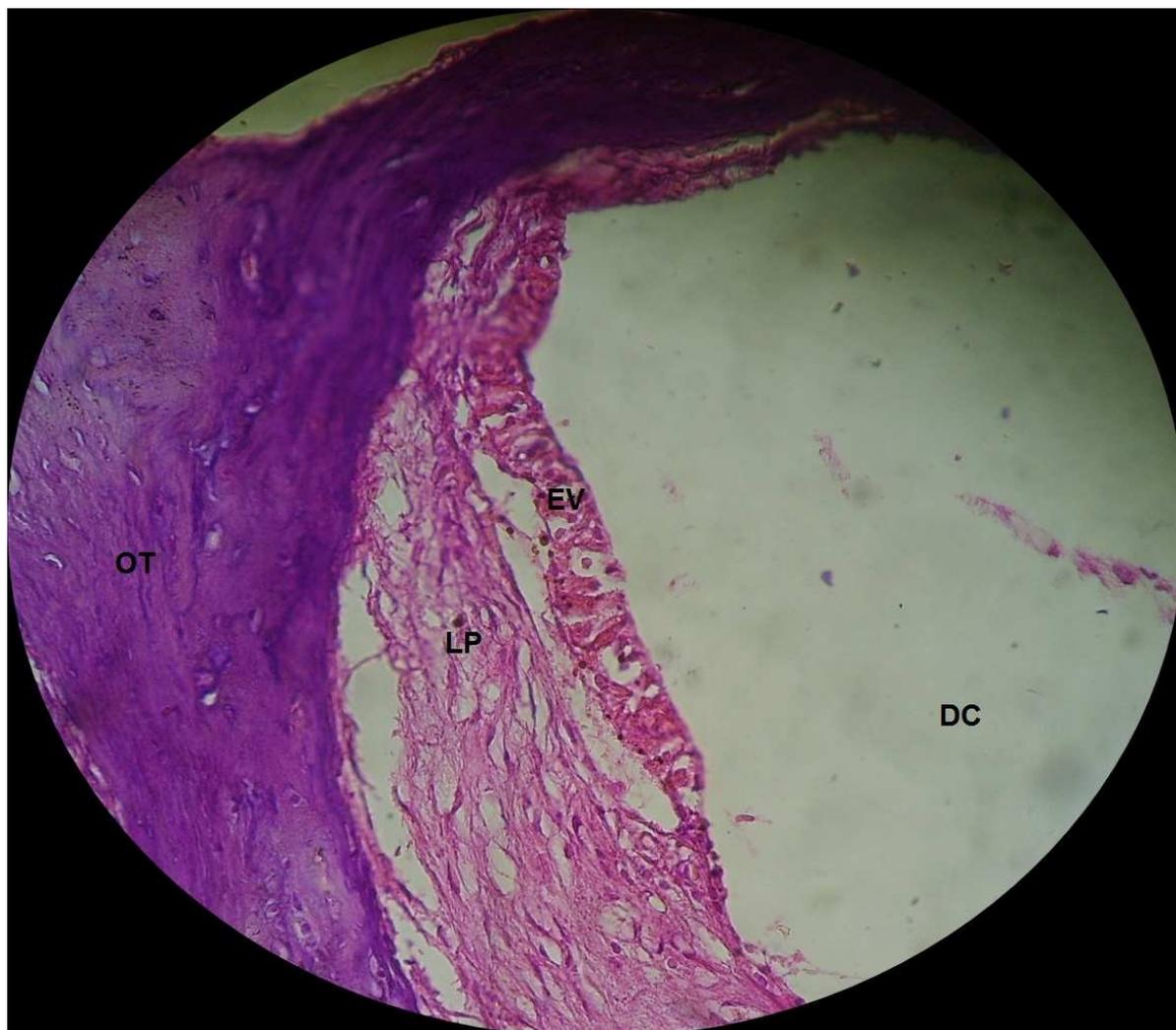
Legenda: MO – Modíolo

EVE – Escala Vestibular

ETI – Escala Timpânica

DC – Ducto Coclear

EV – Estria Vascular



**Figura 7 - Estria vascular sem alterações em cobaia do grupo controle.**

Aumento 40x.

Legenda: DC – Ducto Coclear  
EV – Estria Vascular  
LP – Lâmina Própria  
OT – Osso Temporal



**Figura 8 - Estria vascular sem vacuolização em cobaia do grupo controle.**

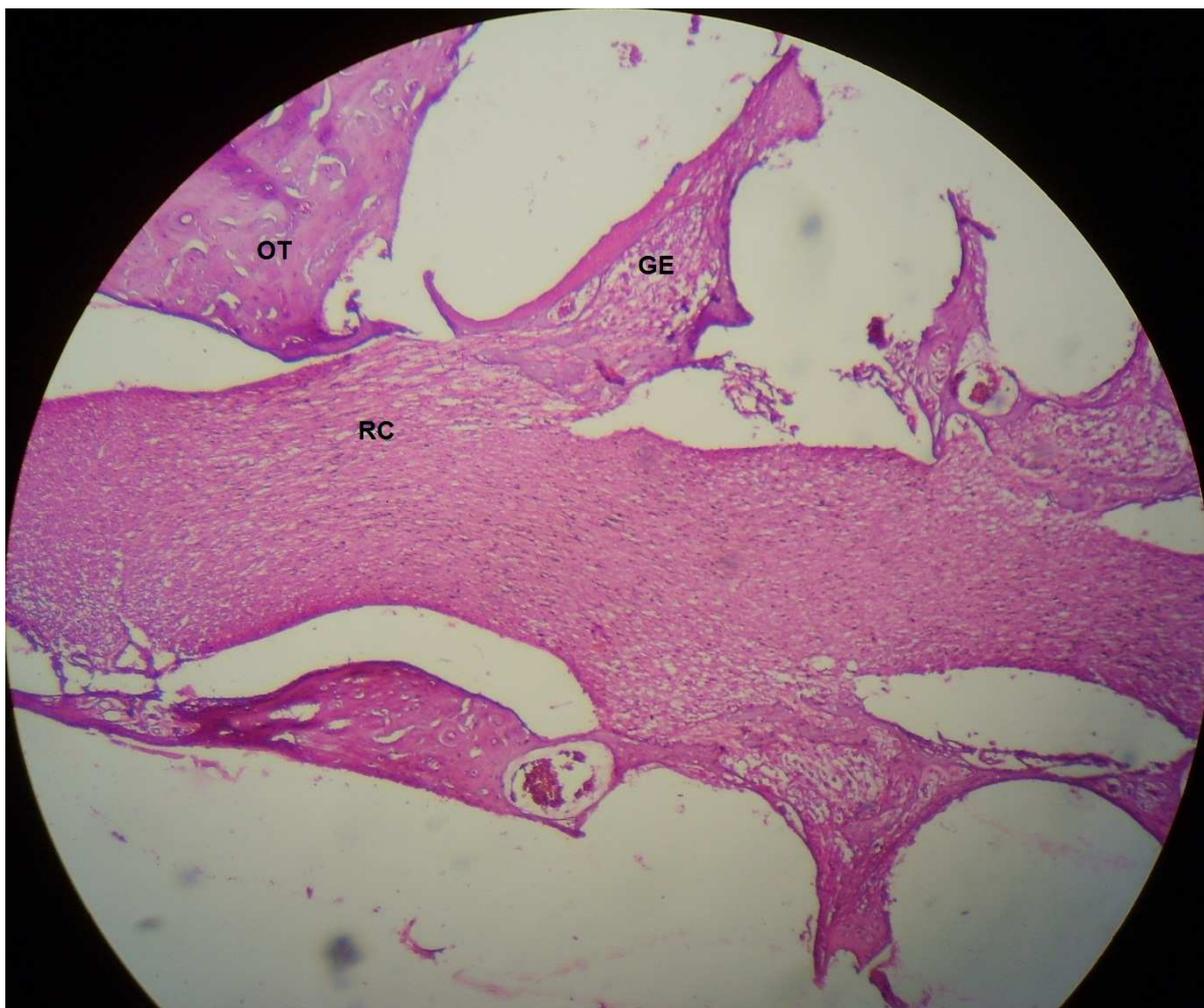
Aumento 40x.

Legenda: MV – Membrana Vestibular

EVE – Escala Vestibular

DC – Ducto Coclear

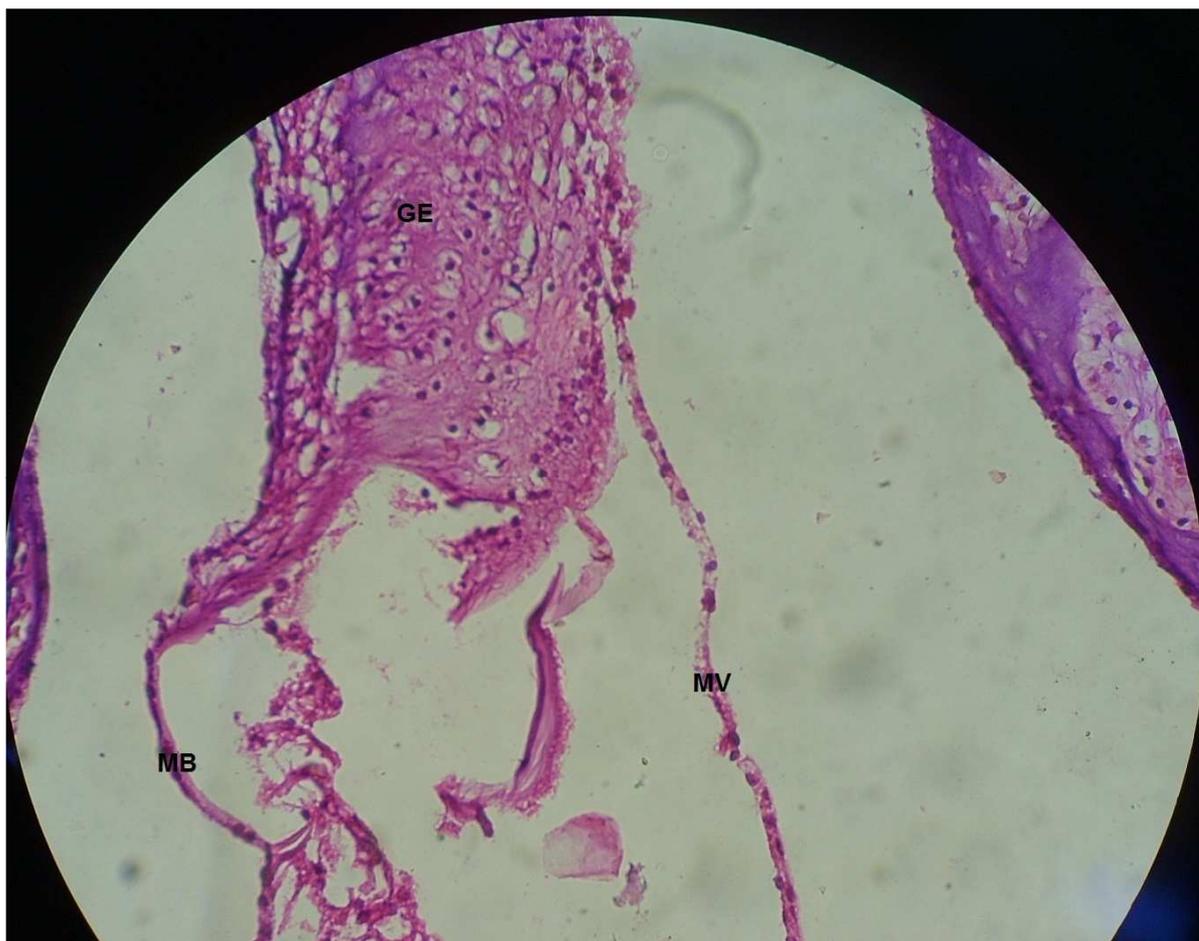
EV – Estria Vascular



**Figura 9 - Início do ramo coclear com aspecto normal e sem desmielinização em cobaia do grupo controle.**

Aumento 10x.

Legenda: OT – Osso Temporal  
GE – Gânglio Espiral  
RC – Ramo Coclear



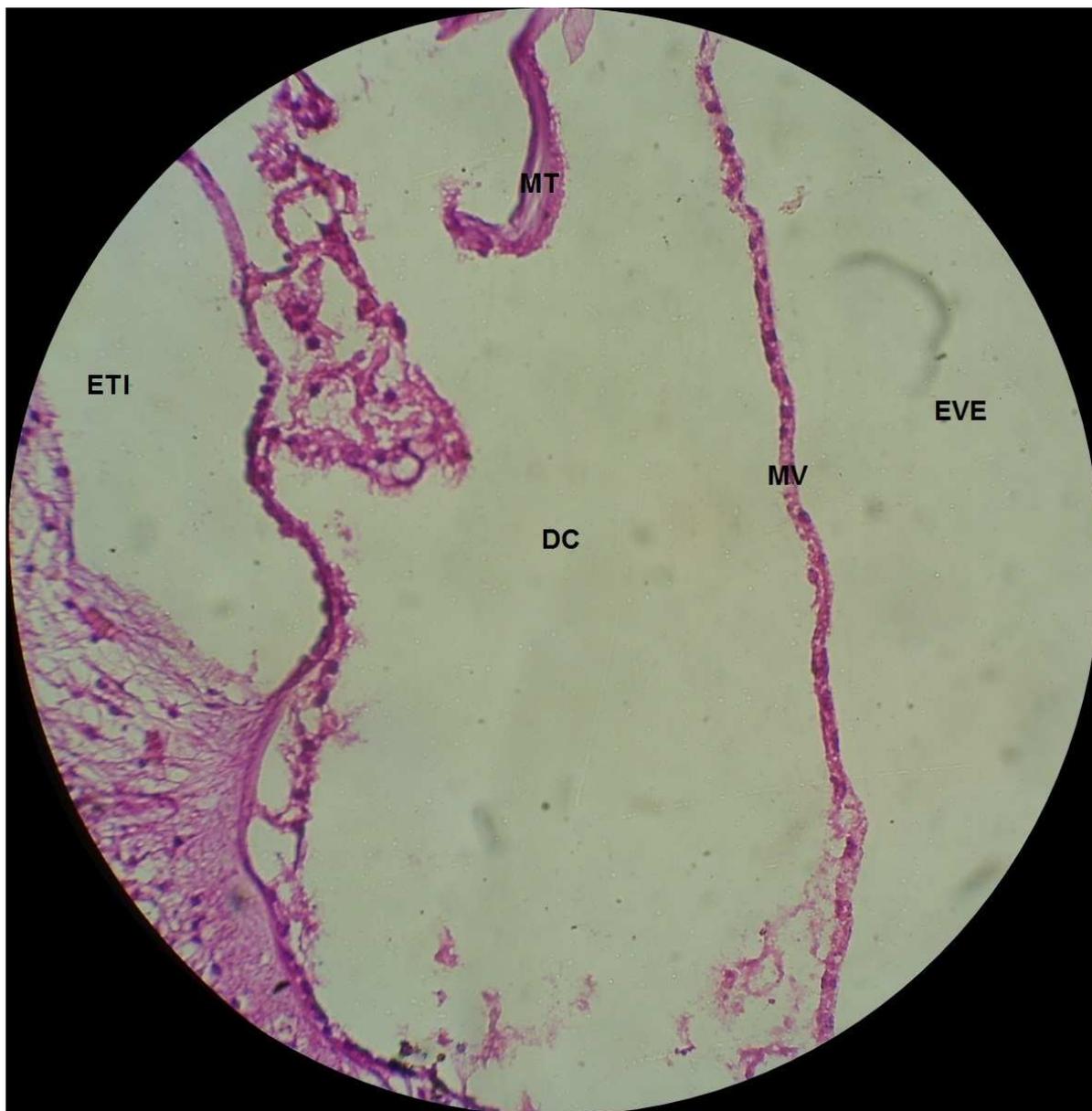
**Figura 10 - Membrana de vestibular sem vacuolização, íntegra e retilínea em cobaia do grupo controle.**

Aumento 40x.

Legenda: MV – Membrana Vestibular

MB – Membrana Basilar

GE – Gânglio Espiral



**Figura 11 - Membrana vestibular sem vacuolização, íntegra e retilínea, em cobaia do grupo controle.**

Aumento 10x.

Legenda: MV – Membrana Vestibular

MT – Membrana Tectória

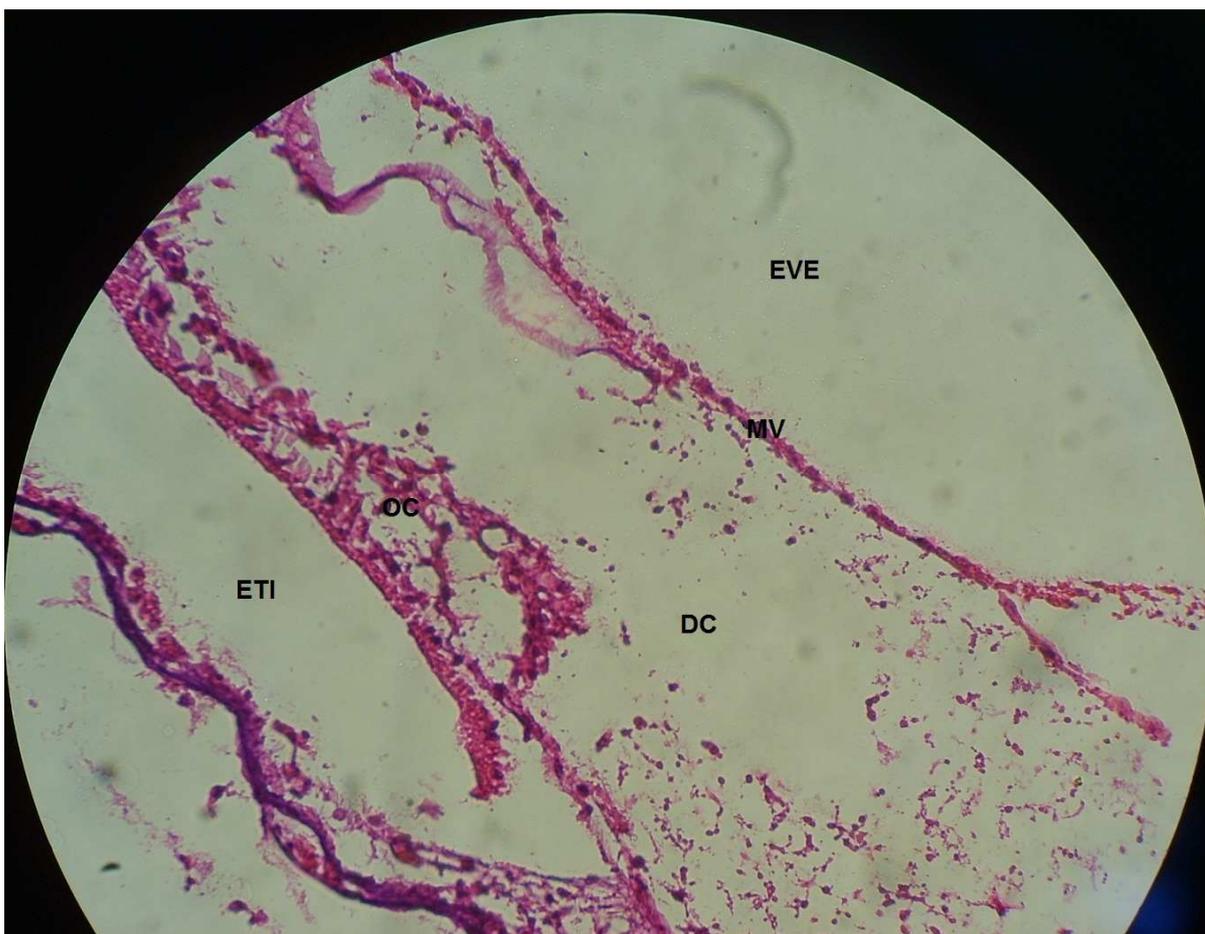
EVE – Escala Vestibular

ETI – Escala Timpânica

DC – Ducto Coclear

Nas cobaias que receberam cisplatina (3mg/kg por seis dias consecutivos) verificou-se extensa perda da microcitoarquitetura normal do órgão de Corti: células ciliadas externas e internas sem definição e ausência de membrana tectória (Figura

12); ausência completa do órgão de Corti na espira média da cóclea e alterações generalizadas nas células da estria vascular, sem definição celular (Figura 13); membrana vestibular descontínua e muitas células não exibindo o núcleo (Figura 14); neurônios do gânglio espiral esparsos e com alterações celulares, como a ausência de núcleos (Figura 15).



**Figura 12 - Microcitoarquitetura do órgão de Corti em cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos.**

Aumento 40x.

Legenda: MV – Membrana Vestibular

EVE – Escala Vestibular

ETI – Escala Timpânica

DC – Ducto Coclear

OC – Órgão de Corti



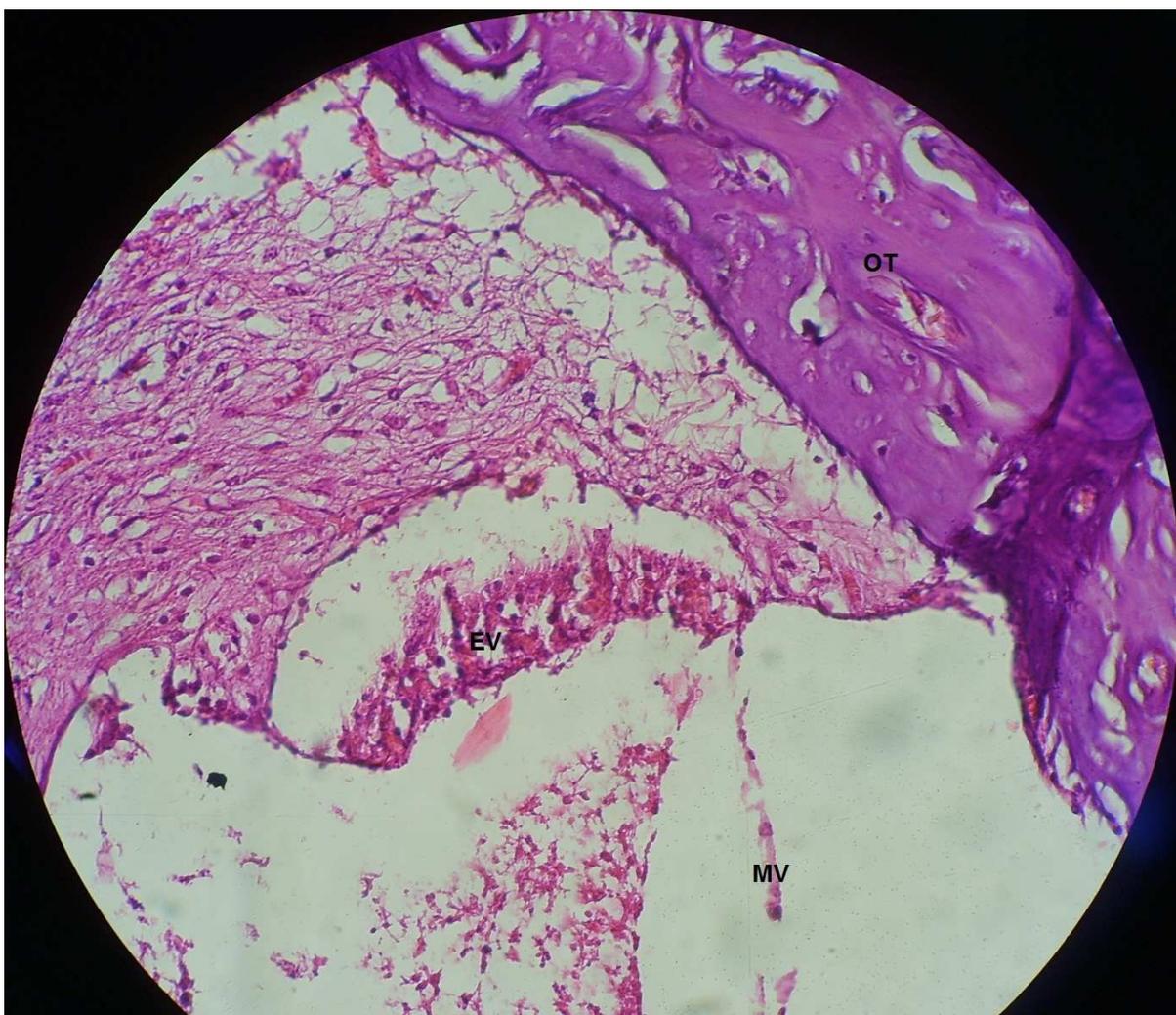
**Figura 13 - Ausência completa do órgão de Corti na espira média da cóclea de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos.**

Aumento 40x.

Legenda: MV – Membrana Vestibular

EV – Estria Vascular

OC – Órgão de Corti



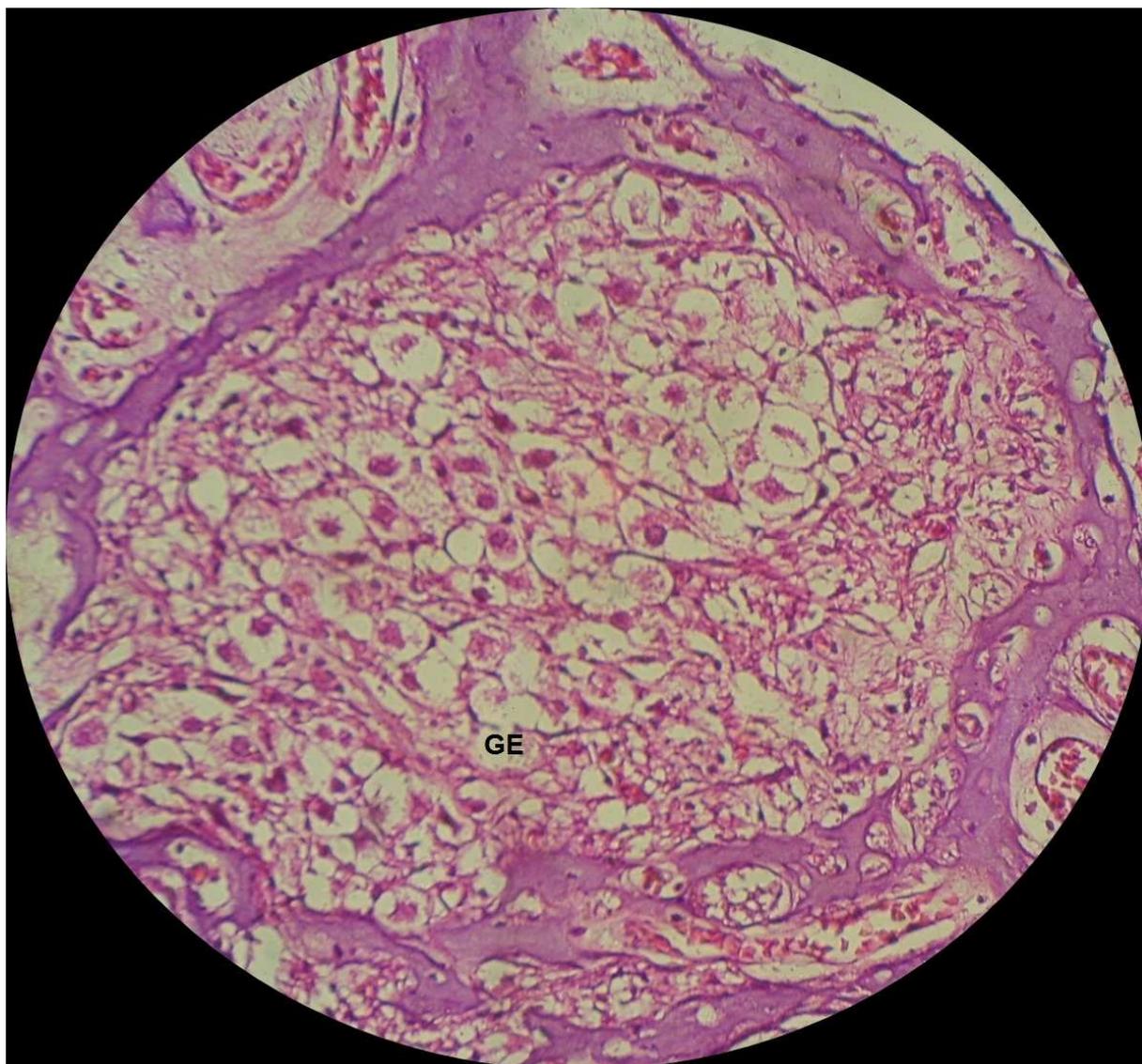
**Figura 14 - Alterações generalizadas nas células da estria vascular, sem definição da organização celular e aspecto da membrana vestibular de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos .**

Aumento 40x.

Legenda: MV – Membrana Vestibular

EV – Estria Vascular

OT – Osso Temporal



**Figura 15 - Aspecto dos neurônios do gânglio espiral de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos.**

Aumento 40x.

Legenda: GE – Gânglio Espiral

### **Discussão**

Constatou-se índice elevado de óbito das cobaias do GE após a sexta aplicação de cisplatina. Especula-se que a dose de 3mg/kg/dia possa ter sido letal. IHA *et al.*, (2007) relataram elevado índice de mortalidade quando aplicadas doses de 8mg/kg/dia por três dias consecutivos. Já no experimento de VAN RUIJVEN *et al.*, (2004) todas as cobaias sobreviveram a administração de cisplatina por 4, 6 e 8 dias consecutivos na dose de 2mg/kg/dia.

O reflexo de Preyer e as EOAPDs estiveram presentes em todas as cobaias testadas no GC e GE antes do início da administração de cisplatina, comprovando que todas elas tinham resposta auditiva (JERO *et al.*, 2001 *apud* BAGGIO, 2007).

Verificou-se que as baixas frequências (501Hz e 708Hz) apresentaram menores amplitudes de EOAPDs em todas as cobaias (Figura 4). Este achado concorda com o relato de HYPOLITO *et al.*, (2005), segundo o qual as dimensões do meato acústico externo da cobaia causam dificuldade de detecção das EOA nas frequências inferiores a 1500Hz. As respostas coincidem com aquelas obtidas na presença de ruído.

Nas cobaias do GC, somente na frequência de 2830 Hz, a amplitude das EOAPDs aumentou após a administração de solução fisiológica de cloreto de sódio a 9% (diferença estatisticamente significativa), o que demonstra que a aplicação de solução fisiológica não causou alteração auditiva (Tabela 1).

Nas cobaias do GE houve redução da média das amplitudes das EOAPDs após a aplicação de cisplatina, 3mg/kg por seis dias consecutivos, com diferença estatisticamente significativa nas frequências de 1000Hz à 3998Hz (Tabela 2). Tais achados concordam com outros estudos que mostram redução na amplitude das EOAPDs em cobaias que receberam aplicações de cisplatina (HYPOLITO *et al.*, 2003; ZOCOLI *et al.*, 2003, HYPOLITO *et al.*, 2005, FREITAS *et al.*, 2009).

Após a aplicação de solução fisiológica de cloreto de sódio 9%, nas cobaias do GC e de cisplatina, 3mg/kg por seis dias consecutivos, nas cobaias do GE verificou-se redução estatisticamente significativa na amplitude das EOAPDs nas cobaias do GE, nas frequências de 2830Hz e 5657Hz (Figura 5). De fato, outros estudos mostram que as alterações mais significativas são encontradas nas frequências acima de 4000Hz (HYPOLITO e OLIVEIRA, 2005; RADEMAKER-LAKHAI *et al.*, 2006).

Constatou-se redução importante na amplitude das EOAPDs em todas as frequências no grupo das cobaias que receberam cisplatina (Tabela 2 e Figura 5). Este achado corrobora os de HYPOLITO *et al.* (2003), HYPOLITO *et al.* (2005) e FREITAS *et al.* (2009), que também verificaram redução expressiva na amplitude das EOAPDs das cobaias que receberam cisplatina.

Nas cobaias do GC verificou-se que a estrutura microscópica da cóclea em corte da base ao ápice, mostra as espiras, o modíolo ao centro, dentro do qual

encontram-se os neurônios do gânglio espiral (Figura 6). Não há alterações na estrutura coclear das cobaias do GC. No entanto encontrou-se dificuldade na análise das lâminas histológicas devido a baixa qualidade das mesmas, preparadas com blocos de parafina. O ideal seriam blocos feitos com resina, no entanto este material não estava disponível.

Nas cobaias do GC verificou-se que a estria vascular não apresentava alterações (Figuras 7 e 8). Já nas cobaias do GE foi possível notar alterações generalizadas nas células da estria vascular com ausência de definição celular (Figura 14). A estria vascular é um dos alvos principais da cisplatina na cóclea (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005). No entanto, CARDINAAL *et al.*, (2000), não verificaram alterações na estria vascular de cobaias que receberam cisplatina por oito dias consecutivos, tanto com a menor dose diária (0,7 mg/kg/dia) como na dose diária mais elevada (2,0mg/kg/dia). Outros experimentos também não encontraram nenhum efeito histológico na estria vascular ao utilizar dose de 2mg/kg/dia por 4, 6 e 8 dias consecutivos (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005). Assim é possível inferir que a dose capaz de causar lesão na estria vascular é maior que 2,0 mg/kg/dia.

O ramo coclear das cobaias do GC apresentou aspecto normal, sem desmielinização (Figura 9) e os neurônios do gânglio espiral não evidenciaram alterações (Figura 10). Nas cobaias do GE os neurônios do gânglio espiral mostraram-se esparsos e com alterações celulares, como a ausência de núcleos (Figura 15). Tais achados concordam com CARDINAAL *et al.*, (2000) que encontraram mudanças morfológicas nas células do gânglio espiral como vacuolização citoplasmática. Outros estudos também relataram alterações no ganglio espiral (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005). Nota-se que o gânglio espiral é um dos alvos principais das alterações causadas pela cisplatina (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005).

Nas cobaias do GC encontrou-se membrana vestibular de aspecto normal, retilínea e sem vacuolização citoplasmática (Figuras 10 e 11). Já nas cobaias do GE a membrana vestibular apresentava-se descontínua e havia ausência de núcleo em várias células (Figura 14). Constatou-se ainda vacuolização das células epiteliais da membrana vestibular.

Nas cobaias que receberam dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos (GE) verificou-se extensa perda da microcitoarquitetura normal do órgão de Corti, como: células ciliadas externas e internas sem definição e ausência de membrana tectória (Figura 12) e ausência completa do órgão de Corti na espira média da cóclea (Figura 13). Há uma discordância sobre o giro da cóclea mais afetado pela cisplatina. Tal como no presente estudo, CARDINAAL *et al.* (2000) verificaram perda acentuada de células ciliadas externas principalmente nos giros basal e médio. Outros autores, que também referiram alterações no órgão de Corti, com extensa lesão nas células ciliadas externas (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005), apontaram o giro basal como o mais afetado (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004).

A ausência completa do órgão de Corti na espira média da cóclea verificada pela microscopia de luz óptica (Figura 13) é compatível com os resultados das EOAPDs (Tabela 2) que evidenciaram redução na amplitude das EOAPDs nas frequências de 1000Hz à 3998Hz.

### **Conclusão**

A administração de cisplatina, dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos, provoca redução da amplitude das EOAPDs nas frequências médias e agudas. Estes achados indicam alterações na função coclear, até as células ciliadas externas do órgão de Corti, nas espiras média e basal da cóclea, o que é corroborado parcialmente pela análise histológica, a qual evidencia ausência total do órgão de Corti na espira média e alteração no gânglio espiral.

### **Referências Bibliográficas**

1. BAGGIO, C. **Análise Microscópica das Células Ciliadas Externas no uso da Gentamicina**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
2. CARDINAAL, R.M.; DE GROOT, J.C.M.J.; HUIZING, E.H.; VELDMAN J.E.; SMOORENBURG, G.F. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. **Hearing Research**, v.144, p.135-146, 2000.

3. COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>>. Acesso em: 20 out 2008.
4. DE GROOT, J.C.M.J.; HAMERS, F.P.T.; GISPEN, W.H.; SMOORENBURG, G.F. Co-administration of the neurotrophic ACTH 4ÿ9 analogue, ORG 2766, may reduce the cochleotoxic effects of cisplatin. **Hearing Research**, v. 106, p. 9-19, 1997.
5. FREITAS, M.R.; *et al.* Avaliação da sensibilidade das emissões otoacústicas produzidas por distorção e dos potenciais auditivos evocados de tronco encefálico na ototoxicidade por cisplatina em ratos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.75, n.4, p. 476-84, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-86942009000400002&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942009000400002&lng=en)>. Acesso em: 13 abr. 2010.
6. HYPOLITO, M.A.; *et al.* Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.69, n.4, p.504-11, jul.-ago. 2003.
7. HYPOLITO, M.A.; *et al.* Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produzidas por distorção e microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.7, n.3, p.168-273, 2005.
8. HYPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, J.A.A. Ototoxicidade, otoproteção e autodefesa das células ciliadas da cóclea. **Medicina Ribeirão Preto**, v.38, n.3/4, p. 279-89, 2005.
9. IHA, L.; *et al.* Ototoxicidade induzida pela cisplatina em cobaias: efeito dose-dependente - avaliação funcional. **Acta ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia**, v.25, n.2, p.112-8, 2007.
10. JOHNSON, A.C. The ototoxic effect of toluene and the influence of noise, acetylsalicylic acid or genotype: a study in rats and mice. **Scandinavian Audiology**, v.30, p.1-40, 1993.

11. JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. Histologia e seus Métodos de Estudo. In:\_\_\_\_\_. **Histologia básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 1, p. 1-18.
12. KASSE, C.A.; *et al.* O uso de Maytenus ilicifolia na prevenção da ototoxicidade induzida pela cisplatina. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.74, n.5, p.712-17, 2008.
13. LONSBURY-MARTIN, B.L.; MARTIN, G.K.; TELICHI, F.F. Emissões Otoacústicas. In: MUSIEK, F.E.; RINTELMANN, W.F. **Perspectivas atuais em Avaliação Auditiva**. Barueri: Editora Manole Ltda, 2001. cap.6, p. 163-92.
14. RADEMAKER-LAKHAI, J.M.; *et al.* Relationship Between Cisplatin Administration and the Development of Ototoxicity. **Journal of Clinical Oncology**, v.24 , p.918-24, 2006.
15. SAITO, T.; ARAN, J.M. Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. **Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties**, v.56, p.315-20, 1994.
16. SERGI, B.; *et al.* Cisplatin ototoxicity in the guinea pig: vestibular and cochlear damage. **Hearing Research**, v.182, n.1-2, p.56-64, ago. 2003.
17. VAN RUIJVEN, M.W.M.; DE GROOT, J.C.M.J.; SMOORENBURG, G.F. Time sequence of degeneration pattern in the guinea pig cochlea during cisplatin administration. A quantitative histological study. **Hearing Research**, v. 197, p. 44–54, 2004.
18. VAN RUIJVEN, M.W.M.; *et al.* The cochlear targets of cisplatin: An electrophysiological and morphological time-sequence study. **Hearing Research**, v. 205, p.241–48, 2005.
19. ZOCOLI, R.; REICHOW, S.L.; ZOCOLI, A.M.F. Emissões otoacústicas x cisplatina: detecção em pacientes oncológicos. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.69, n.2, p.222-25, 2003.

## 5 ARTIGO DE PESQUISA

### Efeitos da cisplatina em cobaias: histologia coclear e genotoxicidade

*Effects of cisplatin in guinea pigs: histology and cochlear genotoxicity*

#### Resumo

**Introdução:** Conhecer as respostas do ácido desoxirribonucleico (DNA) aos agentes externos como a cisplatina pode ser relevante para o diagnóstico e tratamento das alterações auditivas causadas pela administração deste fármaco.

**Objetivos:** Verificar a influência da cisplatina sobre a cóclea e o DNA de cobaias.

**Material e Método:** Estudo experimental executado com 12 cobaias (*Cavia porcellus*). O critério de inclusão de cobaias na amostra foi a presença de reflexo de Preyer (contração do pavilhão auricular frente a estímulo sonoro) e emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPDs). As cobaias foram divididas em dois grupos: **Grupo controle (GC)** - composto de seis cobaias, as quais foi administrada solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% por seis dias consecutivos; **Grupo estudo (GE)** - composto por seis cobaias, as quais foi administrada cisplatina em seis doses consecutivas de 3mg/kg/dia via intraperitoneal. Vinte e quatro horas após a última aplicação de cisplatina as cobaias foram sacrificadas, foi coletada amostra sanguínea para realização do Ensaio Cometa, e as cócleas foram removidas para análise histológica. **Resultados:** Administração de cisplatina não provocou alterações genotóxicas. A análise histológica mostrou alterações no órgão de Corti e gânglio espiral. **Conclusão:** A cisplatina provoca alterações na histologia coclear como perda da microcitoarquitetura normal do órgão de Corti e redução dos neurônios do gânglio espiral com alterações celulares, no entanto não detectou danos genotóxicos.

**Palavras chave:** Ototoxicidade; Genotoxicidade; Cisplatina; Cobaias; Histologia.

## **Abstract**

**Introduction:** To know the answers of deoxyribonucleic acid (DNA) to external agents such as cisplatin may be relevant to the diagnosis and treatment of hearing disorders caused by the administration of this drug. **Objectives:** To investigate the cisplatin influence on the cochlea and DNA of guinea pigs. **Material and Methods:** An experimental study done in 12 guinea pigs (*Cavia porcellus*). The inclusion criterion of guinea pigs in the sample was the presence of Preyer's reflex (contraction of the pinna when facing the sound stimulus) and the distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs). Guinea pigs were divided into two groups: **Control Group (CG)** - composed by six guinea pigs, to which it was administrated physiological solution of sodium chloride 0.9% during six consecutive days; **Study Group (SG)** - composed by six guinea pigs, to which it was administrated cisplatin during six consecutive doses of 3mg/kg/day intraperitoneally. Twenty-four hours after the last application of cisplatin the guinea pigs were sacrificed, blood samples were collected to perform the Comet essay, and the cochleas were removed to histological analysis. **Results:** Administration of cisplatin did not cause identifiable changes in the DNA. Histological analysis showed alterations in the organ of Corti and spiral ganglion. **Conclusion:** Cisplatin causes changes in the cochlear histology like loss of the normal microcitoarchitecture of the Corti organ, and reduction of neurons of the spiral ganglion with cell alterations, however, DNA damage was not detected.

**Key words:** Ototoxicity; Genotoxicity; Cisplatin; Guinea pig; Histology.

## **Introdução**

A cisplatina é um quimioterápico utilizado em adultos e crianças na terapia do câncer avançado. Seus efeitos colaterais são irreversíveis e não podem ser evitados. A toxicidade da cisplatina é encontrada nos rins, sistema nervoso central e/ou periférico, intestino, medula óssea e também no órgão de Corti (HYPPOLITO E OLIVEIRA, 2005).

Ao atingir o órgão de Corti, a cisplatina inicia sua ação deletéria pelas células de sustentação, seguida pelas células ciliadas externas, principalmente nos giros médio e basal, posteriormente estria vascular e nervo auditivo (SERGI *et al.*, 2003).

Durante a administração de cisplatina ocorre um bloqueio nos canais iônicos das células ciliadas externas, impedindo a transdução do estímulo e causando perda auditiva (Mc ALPINE e JOHNSTONE, 1990).

A cisplatina provoca alterações no sistema antioxidante das células ciliadas externas da cóclea (HYPPOLITO e OLIVEIRA, 2005). Além disto, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que provoca a morte celular (RYBAK, 2007). O estresse oxidativo ocorre quando há produção aumentada de radicais livres ou quando os mecanismos antioxidantes estão prejudicados (DRÖGE, 2002, FENSTER *et al.*, 2002).

O Ensaio Cometa tem uma ampla variedade de aplicações incluindo biomonitoramento humano, genotoxicologia, monitoramento ecológico, como ferramenta para investigar danos e reparo ao DNA em resposta a uma série de agentes nocivos (COLLINS, 2004). Ainda fornece informações valiosas sobre as características intrínsecas do DNA de células individuais (MCKENNA, MCKEOWN, MCKELVEY-MARTIN, 2008).

Conhecer as respostas do DNA aos agentes externos como a cisplatina pode ser relevante para a prevenção, diagnóstico e tratamento das alterações auditivas causadas pela administração deste fármaco.

Assim, o presente trabalho objetiva verificar a influência da cisplatina sobre a cóclea e o DNA de cobaias.

## **Material e Método**

Delineamento da pesquisa:

Estudo experimental no qual foram estudadas 12 cobaias (*Cavia porcellus*), pela facilidade de manipulação e dissecação coclear, além de manutenção simples e resistência à infecções (HIPPOLYTO, 2003; BAGGIO, 2007).

Foram seguidas as diretrizes do Guia para os Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e também os princípios éticos e de biosegurança.

O critério de inclusão de cobaias na amostra foi a presença de reflexo de Preyer (contração do pavilhão auricular frente a estímulo sonoro) e EOAPDs.

Os fármacos utilizadas no estudo foram:

- Cisplatina: concentração de 1 mg/ml;
- Solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%;
- Halotano.

As cobaias foram divididas em dois grupos:

**Grupo controle (GC)** - composto de seis cobaias, as quais foi administrada solução fisiológica de cloreto de sódio a por seis dias consecutivos;

**Grupo estudo (GE)** - composto por seis cobaias, as quais foi administrada cisplatina em seis doses consecutivas de 3mg/kg/dia via intraperitoneal.

A audição foi avaliada pela ocorrência do reflexo de Preyer e registro das EOAPDs antes do início e 24 horas após o encerramento das aplicações de cisplatina. Para testar o reflexo de Preyer, foi percutido o agogô, campânula grande, com intensidade superior a 90 dB. As cobaias deveriam apresentar contração do pavilhão auricular. Para a avaliação das EOAPDs as cobaias foram sedadas com halotano. O registro das EOAPDs foi feito com utilização do aparelho de emissões otoacústicas (EOAs) modelo SmartEp da marca *Intelligent Hearing Systems®* (IHS). Foram analisadas as emissões otoacústicas nas frequências de 500 Hz a 6000 Hz. Os resultados foram impressos para análise e comparação.

O critério de integridade funcional da cóclea foi a presença EOAPDs (HYPPOLITO *et al.*, 2005). As EOAPDs foram também avaliadas pela comparação dos valores médios da relação sinal/ruído por frequência no início e fim do experimento, a fim de observar indícios de sofrimento precoce das células ciliadas externas (KASSE *et al.*, 2008).

A análise dos danos ao DNA foi feita por meio do Ensaio Cometa. Para tal foi realizada coleta de amostra sanguínea, pós administração de cisplatina.

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com o método proposto por SINGH *et al.*, (1988) e modificado por COLLINS *et al.*, (1995). Todos os passos foram realizados sem luz direta para prevenir danos adicionais ao DNA.

Foram preparadas duas lâminas para cada cobaia onde foram contados 50 núcleos por lâmina. Ambas as lâminas foram analisadas por dois observadores independentes. Para o índice de dano (ID) foi considerada a média dos danos observados pelos dois analisadores para 100 núcleos por cobaia.

As células “cometa”, coradas com nitrato de prata, foram analisadas em microscópio óptico normal e classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça (Figura 16) (COLLINS *et al.*, 1997):

- Classe 0 (ID0): sem cauda (sem dano);
- Classe 1 (ID1): com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça;
- Classe 2 (ID2): com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça;
- Classe 3 (ID3): com uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça;
- Classe 4 (ID4): cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3;
- Apoptose: ausência de núcleo.

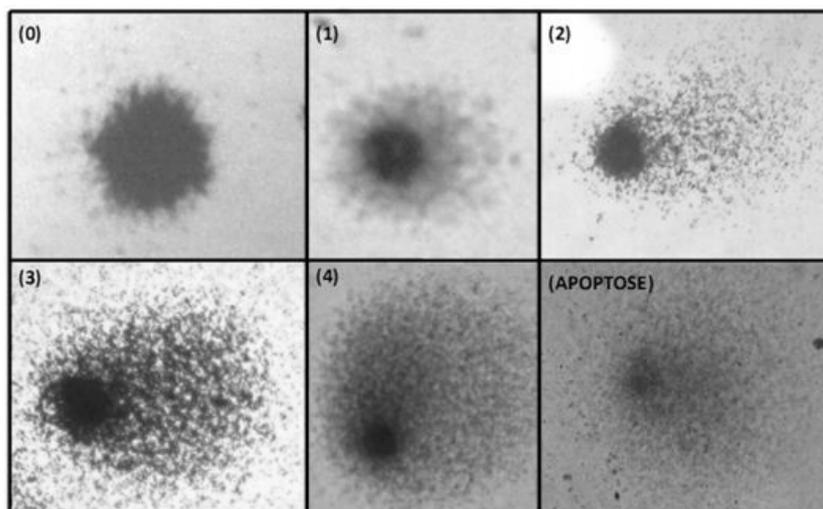


Figura 16 - Classificação do dano ao DNA das cobaias analisadas (FRONZA, 2010).

Após a última aplicação de cisplatina nas cobaias do GE e solução salina nas cobaias do GC, imediatamente após a realização das EOAPDs, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% via intramuscular e sacrificados pelo método de decapitação.

Seus ossos temporais foram rapidamente removidos e abertos para a exposição da cóclea, com corte no crânio no sentido longitudinal mediano estendendo-se posteriormente à região vestibulococlear.

Para evitar a destruição das células por autólise, ou bactérias e preservar a morfologia e a composição dos tecidos, as cócleas foram fixadas com formaldeído 4% em solução tamponada (pH 7,5). Após a fixação, foi realizada a desidratação, com banhos de concentração crescente de etanol, de 70% até etanol puro (100%). Para a inclusão em parafina, utilizou-se o xilol para que as peças se tornassem translúcidas. Em seguida, colocou-se um pouco de parafina fundida e deixou-se solidificar à temperatura ambiente, formando-se um bloco com a cóclea no seu interior. Após os blocos foram seccionados por meio de uma navalha de aço acoplada ao micrótomo, de onde obteve-se cortes de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de espessura. Foi utilizada a coloração dupla pela hematoxilina e eosina, que corou as lâminas em tons de azul e vermelho (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Foi utilizado o microscópio óptico binocular da marca Olympus modelo CX40 para visualização do material coclear e DNA.

Os resultados da microscopia óptica foram fotografados e analisados.

O projeto foi aprovado pelo Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal da UFSM (ANEXO 1).

Análise estatística:

A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual determina se a característica estudada da amostra é oriunda de uma população com distribuição normal.

Quando testada a normalidade das variáveis em estudo verificou-se, que todos os dados testados seguiram uma distribuição normal.

Foi utilizado o teste *T-Student* ao analisar-se as orelhas (direita e esquerda), a média de amplitude das EOAPDs e Ensaio Cometa. Considerou-se como diferença significativa valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Para o cálculo do índice de dano (ID) foi utilizada a seguinte fórmula de acordo com CAVALCANTI *et al.*, (2008):

$ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$ , onde  $n$  = número núcleos de cada classe analisada. Desta forma o índice de dano para 100 nucleóides pode variar de zero (completamente sem danos  $0 \times 100$ ) a 400 (totalmente danificadas  $100 \times 4$ ).

Foi utilizado o coeficiente de correlação de postos de Spearman, para correlacionar o índice de dano ao DNA. O coeficiente  $\rho$  de Spearman varia entre -1 e 1. Quanto mais próximo estiver destes extremos, maior será a associação entre as variáveis. O sinal negativo da correlação significa que as variáveis variam em sentido contrário. 0,70 (+ ou -) indica uma forte correlação. Considerou-se como correlação significativa ao nível de 0,001.

## **Resultados**

As cobaias foram divididas em dois grupos, GC referente às cobaias que receberam solução salina e GE referente às cobaias que receberam cisplatina. Cada grupo foi composto por seis cobaias.

Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre o comportamento das orelhas direita e esquerda quando analisadas pelo teste *T-Student*. Assim, os dados obtidos de ambas as orelhas foram estudados em conjunto.

Verificou-se presença do reflexo de Preyer e das EOAPDs em todas as cobaias do GC e do GE, antes do início da aplicação de solução fisiológica e cisplatina, respectivamente, totalizando 24 orelhas.

Após seis dias de aplicação de cisplatina, quatro cobaias do GE foram a óbito. Foi possível a remoção das oito cócleas para análise histológica e em uma delas foi possível coleta de sangue para análise do DNA, bem como nas cobaias restantes.

Não houve diferença estatisticamente significativa no Ensaio Cometa entre as cobaias do GC e GE (Tabela 3).

**Tabela 3. Índice de dano ao DNA no grupo controle e no grupo estudo.**

Índice de Dano	Controle		Estudo		p-valor
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
ID0	41,37	2,76	39,58	3,41	0,420519
ID1	4,93	1,84	5,08	1,58	0,906553
ID2	1,72	0,72	2,66	0,28	0,073190
ID3	1,19	0,64	1,25	0,90	0,917171
ID4	1,59	1,20	2,33	0,72	0,371587
APOPTOSE	2,50	2,65	5,16	4,40	0,284619

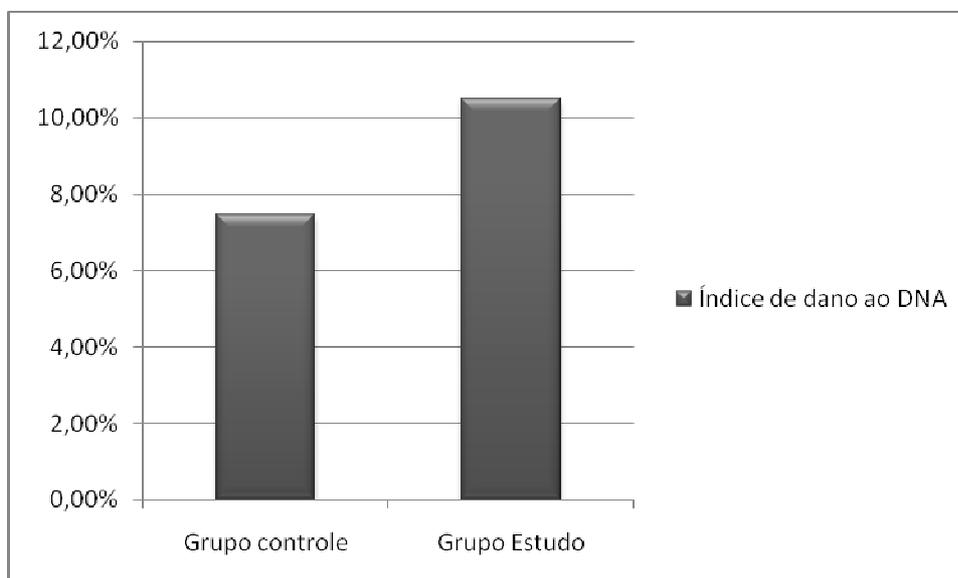
(p-valor<0,005 ou p-valor menor que 5%)

LEGENDA: ID- índice de dano

Nas cobaias do GC a aplicação de solução fisiológica a 9% resultou em nenhum ou pouco dano ao DNA, isto é, houve correlação altamente negativa (-0,943\*) entre as variáveis ID0 (sem dano, sem cauda) e ID1 (com pouco dano, apresentando uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça) (\*correlação significativa ao nível de 0,001).

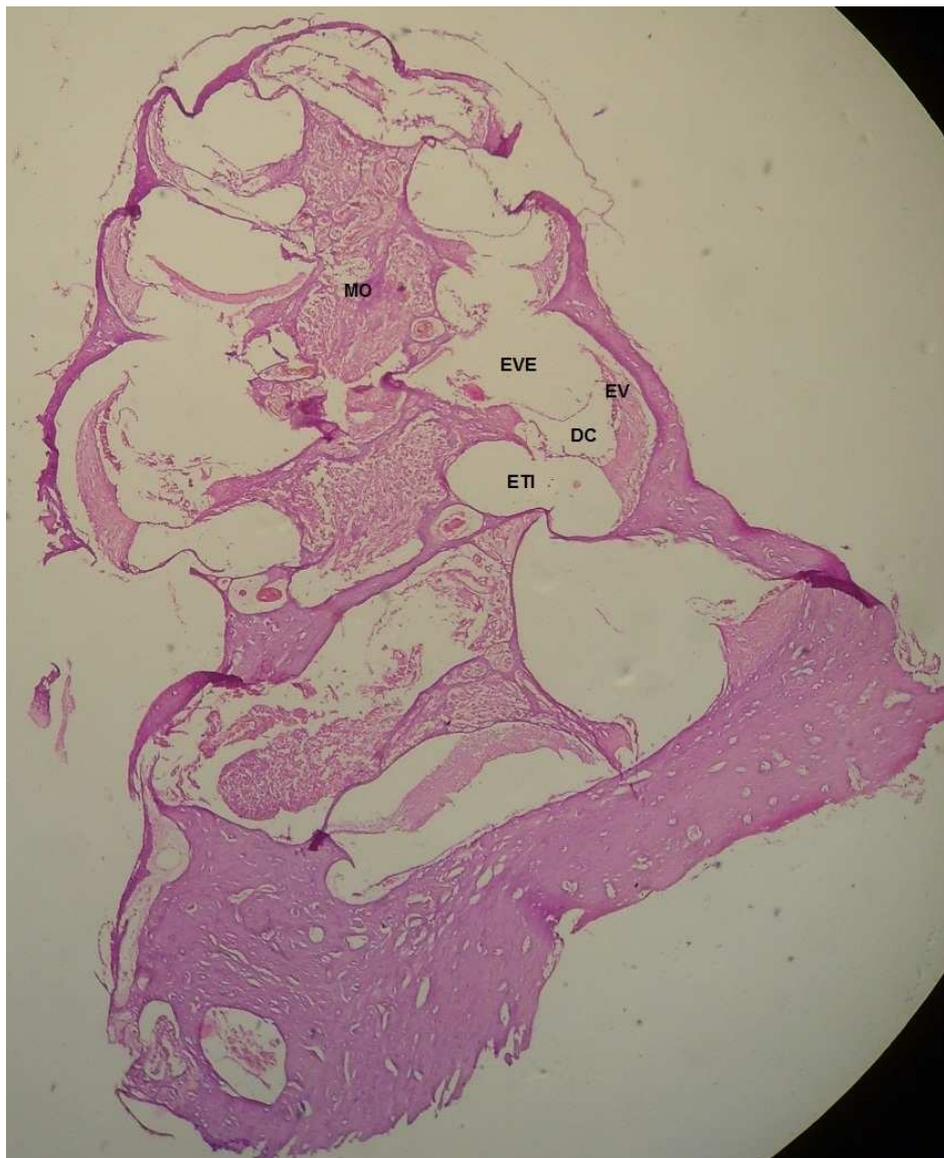
Nas cobaias do GE a aplicação de cisplatina 3mg/kg por seis dias consecutivos, causou pouco dano ou dano total ao DNA, isto é, houve correlação altamente negativa (-1,00\*) entre as variáveis apoptose (totalmente danificada, com ausência de núcleo) e ID1 (com pouco dano, apresentando uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça) (\*correlação significativa ao nível de 0,001).

O índice de dano ao DNA nas cobaias do GC (7,45%) foi inferior ao das cobaias do GE (10,5%) (Figura 17).



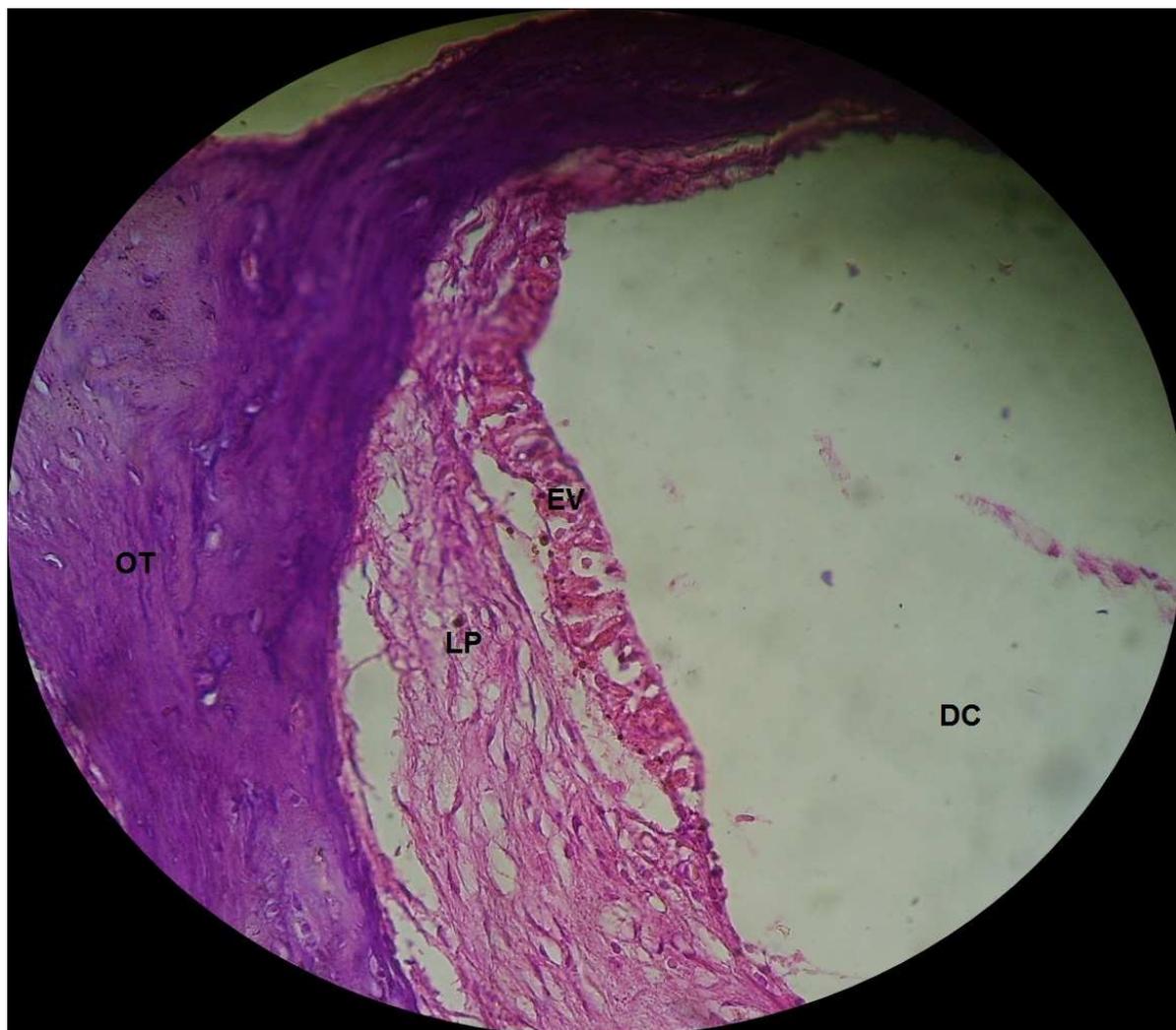
**Figura 17 - Índice de dano ao DNA por grupo.**

Nas cobaias do GC, que receberam solução fisiológica de cloreto de sódio a 9%, a estrutura microscópica da cóclea em corte da base ao ápice, mostrou as espiras e o modíolo ao centro, dentro do qual encontram-se os neurônios do gânglio espiral (Figura 18); a estria vascular sem alterações (Figuras 19 e 20); o ramo coclear com aspecto normal, sem desmielinização (Figura 21); os neurônios do gânglio espiral sem alterações (Figura 21) e a membrana vestibular de aspecto normal, retilínea e sem vacuolização citoplasmática (Figuras 22 e 23).



**Figura 18 - Estrutura microscópica da cóclea de cobaia do GC em corte da base ao ápice, demonstra as espiras, o modíolo no centro, dentro do qual encontram-se os neurônios do gânglios espirais. Aumento de 4x.**

Legenda: MO – Modíolo  
EVE – Escala Vestibular  
ETI – Escala Timpânica  
DC – Ducto Coclear  
EV – Estria Vascular



**Figura 19 - Estría vascular com aspecto normal sem alterações em cobaia do GC. Aumento 40x.**

Legenda: DC – Ducto Coclear  
EV – Estría Vascular  
LP – Lâmina Própria  
OT – Osso Temporal



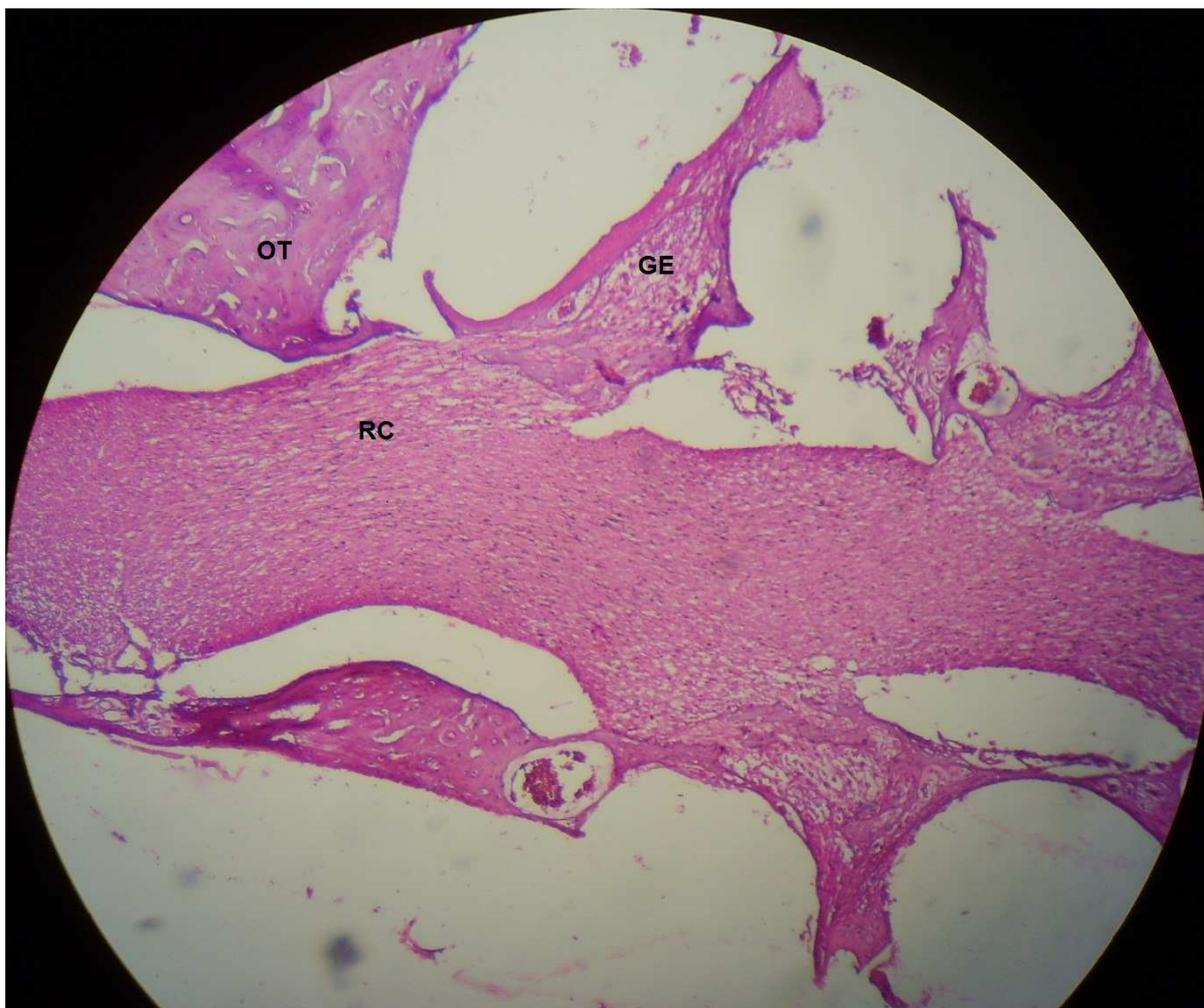
**Figura 20 - Estria vascular sem vacuolização em cobaia do GC. Aumento 40x.**

Legenda: MV – Membrana Vestibular

EVE – Escala Vestibular

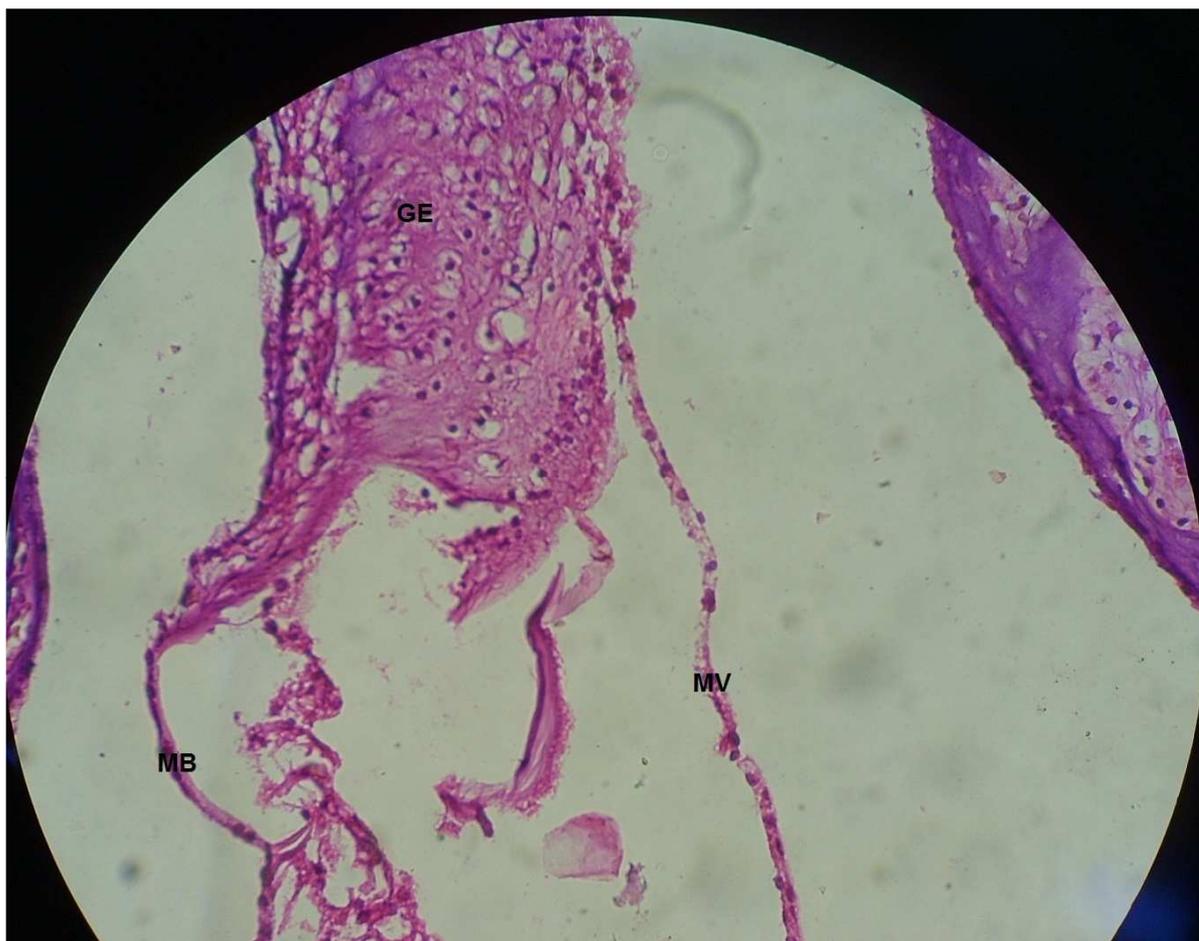
DC – Ducto Coclear

EV – Estria Vascular



**Figura 21 - Início do ramo coclear demonstrando aspecto normal e sem desmielinização em cobaia do GC. Aumento 10x.**

Legenda: OT – Osso Temporal  
GE – Gânglio Espiral  
RC – Ramo Coclear

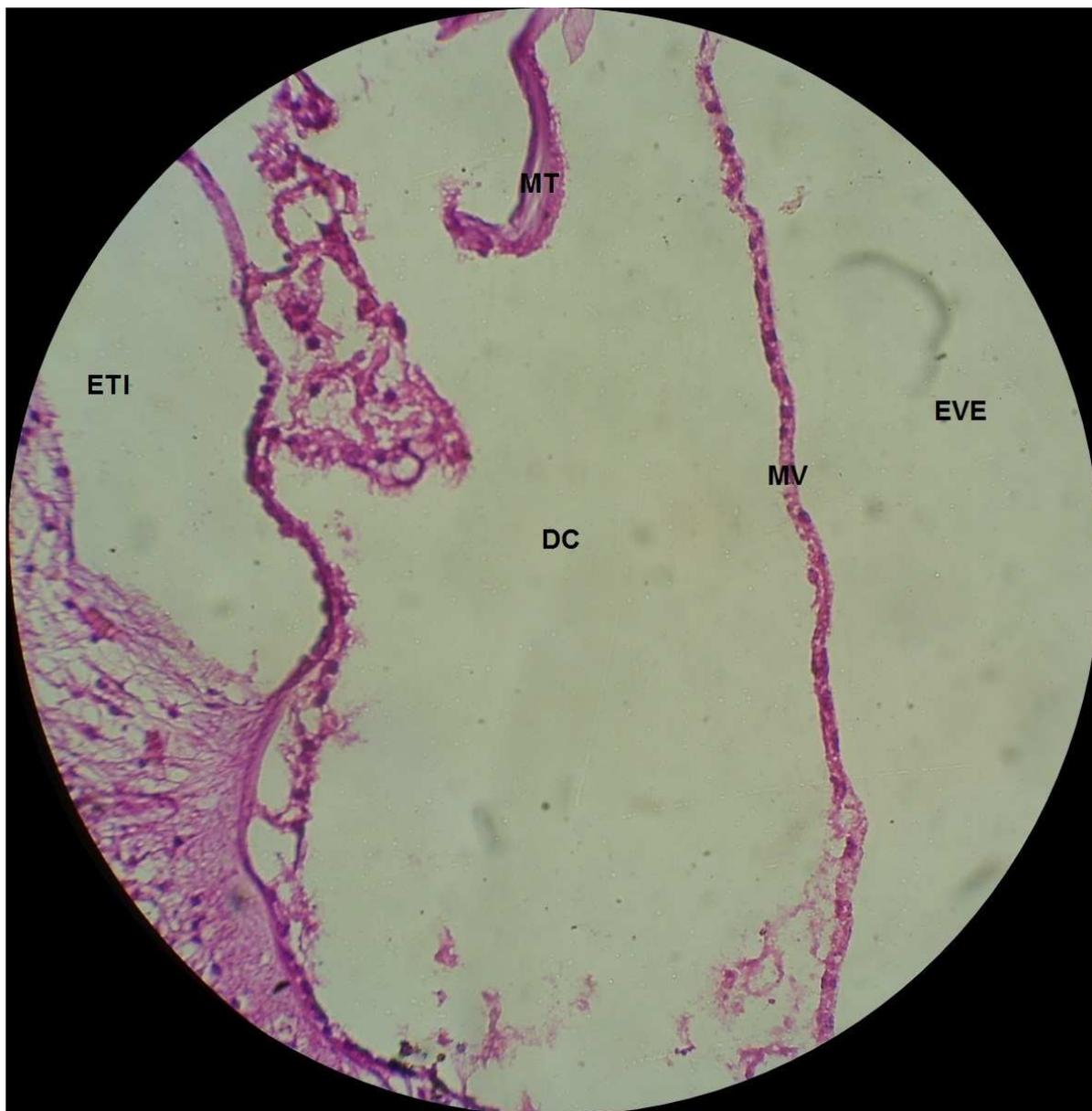


**Figura 22 - Membrana de vestibular sem vacuolização, íntegra e retilínea em cobaia do GC. Aumento 40x.**

Legenda: MV – Membrana Vestibular

MB – Membrana Basilar

GE – Gânglio Espiral



**Figura 23 - Membrana de vestibular sem vacuolização, íntegra e retilínea, em cobaia do GC. Aumento 10x.**

Legenda: MV – Membrana Vestibular  
MT – Membrana Tectória  
EVE – Escala Vestibular  
ETI – Escala Timpânica  
DC – Ducto Coclear

Nas cobaias que receberam cisplatina (GE), verificou-se extensa perda da microcitoarquitetura normal do órgão de Corti (Figura 24): células ciliadas externas e internas sem definição (Figura 24); ausência de membrana tectória (Figura 24); ausência completa do órgão de Corti em espira média da cóclea (Figura 25);

alterações generalizadas nas células da estria vascular, sem definição celular (Figura 26); membrana vestibular descontínua e muitas células não exibindo o núcleo (Figura 26); neurônios do gânglio espiral esparsos e com alterações celulares, como a ausência de núcleos (Figura 27).



**Figura 24 - Extensa perda da microcitoarquitetura normal do órgão de Corti, células ciliadas externas e internas sem definição. Ausência de membrana tectória em cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. Aumento 40x.**

Legenda: MV – Membrana Vestibular

EVE – Escala Vestibular

ETI – Escala Timpânica

DC – Ducto Coclear

OC – Órgão de Corti

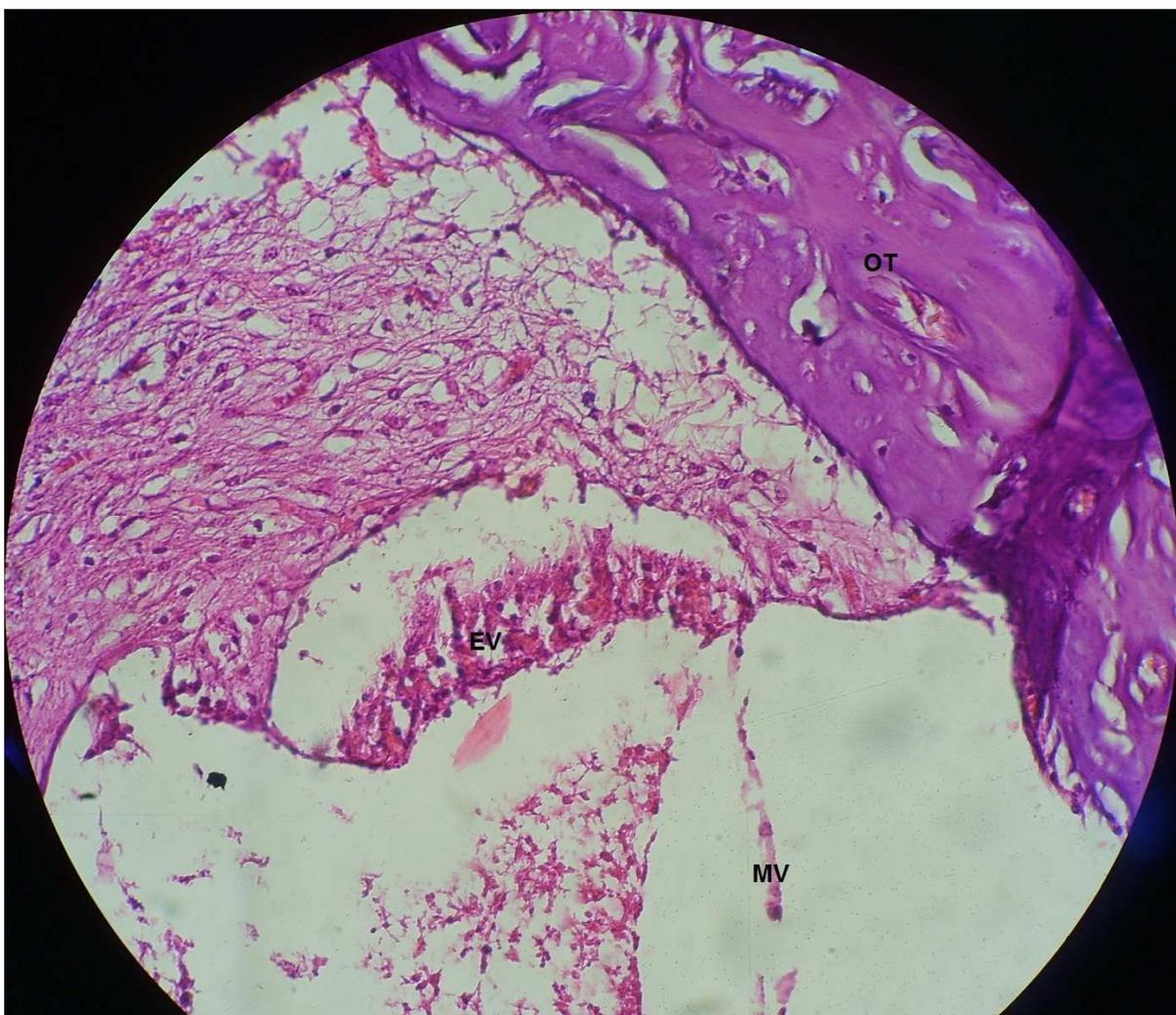


**Figura 25 - Ausência completa do órgão de Corti em espira média da cóclea de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. Aumento 40x.**

Legenda: MV – Membrana Vestibular

EV – Estria Vascular

OC – Órgão de Corti

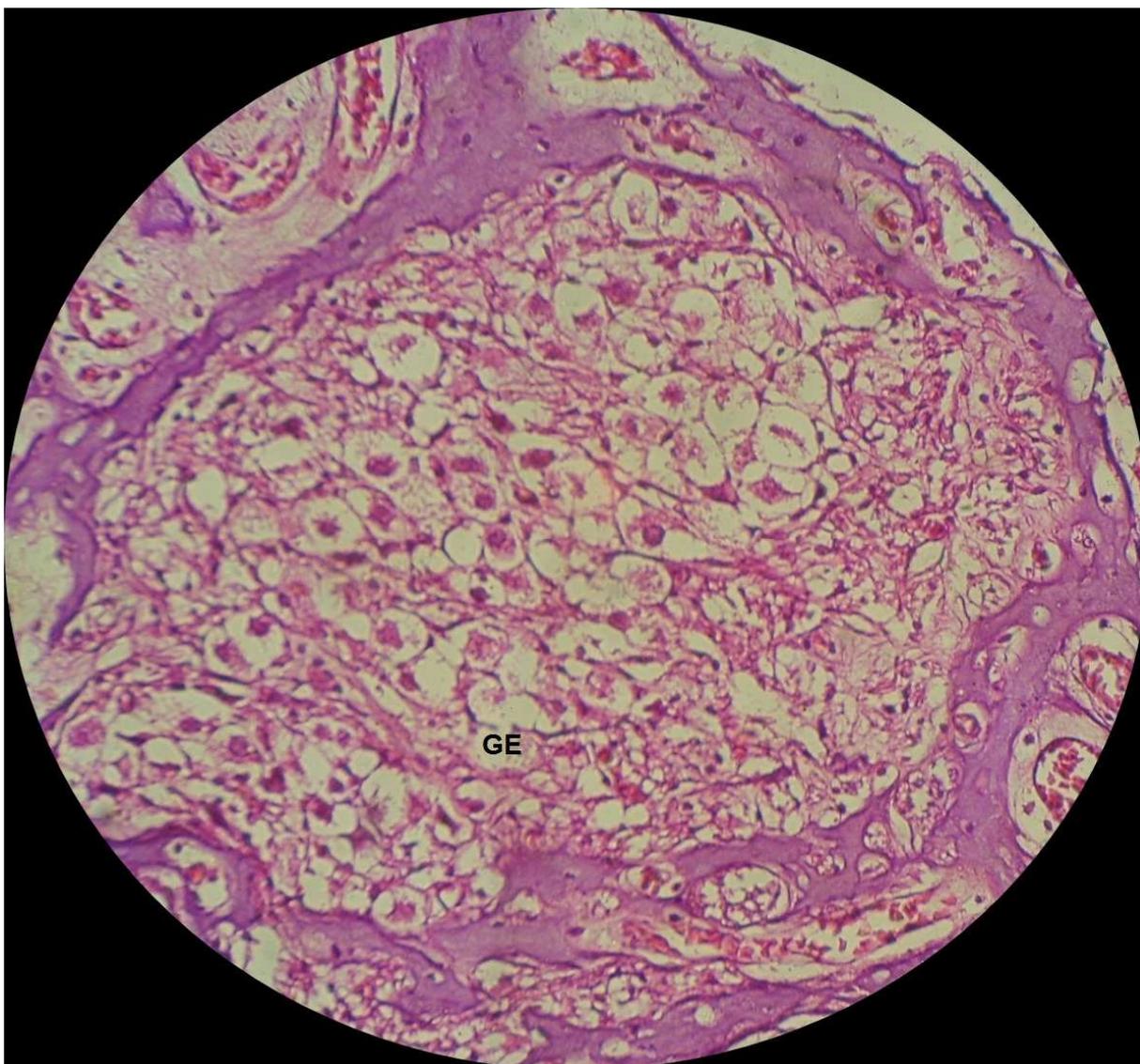


**Figura 26 - Alterações generalizadas nas células da estria vascular, sem definição da organização celular e aspecto da membrana vestibular de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. Aumento 40x.**

Legenda: MV – Membrana Vestibular

EV – Estria Vascular

OC – Órgão de Corti



**Figura 27 - Aspecto dos neurônios do gânglio espiral de cobaia tratada com cisplatina na dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos. Aumento 40x.**

Legenda: GE – Gânglio Espiral

### **Discussão**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no teste Ensaio Cometa (Tabela 3). De fato, a cisplatina não produz danos detectáveis pelo Ensaio Cometa, devido à produção de ligações cruzadas que interferem na migração do DNA (WOZNIAK, CZECHOWSKA, BLASIAK, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006; NADIN *et al.*, 2006; SHEIKH-HAMAD, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2010).

Para a análise do DNA nas cobaias do GC houve correlação altamente negativa entre as variáveis ID0 e ID1. Quanto maior o ID0 menor ID1 e vice-versa, isto é, não há índices elevados de dano ao DNA nas cobaias do GC.

Já nas cobaias do GE houve correlação altamente negativa entre as variáveis apoptose e ID1, ou seja, à medida que aumenta o número de apoptose diminui o ID1 e vice-versa, com isso é possível verificar que, nas cobaias do GE, há baixo índice de dano ao DNA, ou a célula está destruída. SLATTERY e WARCHOL (2010) verificaram que o tratamento com cisplatina causa apoptose das células ciliadas auditivas e vestibulares.

Verificou-se que o índice de dano ao DNA foi baixo tanto nas cobaias do GC como nas cobaias do GE. Nas cobaias do GC o índice de dano encontrado foi de 7,45% (Figura 17), nas cobaias do GE o índice de dano foi de 10,5% (Figura 17). Foi possível verificar um pequeno aumento no índice de dano ao DNA nas cobaias que receberam cisplatina.

Nas cobaias do GC, administrada solução fisiológica salina 9%, verificou-se que a estrutura microscópica da cóclea em corte da base ao ápice, demonstra as espiras, o modíolo no centro, dentro do qual encontram-se os neurônios do gânglio espiral (Figura 18), estria vascular com aspecto normal sem alterações (Figura 19 e 20), ramo coclear com aspecto normal, sem desmielinização (Figura 21) e neurônios do gânglio espiral sem alterações (Figura 22), membrana vestibular de aspecto normal, retilínea e sem vacuolização citoplasmática (Figura 22 e 23).. Outros estudos também não constataram alteração histológica nos grupos não tratados com cisplatina (CARDINAAL *et al.*, 2000; VAN RUIJVEN *et al.*, 2004).

A baixa qualidade das lâminas histológicas dificultou as análises, os blocos foram feitos com parafina, para que a qualidade das lâminas fosse alta, o ideal seriam blocos de resina, no entanto este material não estava disponível.

Nas cobaias que receberam cisplatina houve alterações generalizadas nas células da estria vascular com ausência de definição celular (Figura 26). A estria vascular é um dos alvos principais da cisplatina na cóclea (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005). No entanto, CARDINAAL *et al.*, (2000), não verificaram alterações na estria vascular de cobaias, que receberam cisplatina por oito dias consecutivos, tanto com a menor dose diária (0,7 mg/kg/dia) como na dose diária mais elevada (2,0mg/kg/dia). Outros experimentos também não encontraram

nenhum efeito histológico na estria vascular (dose de 2mg/kg/dia por 4, 6 e 8 dias consecutivos) (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005). Assim é possível inferir que a dose capaz de causar lesão na estria vascular é maior que 2,0 mg/kg/dia.

Nas cobaias do GE os neurônios do gânglio espiral mostram-se esparsos e com alterações celulares, como a ausência de núcleos (Figura 27). Tais achados concordam com CARDINAAL *et al.*, (2000) que encontraram mudanças morfológicas nas células do gânglio espiral como vacuolização citoplasmática. Outros estudos também relatam alterações no gânglio espiral (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005). Nota-se que o gânglio espiral é um dos alvos principais das alterações causadas pela cisplatina (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005).

Nas cobaias que receberam cisplatina (GE), dose de 3mg/kg por seis dias consecutivos, verificou-se extensa perda da microcitoarquitetura normal do órgão de Corti (Figura 24), células ciliadas externas e internas sem definição (Figura 24). ausência de membrana tectória (Figura 24), ausência completa do órgão de Corti em espira média da cóclea (Figura 25). Estes achados corroboram os de CARDINAAL *et al.*, (2000) que mostram perda grave de células ciliadas externas, em especial no giro basal e médio da cóclea. Outros estudos também mostram alterações no órgão de Corti, com extensa lesão nas células ciliadas externas (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004; VAN RUIJVEN *et al.*, 2005), no entanto relatam que o giro basal é o mais afetado (VAN RUIJVEN *et al.*, 2004).

Apesar de a cisplatina não causar alterações genotóxicas estatisticamente significantes identificáveis pelo Ensaio Cometa, foi possível observar alterações na histologia coclear. Tais achados corroboram outros estudos que relatam a produção de ligações cruzadas que interferem na migração do DNA no Ensaio Cometa (WOZNIAK, CZECHOWSKA, BLASIAK, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006; NADIN *et al.*, 2006; SHEIKH-HAMAD, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2010). Assim supõe-se que a cisplatina provoca alterações no mecanismo antioxidante celular. O mecanismo de ototoxicidade da cisplatina deve-se a alterações no sistema antioxidante das células ciliadas externas da cóclea (HYPPOLITO e OLIVEIRA, 2005). Além disso ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que provoca a morte celular (RYBAK, 2007). VAN RUIJVEN *et al.*, (2005) demonstraram a presença de DNA-

platinado nos núcleos da maioria das células no órgão de Corti após administração de cisplatina. Assim, a cisplatina forma ligações cruzadas com o DNA, o que impede a migração do DNA no Ensaio Cometa. No entanto, a cisplatina diminui a capacidade antioxidante das células, provocando a morte celular, o que causa as alterações cocleares identificadas na análise histológica.

### **Conclusão**

As cócleas de cobaias que receberam cisplatina evidenciaram perda da microcitoarquitetura normal do órgão de Corti, tais como células ciliadas externas e internas sem definição, ausência de membrana tectória, ausência completa do órgão de Corti em espira média da cóclea, alterações generalizadas nas células da estria vascular, descontinuidade da membrana vestibular e redução dos neurônios do gânglio espiral, com alterações celulares, como a ausência de núcleo.

A cisplatina não produz danos genotóxicos detectáveis pelo Ensaio Cometa.

### **Referências Bibliográficas**

1. ALMEIDA, G.M.; DUARTE, T.L.; STEWARD, W.P.; JONES, G.D. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. **DNA Repair**, v.5, n.2, p.219-225, 2006.
2. BAGGIO, C. **Análise Microscópica das Células Ciliadas Externas no uso da Gentamicina**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
3. CARDINAAL, R.M.; DE GROOT, J.C.M.J.; HUIZING, E.H.; VELDMAN J.E.; SMOORENBURG, G.F. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. **Hearing Research**, v.144, p.135-146, 2000.
4. CAVALCANTI, B. C.; SOMBRA, C. M. L.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; BERLINCK, R. G. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Citotoxicity and Genotoxicity of ingenamine G Isolated from the Brazilian Marine Schponge Pachychalina alcaloidifera. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.147, p. 409 - 415, 2008.

5. COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>>. Acesso em: 20 out 2008.
6. COLLINS, A.R.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research (DNA Repair)**, v.336, n.1, p.69-77, 1995.
7. COLLINS, A.; *et al.* Comet assay in human biomonitoring studies—reliability, validation and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.30, n.2, p.139-146, 1997.
8. DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.
9. FRONZA, A.B. **Associação entre audição, tabagismo e genotoxicidade em adultos jovens**. 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
10. HYPOLITO, M.A.; *et al.* Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. **Revista Brasileira Otorrinolagologia**, v.69, n.4, p.504-11, jul.-ago. 2003.
11. 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. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.7, n.3, p.168-273, 2005.
12. HYPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, J.A.A. Ototoxicidade, otoproteção e autodefesa das células ciliadas da cóclea. **Medicina Ribeirão Preto**, v.38, n.3/4, p. 279-89, 2005.
13. JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. Histologia e seus Métodos de Estudo. In: \_\_\_\_\_. **Histologia básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 1, p. 1-18.

14. KASSE, C.A.; *et al.* O uso de *Maytenus ilicifolia* na prevenção da ototoxicidade induzida pela cisplatina. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.74, n.5, p.712-17, 2008.
15. Mc ALPINE, D.; JOHNSTONE, B.M. The ototoxic mechanism of cisplatin. **Hearing Research**, v.47, p.191-203, 1990.
16. MCKENNA, D.J.; MCKEOWN, S.R.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.183-90, 2008.
17. MENDONÇA, L. M.; *et al.* Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, p. 635-43, 2010.
18. NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; DRAGO, G.; IBARRA, J.; CIOCCA, D.R. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from health individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Letters**, v.239, n.1, p.84-97, 2006.
19. RYBAK L.P., WHITWORTH C.A., MUKHERJEA D., RAMKUMAR V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. **Hearing Research**, v.226, n.1-2, p. 157-67, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T73-4MC71JP-1/2/fb18d5deb520a6bac4ec2791023bf17c>. Acesso em: 24 jun. 2010.
20. SERGI, B.; *et al.* Cisplatin ototoxicity in the guinea pig: vestibular and cochlear damage. **Hearing Research**, v.182, n.1-2, p.56-64, ago. 2003.
21. SHEIKH-HAMAD, D. Cisplatin-induced cytotoxicity: is the nucleus relevant? **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.295, n.1, p.F42-F43, 2008.
22. SINGH, N.P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
23. SLATTERY, E.L.; WARCHOL, M.E. Cisplatin ototoxicity blocks sensory regeneration in the avian inner ear. **The Journal of Neuroscience**. v.30, n.9,

p.3473-8, 2010. Disponível em:  
<<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/30/9/3473#B33>> . Acesso em: 18 jan 2011.

- 24.VAN RUIJVEN, M.W.M.; DE GROOT, J.C.M.J.; SMOORENBURG, G.F. Time sequence of degeneration pattern in the guinea pig cochlea during cisplatin administration. A quantitative histological study. **Hearing Research**, v. 197, p. 44–54, 2004.
- 25.VAN RUIJVEN, M.W.M.; *et al.* The cochlear targets of cisplatin: An electrophysiological and morphological time-sequence study. **Hearing Research**, v. 205, p.241–48, 2005.
- 26.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.112-21, 2005.
- 27.WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chemico-Biological Interactions**, v.147, n.3, p.309-318, 2004.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SURRAH, A.S.; KETTUNEN, M. Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1337-57, 2006.

ALMEIDA, G.M.; DUARTE, T.L.; STEWARD, W.P.; JONES, G.D. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. **DNA Repair**, v.5, n.2, p.219-225, 2006.

BAGGIO, C. **Análise Microscópica das Células Ciliadas Externas no uso da Gentamicina**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

CARDINAAL, R.M.; DE GROOT, J.C.M.J.; HUIZING, E.H.; VELDMAN J.E.; SMOORENBURG, G.F. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. **Hearing Research**, v.144, p.135-146, 2000.

CAVALCANTI, B. C.; SOMBRA, C. M. L.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; BERLINCK, R. G. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Citotoxicity and Genotoxicity of ingenamine G Isolated from the Brazilian Marine Schponge *Pachychalina alcaloidifera*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.147, p. 409 - 415, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>>. Acesso em: 20 out 2008.

COLLINS, A.; *et al.* Comet assay in human biomonitoring studies—reliability, validation and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.30, n.2, p.139-146, 1997.

COLLINS, A.R.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research (DNA Repair)**, v.336, n.1, p.69-77, 1995.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, n.3, p.249-261, 2004.

COSTA, M.J.; GARCIA, M.V. Relato de experiência em doação e adaptação de próteses auditivas na Universidade Federal de Santa Maria. **Saúde**, v.31, n.1-2, p.27-33, 2005.

DE GROOT, J.C.M.J.; HAMERS, F.P.T.; GISPEN, W.H.; SMOORENBURG, G.F. Co-administration of the neurotrophic ACTH 4ÿ9 analogue, ORG 2766, may reduce the cochleotoxic effects of cisplatin. **Hearing Research**, v. 106,p. 9-19, 1997.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.

FAULDCISPLA. Cíntia Delphino de Andrade. São Paulo: LIBBS Farmacêutica Ltda. 2010. Bula de remédio.

FENSTER CP, WEINSIER RL, DARLEY-USMAR VM, PATEL RP. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. **Obesity Research**, v.10, p.964-8, 2002.

FRANCESCATO, H.D.C.; *et al.* Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. **Kidney and Blood Pressure Research**, v.27, n.3, p.148-158, 2004.

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. 476-84, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-86942009000400002&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942009000400002&lng=en)>. Acesso em: 13 abr. 2010.

FRONZA, A.B. **Associação entre audição, tabagismo e genotoxicidade em adultos jovens**. 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GONZALEZ, V.M.; FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Molecular Pharmacology**, v.59, n.4, p.657-63, 2001.

HARTMANN, J.T.; LIPP, H.P. Toxicity of platinum compounds. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.4, n.6, p.889-901, 2003.

HO, Y.P.; AU-YEUNG, S.C.F.; TO, K.K.W. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. **Medicinal Research Reviews**, v.23, n.5, p.633-655, 2003.

HOPMAN, E.B.; FENIMAN, M.; SCOTON, M. A correlação entre o perfil audiológico e o tipo de medicamento em indivíduos pós-ototoxidade. **Jornal Brasileiro de Fonoaudiologia**, v.3, n.12, p.218-22, 2002.

HYPOLITO, MA.; *et al.* Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. **Revista Brasileira Otorrinolagologia**, v.69, n.4, p.504-11, jul.-ago. 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. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.7, n.3, p.168-273, 2005.

HYPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, J.A.A. Ototoxidade, otoproteção e autodefesa das células ciliadas da cóclea. **Medicina Ribeirão Preto**, v.38, n.3/4, p. 279-89, 2005.

IHA, L.; *et al.* Ototoxicidade induzida pela cisplatina em cobaias: efeito dose-dependente - avaliação funcional. **Acta ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia**, v.25, n.2, p.112-8, 2007.

JACKSON, S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. **Carcinogenesis**, v.23, n.5, p.687-96, 2002.

JOHNSON, A.C. The ototoxic effect of toluene and the influence of noise, acetylsalicylic acid or genotype: a study in rats and mice. **Scandinavian Audiology**, v.30, p.1-40, 1993.

JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. Histologia e seus Métodos de Estudo. In: \_\_\_\_\_. **Histologia básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 1, p. 1-18.

KASSE, C.A.; *et al.* O uso de *Maytenus ilicifolia* na prevenção da ototoxicidade induzida pela cisplatina. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.74, n.5, p.712-17, 2008.

LONSBURY-MARTIN, B.L.; MARTIN, G.K.; TELICHI, F.F. Emissões Otoacústicas. In: MUSIEK, F.E.; RINTELMANN, W.F. **Perspectivas atuais em Avaliação Auditiva**. Barueri: Editora Manole Ltda, 2001. cap.6, p. 163-92.

MARKMAN, M. Toxicities of the platinum antineoplastic agents. **Expert Opinion on Drug Safety**, v.2, n.6, p.597-607, 2003.

Mc ALPINE, D.; JOHNSTONE, B.M. The ototoxic mechanism of cisplatin. **Hearing Research**, v.47, p.191-203, 1990.

MCKELVEY-MARTIN, V.J.; *et al.* The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review. **Mutation Research**, v. 288, p.47-63, 1993.

MCKENNA, D.J.; MCKEOWN, S.R.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.183-90, 2008.

MÉNDEZ-RAMÍREZ, M.R.; ALTAMIRANO-GONZÁLEZ, A. Emisiones otoacústicas evocadas transientes em pacientes con patología aguda de oído médio. **Cirugía y Cirujanos**, v. 74, p. 309-14, 2006.

MENDONÇA, L. M.; *et al.* Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, p. 635-43, 2010.

MIYAMAE, Y.; *et al.* Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (comet) assay: relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. **Mutation Research**, v.415, n.3, p.229-35, 1998.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; DRAGO, G.; IBARRA, J.; CIOCCA, D.R. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from health individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Letters**, v.239, n.1, p.84-97, 2006.

PANG, S.-K., YU, C.-W., AU-YEUNG, S.C.F., HO, Y.-P. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.363, n.1, p.235-240, 2007.

PÉREZ, J.H.; *et al.* Antibióticos aminoglicosídios. **Medicine**, v.7, n.76, p.3515-3523, 1998.

PEREZ, R.P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. **European Journal of Cancer**, v.34, n.10, p.1535-42, 1998.

POIRRIER, A.L.; *et al.* Ototoxic drugs: difference in sensitivity between mice and guinea pig. **Toxicology letters**, v.193, p.41-49, 2010.

RADEMAKER-LAKHAI, J.M.; *et al.* Relationship Between Cisplatin Administration and the Development of Ototoxicity. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, p.918-24, 2006.

RAVI, R.; SOMANI, S.M.; RYBAK, L.P. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. **Pharmacology & Toxicology**, v.76, p.386-94, 1995.

Rybak, L.P. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**. v.15, n.5, p.364-9, 2007.

RYBAK L.P., WHITWORTH C.A., MUKHERJEA D., RAMKUMAR V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. **Hearing Research**, v.226, n.1-2, p. 157-67, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T73-4MC71JP-1/2/fb18d5deb520a6bac4ec2791023bf17c>>. Acesso em: 24 jun. 2010.

SAITO, T.; ARAN, J.M. Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. **Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties**, v.56, p.315-20, 1994.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; *et al.* DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutation Research**, v. 640, n.1-2, p.8-15, 2008.

SAVI, L.A. **Avaliação da Genotoxicidade e das Atividades Anti-Herpética e Antioxidante de Compostos Fenólicos**. 2004. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SERGI, B.; *et al.* Cisplatin ototoxicity in the guinea pig: vestibular and cochlear damage. **Hearing Research**, v.182, n.1-2, p.56-64, ago. 2003.

SHEIKH-HAMAD, D. Cisplatin-induced cytotoxicity: is the nucleus relevant? **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.295, n.1, p.F42-F43, 2008.

SILVA, J. ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, v. 1, 422 p.

SINGH, N.P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SLATTERY, E.L.; WARCHOL, M.E. Cisplatin ototoxicity blocks sensory regeneration in the avian inner ear. **The Journal of Neuroscience**. v.30, n.9, p.3473-8, 2010. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/30/9/3473#B33>>. Acesso em: 18 jan 2011.

SOUSA, L.C.A.; PIZA, M.R.T.; ALVARENGA, K.F.; CÓSER, P.L. Emissões Otoacústicas (EOA). In:\_\_\_\_\_. **Eletrofisiologia da audição e Emissões Otoacústicas: Princípios e aplicações Clínicas**. São Paulo: Tecmedd, 2008. cap. 10, p.109-31.

VAN CAMPEN, L.E. *et al.* Oxidative DNA damage is associated with intense noise exposure in the rat. **Hearing Research**, v. 164, p. 29-38, 2002.

VAN RUIJVEN, M.W.M.; DE GROOT, J.C.M.J.; SMOORENBURG, G.F. Time sequence of degeneration pattern in the guinea pig cochlea during cisplatin administration. A quantitative histological study. **Hearing Research**, v. 197, p. 44-54, 2004.

VAN RUIJVEN, M.W.M.; *et al.* The cochlear targets of cisplatin: An electrophysiological and morphological time-sequence study. **Hearing Research**, v. 205, p.241-48, 2005.

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.112-21, 2005.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.4, p.307-20, 2005.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v.23, n.4, p.209-40, 1997.

WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chemico-Biological Interactions**, v.147, n.3, p.309-318, 2004.

ZHANG, J.; LIU, L.; GONG, Y.; ZHENG, X.; YANG, M.; CUI, J.; SHEN, S. Synthesis, characterization and antitumor activity of new type binuclear platinum (II) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 2322-7, 2008.

ZOCOLI, R.; REICHOW, S.L.; ZOCOLI, A.M.F. Emissões otoacústicas x cisplatina: detecção em pacientes oncológicos. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.69, n.2, p.222-25, 2003.

## **ANEXO - 1**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMITÊ INTERNO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-UFSM**

### **CARTA DE APROVAÇÃO**

O Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** "Histologia, função coclear genotoxicidade em cobaias tratadas com cisplatina e extrato de chá-verde"

**Numero do Parecer:** 66/2010

**Pesquisador Responsável:** Tânia Tochetto

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

Os membros da CIETEA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:** 25/11/2010

Santa Maria, 25 de Novembro de 2010.

**Maria Lizandra do Rêgo Leal**  
Coordenador do Comitê Interno de Ética em Experimentação  
Animal-UFSM

# APÊNDICE - 1

## FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DAS COBAIAS

Número da cobaia: \_\_\_\_\_

Cor: \_\_\_\_\_ Peso inicial: \_\_\_\_\_ Peso final: \_\_\_\_\_

Reflexo Preyer: \_\_\_\_\_

**GRUPO CONTROLE ( )**                      **GRUPO ESTUDO (GE\_\_)( )**

**1ª avaliação:**

---

---

---

---

---

### EOAPDS OD

Hz	500 Hz	1000 Hz	2000 Hz	3000 Hz	4000 Hz	5000 Hz	6000 Hz	8000 Hz
DP								
Ns								
SNR								

### EOAPDS OE

Hz	500 Hz	1000 Hz	2000 Hz	3000 Hz	4000 Hz	5000 Hz	6000 Hz	8000 Hz
DP								
Ns								
SNR								

### CISPLATINA

1ª aplicação cisplatina: Data: \_\_/\_\_/\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

2ª aplicação cisplatina: Data: \_\_/\_\_/\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

3ª aplicação cisplatina: Data: \_\_/\_\_/\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

4ª aplicação cisplatina: Data: \_\_/\_\_/\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

5ª aplicação cisplatina: Data: \_\_/\_\_/\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

6ª aplicação cisplatina: Data: \_\_/\_\_/\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

7ª aplicação cisplatina: Data: \_\_/\_\_/\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

