

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ANÁLISE DO EFEITO CITOPROTETOR DA  
AMIFOSTINA NA ORELHA INTERNA IRRADIADA  
DE COBAIAS: ESTUDO EXPERIMENTAL**

**RICARDO MIRANDA LESSA**

**Ribeirão Preto  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**ANÁLISE DO EFEITO CITOPROTETOR DA  
AMIFOSTINA NA ORELHA INTERNA IRRADIADA  
DE COBAIAS: ESTUDO EXPERIMENTAL**

***Aluno: Ricardo Miranda Lessa***

***Orientador: Prof. Dr. José Antonio Aparecido de Oliveira***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Medicina, Área de Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-vestibular.

**Ribeirão Preto**

**2006**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lessa, Ricardo Miranda

Análise do efeito citoprotetor da amifostina na orelha interna irradiada de cobaias: estudo experimental.  
Ribeirão Preto, 2006.  
84p.;il.;30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo – Programa: Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Orientador: Oliveira, José Antônio Aparecido de

1. citoproteção. 2. amifostina. 3. irradiação. 4. células ciliadas externas.  
5. orelha interna

“O conformismo é o carcereiro da liberdade e o inimigo do crescimento”

John Kennedy

# DEDICATÓRIAS

*“Não diga a Deus o tamanho do seu problema, mas diga ao seu problema o tamanho de Deus”.*

**A Deus pela sua bondade e por iluminar todos os meus caminhos e abençoar a mim e a minha família, tudo de mais precioso que possuo.**

*“Nada nasce senão do amor, nada se faz a não ser por amor; só é preciso reconhecer as diferentes fases do amor”.*

C.F. Ramuz

**À minha querida esposa Danielle, aos meus filhos Maria Luiza e João Pedro pelo amor e dedicação diários que preenchem a minha vida e me estimulam para novas realizações.**

*“A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás, mas só pode ser vivida olhando para frente”.*

Soren Kierkegaard

**Aos meus pais Hélio e Tânia, aos meus irmãos Tatiana e Marcus sempre presentes nos meus pensamentos me estimulando pelos seus exemplos de caráter e de vida.**

# **AGRADECIMENTOS**

**Ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo:**

Ao Professor Dr. *José Antônio Aparecido de Oliveira*, meu Orientador, pelos conhecimentos transmitidos e por acreditar no nosso trabalho.

Todos os colegas Docentes, Assistentes e Residentes do Serviço de Otorrinolaringologia, em especial ao Prof. Dr. *Miguel Ângelo Hyppolito* pela amizade e pelo apoio constante na realização deste trabalho.

Todos os Funcionários do Departamento em especial à *Maria Rossato* pela paciência, meu eterno agradecimento pelo apoio, dedicação e entusiasmo que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

## **Serviço de Radioterapia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP:**

Ao Prof. Dr. Thomaz Ghilardi Netto, Coordenador e Supervisor das Atividades Técnicas e Administrativas do Serviço de Radioterapia.

À Vilma Maria de Faria Locci, agente administrativo, Dirce de Souza Almeida, técnica em radiologia e Leandro Federiche Borges, Aprimorando em Física aplicada à radiologia, pela atenção, colaboração e empenho que tiveram durante a realização deste trabalho.

Ao Laboratório Schering-Plough S.A., responsável pela comercialização do medicamento Ethiol® (amifostina) no Brasil, pelo pronto atendimento da solicitação de doação de amostras para realização deste trabalho.

<b>BERA-</b>	brainstem evoked reflex responses audiometry
<b>Cc-</b>	centímetros cúbicos
<b>CCE-</b>	células ciliadas externas
<b>CCI-</b>	células ciliadas internas
<b>cGy-</b>	centigray
<b>dB-</b>	decibel
<b>DLL</b>	distância latero-lateral
<b>DNA-</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>E2-</b>	segunda espira
<b>E3-</b>	terceira espira
<b>EOA-</b>	emissões otoacústica
<b>EOAPD-</b>	emissões otoacústicas por produtos de distorção
<b>et al-</b>	e colaboradores
<b>F1-</b>	primeira fileira
<b>F2-</b>	segunda fileira
<b>F3-</b>	terceira fileira
<b>FMRP-USP-</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
<b>Gy-</b>	gray
<b>HCFMRP-USP-</b>	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
<b>H0-</b>	hipótese H0
<b>H1-</b>	hipótese H1
<b>ILO-</b>	Institute of Otolaryngology and Otology
<b>IMRT-</b>	Intensity Modulated Radiation Therapy
<b>Irr-</b>	irradiação
<b>Kg-</b>	Kilograma

<b>kHz-</b>	kilohertz
<b>Krad-</b>	kilorad
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>m<sup>2</sup>-</b>	metro quadrado
<b>mg-</b>	miligrama
<b>NA-</b>	nível de audição
<b>Rad-</b>	unidade de radiação
<b>SNC-</b>	sistema nervoso central
<b>x<sup>2</sup></b>	qui-quadrado
<b>µm</b>	micrometro

<b>Figura 1.</b> Caixa acrílica utilizada para contenção das cobaias .....	33
<b>Figura 2.</b> Cobaia posicionada para ser irradiada.....	33
<b>Figura 3.</b> Cobaia preparada para ser irradiada com posicionamento dos bolus ..	33
<b>Figura 4.</b> Equipamento utilizado para irradiação: Bomba de Cobalto.....	34
<b>Figura 5.</b> Proporção CCE lesadas do grupo Irr .....	41
<b>Figura 6.</b> Proporção CCE lesadas do grupo Irr+100mg .....	41
<b>Figura 7.</b> Proporção CCE lesadas do grupo Irr+200mg .....	42
<b>Figura 8.</b> Percentuais de CCE lesadas em cada grupo.....	43
<b>Figura 9.</b> Proporção de CCE lesadas e total CCE na espira basal .....	44
<b>Figura 10.</b> Percentuais de CCE lesadas na espira basal .....	45
<b>Figura 11.</b> Seguimento sem lesões da espira basal do grupo Irr .....	45
<b>Figura 12.</b> Proporção de CCE lesadas e o total CCE na espira 2 .....	46
<b>Figura 13.</b> Percentuais de CCE lesadas na espira 2.....	47
<b>Figura 14.</b> Espira 2 do grupo Irr+200mg mostrando preservação CCE.....	48
<b>Figura 15.</b> Proporção de CCE lesadas e o total CCE na espira 3 .....	49
<b>Figura 16.</b> Percentuais de CCE lesadas na Espira 3 .....	50
<b>Figura 17.</b> Espira 3 do grupo Irr+200mg com preservação CCE.....	50
<b>Figura 18.</b> Espira basal do grupo Irr+200mg sem lesões .....	52
<b>Figura 19.</b> Espira 2 do grupo Irr com lesões em F2 e F3 .....	54
<b>Figura 20.</b> Espira 3 do grupo Irr com lesões em F2 e F3 .....	56
<b>Figura 21.</b> Espira apical do grupo Irr+100mg com padrão apical normal .....	57
<b>Figura 22.</b> Espira 2 do grupo Irr+100mg com padrão normal de enfileiramento das CCI .....	58

<b>Tabela 1-</b> Percentuais de CCE lesadas em cada grupo .....	42
<b>Tabela 2-</b> Percentuais de CCE lesadas na espira basal.....	44
<b>Tabela 3-</b> Percentuais de CCE lesadas na espira 2 .....	47
<b>Tabela 4-</b> Percentuais de CCE lesadas na Espira 3.....	49
<b>Tabela 5-</b> Percentuais de CCE lesadas na primeira fileira (F1) da espira basal...	51
<b>Tabela 6-</b> Percentuais de CCE lesadas na segunda fileira (F2) da espira basal..	51
<b>Tabela 7.</b> Percentuais de CCE lesadas na terceira fileira (F3) da espira basal....	52
<b>Tabela 8-</b> Percentuais de CCE lesadas na primeira fileira (F1) da Espira 2.....	53
<b>Tabela 9-</b> Percentuais de CCE lesadas na segunda fileira (F2) da Espira 2.....	53
<b>Tabela 10-</b> Percentuais de CCE lesadas na terceira fileira (F3) da Espira 2.....	54
<b>Tabela 11-</b> Percentuais de CCE lesadas na primeira fileira (F1) da Espira 3.....	55
<b>Tabela 12-</b> Percentuais de CCE lesadas na segunda fileira (F2) da Espira 3.....	55
<b>Tabela 13.</b> Percentuais de CCE lesadas na terceira fileira (F3) da Espira 3.....	56

# ÍNDICE

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2- REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
2.1. Estudos clínicos e de revisão sobre as alterações morfo-histológicas e repercussões funcionais da radiação no sistema auditivo periférico.....	7
2.2. Estudos experimentais sobre as alterações morfo-histológicas e repercussões funcionais da radiação no sistema auditivo periférico.....	22
2.3. Estudos experimentais sobre drogas otoprotetoras da radiação no sistema auditivo periférico.....	26
<b>3- OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1. Critérios de seleção e inclusão de animais no estudo.....	31
4.2. Drogas utilizadas, Doses e Via de Administração .....	31
4.3. Tipo de irradiação, Dose total e Cálculo da dose .....	32
4.4. Grupos de estudo .....	34
4.5. Sacrifício e Preparo das Cócleas .....	35
4.6. Método de Contagem Celular e Análise Estatística.....	36
<b>5- RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
5.1. Comparação do percentual do total de CCE entre os grupos.....	40
5.2. <i>Comparação do percentual de células ciliadas externas lesadas em cada espira (basal, E2 e E3) entre os grupos .....</i>	<i>43</i>
5.2.1. <i>Espira Basal.....</i>	<i>43</i>
5.2.2 <i>Espira 2.....</i>	<i>46</i>
5.2.3 <i>Espira 3.....</i>	<i>48</i>
5.3. Comparação do percentual de células ciliadas externas lesadas em cada fileira (F1, F2 e F3) entre os grupos .....	51

5.3.1. Espira Basal – Fileiras 1, 2 e 3.....	51
5.3.2. Espira 2 – Fileiras 1, 2 e 3.....	52
5.3.3. Espira 3 – Fileiras 1, 2 e 3.....	55
5.4 Espira Apical.....	57
5.5. Células ciliadas internas .....	58
<b>6- DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>7- CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO</b>	
<b>ANEXO DE PUBLICAÇÃO</b>	

**RESUMO**

---

A radioterapia causa lesão de graus variados na orelha interna podendo provocar desde a surdez sensorineural até a anacusia. Com o objetivo de verificar o efeito antioxidante e radioprotetor da amifostina no órgão de Corti de cobaias irradiadas em região da cabeça e pescoço, foi realizado um estudo envolvendo três grupos de animais: um grupo foi submetido à lesão imediata de células ciliadas pela irradiação em dose única de 350cGy e outros dois passaram por processos idênticos, porém receberam doses de 100 e 200mg/kg de amifostina nos 30 minutos que antecederam a irradiação. Todas as cobaias foram sacrificadas 30 dias após o experimento e suas bulas retiradas para estudo em microscópio de varredura. Depois de realizada a contagem das células ciliadas externas e o somatório dos percentuais de lesão em cada espira de cada grupo isoladamente, concluiu-se que a lesão das células ciliadas externas foi menor nos dois grupos que receberam a amifostina que no grupo apenas irradiado. Essa diferença ocorreu principalmente nas segunda e terceira espiras das cócleas onde a diferença foi estatisticamente significativa. Não foi encontrada diferença de proteção entre as doses de amifostina testadas.

## **ABSTRACT**

---

Radiotherapy produces damage in the internal ear which can lead to many degrees of sensorineural hearing loss and even deafness. With the purpose of verifying the antioxidant and radioprotector effect of amifostine on the organ of Corti of experimental guinea pig model irradiated in the head and neck, a study involving 3 groups of animals was conducted: one of the groups was submitted to immediate lesion of ciliated cells by a single dose of 350cGy and the other two went through identical processes; however, they received doses of 100 and 200mg/kg of amifostine in the 30 minutes that preceded radiation. All of the guinea-pigs were sacrificed 30 days after experiment and their bullas extracted for scanning microscope study. After counting outer hair cells with the sum total of lesion percentage in each spire of each group separately, it was concluded that the lesion of the external ciliated cells was smaller in the two groups that had received amifostine than in the group that had only been irradiated. Such difference occurred mainly in the second and third spires of the cochlea where the difference was statistically significant. Protection difference was not found between the tested amifostine.

# 1- INTRODUÇÃO

---

A radioterapia constitui uma das formas de tratamento mais utilizada nos tumores malignos localizados na região da cabeça e pescoço. O seu mecanismo de ação sobre as células cancerígenas se baseia na desestruturação da seqüência de seus nucleotídios, desta forma modificando as moléculas, proteínas e DNA (ácido desoxirribonucléico) das células, comprometendo o seu metabolismo e o mecanismo de divisão celular, impedindo assim, o crescimento tumoral. Outras afecções benignas também podem ser tratadas por essa modalidade terapêutica; dentre elas, ressalta-se a sua aplicação no controle da psoríase e na prevenção da cicatriz hipertrófica.

As células cancerígenas são mais suscetíveis à radiação pela sua incapacidade de reparar prontamente as lesões sofridas. No entanto, células de tecidos e órgãos normais adjacentes ao sítio tumoral também podem ser afetadas. Isso se constitui num dos grandes inconvenientes da radioterapia em cabeça e pescoço que, pelo fato de o osso temporal e as estruturas da orelha interna se encontrarem no campo de irradiação dos tumores, tal como ocorre nos tumores da parte nasal da faringe, o aparelho auditivo pode ser inevitavelmente atingido e o paciente evoluir com variados graus de perda auditiva, inclusive alguns podendo chegar à anacusia (ONDREY et al., 2000).

Aplicada superficialmente ao osso temporal, a radioterapia pode atingir a orelha externa e média ocasionando perda auditiva condutiva secundária à otite externa, otite média com efusão, otite média crônica ou radionecrose do osso temporal (SCHOT et al., 1992; ANTEUNIS et al., 1994; SMOUHA &

---

KARMODY, 1995). Nos tumores mais profundos, onde a radiação alcança a orelha interna, as complicações podem ser severas e irreversíveis. Ao atingir o órgão vestibulococlear, distúrbios auditivos e do equilíbrio podem surgir; dentre eles, a perda auditiva sensorineural que é a complicação mais comum e está em maior frequência associada à lesão e perda de células ciliadas externas do órgão de Corti (NYLÉN et al., 1960; WINTHER, 1969; GAMBLE et al., 1968; HULTCRANTZ et al., 1989; SCHOT et al., 1992; ANTEUNIS et al., 1994; FONG et al., 1995; LEIGHTON et al., 1997; CHEN et al., 1999).

A disacusia secundária à radioterapia pode se instalar durante o tratamento, imediatamente após ou decorridos meses ou anos do seu término. A complicação imediata resulta, em geral, da injúria celular direta pela radiação sobre as estruturas do órgão de Corti e estria vascular. Já os efeitos tardios costumam ocorrer pela ação indireta da radiação sobre os vasos da orelha interna, gerando o processo de endoarterite obliterante, que progressivamente interrompe o aporte sanguíneo a estruturas vitais como o neuroepitélio da cóclea e o VIII par craniano (TALMI et al., 1989; VARGHESE et al., 1996; YOUNG & LOU, 1999).

A gravidade e os graus de disacusia estão relacionados com a dose total e o fracionamento desta, sendo que quanto maior a dose empregada maior a chance de perda auditiva. Em geral, na maior parte dos ensaios clínicos e trabalhos experimentais, a dose total de radiação necessária para produzir uma lesão ao sistema auditivo varia entre 3000 e 6000 rad (BERG & LINDGREN, 1961; WINTHER, 1969; EVANS et al., 1988; TALMI et al., 1989;

---

GRAU et al., 1991; CHEN et al., 1999; HONORÉ et al., 2002; JOHANNESSEN et al., 2002).

Muitos esforços têm sido feitos na tentativa de minimizar ou neutralizar a ação da radiação na orelha interna. Nesse particular, o desenvolvimento de novas técnicas e equipamentos emissores de radiação, bem como a utilização de novas fontes de energia, tipo prótons, têm reduzido os efeitos da radiação sobre o órgão auditivo (LIN et al., 2000; HUANG et al., 2002).

Estudos envolvendo drogas protetoras contra efeitos lesivos da radiação em tecidos normais em região de cabeça e pescoço são de valor inestimável, porém muito escassos na literatura nacional e estrangeira. Quando o assunto é otoproteção contra radioterapia essa realidade é ainda pior.

O conceito de citoproteção antecede a era moderna da terapia oncológica. Em trabalho original, Patt et al. (1949) demonstraram que o pré-tratamento com cisteína (sulfidril-amino-ácido-cisteína) tinha a capacidade de proteger camundongos contra os efeitos letais da radiação. Essa e outras observações estimularam intensas pesquisas envolvendo os tióis e seu papel como citoprotetores.

A amifostina (WR-2721), um análogo da cisteína, é um composto orgânico de tiofosfato desenvolvido na década de 50 nos Estados Unidos como parte de um programa anti-radiação para proteger soldados na eventualidade de uma guerra nuclear. Trata-se de uma pró-droga que após a administração sofre desfosforilação pela fosfatase alcalina presente nos tecidos transformando-se em seu metabólito ativo, o WR-1065, um tiol. O WR-1065, como os outros tióis endógenos, exerce o seu efeito químico e radioprotetor

através do bloqueio de radicais livres, doação de hidrogênio, inativação de radicais reativos através de conjugados tioester e, no caso dos derivados da platina, através da prevenção ou reversão dos aduto Pt-DNA (COSTA, 1997).

A amifostina é uma droga com potencial citoprotetor seletivo de tecidos normais contra a agressão da radio e quimioterapia. Os trabalhos da literatura pesquisada comprovam o efeito citoprotetor da amifostina na hematotoxicidade da ciclofosfamida e carboplastina; na neurotoxicidade, nefrotoxicidade, hematotoxicidade e ototoxicidade da cisplatina; na hematotoxicidade e toxicidade mucosa da radioterapia (LIST et al., 1996; STOLARSKA et al., 2006; BUENTZEL et al., 2006).

Com relação aos efeitos otoprotetores da amifostina, quando utilizada em radioterapia para tumores de cabeça e pescoço, na literatura pesquisada não foram encontrados trabalhos que avaliassem a ação desta droga na proteção das células ciliadas do Órgão de Corti, bem como a sua atuação na preservação dos limiares auditivos em pacientes submetidos a essa modalidade de tratamento, por isso estudos são necessários a esse respeito.

## **2- REVISÃO DE LITERATURA**

---

## **2.1. Estudos clínicos e de revisão sobre as alterações morfo-histológicas e repercussões funcionais da radiação no sistema auditivo periférico**

Borsanyi *et al.* (1961) acompanharam 14 pacientes que se submeteram a doses de radioterapia entre 4000 a 6000 rad em região de cabeça e pescoço. Notaram que a frequência mais afetada foi a de 4000Hz, e a menos afetada a de 2000Hz. Observaram ainda que, na maioria dos casos, existiu a concomitância de um componente condutivo, preferencialmente nas frequências mais altas, cujo aparecimento ocorreu antes da perda sensorial. Concluíram que a radioterapia tem efeito lesivo às estruturas da orelha média e orelha interna. Na orelha média, degenera o colágeno e o músculo liso da parede dos vasos, provocando trombose micro-vascular e isquemias localizadas, podendo levar à necrose da cadeia ossicular. No labirinto, o processo de vasculite torna a estria vascular e a aracnóide mais permeáveis, levando a um aumento das pressões endolinfática e perilinfática e ao comprometimento metabólico das células ciliadas.

Adler *et al.* (1985) estudaram os efeitos teciduais da irradiação no meato acústico externo, por meio do exame de 13 ossos temporais de 10 pacientes submetidos à radioterapia em cabeça e pescoço que sobreviveram entre 5 e 21 anos pós-tratamento. Os principais achados foram: hiperplasia epitelial, atrofia de glândulas ceruminosas, ausência de folículos pilosos, fibrose sub-epitelial e colesteatoma secundário.

Elwany (1985) relatou seis pacientes que desenvolveram perda auditiva entre 6 e 11 meses após receberem a dose total de 6.500 a 8.500 rad para tratamentos de tumores adjacentes, mas que não envolviam o osso temporal. Em todos eles foram realizadas timpanotomia exploradora e biópsia de fragmentos da mucosa de orelha média, que foram encaminhados para exame microscópico de transmissão e varredura. Encontrou redução da motilidade ciliar nos estágios iniciais de lesão, que culminou em grande falha ciliar no epitélio de revestimento da orelha média. As células caliciformes estavam presentes em pequena quantidade e as glândulas mucoprodutoras em estado inativo. Esses achados, segundo o autor, poderiam explicar a ausência de fluido intratimpânico, a despeito do intenso dano ciliar provocado pela radiação ionizante. Concluiu que as mudanças tardias na mucosa da orelha média irradiada, em certos aspectos, são semelhantes às da otite média adesiva, porém, não existem aderências intratimpânicas na orelha pós-irradiada.

Evans *et al.* (1988) reuniram 20 pacientes, com idade média de 65 anos, que receberam radioterapia pós-cirurgia para tumor unilateral de parótida, e os avaliaram quanto ao aparecimento de deficiência auditiva permanente após a terapia. No estudo, utilizaram audiometria tonal para avaliar frequências de 500Hz a 4000Hz na orelha irradiada e comparar os resultados audiométricos, pré e pós-tratamento, com os da orelha controle. A dosimetria revelou que menos de 10% da radiação atingiu a orelha contralateral. Utilizaram a megavoltagem na dose total de 6000cGy em frações de 200 a 220cGy e fizeram o seguimento dos pacientes de 2 a 16 anos após o término da terapia. A análise estatística não mostrou diferença na audição entre as duas orelhas

avaliadas, irradiada e controle, nem mesmo quando foi calculada a média dos limiares auditivos para cada frequência isoladamente. Concluíram que a intensidade do fracionamento da dose é muito importante na gênese da lesão ao tecido nervoso auditivo, o que explicaria a maior frequência dessa lesão nos tumores da parte nasal da faringe que costumam receber doses de até 400cGy.

Talmi *et al.* (1989) realizaram uma revisão bibliográfica dos efeitos da radioterapia na audição de humanos e animais de experimentação. Concluíram que, apesar das controvérsias sobre as alterações auditivas causadas pela radioterapia, essas foram mais comuns nos pacientes submetidos a doses de radiação superiores a 6000cGy, apesar de existirem casos relatados de deficiência auditiva após doses inferiores a 3000cGy. Sugeriram a realização de audiometria pré e imediatamente pós-radioterapia, bem como o seguimento dos pacientes, com testes auditivos de rotina, por vários anos após o tratamento. Já nos casos que envolveram crianças, os autores salientaram que a atenção no controle auditivo deveria ser ainda maior.

Grau *et al.* (1991) investigaram a sensibilidade à irradiação da orelha média e interna. A função coclear foi avaliada em 22 pacientes antes e após a radioterapia, em um período que variou de 7 a 84 meses após o término das sessões para tratamento do carcinoma da parte nasal da faringe. As funções auditivas pré e pós-radioterapia foram comparadas. Os autores concluíram que o dano coclear é dose dependente e que a lesão acontece mesmo em doses usuais utilizadas no tratamento radioterápico do tumor estudado. Ainda sobre a latência das complicações, afirmaram que esta pode variar de meses a anos.

Kirkbride *et al.* (1992) acompanharam 19 pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de tumor de parótida com doses que variaram de 4500 a 6000cGy. Todos realizaram audiograma no mínimo sete anos após o término do tratamento que revelou uma incidência de 29% de deficiência auditiva unilateral do tipo sensorineural, principalmente para os agudos, não se identificando nenhum outro fator predisponente para deficiência auditiva. Concluíram que as deficiências auditivas condutivas costumavam predominar nos estudos com segmento curto dos pacientes, cedendo lugar para as deficiências auditivas sensorineurais nos ensaios prospectivos maiores que 12 meses.

Schot *et al.* (1992) estudaram o efeito da radioterapia na audição de 30 portadores de adenoma pleomórfico de parótida, operados inadequadamente, que tiveram recorrência do tumor. A média de idade dos pacientes foi 56 anos e o segmento médio de 8,1 anos. Os métodos de avaliação foram audiometria tonal e vocal, impedanciometria e audiometria de altas frequências (de 10 a 20kHz). Nos resultados, a timpanometria mostrou uma pequena, porém significativa ( $p < 0,05$ ) redução da complacência da membrana timpânica da orelha irradiada (35,2%) comparada à orelha contralateral. A correlação entre sensação de deficiência auditiva e perda auditiva, confirmada na audiometria, foi positiva apenas para frequências de 1 a 2kHz ( $p = 0,04$ ). A audiometria mostrou aumento significativo nos limiares auditivos proporcional à frequência avaliada, apenas para os intervalos de 1 a 2kHz; 4 a 8kHz e 10 a 20kHz. A perda auditiva foi basicamente sensorineural, com exceção das frequências de 250 e 500Hz em que houve predomínio da componente condutiva. Doses

abaixo de 55Gy foram praticamente inócuas, em contraste com as superiores a 65Gy que causaram perda auditiva importante. Concluíram que a radioterapia causa deficiência auditiva sensorineural dose-dependente, principalmente nas frequências de 4 a 8kHz.

Anteunis *et al.* (1994) estudaram 18 portadores de tumor unilateral de parótida, com idades entre 17 a 76 anos, e média de 50 anos. Utilizando o acelerador linear em doses diárias de 2 a 2,5Gy, realizaram audiometria tonal, timpanometria, pesquisa do reflexo estapediano e “BERA” antes e dois anos após o término da radioterapia. Os resultados mostraram que menos da metade dos pacientes desenvolveram deficiência auditiva clinicamente relevante na orelha irradiada. A deficiência auditiva, quando apareceu, foi permanente e afetou a qualidade de vida em 33% dos estudados. Os autores sugeriram a ocorrência de lesões na orelha média, orelha interna, nervo auditivo e tronco cerebral. Nos casos de deficiência auditiva mista, alguns pacientes revelaram-se puramente condutivos, seis meses após a irradiação, com o desaparecimento da alteração da componente óssea da perda. Os autores tentaram explicar a alteração da componente óssea da deficiência auditiva como sendo uma pseudoperda auditiva, tal como ocorre no entalhe de Carhard, pela fixação da platina do estribo na janela do vestíbulo na evolução clínica da otosclerose.

Sataloff & Rosen (1994) fizeram uma revisão da literatura avaliando os efeitos da irradiação craniana sobre a acuidade auditiva. Verificam diversas citações sobre alterações auditivas, principalmente em tumores da parte nasal da faringe e parótida, onde a cóclea está inteiramente exposta. Verificaram que

a literatura é clara quanto à existência de otite e distúrbios da função labiríntica induzidas durante ou imediatamente após a irradiação; porém faltam provas para confirmar a perda auditiva tardia pós-radioterapia. Alertaram que a perda auditiva ocorrida após a radioterapia pode não estar relacionada à irradiação, mas sim à invasão direta do tumor às estruturas da orelha interna, a doenças sistêmicas associadas ou ao não tratamento do tumor, dentre outras. Destarte, os autores questionaram a perda auditiva ocorrida após 18 a 36 meses da radioterapia, afirmando, nesses casos, ser ainda menos provável que a deficiência auditiva tenha sido causada pela irradiação.

Smouha & Karmody (1995) apresentaram uma série de casos clínicos ilustrando o espectro de complicações não osteíticas da radioterapia, dentre elas: estenose de meato acústico externo, otite média com efusão, otite média crônica supurativa (colesteatomatosa e não colesteatomatosa), paralisia facial, distúrbios vestibulares (lesão vestibular) e deficiência auditiva sensorineural. Segundo os autores, a deficiência auditiva sensorineural, que normalmente aparece após vários ciclos de irradiação, desenvolve-se tanto por efeito primário tóxico da radioterapia sobre a cóclea, como pelo efeito secundário da oclusão vascular na orelha interna.

Fong *et al.* (1995) estudaram retrospectivamente quatro menores, com idades que variavam de 6 a 10 anos, que receberam radioterapia exclusiva após exérese de tumor de fossa craniana posterior. A dosimetria mostrou que doses entre 50 e 54Gy, correspondentes de 93 a 100% da dose total aplicada, atingiram as cócleas após 6 a 7 semanas de sessões de fracionamento. A maioria desenvolveu deficiência auditiva sensorineural assimétrica sem

padrão definido, porém com predomínio das freqüências agudas na pior das orelhas. Observaram, ainda, que a deficiência auditiva teve um caráter flutuante, especialmente na melhor orelha, e que se manifestara em média 18 a 36 meses após o término da radioterapia. Em apenas um caso predominou a deficiência auditiva sensorineural nas freqüências graves.

Varghese *et al.* (1996) acompanharam, por meio de audiometria tonal, 25 portadores de tumor em região de cabeça e pescoço com audição normal antes da radioterapia. Os pacientes receberam doses de radioterapia, que variaram de 5000 a 6500 rad, durante 30 dias. Observaram que os sintomas mais freqüentes foram sensação de plenitude auricular (44%), perda auditiva (40%), otalgia (16%), zumbido (8%) e vertigem (4%). Quanto aos achados otoscópicos, prevaleceram o derrame seroso na orelha média (56%) e hiperemia da membrana do tímpano (4%). A deficiência auditiva mais encontrada foi condutiva, no percentual de 62%, seguida da mista (32%) e sensorineural (6%).

Leighton *et al* (1997) estudaram o comportamento dos potenciais auditivos evocados de tronco cerebral em 19 pacientes, sem problemas auditivos prévios, que foram submetidos à radioterapia exclusiva no tratamento do carcinoma da parte nasal da faringe. Apesar de reconhecerem o potencial lesivo da irradiação sobre estruturas nervosas do tronco cerebral, entre as quais se inclui o VIII par craniano nas suas porções interna e externa ao meato acústico interno, não encontraram aumento nas latências ou ausências das ondas nos exames em que realizaram. Por contrariarem trabalhos anteriores que evidenciavam lesão ao nervo auditivo após tratamentos com altas doses

de radiação, atribuíram que a ausência de lesão nos seus pacientes se deveu à restrição da área atingida pela radiação na superfície anterior da ponte e da medula. Concluíram que as vias auditivas se situam na porção central e dorsal do tronco cerebral, com isso podiam ser preservadas quando a radiação se limitava à superfície ventral.

Silveira (1998) estudou 38 orelhas de 21 pacientes submetidos à radioterapia, utilizando a megavoltagem emitida por aparelhos de cobaltoterapia e acelerador linear, para tratamento de tumores de cabeça e pescoço, cujo campo de irradiação incluía o osso temporal. Acompanhou-os com audiometria limiar tonal pré e pós-radioterapia e comparou a evolução das deficiências auditivas com os perfis audiométricos pré-tratamento. Dentre os tumores, os mais freqüentes foram de base e dorso de língua (23,8%) e os menos freqüentes de trígono retromolar (9,5%). Analisando as condições antes e após o tratamento da radioterapia, levando em conta cada tipo de via (aérea e óssea), grupo (audição normal, sensorineural, misto e condutivo) e freqüência (aguda e grave) acometida. Verificou que, no grupo sensorineural, tanto para via aérea quanto para óssea, houve diferença significativa de piora da audição nas freqüências agudas. Quando avaliou a evolução dos limiares pós-radioterapia, levando em consideração o aparelho utilizado, notou que na cobaltoterapia houve uma piora da audição apenas na via aérea, fato que não se confirmou para o acelerador linear. Na via óssea não se constatou diferença significativa, embora as médias das diferenças para cobaltoterapia indicassem elevação das medidas e queda da audição. Concluiu que o grupo de pacientes

que tinha perda auditiva sensorineural antes do tratamento foi o mais afetado após a radioterapia.

Chen *et al.* (1999) estudaram retrospectivamente 21 pacientes portadores de tumor unilateral de parótida irradiados no pós-operatório da exérese tumoral. Realizaram o seguimento da perda auditiva por meio de audiometria e impedanciometria, no período de 2 a 14 anos pós-radioterapia. No critério dos autores, somente as perdas auditivas com diferenças superiores a 20dB entre as orelhas seriam consideradas relevantes na avaliação. Eles buscaram analisar a intensidade da dose da radioterapia e o seu efeito na audição por meio de audiometria tonal e vocal, timpanometria e um questionário distribuído aos pacientes avaliando a subjetividade da perda auditiva. No resultado, foi observado que, somente nas doses superiores a 60Gy, houve a correlação positiva entre a intensidade da dose aplicada e três achados: deficiência auditiva sensorineural (60%), timpanometria tipo B (53%) e subjetividade da perda auditiva (33%), nas frequências de 500, 1000 e 2000Hz. Notaram, ainda, a diferença significativa na incidência de deficiência auditiva, quando foram comparados os grupos que receberam doses cocleares iguais ou maiores a 60Gy e os que receberam doses inferiores a essa. Os autores relataram o aparecimento de deficiência auditiva sensorineural em 88% dos pacientes com timpanometria tipo B após a irradiação e em 15% dos pacientes com timpanometria tipo A. Concluíram que a associação entre timpanometria B e deficiência auditiva sensorineural só é encontrada quando se utilizam doses extremamente elevadas, acima de 6000cGy.

Ho *et al.* (1999) estudaram prospectivamente 294 pacientes tratados para carcinoma da parte nasal da faringe, dos quais 221 fizeram apenas radioterapia e 73 receberam também quimioterapia com doses de cisplatina inferiores a 275mg/m<sup>2</sup>, que, segundo os autores, são doses baixas e inferiores à dose mínima ototóxica para esse quimioterápico. A dose total da radioterapia na parte nasal da faringe variou de 60Gy a 70Gy, e na orelha interna foi estimada entre 70Gy e 90Gy. As audiometrias tonais foram realizadas pré-tratamento e no período que variou de 3 a 102 meses após a irradiação, com média de 30 meses. Três meses após a radioterapia, perda auditiva superior a 10dB em 4000Hz e nas freqüências de fala (500, 1000 e 2000Hz) já podiam ser notadas em 31% e 14% das orelhas respectivamente. Observaram que as perdas auditivas mais acentuadas (acima de 30dB) que ocorreram em 17 orelhas, deveram-se, provavelmente, à radiosensibilidade intrínseca de cada organismo afetado. A longo prazo, principalmente após o segundo ano de radioterapia, as perdas auditivas melhoraram em 40% das orelhas; contudo, a probabilidade de persistência de deficiência auditiva, com deterioração significativa dos limiares, aumentou com o passar dos anos. Notaram que, nos pacientes acima de 50 anos, o processo de degeneração senil do órgão vestibulococlear provavelmente facilitou a lesão auditiva pela irradiação, manifestando-se por uma piora dos limiares acima de 10dB na freqüência isolada de 4000Hz. Sugeriram a existência de um platô de estagnação da piora auditiva, que corresponderia ao valor de 60dB, acima do qual a deficiência auditiva não mais progrediria, mesmo no curso da radioterapia. Concluíram que

a maior suscetibilidade das células basais deveu-se ao reduzido número de células nesse setor quando comparados às células da espira apical da cóclea.

Young & Lou (1999) publicaram estudo com 15 pacientes portadores de carcinoma da parte nasal da faringe que, após serem irradiados, desenvolveram perda sensorineural súbita da audição. Dentre eles, sete desenvolveram anacusia, sete perda profunda e um perda moderada. A média de tempo para o aparecimento da complicação foi de 12 anos e todos foram submetidos a tratamento com expansor plasmático, tipo Dextran 40®, para reversão da perda auditiva. O índice de melhora da deficiência auditiva foi de 60% e não houve correlação entre a ocorrência da deficiência auditiva e a dose de radiação. A média de radiação aplicada nesta série foi de 72Gy, não havendo aumento na incidência da deficiência auditiva quando comparado o grupo que recebeu 50Gy e o que recebeu 80Gy. Os achados, segundo os autores, reforçam a hipótese da insuficiência vascular como mecanismo causal para a deficiência auditiva pós-irradiação.

Gibb & Loh (2000) descreveram um caso de tumor da parte nasal da faringe que evoluiu com deficiência auditiva mista severa bilateral precoce após receber múltiplos ciclos de radioterapia por recidivas. O estudo *post-mortem* mostrou que havia invasão tumoral do VIII par craniano e abscesso no meato acústico interno homolateral à perda. Sugeriram que, no diagnóstico diferencial da deficiência auditiva pós-irradiação, dever-se-ia considerar a extensão tumoral e/ou a infecção labiríntica que pode acompanhar o processo invasivo do tumor à orelha interna. Concluíram, reforçando a importância do exame

histopatológico, *post-mortem*, do osso temporal, para afastar-se a possibilidade de erros diagnósticos.

Lin *et al.* (2000) estudaram nove crianças com tumor primário do sistema nervoso central, entre 1 e 7 anos de idade, e que foram encaminhadas para radioterapia. Compararam a técnica de planejamento em 3D para irradiação com fontes de energia de fótons com a radioterapia emitida por meio de prótons, e quantificaram o poder de cada uma delas em preservar as estruturas da orelha interna adjacentes ao tumor. Concluíram que as estruturas normais receberam menor dose quando irradiadas por prótons do que por fótons. A cóclea recebeu uma dose média de 25% da dose prescrita para o tumor na radioterapia por prótons e 75% na radioterapia em 3D por fótons. Aproximadamente 40% do lobo temporal ficaram completamente excluídos da radioterapia por prótons, enquanto 90% do lobo temporal receberam 31% da dose de radiação por fótons. Concluíram que avanços nas técnicas de irradiação, tal como a utilização de radioterapia emitida por meio de prótons, reduziram substancialmente os efeitos adversos sobre o órgão vestibulococlear nessa modalidade de tratamento.

Ondrey *et al.* (2000) calcularam a dosimetria de radiação para diferentes estruturas otológicas por meio da tomografia computadorizada. Estabeleceram a percentagem da dose total irradiada que atingiu diferentes estruturas da orelha (tuba auditiva, mastóide e cóclea) para os diferentes sítios tumorais irradiados em cabeça e pescoço. Concluíram que, nos pacientes com tumor oriundos da parte nasal da faringe, as estruturas otológicas têm maior risco de serem atingidas por altas doses de radiação. Nesses casos, alguns pacientes

chegaram a receber uma dose coclear maior que a calculada para o sítio tumoral. Ainda nos tumores da parte nasal da faringe, a tuba auditiva é a estrutura que quase sempre recebe a dose total calculada para o tumor. Finalizaram afirmando que os tumores em cabeça e pescoço, acompanhados de adenopatia jugulo-digástrica alta, encontram-se igualmente expostos à radiação, e neles a cóclea também recebeu uma dose alta de radiação.

Paulino *et al.* (2000) estudaram 30 crianças que foram submetidas à radioterapia em região de cabeça e pescoço para o tratamento de rabdomiosarcoma. A cóclea estava no campo da irradiação em oito crianças que receberam doses de 3000 a 5600cGy. Além disso, seis dos oito pacientes, ou seja, 75% desenvolveram perda auditiva. Dentre eles, cinco tiveram perda unilateral por envolvimento da orelha média (otite média crônica) ou por lesão da orelha interna. Apenas um dos pacientes teve perda sensorineural bilateral secundária à terapia com cisplatina. Até a data da última avaliação, duas crianças estavam usando prótese auditiva para correção de deficiência auditiva sensorineural.

Honoré *et al.* (2002) examinaram 36 orelhas de 20 pacientes portadores de carcinoma parte nasal da faringe, visando estimar a relação entre dose de radiação e o seu efeito na deficiência auditiva sensorineural. Análises estatísticas de multivariância foram utilizadas para se estabelecer uma relação entre a perda auditiva pós-radioterapia e a dose de radiação empregada, idade do paciente, limiares auditivos pré-tratamento e tempo de observação sob monitoramento da deficiência auditiva. Nos resultados, notaram que a idade, a dose da radiação e limiares auditivos pré-terapêuticos estiveram

significativamente relacionados à deficiência auditiva em 4000 Hz. Concluíram que, apesar de haver uma maior tendência à lesão auditiva com doses de radioterapia mais elevadas, esta condição não mostrou ter uma correlação linear positiva.

Huang *et al.* (2002) estudaram 36 crianças portadoras de meduloblastoma, tratadas em dois grupos, e compararam os efeitos de duas técnicas de radioterapia sobre a audição dos pacientes: a convencional e a de intensidade modulada (IMRT). Esta última, segundo os autores, consiste em uma nova técnica de radioterapia que libera doses menores de radiação para estruturas vizinhas ao tumor; desta forma, poupa a cóclea e o VIII par craniano, minimizando os grandes danos à audição. De fato, observaram que na IMRT, a orelha interna (cóclea e VIII par) recebeu apenas 68% da dose comparada à radioterapia convencional. Isso fez com que, na IMRT, se reduzisse de 64% para 13% o índice de pacientes com deficiência auditiva acima de 40dB em todas as frequências testadas. Tal fato foi atribuído à redução, na IMRT, de 32% da dose cumulativa de radiação na orelha interna, além do menor efeito biológico causado pela diminuição da fração da dose direcionada ao órgão vestibulococlear.

Johannesen *et al.* (2002) acompanharam 33 pacientes portadores de tumores cerebrais irradiados em região do osso temporal, com o intuito de avaliar as funções auditiva, vestibular e gustativa dos pacientes após o tratamento radioterápico. Segundo os autores, na irradiação dos tumores cerebrais, o labirinto vestibular e os núcleos vestibulares normalmente se encontram no campo de irradiação; contudo, a relação existente entre dose de

radiação e distúrbio vestibular ainda não foi bem estabelecida. Quando se trata de lesão ao nervo corda do tímpano, ainda é menos esclarecida a sua presença gerando alterações gustativas dos 2/3 anteriores da língua. Nos resultados, encontraram uma correlação significativa entre dose de radioterapia e perda auditiva sensorineural, principalmente para doses superiores a 54Gy. Hiporreflexia vestibular homolateral à irradiação foi encontrada em três pacientes, porém não houve correlação entre distúrbio vestibular e deficiência auditiva sensorineural. Do total, apenas três pacientes tiveram redução da sensibilidade gustativa do mesmo lado da radioterapia; entretanto não apresentaram déficit motor do nervo facial. Concluíram que a irradiação do osso temporal, com doses usualmente empregadas no tratamento de tumores cerebrais, pode provocar osteoradionecrose temporal, deficiência auditiva sensorineural, disfunção vestibular e perda da gustação.

Raaijmakers & Engelen (2002) realizaram uma revisão da literatura visando observar a frequência e a intensidade da lesão auditiva sensorineural após a radioterapia de tumores de parótida e da parte nasal da faringe. Afirmaram que a hipoacusia condutiva secundária à otite média com efusão pós-radioterapia consistia em uma complicação auditiva transitória e que tendia a se resolver espontaneamente no prazo de um ano após o término do tratamento. Por esse motivo, concentraram-se em estudar a deficiência auditiva sensorineural que, segundo eles, tinha um caráter permanente e costumava aparecer entre 18 e 24 meses após a exposição à radiação. Após analisarem nove trabalhos publicados nos últimos 20 anos, concluíram que 42% dos pacientes irradiados desenvolveram deficiência auditiva sensorineural, com

piora de mais de 10dB nos limiares pré-tratamento, em todas as frequências avaliadas, porém de forma mais significativa em 4000Hz. O total de orelhas lesadas correspondeu a 1/3 dos pacientes que receberam doses de radiação superiores a 70Gy, divididas em frações de até 2Gy.

## **2.2. Estudos experimentais sobre as alterações morfo-histológicas e repercussões funcionais da radiação no sistema auditivo periférico**

Nylén *et al.* (1960) publicaram estudo prospectivo no qual se investigaram os efeitos locais da radiação no labirinto de 20 ratos que receberam a dose total de 30 Krad e foram sacrificados, em tempos diferentes, até três meses após a terapia. Observaram-se sintomas vestibulares (nistagmo) e cocleares (deficiência auditiva). O exame histopatológico demonstrou edema da janela do vestíbulo e ao redor do estribo, degeneração do VIII par craniano no interior do meato acústico interno, além de lesão óssea e muscular restritas à região do osso temporal exposta no campo de irradiação.

Berg & Lindgren (1961) observaram distúrbios comportamentais e alterações morfológicas sugestivas de lesões vestibulo-cerebelares na orelha interna de coelhos irradiados na região do osso temporal. Notaram que as lesões vestibulares e dos nervos do tronco do encéfalo ocorreram tanto após a aplicação da dose total, de uma só vez, como quando fracionada. Os sintomas vestibulares apareceram entre quatro meses e um ano após a exposição, e a patogênese das lesões foi bastante variada. Concluíram que a irradiação pelo Cobalto 60 em dose única menor que 220 rad não ocasionou lesão cerebral ou auditiva, no entanto, doses totais iguais ou superiores a 2500 rad produziram

lesões sépticas labirínticas e na cavidade timpânica, provocadas por baixa da resistência local.

Kelemen (1963) expôs ratos jovens à irradiação de corpo inteiro, com doses entre 100 a 3000 rad. Após o estudo dos ossos temporais à microscopia óptica, notou que o edema da membrana timpânica e da mucosa da orelha média era intenso e que, apesar de contíguas, a orelha média e interna no mesmo animal poderiam responder de maneira diferente aos efeitos da irradiação. Desta forma, chegou a encontrar a orelha interna intacta em alguns casos onde a cavidade timpânica estava extremamente danificada. Em outros casos, o dano vascular provocou hemorragia na estria vascular, edema no espaço perilinfático, compressão do espaço endolinfático vestibular e destruição dos elementos do ducto coclear. Concluiu que a lesão ao órgão de Corti foi menor na espira apical e que o comportamento da orelha interna após a exposição à radioterapia é imprevisível, podendo a porção coclear estar lesada em concomitância com a porção vestibular normal ou, em outras situações, a porção coclear estar normal na presença de infecção concomitante da orelha média.

Gamble *et al.* (1968) estudaram o efeito da irradiação sobre as estruturas da orelha interna pelo exame histológico e avaliação da fisiologia coclear. Utilizaram a microscopia óptica e a captação do microfonismo coclear na avaliação de 150 porcos da Índia submetidos a diversos níveis de intensidade de irradiação com a kilovoltagem. Após aplicarem doses únicas de 500 a 6000 rad na orelha de cada animal, concluíram que o labirinto vestibular é mais resistente aos efeitos da radiação do que a cóclea. O exame histológico

mostrou a lesão inicialmente na estria vascular que, após se tornar permeável pelo efeito da radiação, causou dilatação do sistema endolinfático por aumento na pressão endolinfática. Esses achados coincidiram com a avaliação funcional, principalmente na segunda semana após a terapia, quando se notou a perda auditiva nas frequências altas, ou seja, acima de 7kHz, nos animais expostos à dose de radiação maior que 3000 rad. A perda auditiva nas frequências graves foi rara, notada em poucos animais 24 horas após a irradiação.

Winther (1969) realizou trabalho com 26 porcos da Índia, com idade aproximada de três meses, pesando entre 250 e 300 gramas. A proposta foi irradiar as cócleas dos animais com doses que variavam de 1000 a 7000 rad e realizar o estudo histológico das cócleas retiradas de animais sacrificados em diferentes intervalos de tempo. Seu objetivo era saber se a irradiação com raios-X causava algum dano ao órgão de Corti, se esse dano tinha algum padrão característico, e se existiam sinais precoces de lesão. Notou que a menor dose lesiva ao órgão de Corti foi de 4000 rad e que a lesão se caracterizava por um pequeno número de células ciliadas externas degeneradas. Após a irradiação com 7000 rad, encontrou alterações precoces nos núcleos das células ciliadas externas da espira basal da cóclea três horas após o início da exposição. Após a 6ª hora, muitos núcleos nessa área eram picnóticos, e após a 8ª hora grande parte das células estavam completamente degeneradas. Concluiu que as alterações nucleares foram os primeiros sinais de degeneração celular, possivelmente causadas por efeito radioativo direto na célula, indireto vascular, ou a combinação de ambos.

Hultcrantz *et al.* (1989) avaliaram o efeito sensibilizante da irradiação pré-natal sobre a estrutura e a função da cóclea madura. Submeteram 42 ratas, com idades gestacionais diferentes, a três intensidades de radiação correspondentes a 0.5, 1 e 2Gy. Após o nascimento, realizaram “BERA” e obtiveram os limiares para as freqüências de 2 a 31,5kHz. Quando os animais atingiram a idade de 25 a 36 meses, os limiares foram re-testados e então foram sacrificados para o estudo morfológico da cóclea por microscopia eletrônica de varredura. Em todas as cócleas foram observadas extensas áreas com ausência dos cílios das células ciliadas externas em concomitância a deformidades na estrutura tubular do cílio, que perdeu a sua rigidez estrutural normal. O dano coclear foi restrito ao órgão de Corti, ficando as demais estruturas da escala média não afetadas, dentre elas a estria vascular, a membrana tectorial e a membrana de Reissner. No grupo de animais irradiados, em comparação ao controle, houve maior perda de células ciliadas internas e externas na espira média da cóclea e redução dos limiares auditivos, obtidos no “BERA”, para as freqüências médias.

Kim & Shin (1994) realizaram microscopia de varredura e transmissão em 44 cobaias submetidas à irradiação com nêutrons rápidos na região do osso temporal. Após serem submetidos a doses que variaram de 2 a 15Gy, equivalentes a doses de 24 a 40Gy emitidas por fontes convencionais, as cobaias foram sacrificadas em intervalos de tempo mínimo de 18 horas e máximo de sete dias pós-irradiação. Na microscopia de varredura, a principal característica observada foi a tendência de maior lesão nas células ciliadas externas do que nas células ciliadas internas. Não houve diferença de

suscetibilidade entre as espiras; contudo, a primeira fileira mais interna de células ciliadas externas foi menos atingida do que as duas fileiras mais externas. O padrão de lesão se resumiu na deformidade estrutural dos cílios que perderam seu formato normal, ou ausência completa dos cílios das células externas. Na microscopia de transmissão as alterações se concentraram no núcleo e no citoplasma: no núcleo, houve o adensamento da eucromatina e conseqüente difusão da heterocromatina; já no citoplasma, predominaram as vacuolizações e a degeneração mitocondrial. Essa modificação nuclear representou um forte indício de declínio na atividade metabólica da célula ciliada. Na estria vascular, predominaram os edemas perivasculares e intercelulares reversíveis, secundários ao aumento na permeabilidade dos vasos.

### **2.3. Estudos experimentais sobre drogas otoprotetoras da radiação no sistema auditivo periférico**

Atlas *et al.* (2006) estudaram o efeito do piracetam na prevenção da lesão coclear induzida pela radioterapia aplicada na região craniana de porcos da Índia. Dividiu a amostra em três grupos dos quais um foi o controle; o segundo recebeu irradiação cefálica na dose total de 60Gy em cinco frações diárias consecutivas de solução salina intra-peritoneal; o terceiro as mesmas condições de irradiação do anterior acrescidos de 350mg/Kg diários de piracetam durante o período de irradiação. Após estudos histopatológicos realizados nas cócleas das cobaias sacrificadas em tempos diferentes após a última dose de radiação concluiu que no grupo apenas irradiado ocorreu lesão

na estria vascular, células do gânglio espiral, células ciliadas internas e externas. Já no grupo que recebeu piracetam concomitantemente à irradiação, os resultados foram estatisticamente significantes e não mostraram degeneração coclear na estria vascular e células ciliadas externas nos animais sacrificados 24 e 96 horas após o termino da irradiação.

### **3- OBJETIVOS**

---

Os objetivos deste trabalho são:

1. Verificar se a amifostina desempenha função citoprotetora na orelha interna, preservando a integridade das células ciliadas externas de cobaias irradiadas em região de cabeça e pescoço pelo Cobalto 60 (Co60) na dose de 350cGy.
2. Observar se existe diferença na otoproteção pela amifostina das células ciliadas externas entre as espiras da cóclea, ou mesmo diferenças entre as fileiras de células ciliadas dentro de uma mesma espira.
3. Analisar se existe diferença de resposta protetora, ou seja, se existe potencialização da radioproteção da orelha interna das cobaias quando se aumenta a dose da amifostina de 100mg para 200mg/kg, utilizando-se a mesma dose de radiação que é de 350cGy.

## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

---

O presente estudo teve seu projeto inicial submetido à avaliação e obteve aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) sob o número de protocolo 043/2005. Vide anexo.

#### **4.1. Critérios de seleção e inclusão de animais no estudo**

O animal escolhido para o estudo foi a cobaia albina do sexo masculino. Foram selecionados apenas os animais oriundos do Biotério Central da FMRP-USP, que apresentaram reflexo de Preyer positivo (JERO et al., 2001) que pesaram entre 300 e 450 gramas e que apresentaram Emissões Otoacústicas por Produtos de Distorção (EOAPD) presentes nas duas orelhas no momento da seleção. O equipamento utilizado foi o ILO 92 CAE System Otodynamics LTD disponível no Departamento. A intensidade do estímulo desencadeante foi de 70dB NPS, tanto para F1 quanto para F2, seguindo a relação de frequências 2F1-F2 com proporção F1:F2 = 1,22 e resolução dois pontos por oitava.

#### **4.2. Drogas utilizadas, Doses e Via de Administração**

1- amifostina (50mg/ml) – 100 e 200mg/kg – via intra-peritoneal;

As ampolas de amifostina (500mg/10ml) utilizadas no estudo foram doadas pelo laboratório fabricante Schering-Plough S.A., na forma injetável, pertencentes aos lotes 306 e 54189-024.

Na administração da amifostina intra-peritoneal e Ketamina intramuscular foram utilizadas seringas descartáveis milimetradas de 1cc e agulhas descartáveis BD 21G1 (25x8).

#### **4.3. Tipo de radiação, Dose total e Cálculo da dose**

A aplicação da radiação foi realizada no Setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (HCFMRP-USP). A técnica empregada foi a Teleterapia, a fonte de radiação foi o Cobalto 60 (Co60) e o equipamento o Siemens Gammatron 580. A irradiação foi feita em dose única, 30 dias antes do sacrifício dos animais. As cobaias foram colocadas em uma caixa de acrílico com espessura da parede de 0,5cm especialmente construída para o experimento, que apresentava as seguintes dimensões: comprimento 25cm, largura 8cm, profundidade 10cm. Vide Figura 1. Após serem anestesiadas com Ketamina (65mg/kg), por injeção intra-muscular, as cobaias foram colocadas na caixa com a cabeça imobilizada para evitar que ocorressem movimentos cefálicos e desvios com variações no campo de irradiação. Vide Figura 2. Um bolus de 1,0cm de espessura foi posicionado bilateralmente entre a face das cobaias e a superfície interna da caixa de acrílico, restando aproximadamente 0,5cm de ar entre a cobaia e o bolus. Vide Figura 3.



**Figura 1.** Caixa acrílica utilizada para contenção das cobaias



**Figura 2.** Cobaia posicionada para ser irradiada



**Figura 3.** Cobaia preparada para ser irradiada com posicionamento dos bolus

A dose total de 350cGy foi calculada no meio do DLL na profundidade de 4cm, a partir da superfície externa da caixa de acrílico, interessando as duas orelhas de maneira simétrica, em dois campos paralelos alinhados à cabeça do animal e opostos com dose de 175cGy em cada campo. Vide Figura 4.



**Figura 4.** Equipamento utilizado para irradiação: Bomba de Cobalto

#### 4.4. Grupos de estudo

O estudo envolveu 51 cobaias divididas em quatro grupos distintos:

**Grupo amifostina-** Composto de quatro animais, recebeu isoladamente amifostina na dose de 200mg/Kg de peso e serviu com um controle negativo do experimento, uma vez que não se encontra descrito na literatura nenhum efeito ototóxico dessa droga.

**Grupo Irradiação (Irr)-** Formado por onze cobaias que receberam apenas a radiação na região de cabeça e pescoço na dose de 350cGy simetricamente em cada orelha.

**Grupo amifostina 100mg + Irradiação (Irr+100mg)-** Composto de 18 cobaias que receberam amifostina na dose de 100mg/kg de peso 30 minutos antes da irradiação na dose de 350cGy.

**Grupo amifostina 200mg + Irradiação (Irr+200mg)-** Composto de 18 cobaias que receberam amifostina na dose de 200mg/kg de peso 30 minutos antes da irradiação na dose de 350cGy.

Todos os grupos permaneceram no laboratório de cirurgia experimental do HCFMRP-USP, atendendo as exigências de alimentação e confinamento preconizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP, sendo sacrificados 30 dias após a data do experimento.

#### **4.5. Sacrifício e Preparo das Cócleas**

O método de sacrifício utilizado foi a decapitação. Após o sacrifício foram removidas as bulas, dissecadas as cócleas e fixadas com Glutaraldeído 3% durante 4 horas. Em seguidas as bulas foram submetidas à lavagem em solução tampão 0,1mol, onde permaneceram por 24 horas. Só então foi realizada dissecação e exposição do modíolo e das espiras da cóclea. Após esse procedimento foi feita a re-fixação com ósmio durante 2 horas e

desidratação progressiva com etanol a 50%, 70%, 90%, 95%, e 100%. Finalmente, realizada a secagem em unidade de CO<sub>2</sub>, montagem em *stubs* com cola de carbono e banho em ouro como preparo para microscopia de varredura em aparelho da marca JEOL 5000.

#### **4.6. Método de Contagem Celular e Análise Estatística**

O método utilizado para comparação do grau de lesão das células ciliadas foi o citococleograma. Neste método foram contadas as células ciliadas externas que se encontravam ausentes nas três fileiras de três espiras da cóclea: basal, E2, E3. O parâmetro considerado para classificação de lesão foi a ausência total de cílios, ou seja, a perda completa da projeção filamentar dos cílios sobre a placa cuticular. O local escolhido para contagem das células foi o seguimento médio de cada espira obtendo-se o maior número de células possível dentro de um campo microscópico fotográfico a um aumento de 350 a 700 vezes. Todas as espiras foram fotografadas e os negativos revelados para posterior processo de análise. Os números resultantes desta contagem celular foram transformados em frações do número total de células ausentes dividido pela população total de células daquele campo fotográfico analisado. O motivo de se transformar números em frações foi para prevenir possíveis erros decorrentes de sub-notificações causadas na contabilização da população de células lesadas, uma vez que, nem sempre as espiras se apresentam perfeitas para a contagem, podendo ocorrer áreas danificadas por lesão mecânica ou mesmo rotação com inversão completa do posicionamento da espira, ambos decorrentes do processo de dissecação e fixação, etapas importantes no

preparo dos *Stubs* para microscopia de varredura. No processo de contagem, as cócleas foram divididas por espiras e por fileiras em três grupos distintos: Irr, Irr+100mg e Irr+200mg.

Para a comparação entre os grupos de estudo foram feitas três análises: a primeira comparou o percentual de células lesadas entre os grupos (Irr, Irr+100mg e Irr+200mg) levando-se em consideração o percentual do somatório de células ciliadas externas lesadas nas três espiras (Basal, E2 e E3) de cada grupo; a segunda comparou o percentual de células ciliadas externas lesadas em cada espira (Basal, E2 e E3) entre os três grupos estudados e a terceira comparou o percentual de células ciliadas externas lesadas em cada fileira (F1, F2 e F3) entre os três grupos. Esse procedimento foi adotado, pois é sabido que existem diferenças na vulnerabilidade da lesão das células ciliadas pela radioterapia, ocorrendo diferenças de proteção em determinadas fileiras dentro de uma mesma espira (WINTHER, 1969; FONG et al., 1995).

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa Statistical Package for Social Sciencies (SPSS). Na comparação dos valores entre os três grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com teste *post hoc* de Dunn quando verificada a existência de diferença significativa. Assim, as hipóteses H0 e H1 foram:

H0: Os valores percentuais de lesão dos três grupos do estudo são equivalentes entre si.

X

H1: Existe no mínimo um grupo que difere significativamente dos demais.

Em sendo a H0 rejeitada, usaríamos o teste *post-hoc* de Dunn para verificar as diferenças detectadas.

Para esta análise estatística foi adotado como nível de significância um valor de  $p \leq 0,05$ .

## **5- RESULTADOS**

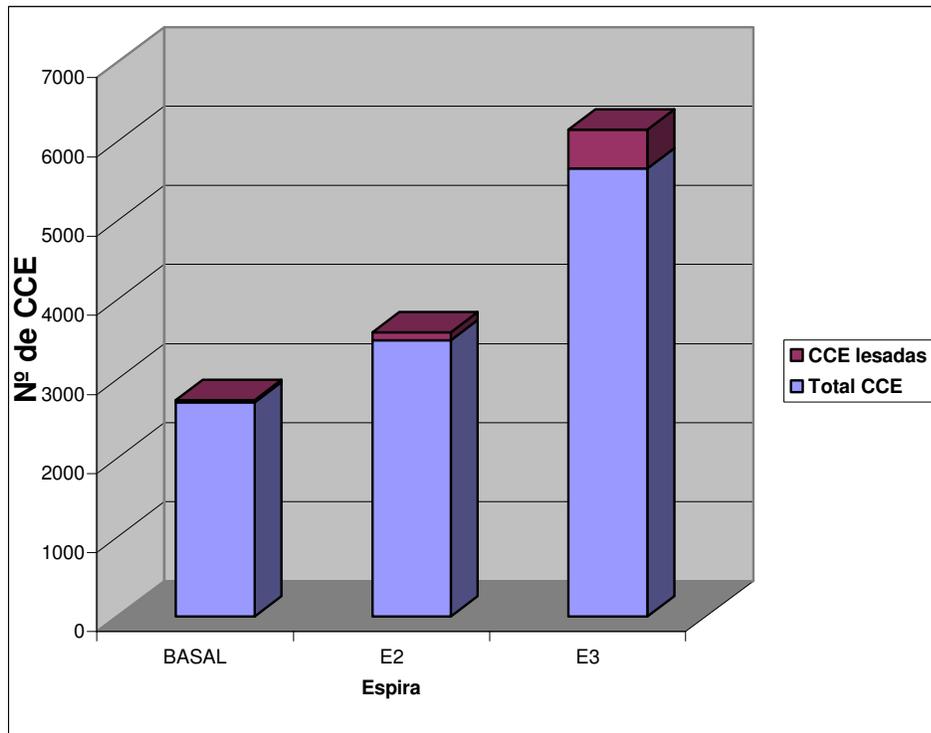
---

O presente trabalho inicialmente envolveu um total de 51 cobaias, sendo que ocorreram sete mortes. Dessas; duas foram do grupo Irr+200mg, quatro do grupo Irr+100mg, e uma do grupo amifostina. Todas as mortes ocorreram por conta de diarreia de provável causa viral. Das 44 cobaias restantes resultaram 88 cócleas, sendo que no final do estudo foram computadas apenas 84, pois três cócleas foram excluídas do trabalho, pois as cobaias apresentaram sinais de inflamação/infecção na orelha média e uma cóclea foi perdida por ficar extremamente danificada após a sua dissecação.

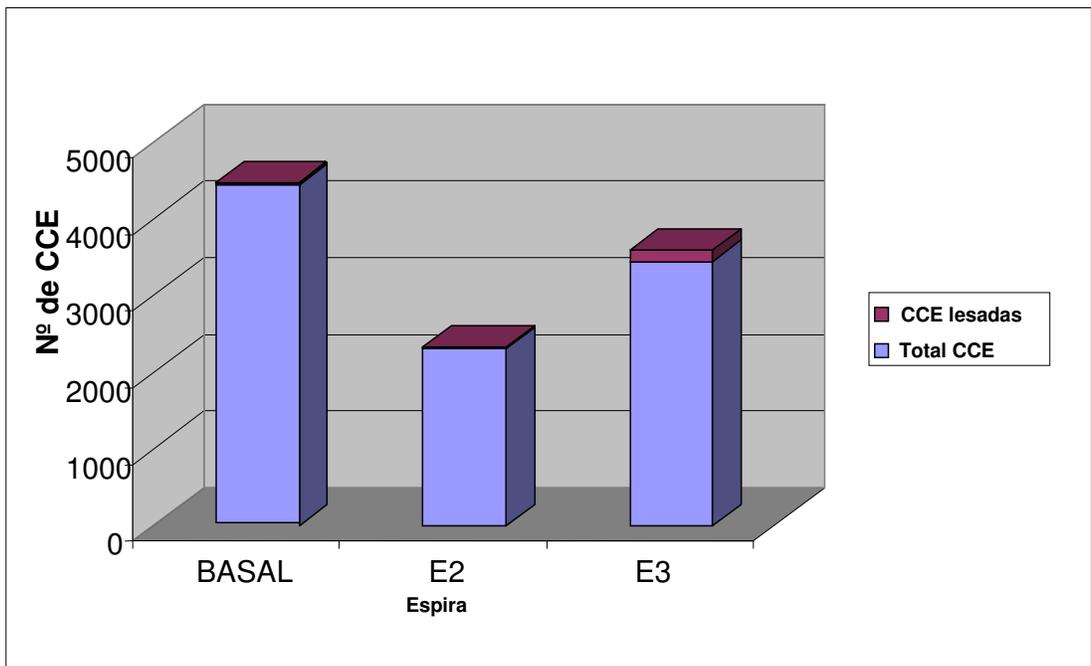
O grupo amifostina, após análise das espiras, não mostrou ausência de CCE e por isso serviu apenas como controle negativo do experimento, não entrando na análise comparativa junto com os três grupos testes.

### **5.1. Comparação do percentual do total de CCE entre os grupos**

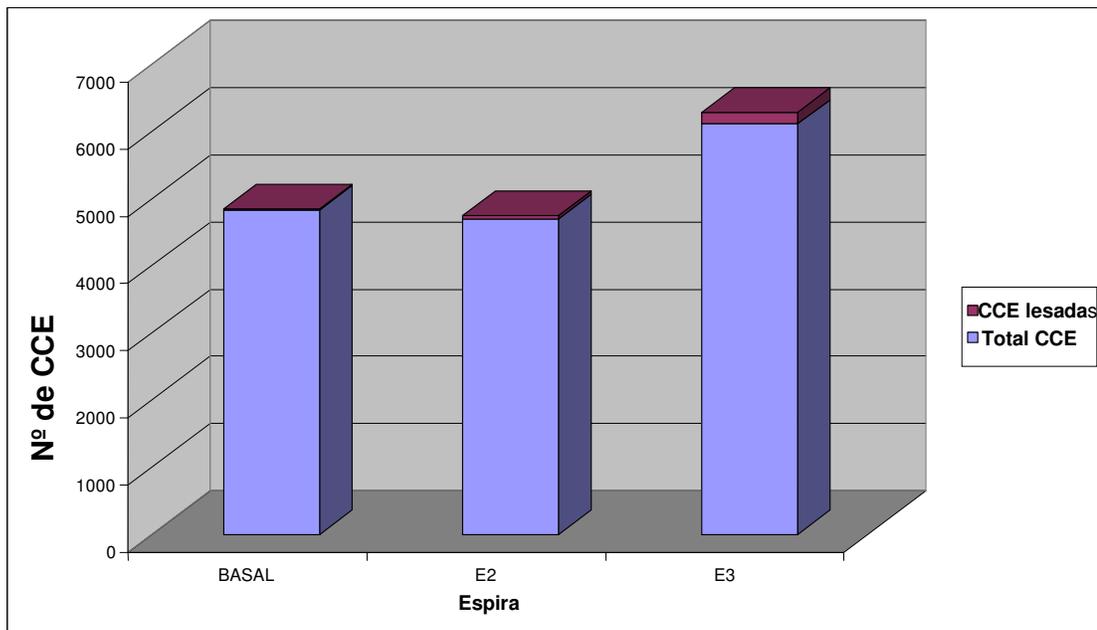
Na comparação dos totais de CCE lesadas em cada grupo do estudo observou-se que, no grupo Irr o percentual total de lesões das CCE foi significativamente maior que nos grupos Irr+100mg e Irr+200mg, que se equivaleram. Vide Figuras 5, 6, 7, 8 e Tabela 1.



**Figura 5.** Proporção CCE lesadas do grupo Irr



**Figura 6.** Proporção CCE lesadas do grupo Irr+100mg

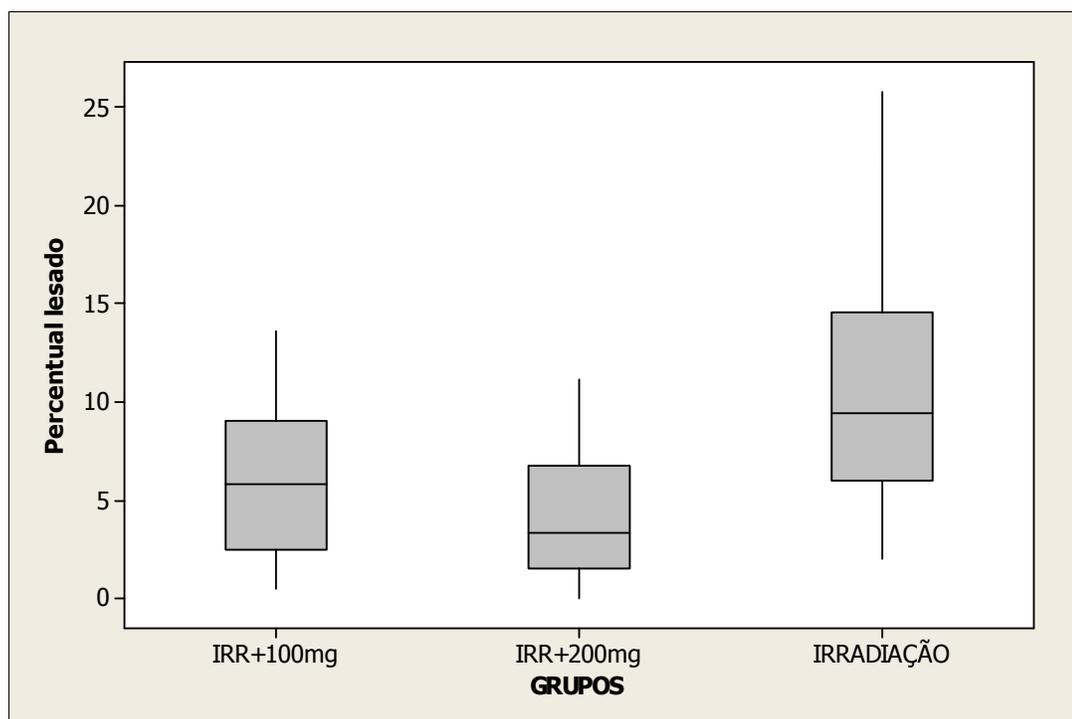


**Figura 7.** Proportão CCE lesadas do grupo Irr+200mg

**Tabela 1-** Percentuais de CCE lesadas em cada grupo.

Grupos	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Média	DP
Irr+100mg	0,45	3,25	6,62	4,10	3,91
Irr+200mg	0,92	2,55	5,31	3,54	3,34
Irradiação	5,28	8,04	13,65	10,10	6,60

$X^2=19,38$   $p<0,001$

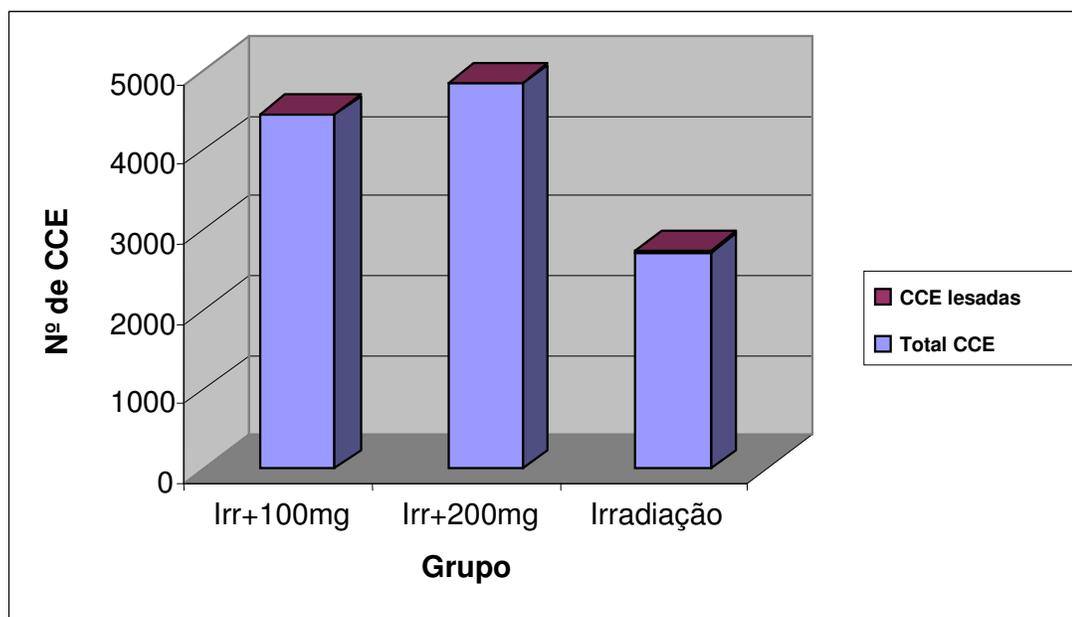


**Figura 8.** Percentuais de CCE lesadas em cada grupo.

## 5.2. Comparação do percentual de células ciliadas externas lesadas em cada espira (basal, E2 e E3) entre os grupos

### 5.2.1. Espira Basal

Na espira basal quase não foram observadas lesões em nenhum dos três grupos estudados e quando elas ocorreram foram de forma isolada e inconstante. Aplicando-se o teste estatístico não houve diferença significativa entre os grupos que receberam amifostina (100mg/kg e 200mg/kg) antes da irradiação e o que foi irradiado isoladamente na dose de 350cGy. Vide Figuras 9, 10, 11 e Tabela 2.



**Figura 9.** Proporção de CCE lesadas e total CCE na espira basal

**Tabela 2-** Percentuais de CCE lesadas na espira basal.

Grupos	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Média	DP
Irr+100mg	0,00	0,00	0,83	0,51	0,81
Irr+200mg	0,00	0,00	0,45	0,20	0,34
Irradiação	0,00	0,00	1,03	0,96	2,27

$X^2=1,61$   $p=0,45$

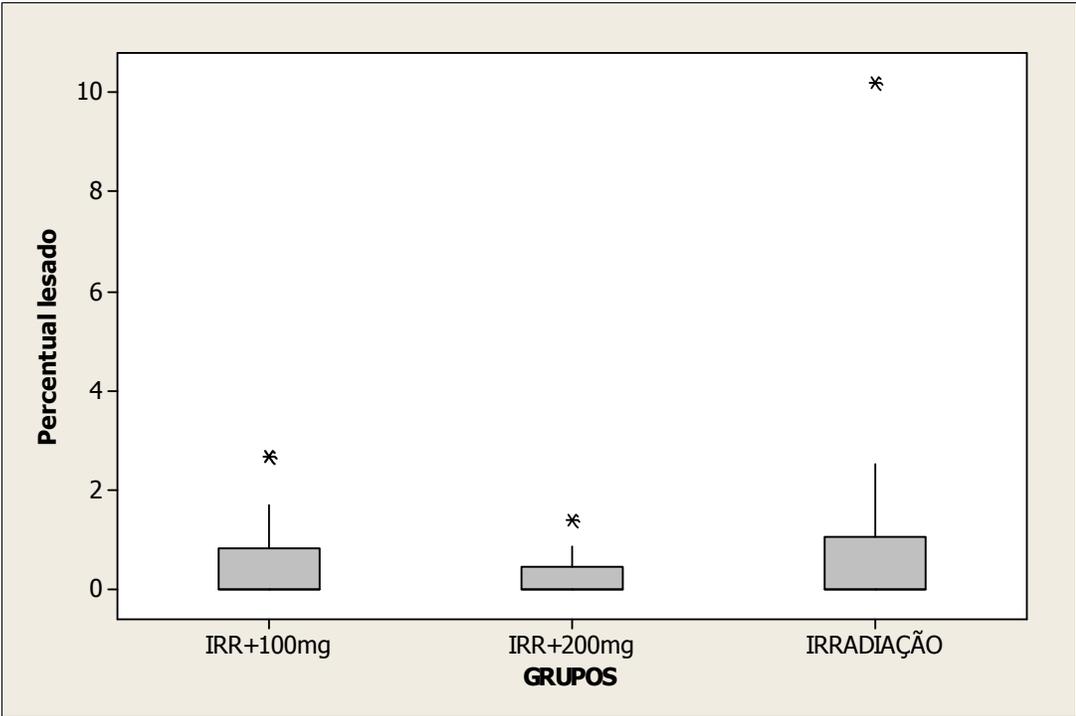


Figura 10. Percentuais de CCE lesadas na espira basal

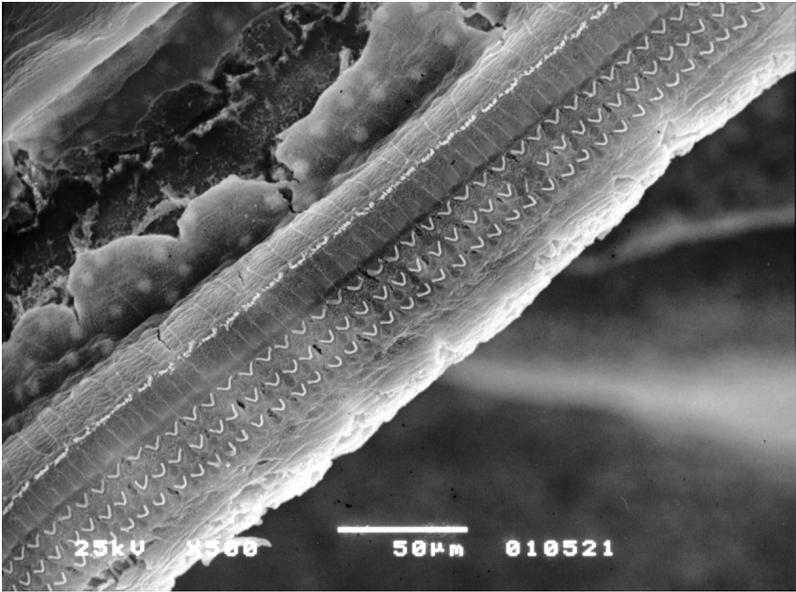
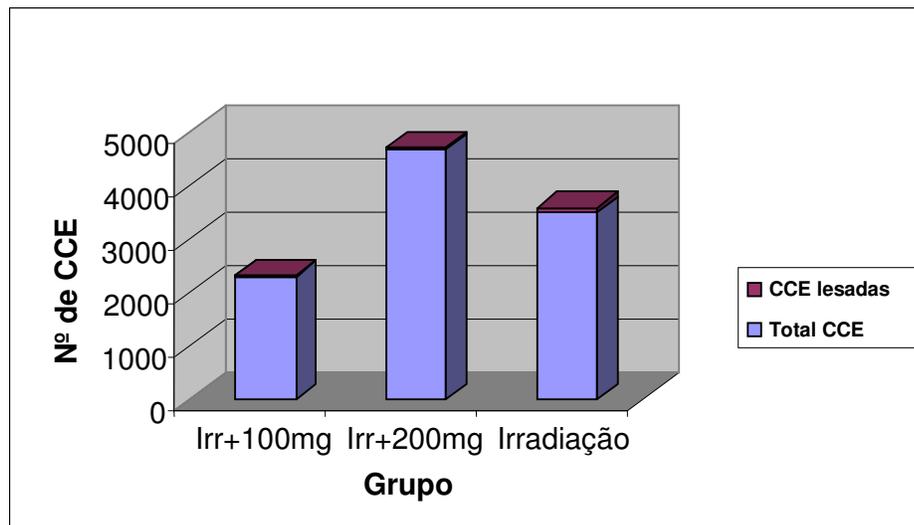


Figura 11. Seguimento sem lesões da espira basal do grupo Irr

### 5.2.2. Espira 2

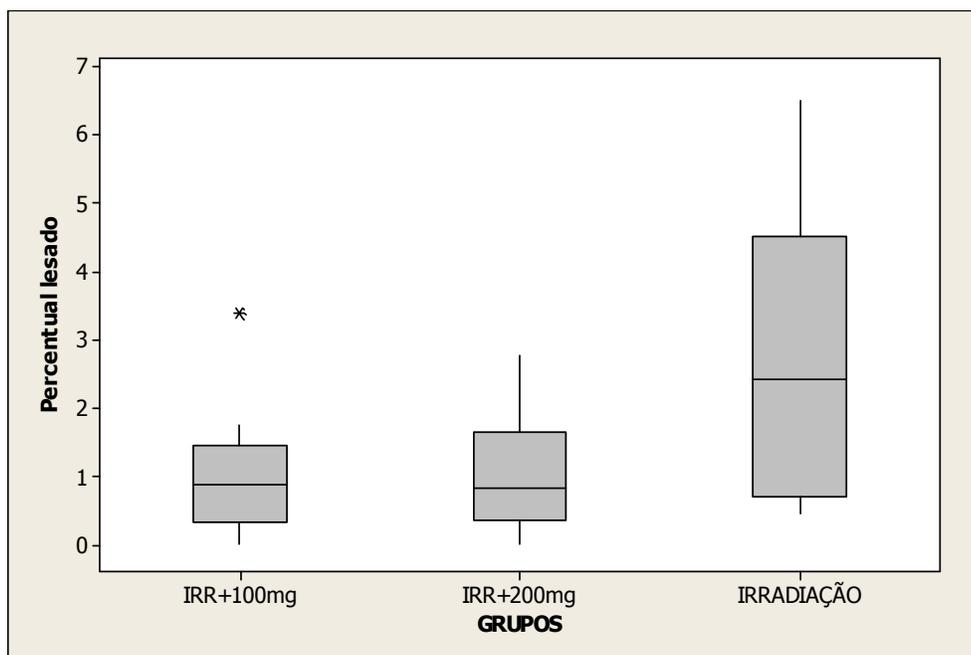
Na segunda espira observou-se um aumento nas falhas nas fileiras de células ciliadas externas principalmente ocorridas no grupo que não usou amifostina previamente à irradiação. O maior grau de lesão ocorrida neste grupo foi estatisticamente significante quando comparados os totais de células lesadas desta espira com os outros dois grupos que receberam amifostina antes da irradiação. Entre os grupos que receberam amifostina não existiu diferença significante. Vide Figuras 12, 13, 14 e Tabela 3.

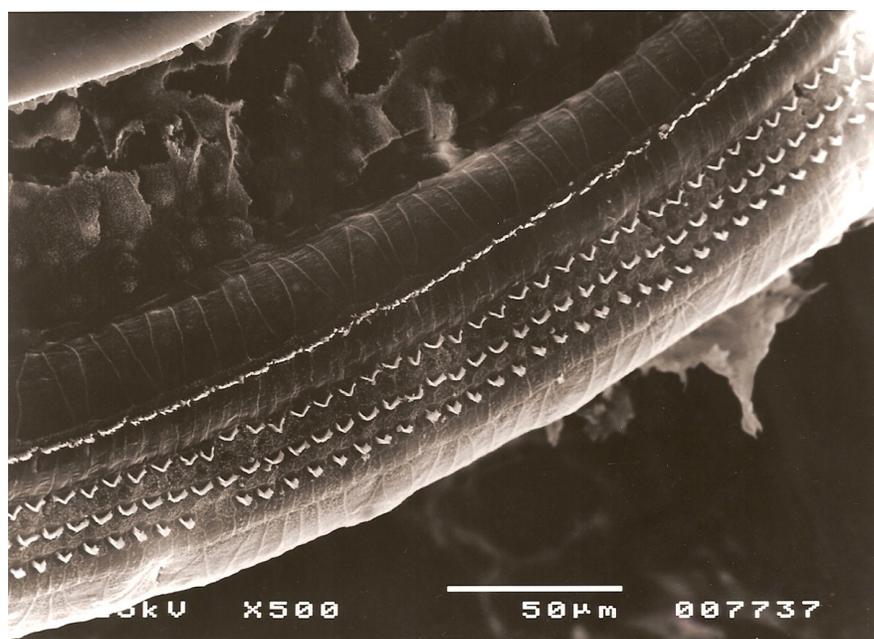


**Figura 12.** Proporção de CCE lesadas e o total CCE na espira 2

**Tabela 3-** Percentuais de CCE lesadas na espira 2.

Grupos	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	Média	DP
Irr+100mg	0,33	0,89	1,47	1,02	0,91
Irr+200mg	0,34	0,83	1,64	0,99	0,84
Irradiação	0,70	2,43	4,51	2,97	2,07

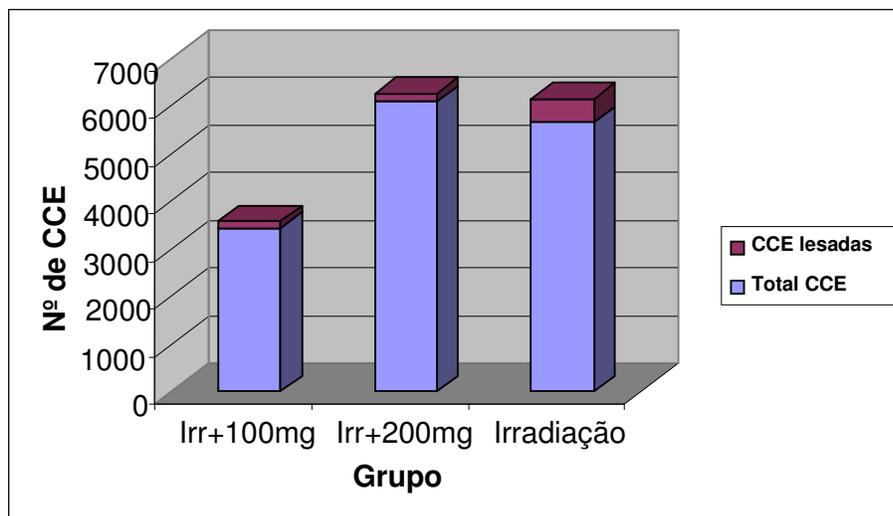
 $\chi^2=9,98$   $p=0,007$ **Figura 13.** Percentuais de CCE lesadas na espira 2



**Figura 14.** Espira 2 do grupo Irr+200mg mostrando preservação CCE

### 5.2.3. Espira 3

Na terceira espira, em comparação com a E2, observou-se uma tendência maior de lesão nos três grupos. Aqui, os grupos Irr+100mg e Irr+200mg também mostraram valores significativamente inferiores ao grupo irradiado isoladamente. Os dois grupos que usaram amifostina se equivaleram e não mostram diferença significativa. Vide Figuras 15, 16, 17 e Tabela 4.



**Figura 15.** Proporção de CCE lesadas e o total CCE na espira 3

**Tabela 4-** Percentuais de CCE lesadas na Espira 3.

Grupos	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	Média	DP
Irr+100mg	1,38	3,39	5,38	4,16	3,49
Irr+200mg	0,35	1,86	5,44	3,03	3,32
Irradiação	3,46	5,04	8,23	7,20	6,19

$X^2=9,24$   $p=0,01$

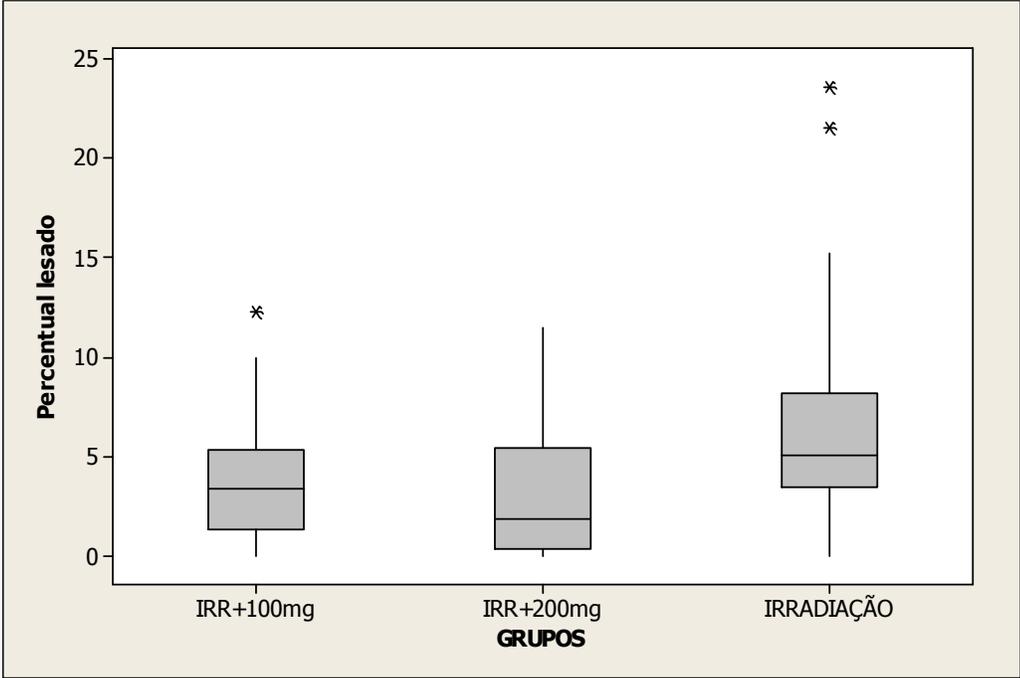


Figura 16. Percentuais de CCE lesadas na Espira 3

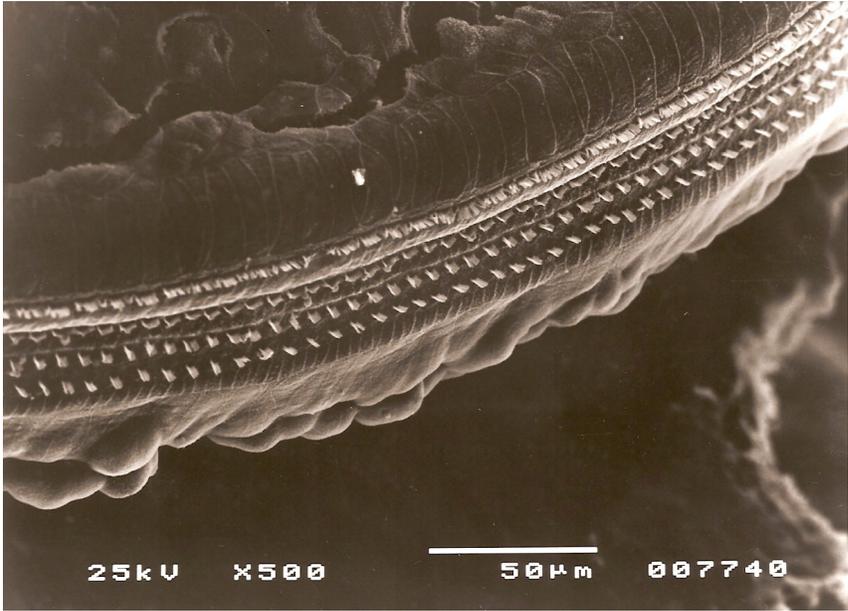


Figura 17. Espira 3 do grupo IRR+200mg com preservação das CCE.

### **5.3. Comparação do percentual de células ciliadas externas lesadas em cada fileira (F1, F2 e F3) entre os grupos**

#### **5.3.1. Espira Basal – Fileiras 1, 2 e 3**

Na comparação feita entre as fileiras da espira basal não houve diferença significativa entre o percentual de CCE lesadas nos três grupos. Vide Tabelas 5, 6, 7 e Figura 18.

**Tabela 5-** Percentuais de CCE lesadas na primeira fileira (F1) da espira basal.

<b>Grupos</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>Irr+100mg</b>	0,00	0,00	0,00	0,20	0,60
<b>Irr+200mg</b>	0,00	0,00	0,00	0,16	0,48
<b>Irradiação</b>	0,00	0,00	0,00	0,09	0,42

$X^2=0,65$   $p=0,72$

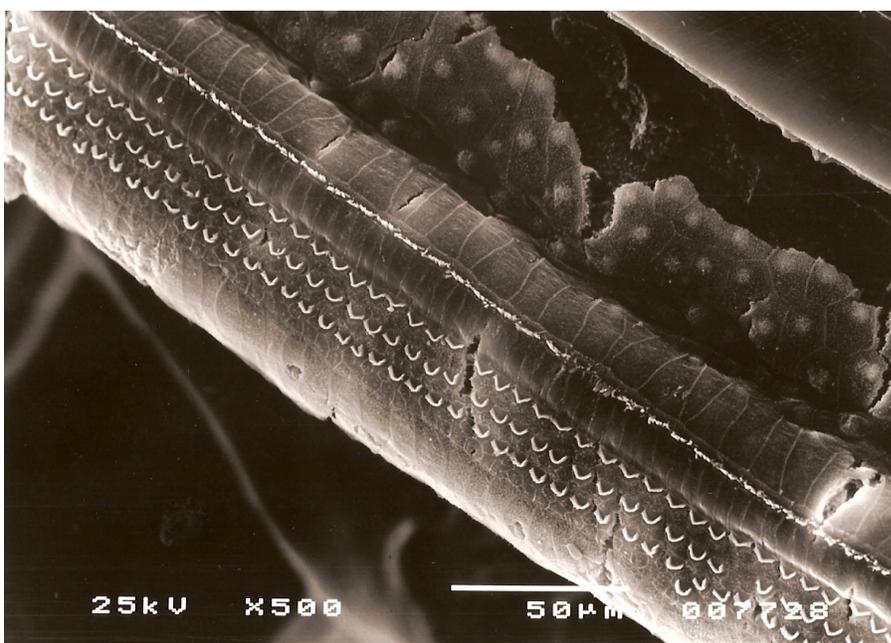
**Tabela 6-** Percentuais de CCE lesadas na segunda fileira (F2) da espira basal.

<b>Grupos</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>Irr+100mg</b>	0,00	0,00	0,29	0,50	1,05
<b>Irr+200mg</b>	0,00	0,00	0,00	0,20	0,63
<b>Irradiação</b>	0,00	0,00	0,00	0,53	1,34

$X^2=1,56$   $p=0,46$

**Tabela 7.** Percentuais de CCE lesadas na terceira fileira(F3) da espira basal.

Grupos	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Média	DP
Irr+100mg	0,00	0,00	1,57	0,85	1,57
Irr+200mg	0,00	0,00	0,00	0,24	0,64
Irradiação	0,00	0,00	2,05	2,24	5,68

 $\chi^2=2,57$   $p=0,28$ **Figura 18.** Espira basal do grupo Irr+200mg sem lesões

### 5.3.2. Espira 2 – Fileiras 1, 2 e 3

Na comparação do percentual de CCE lesadas entre as fileiras isoladamente nos três grupos observou-se que, apesar de as maiores médias de lesão ocorrerem na segunda (F2) e terceira (F3) fileiras, apenas na primeira

fileira (F1) foi notada diferença significativa pelo teste *post hoc* de Dunn, onde o grupo irradiado isoladamente (Irr) apresentou valores significativamente superiores de lesão aos dos grupos Irr+100mg e Irr+200mg, que se equivaleram. Vide Tabelas 8, 9, 10 e Figura 19.

**Tabela 8-** Percentuais de CCE lesadas na primeira fileira (F1) da Espira 2.

<b>Grupos</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>Irr+100mg</b>	0,00	0,00	0,00	0,27	0,71
<b>Irr+200mg</b>	0,00	0,00	1,19	0,51	0,73
<b>Irradiação</b>	0,00	1,75	3,03	2,30	3,18

$X^2=10,84$   $p=0,004$

**Tabela 9-** Percentuais de CCE lesadas na segunda fileira (F2) da Espira 2

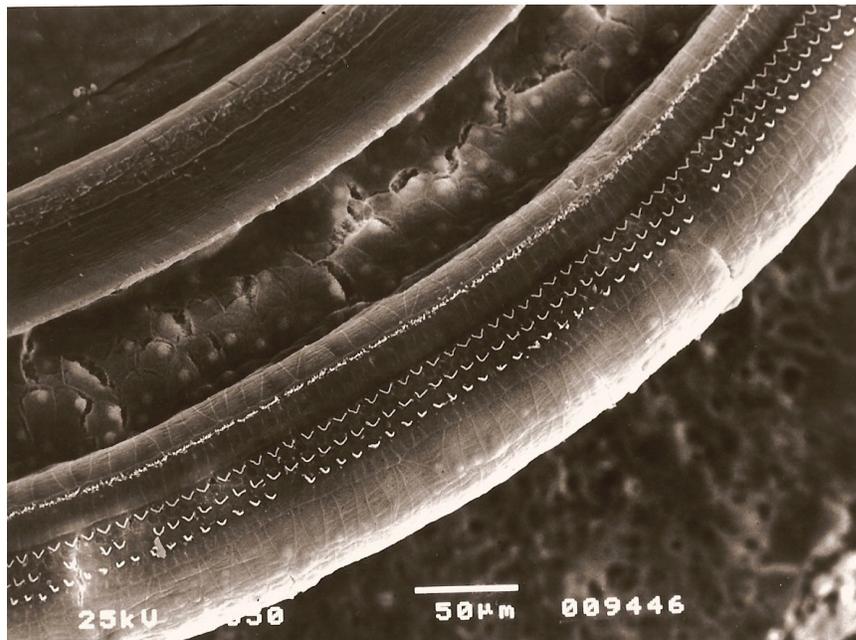
<b>Grupos</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>Irr+100mg</b>	0,00	0,00	1,36	1,02	1,84
<b>Irr+200mg</b>	0,00	0,00	1,37	1,01	1,57
<b>Irradiação</b>	0,00	1,06	6,40	2,85	3,53

$X^2=3,78$   $p=0,15$

**Tabela 10-** Percentuais de CCE lesadas na terceira fileira (F3) da Espira 2.

Grupos	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	Média	DP
Irr+100mg	0,00	0,66	3,63	1,73	2,01
Irr+200mg	0,00	1,28	2,64	1,45	1,53
Irradiação	0,00	1,81	6,78	3,60	4,33

$X^2=1,91$   $p=0,38$

**Figura 19.** Espira 2 do grupo Irr com lesões em F2 e F3

### 5.3.3. Espira 3 – Fileiras 1, 2 e 3

Comparando-se os percentuais de CCE lesadas entre as fileiras, isoladamente nessa espira, notou-se uma tendência de maiores médias de lesões na segunda (F2) e terceira (F3) fileiras, repetindo o que ocorreu na espira 2, porém, apenas na terceira (F3) fileira houve aumento estatisticamente significativo de lesão no grupo irradiado isoladamente comparado aos outros dois grupos que receberam amifostina nas doses de 100mg e 200mg/kg, que se equivaleram. Vide Tabelas 11, 12, 13 e Figura 20.

**Tabela 11-** Percentuais de CCE lesadas na primeira fileira (F1) da Espira 3.

<b>Grupos</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>Irr+100mg</b>	0,00	0,00	4,00	3,02	7,65
<b>Irr+200mg</b>	0,00	0,00	1,30	1,12	2,38
<b>Irradiação</b>	0,00	1,22	3,12	3,84	6,41

$X^2=3,01$   $p=0,22$

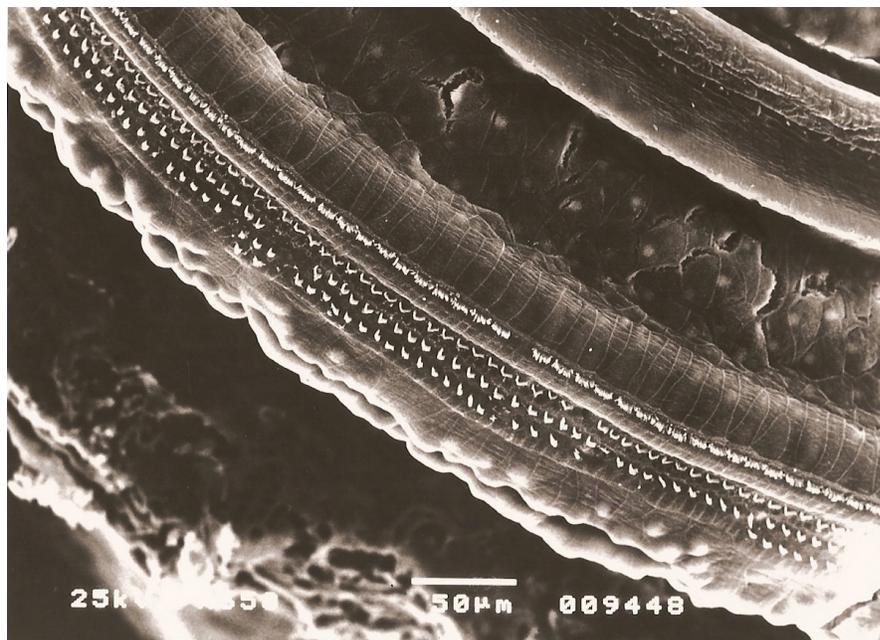
**Tabela 12-** Percentuais de CCE lesadas na segunda fileira (F2) da Espira 3.

<b>Grupos</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>Irr+100mg</b>	0,00	2,53	3,90	2,51	2,44
<b>Irr+200mg</b>	0,00	1,05	4,31	2,69	4,40
<b>Irradiação</b>	1,17	3,12	8,13	6,14	8,33

$X^2=3,86$   $p=0,15$

**Tabela 13.** Percentuais de CCE lesadas na terceira fileira (F3) da Espira 3.

Grupos	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	Média	DP
Irr+100mg	1,96	5,13	10,64	6,97	7,48
Irr+200mg	0,65	3,40	9,30	5,27	5,63
Irradiação	6,66	10,16	16,08	11,59	6,89

 $X^2=11,71$   $p=0,002$ **Figura 20.** Espira 3 do grupo Irr com lesões em F2 e F3

#### **5.4. Espira Apical**

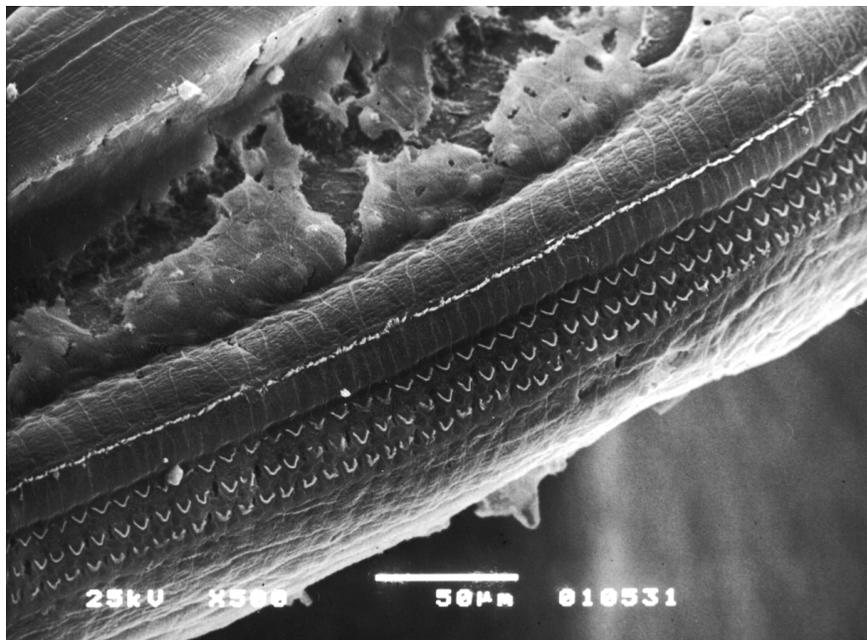
Apesar de não terem sido computadas as células ciliadas externas nessa espira, por dificuldade técnica devido à falta de organização em fileiras individualizadas, todas as cócleas foram inspecionadas e visualmente não mostraram padrões de falhas ou aumento do número de lesões, em nenhum dos três grupos estudados, quando comparados ao padrão apical de normalidade. Vide Figura 21.



**Figura 21.** Espira apical do grupo Irr+100mg com padrão apical normal

### 5.5. Células Ciliadas Internas

As células ciliadas internas não entraram no processo de contagem celular por apresentarem um padrão de distribuição e enfileiramento contínuo, não apresentando formato ciliar de “V” ou “W”, tal como ocorre com as ciliadas externas, o que dificultou a individualização destas células e conseqüentemente a notificação das falhas celulares. Apesar disso, foram observadas em todo o trajeto das cócleas desde a base até o ápice e não apresentaram padrões de falhas que as diferenciasssem do padrão normal para células ciliadas internas. Vide Figura 22.



**Figura 22.** Espira 2 do grupo Irr+100mg com padrão normal de enfileiramento das CCI

## **6- DISCUSSÃO**

---

A perda auditiva induzida pela radiação apesar de ser um assunto da maior relevância quando se trata das complicações e seqüelas do tratamento radioterápico a pacientes portadores de tumor em região de cabeça e pescoço ainda é pouco conhecida nos dias atuais e, de certa forma, pouco prevenida no meio dos profissionais envolvidos com esta modalidade de tratamento. Isso se deve, em parte, a discrepância entre os grandes avanços obtidos com a descoberta de novos esquemas terapêuticos radio e quimioterápicos e a baixa produção científica envolvendo estudos com drogas de potencial radioprotetor para o órgão da audição. Neste particular, o que efetivamente nos motivou a estudar a radioproteção da orelha interna foi o fato de, até o início desse projeto, não termos achado publicado na literatura nenhum trabalho que testasse ou comprovasse o efeito de drogas citoprotetoras das estruturas da orelha interna.

Quanto aos tipos de disacusia induzidos pela radioterapia, é sabido que podem ser condutivas, sensorineurais e mistas.

A perda auditiva condutiva pós-radioterapia, em geral, pode manifestar uma alteração morfo-funcional da orelha externa, orelha média ou ambas (VARGHESE et al., 1996; CHEN et al., 1999). Frequentemente, a hipoacusia condutiva se instala imediatamente após ou no curso do tratamento radioterápico e costuma resolver-se em até 12 meses da sua instalação (KIRKBRIDE et al., 1992).

Na orelha média, o processo patogênico se deve ao efeito dos raios ionizantes sobre as estruturas vasculares, epitélio de revestimento da caixa do tímpano, membrana timpânica e cadeia ossicular (BERG & LINDGREN, 1961; BORSANYI et al., 1961; KELEMEN, 1963). Segundo Elwany (1985), as mudanças no epitélio de revestimento da orelha média resultam na diminuição da massa citoplasmática, disfunção da motilidade ciliar, perda extensa dos cílios, presença de poucas células caliciformes e de glândulas mucoprodutoras neoformadas inativas.

Tais transformações promovem a formação do que Moss (1959) apud Borsanyi et al. (1961) denominou de “*radiation otitis media*” e que foi verificada em três cócleas do nosso estudo que foram excluídas por apresentarem sinais inflamatórios com derrame seroso na orelha média. O motivo da exclusão foi que, em algumas situações, é descrito que o derrame seroso aliado à baixa de defesas na orelha média tende a transformar-se em secreção purulenta, transpor as barreiras das janelas oval e redonda e causar labirintite purulenta (BERG & LINDGREN, 1961; BORSANYI et al., 1961), podendo desta forma potencializar o mecanismo de lesão sensorineural direta da radiação que foi o principal objeto de avaliação deste trabalho.

A perda auditiva sensorineural é, sem dúvida, a mais freqüente complicação auditiva pós-radioterapia descrita na literatura. Ela costuma desenvolver-se pela lesão ao órgão de Corti; contudo, pode em freqüência bem menor refletir uma degeneração do VIII par craniano, visto que as estruturas do sistema nervoso central têm uma maior resistência a essa modalidade de

tratamento (NYLÉN et al., 1960; WINTHER et al., 1969; HULTCRANTZ et al., 1989; SCHOT et al., 1992; ANTEUNIS et al., 1994; LEIGHTON et al., 1997).

Quanto à incidência de disacusia sensorioneural pós-radioterapia, a literatura é bastante divergente com relatos que apontam desde a inexistência de perda auditiva até 75% de incidência de perda auditiva (ANTEUNIS et al., 1994; PAULINO et al., 2000; RAAIJMAKERS & ENGELEN, 2002). Em nosso estudo, as EOAPD foram utilizadas somente na triagem auditiva das cobaias pré-irradiação. As EOAPD não foram repetidas para se fazer a correlação da função auditiva com os achados de microscopia eletrônica de varredura pós-irradiação visto que, os efeitos da radiação na orelha média poderiam interferir no resultado das emissões e conseqüentemente na interpretação dos resultados.

Quanto à dose lesiva para o órgão de Corti, é consenso que quanto maior a dose de radiação na orelha interna, maior é o dano auditivo provocado (BERG & LINDGREN, 1961; WINTHER, 1969; EVANS et al., 1988; TALMI et al., 1989; GRAU et al., 1991; CHEN et al., 1999; JOHANNESSEN et al., 2002). Apesar de estarem diretamente relacionadas, na literatura não foi evidenciada uma correlação linear positiva entre dose de radiação e intensidade da perda auditiva (HONORÉ et al., 2002). Na maior parte dos ensaios clínicos e trabalhos experimentais a dose total de radiação necessária para produzir uma lesão ao sistema auditivo varia entre 3000 e 6000 rad. Pela falta de informações na literatura sobre a dose média lesiva ao órgão de Corti de cobaias albinas, a escolha da dose de 350cGy foi baseada num estudo piloto previamente realizado que avaliou o grau de lesão das células ciliadas externas

---

na irradiação pelo Co60 com três doses distintas (250, 350 e 750cGy). Nesse estudo piloto, a dose de 350cGy foi a que mais lesou as células ciliadas externas e não atingiu a dose letal mínima para irradiação em cobaias.

A perda da audição após a radioterapia pode se instalar de forma imediata ou tardia, ser súbita ou rapidamente progressiva (GRAU et al., 1991; SATALOFF & ROSEN, 1994; YOUNG & LOU, 1999). Para se compreender as diferentes evoluções das perdas auditivas pós-radioterapia e classificá-las de acordo com o tempo de instalação, é necessário o conhecimento de duas formas de agressão orgânica pela radioterapia.

A complicação imediata resulta, em geral, da injúria celular direta pela radiação sobre estruturas do órgão de Corti e o endotélio da estria vascular (ADLER et al., 1985). No plano vascular, irão predominar alterações reversíveis que incluem o edema da camada íntima, ruptura vascular e hemorragia para tecidos adjacentes (HOISTAD et al., 1998; GIBB & LOH, 2000). No órgão de Corti, as primeiras alterações surgem nos núcleos das células ciliadas externas que se tornam picnóticos, cerca de 3 horas após a irradiação, podendo evoluir para degeneração completa das células (WINTHER, 1969).

Já os efeitos tardios costumam ocorrer pela ação indireta da radiação sobre os vasos da orelha interna, gerando o processo de endoarterite obliterante, que progressivamente interrompe o aporte sangüíneo a estruturas vitais como o neuroepitélio da cóclea e o VIII par craniano (TALMI et al., 1989; VARGHESE et al., 1996; YOUNG & LOU, 1999). Esse processo pode se estender por muitos anos e reduzir substancialmente o número de capilares, limitando o aporte sangüíneo e, conseqüentemente, o suprimento de oxigênio e

---

nutrientes às estruturas da orelha interna (WINTHER, 1969; SMOUHA & KARMODY, 1995). Paralelamente, a estria vascular em resposta à lesão sofrida pela radiação, torna-se mais permeável causando indiretamente um aumento na pressão do espaço endolinfático (FONG et al., 1995). Com isso fica instalado o processo de hidropsia endolinfática que, em curto prazo, pode distender todo o sistema endolinfático causando deslocamentos e deformidades nas estruturas do labirinto membranoso (KELEMEN, 1963; GAMBLE, 1968).

Em nosso trabalho buscou-se produzir uma perda auditiva imediata nas cobaias que foram sacrificadas no período de 30 dias após a irradiação. A escolha do tempo de sacrifício foi baseada no mesmo estudo piloto anteriormente descrito que avaliou três diferentes tempos de sacrifício (10, 20 e 30 dias) e que elegeu o trigésimo dia pelo maior grau de lesão das CCE.

Com referência à faixa de freqüências mais atingida, a maioria concorda que na deficiência auditiva sensorineural, as freqüências graves e médias, em especial as da fala, raramente estão comprometidas. Já os tons agudos, os mais afetados, a radiação compromete principalmente as freqüências de 4000 a 8000Hz (SCHOT et al., 1992). Dentro desse intervalo, 4000Hz é a freqüência isolada mais atingida com a radioterapia e pode até ser usada como indicador preditivo para queda nas demais (BORSANYI et al., 1961; SCHELL et al., 1989). Os nossos achados apontaram para a lesão preferencialmente ocorrendo nas segunda e terceira espiras, com a preservação da espira basal e apical. Na comparação do grau de lesão entre a E2 e E3 notou-se que a mediana dos percentuais de lesão foi superior na terceira espira ultrapassando

---

o dobro da que ocorrera na segunda espira. Esses resultados coincidem com os achados da literatura e está de acordo com a topografia coclear correspondente à faixa de frequência da audição que é mais comprometida. Esse mecanismo de seletividade para as espiras e conseqüentemente para as frequências auditivas mais atingidas ainda não está bem esclarecido, porém é provável que se deva ao maior consumo de oxigênio e à maior atividade metabólica existente nas células ciliadas e estria vascular mais próximas da base da cóclea (WINTHER, 1969; FONG et al., 1995; HO et al., 1999).

Outro dado que também pudemos observar foi que houve uma tendência a um aumento dos percentuais de células lesadas nas segunda e terceira espiras, principalmente nas duas últimas fileiras mais externas, com preservação da primeira e mais interna. Este fato curioso, porém também notado em outros estudos experimentais envolvendo a radioterapia é evidenciado, segundo alguns autores, por diferenças anatômicas e de constituição bioquímica de cada setor de células ciliadas em particular. Tais diferenças se baseiam nas concentrações de enzimas oxidantes das espiras, níveis de consumo de oxigênio na estria vascular, número de células ciliadas externas em cada espira, distribuição de terminações nervosas, níveis de glicogênio presentes nas células, porcentagem de enzimas oxidantes, dentre outras. Essas particularidades estruturais e de concentração de metabólitos dos diversos grupos celulares da cóclea apontam para diferentes níveis de consumo energético entre as células. Deste modo, as células que estão em setores de maior fragilidade metabólica são as que primeiro sofrem quando o

---

aporte sangüíneo, por qualquer motivo, é restringido (WINTHER, 1969; KIM & SHIN, 1994).

Com relação aos equipamentos utilizados na teleterapia, é importante ressaltar que, na literatura, pouca importância se deu à possibilidade de existirem diferenças quanto ao potencial de lesão ao sistema auditivo de cada aparelho. Outrossim, entre os dois equipamentos mais utilizados em radioterapia de cabeça e pescoço, a cobaltoterapia mostrou-se mais lesiva e piorou significativamente a audição dos pacientes comparados aos que foram irradiados com o acelerador linear (SILVEIRA, 1998). Esse achado foi determinante para a escolha do Co60 para irradiação das cobaias do nosso estudo.

No tocante à radioproteção das estruturas do aparelho auditivo, a maioria dos trabalhos aponta para avanços no campo do desenvolvimento de técnicas terapêuticas que visam a minimizar os efeitos da radiação sobre estruturas saudáveis vizinhas ao tumor, em particular a orelha interna. Programas de planejamento computadorizados em 3D têm sido empregados e aumentaram a precisão em delimitar os tumores ou órgãos alvos. Fontes de energia tipo prótons têm se mostrado superior aos fótons, chegando a excluir em 40% o osso temporal dos efeitos da radiação (LIN et al., 2000). A radioterapia de intensidade modulada (IMRT) é uma das inovações que utiliza milhares de feixes milimétricos de radiação de extrema precisão, aumentando a concentração da dose no tumor, limitando os seus efeitos sobre a orelha interna. HUANG et al. (2002), utilizando a IMRT, conseguiram reduzir em até

32% a dose cumulativa da radiação na orelha interna e, conseqüentemente, os efeitos da radioterapia sobre a audição.

No tocante ao emprego de drogas otoprotetoras na radioterapia, nota-se quase a inexistência de trabalhos abordando este tema. Atlas et al. (2006) em um trabalho original conseguiram reduzir os danos cocleares induzidos pela radiação no gânglio espiral, estria vascular, células ciliadas internas e externas de cobaias que foram tratadas com piracetam uma hora antes da irradiação na dose de 60Gy. Os autores concluíram que a proteção pelo piracetam ocorreu pelo mecanismo de inibição da apoptose celular que essa droga promove de maneira seletiva nos tecidos sadios irradiados que se encontram adjacentes ao sítio tumoral.

Outra droga largamente utilizada no combate aos efeitos adversos da radioterapia e quimioterapia nos tecidos sadios atingidos com a terapia anti-neoplásica é a amifostina. Trata-se de um citoprotetor, de baixa toxicidade, com efeito seletivo em tecidos normais desenvolvida pelo Water Reed Army Institute no final da década de 50 para proteção contra os efeitos adversos da radiação em combatentes numa possível guerra nuclear. Desde então, a Amifostina passou a fazer parte de linhas de pesquisa envolvendo drogas capazes de proteger tecidos normais dos efeitos tóxicos dos agentes anti-neoplásicos e da radiação, sem interferir nos mecanismos de destruição das células tumorais.

A amifostina é uma pró-droga que é convertida pela fosfatase alcalina na superfície da membrana plasmática na molécula sulfidril livre WR-1065. O WR-1065 é metabolizado por oxidação na molécula simétrica disulfide (WR-

33278) ou compostos disulfides. O WR-1065 interage com radicais livres doando íons hidrogênio que se ligam às moléculas de oxigênio e aos metabólitos ativos dos agentes anti-neoplásicos (CAPIZZI & OSTER, 2000). Não são conhecidos e nem descritos efeitos ototóxicos deste anti-oxidante, mesmo assim, neste trabalho foi criado um grupo controle negativo (amifostina) que recebeu a droga na dose de 200mg/kg de maneira isolada, e que também foi sacrificado 30 dias após a aplicação da droga. Nesse grupo não foi observado nenhum grau de lesão nas células ciliadas internas ou externas em nenhuma das quatro espiras estudadas do órgão de Corti.

Na quimioterapia o WR-1065 inativa diretamente os agentes neoplásicos prevenindo a alquilação do ácido nucléico, servindo como sítio nucleofílico para se ligar com íons carbono com carga. Os íons carbono estão associados tanto com os efeitos terapêuticos quanto tóxicos da quimioterapia.

Na literatura, a maioria dos trabalhos aponta a amifostina como um eficiente citoprotetor na hematotoxicidade da ciclofosfamida e carboplastina, na neurotoxicidade, nefrotoxicidade, hematotoxicidade e ototoxicidade da cisplatina. (LIST et al., 1998; CALHOUN & BENNET, 1999; HUSSAIN et al., 2003; STOLARSKA et al., 2006) Glover et al. (1984) estudaram o efeito da amifostina na orelha interna de pacientes que receberam quimioterapia pela cisplatina e constataram otoproteção em 18 pacientes que receberam o citoprotetor 15 a 20 minutos antes da infusão lenta do quimioterápico na dose de 50 a 120mg/m<sup>2</sup>. Perda auditiva transitória e disacusia moderada persistente foram notadas em apenas 30% dos pacientes recebendo cisplatina na dose de 150mg/m<sup>2</sup>. Hyppolito et al. (2005) compararam o numero de células ciliadas externas

lesadas e o comportamento das EOAPD em cobaias tratadas com e sem amifostina e que receberam a cisplatina na dose de 8mg/kg dia durante três dias. Concluíram que a perda de células ciliadas externas ocorrida no grupo que só recebeu a cisplatina não se repetiu nos dois outros grupos tratados somente com amifostina 100mg/kg e cisplatina precedida de amifostina na mesma dose citada anteriormente. O mesmo ocorreu com as emissões otoacústica que chegaram a estar 100% ausentes no grupo pós-cisplatina e 100% presentes no grupo cisplatina precedida da amifostina.

Na radioterapia, vários estudos mostram que WR-1065 protege várias linhagens celulares dos efeitos da radiação. A ligação sulfur-hidrogênio do WR-1065 pode quebrar-se facilmente para doar íons hidrogênio e ajudar no reparo de ligações moleculares danificadas evitando os danos celulares. A habilidade do WR-1065 em procurar por radicais livres protege os tecidos normais contra os efeitos adversos imediatos e tardios da radioterapia. A amifostina já foi testada amplamente e mostrou ser efetiva na radioproteção da medula óssea reduzindo os índices de hematotoxicidade minimizando a trombocitopenia, anemia e leucopenia (CAPIZZI, 1996; LIST et al., 1998; STOLARSKA et al., 2006). Em tumores de cabeça e pescoço, os autores acreditam que a amifostina possa reduzir a radiotoxicidade às glândulas salivares, mucosa esofágica e da cavidade oral, minimizando os efeitos adversos da mucosite e xerostomia que comprometem substancialmente a qualidade de vida dos pacientes pós-irradiados (WASSERMAN, 1994; KONINGS et al., 2005; KOUKOURAKIS & DANIELIDIS, 2005; BUENTZEL et al., 2006). Em nosso estudo ficou evidente que a amifostina protegeu de maneira significativa os

---

grupos Irr+100mg e Irr+200mg que receberam a droga pela via intra-peritoneal 30 minutos antes da irradiação da orelha interna, porém não se observou diferença significativa de proteção apenas com a variação da dose de 100 para 200mg/kg. Essa proteção foi visivelmente marcada nas proporções de células ciliadas lesadas e representou uma redução de até 40% dos percentuais de lesão nas CCE dos grupos que receberam a amifostina, segundo os valores percentuais das medianas. Essa redução, provavelmente se deveu às diferenças de lesão ocorridas na segunda e terceira espiras que, na comparação entre os grupos apontou para uma redução no percentual de lesão estatisticamente significativa ocorridas nos grupos Irr+100mg e Irr+200mg quando comparados ao grupo Irr. Na comparação dos percentuais de lesão da espira basal entre os grupos, não houve diferença significativa de lesão em nenhum dos três grupos. Isso pode ser explicado pelo baixo nível de lesão ocorrida pela radiação neste setor da cóclea em particular.

Quando comparados os grupos em termos de fileiras, apenas a primeira fileira da E2 e a terceira fileira da E3 mostraram valores inferiores e estatisticamente significantes de lesão ciliada nos grupos Irr+100mg e Irr+200mg. Esse, sem dúvida, é um achado do nosso trabalho que, por não ter sido publicado anteriormente na literatura, mereceria aguardar novos experimentos para se verificar se foi um fenômeno casual ou uma especificidade para a droga utilizada.

A radioproteção da amifostina teria pouco benefício se ela se estendesse também aos tecidos malignos interferindo no controle do crescimento tumoral. A proteção seletiva da amifostina fica evidente pelo fato

---

de o WR-1065, seu principal metabólito ativo, estar presente em altas concentrações apenas em tecidos normais e pouco concentrada em tecidos tumorais. Isso se explica, pois a amifostina é absorvida nos tecidos normais por transporte ativo enquanto a absorção tumoral da droga é por difusão passiva. Calabro-Jones et al. (1985) sugeriram que a absorção da amifostina é precedida da defosforilação do WR-1065 que só então é passivamente transportado para dentro das células normais e malignas. Para explicar as diferenças de concentração do WR-1065 nos tumores e tecidos normais, esses autores atribuíram o fato às diferenças de defosforilação e à absorção existentes entre esses dois tecidos.

De maneira geral, três fatores têm sido sugeridos para explicar a absorção preferencial da amifostina pelos tecidos normais: a atividade reduzida da fosfatase alcalina em células tumorais, o grau de isquemia dos tumores e a absorção do WR-1065 pH-dependente. A fosfatase alcalina é uma enzima de superfície celular presente em altas concentrações nos capilares e arteríolas. Desde que os tumores são pobremente vascularizados, as células tumorais têm pouca concentração desta enzima de superfície, além disso, o WR-1065 necessita de pH entre 6.6 e 8.2 para ser absorvido nos tecidos, fato que não acontece nos tumores que predominantemente mantêm pH inferior a esses, fruto da grande atividade anaeróbica que desenvolvem as suas células. Portanto, a baixa absorção da amifostina em células tumorais se deve a habilidade limitada dessas células de convertê-la em droga ativa e a necessidade de pH ideal requerida pelo WR-1065 para sua absorção. Em nosso trabalho a escolha da amifostina foi baseada em aspectos relacionados

ao seu mecanismo seletivo de proteção aos tecidos normais dos efeitos deletérios da radioterapia, bem como da falta de estudos testando essa droga na citoproteção das estruturas do órgão de Corti, em particular as células ciliadas externas.

Apesar do resultado ser considerado positivo nesse trabalho acredita-se que ele deva servir principalmente como um estímulo a outros mais que deverão surgir inclusive testando o efeito da amifostina nas complicações tardias da irradiação no órgão de Corti. Isso se faz necessário para que, num futuro bem próximo, se possa oferecer aos nossos pacientes além de uma maior sobrevida, uma qualidade de vida melhor proporcionada pela preservação de seus limiares auditivos.

## **7- CONCLUSÕES**

---

1. A amifostina utilizada previamente à irradiação da orelha interna protegeu significativamente as células ciliadas externas do órgão de Corti de Cobaias irradiadas em região de cabeça e pescoço pelo Cobalto 60, na dose de 350cGy.
  
2. A amifostina protegeu de maneira significativa a lesão pela irradiação na segunda e terceira espiras da cóclea, fato que não se repetiu na espira basal. Apenas a primeira fileira da segunda espira e a terceira fileira da terceira espira mostraram valores significativamente inferiores de lesão ciliada nos grupos que receberam o citoprotetor.
  
3. Não houve diferença significativa na resposta protetora das células ciliadas externas quando se aumentou a dose da amifostina de 100mg para 200mg/kg.

## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ADLER, M.; HAWKE, M.; BERGER, G.; HARWOOD, A. Radiation effect on the external auditory canal. *J. Otolaryngol.*, 14: 226-32, 1985.

ANTEUNIS, L.J.C.; HENDRIKS, J.J.T.; MANNI, J.J. A prospective longitudinal study on radiation-induced hearing loss. *Am. J. Surg.*, 168: 408-11, 1994.

ATLAS, E.; ERTEKIN, M.V.; KUDUBAN, O.; GUNDOGDU, C.; DEMIRCI, E.; SUTBEYAZ, Y. Effects of piracetam supplementation on cochlear damage occurring in guinea pigs to irradiation. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(7): 1460-1465, 2006.

BERG, N.O & LINDGREN, M. Dose factors and morphology of delayed radiation lesions of the internal and middle ear in rabbits. *Acta Radiol.*, 56: 305-19, 1961.

BORSANYI, S.; BLANCHARD, C.L.; THORNE, B. The effect of ionizing radiation on the ear. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 70: 255-62, 1961.

BUENTZEL, J.; MICKE, O.; ADAMIETZ, I.A.; MONNIER, A.; GLATZEL, M.; VRIES, A. Intravenous amifostine during chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: a randomized placebo controlled phase III study. *Int. J. Oncol. Biol. Phys.*, 64(3): 684-91, 2006.

---

CALABRO-JONES, P.M.; FAHEY, R.C.; SMOLUK, G.D.; WARD, J.F. Alkaline phosphatase promotes radioprotection and accumulation of WR-1065 in V79-171 cells incubated in medium containing WR-2721. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 47: 23-7, 1985.

CALHOUN, E.A. & BENNET, C.L. Pharmacoeconomics of amifostine in ovarian cancer. *Semin Oncol*, 26(Suppl 7): 102-107, 1999.

CAPIZZI, R.L. Amifostine: The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapy. *Semin Oncol.*, 23(Suppl 8): 2-17, 1996.

CAPIZZI, R.L. & OSTER, W. Chemoprotective and radioprotective effects of amifostine: an update of clinical trials. *Int J Hematol.*, 72: 425-35, 2000.

CHEN, W.; LIAO, C.; WANG, C.; TSAI, H.; TANG, S.G.; YEH, J.; HONG, J. Radiation-induced hearing impairment in patients treated for malignant parotid tumor. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 108: 1159-64, 1999.

COSTA, R.N. Amifostina: começo de uma nova era do tratamento oncológico? *Rev. Bras. Med.*, 54: 210-214, 1997.

ELWANY, S. Delayed ultra structural radiation induced changes in the human mesotympanic middle ear mucosa. *J. Laryngol. Otol.*, 99: 343-53, 1985.

EVANS, R.A.; LIU, K.C.; AZHAR, T.; SYMONDS, R.P. Assessment of permanent hearing impairment following radical mega voltage radiotherapy. *J. Laryngol. Otol.*, 102: 588-9, 1988.

FONG, R.S.; BESTE, D.J.; MURRAY, K.J. Pediatric sensorineural hearing loss after temporal bone radiation. *Am. J. Otol.*, 16: 793-6, 1995.

GAMBLE, J.E.; PETERSON, E.A.; CHANDLER, J.R. Radiation effects on the inner ear. *Arch. Otolaryngol.*, 88: 64- 9, 1968.

GIBB, A.G. & LOH, K.S. The role of radiation in delayed hearing loss in nasopharyngeal carcinoma. *J. Laryngol. Otol.*, 114: 139- 44, 2000.

GLOVER, D.; NEGENDANK, W.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; GLICK, J.H. Alterations in oxygen transport following WR-2721. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 10(9): 1565-8, 1984.

GRAU, C.; MÖLLER, K.; ELBRÖND, O.; OVERGAARD, M. OVERGAARD, J. Sensory-neural hearing loss in patients treated with irradiation for nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 21: 723-8, 1991.

HO, W.K.; WEI, W.I.; KWONG, D. AM, J.S.T.; TAI, P.H.; YUEN, A.P.W.; AU, D.K.K. Long-term sensorineural hearing deficit following radiotherapy in

---

patients suffering from nasopharyngeal carcinoma: a prospective study. *Head Neck*, 21: 447-53, 1999.

HOISTAD, D.; ONDREY, F.G.; MUTLU, C.; SCHACHERN, P.A.; PAPARELLA, M.M.; ADAMS, G. Histopathology of human temporal bone after cis-platinum, radiation, or both. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 118: 825-32, 1998.

HONORÉ, H.B.; BENTZEN, S.M.; MOLLER, K.; GRAU, C. Sensori-neural hearing loss after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma: individualized risk estimation. *Radiother. Oncol.*, 65: 9-16, 2002.

HUANG, E.; TEH, B.S.; STROTHER, D.R.; DAVIS, Q.G.; CHIU, J.K.; LU, H.H.; CARPENTER, L.S.; MAI, W.Y.; CHINTAGUMPALA, M.M.; SOUTH, M.; GRANT, W.H.; BUTLER, E.B.; WOO, S.Y. Intensity-modulated radiation therapy for pediatric medulloblastoma: early report on reduction of ototoxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 52: 599-605, 2002.

HULTCRANTZ, M.; ANNIKO, M.; BORG, E. The influence of prenatal gamma irradiation on the ageing of the cochlea. *Acta Otolaryngol.*, 108: 414-23, 1989.

HUSSAIN, A.E.; BLAKLEY, B.W.; NICOLAS, M. ; BALDERSTON, J. Assessment of the effects of amifostine against cisplatin-induced toxicity. *J. Otolaryngol.*, 32(5): 294-7, 2003.

---

HYPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, J.A.; LESSA, R.M.; ROSSATO, M. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de varredura. *Rev Bras Otorrinolaringol.*, 71(3) 268-273, 2005.

JERO, J.; COLING, D.E; LALWANI, A.K. The use of preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. *Acta Otolaryngol.*, 121(5): 586-9, 2001.

JOHANNESEN, T.B.; RASMUSSEN, K.; WINTHER, F.O.; HALVORSEN, U.; LOTE, K. Late radiation effects on hearing, vestibular function and taste in brain tumor patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 53: 86-90, 2002.

KELEMEN, G. Radiation and ear, experimental studies. *Acta Otolaryngol. Suppl.*, 184: 1-45, 1963.

KIM, C.S. & SHIN, S.O. Ultrastructural changes in the cochlea of the guinea pig after fast neutron irradiation. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 110: 419-27, 1994.

KIRKBRIDE, P.; LIU, F.F.; WAX, M.M. A pilot study in patients treated for malignant parotid tumors. *Br. J. Radiol.*, 65: 833-5, 1992.

KONINGS, A.W.; FABER, H.; VISSINK, A.; COPPES, R.P. Radioprotective effect of amifostine on parotid gland functioning is region dependent. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 63(5): 1584-91, 2005.

---

KOUKOURAKIS, M.I. & DANIELIDIS,V. Preventing radiation induced xerostomia. *Cancer. Treat. Rev.*, 31(7): 546-54, 2005.

LEIGHTON, S.E.J.; KAY, R.; LEUNG, S.F.; WOO, J.K.S.; HASSELT, C.A.V. Auditory brainstem responses after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Otolaryngol.*, 22: 350-4, 1997.

LIN, R.; HUG, E.B.; SCHAEFER, R.A.; MILLER, D.W.; SLATER, J.M.; SLATER, J.D. Conformal proton radiation therapy of the posterior fossa: a study comparing protons with three-dimensional planned photons in limiting dose to auditory structures. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 48: 1219-26, 2000.

LIST, A.F.; HEATON, R.; GLINSMANN, G.B. Amifostine protects primitive human hematopoietic progenitors against cytotoxicity from diverse antineoplastics. *Proc. Am.Soc.Clin Oncol.*, 15: 448-50, 1996.

LIST, A.F.; HEATON, R.; GLINSMANN G.B.; CAPIZZI, R.L. Amifostine stimulates formation of multipotent and erythroid bone marrow progenitors. *Leukemia*, 12: 1590-1602, 1998.

NYLÉN, C.O.; ENGFELDT, B.; LARSSON, B. The effect of irradiation of the labyrinth in the rat with ionizing particles. *Acta Otolaryngol. Suppl.*, 158: 217-8, 1960.

---

ONDREY, F.G.; GREIG, J.R.; HERSHER, L. Radiation dose to the otologic structures during head and neck cancer radiation therapy. *Laryngoscope*, 110: 217-21, 2000.

PATT, H.M.; TYREE, E.B.; STRAUBE, R.L. Cysteine protection against X irradiation. *Science*, 110:213-214, 1949.

PAULINO, A.C.; SIMON, J.H.; ZHEN, W.; WEN, B. Long-term effects in children treated with radiotherapy for head and neck rhabdomyosarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 48: 1489-95, 2000.

RAAIJMAKERS, E. & ENGELEN, A.M. Is sensorineural hearing loss a possible side effect of nasopharyngeal and parotid irradiation? A systematic review of the literature. *Radiother. Oncol.*, 65: 1-7, 2002.

SATALOFF, R.T. & ROSEN, D.C. Effects of irradiation on hearing acuity: a review of the literature. *Am. J. Otol.*, 15: 772-80, 1994.

SHELL, M.J.; McHANEY, V.A.; GREEN, A.A.; KUN, L.E.; HAYES, F.A.; HOROWITZ, M.; MEYER, W.H. Hearing loss in children and young adults receiving cisplatin with or without prior cranial irradiation. *J. Clin. Oncol.*, 7: 754-60, 1989.

---

SCHOT, L.J.; HILGERS, F.J.M.; KEUS, R.B.; SCHOUWENBURG, P.F.; DRESCHLER, W.A. Late effects of radiotherapy on hearing. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 249: 305-8, 1992.

SILVEIRA, E.G.C. Avaliação da audiometria tonal limiar em pacientes portadores de tumores de cabeça e pescoço antes e após a irradiação do osso temporal. São Paulo, 1998. (Tese - Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

SMOUHA, E.E & KARMODY, C.S. Non- osteitic complications of therapeutic radiation to the temporal bone. *Am. J. Otol.*, 16 : 83-7, 1995.

STOLARSKA, M.; MLYNARSKI, W.; ZELEWSKA-SZEWCZYK, B.; BOBALSKI, J. Cytoprotective effect of amifostine in the treatment of childhood neoplastic diseases-a clinical study including the pharmacoeconomic analysis. *Pharmacol. Rep.*, 58: 30-34, 2006.

TALMI, Y.P; FINKELSTEIN, Y.; ZOHAR, Y. Post irradiation Hearing loss. *Audiology.*, 28: 121-6, 1989.

VARGHESE, G.; SAHOTA, J.S.; HAZARIKA, P.; RAJASHEKAR, B. Hearing anomalies following radiation therapy for head and neck cancers. *Indian J. Exp. Biol.*, 34: 878-9,1996.

WASSERMAN, H.T. Radiotherapeutic Studies With Amifostine. *Semin Oncol.*, 5(suppl 11): 21-25, 1994.

WINTHER, F.O. X Ray irradiation of the inner ear of the guinea pig, early degenerative changes in the cochlea. *Acta Otolaryngol.*, 68: 98-117, 1969.

YOUNG, Y. & LOU, P. Post-irradiation sudden deafness. *J. Larygol. Otol.*, 113: 815-17, 1999.

**ANEXO**

---



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



## **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° 043/2005, sobre o projeto intitulado “*O efeito citoprotetor da amifostine na orelha interna irradiada: estudo experimental*” sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Antonio Aparecido de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **27 de março de 2006**.

(We certify that the protocol n° 043/2005, about “*The inner ear radiation protection by amifostine: experimental studies*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 03/27/2006 meeting).

Ribeirão Preto, 27 de março de 2006.

**Prof. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI**  
Vice-Presidente da Comissão  
de Ética em Experimentação Animal

Anexo

---

## **ANEXO DE PUBLICAÇÃO**

---

## Análise do Efeito Citoprotetor da Amifostina na Orelha Interna Irradiada de Cobaias: Estudo Experimental

Lessa, Ricardo M. \*, Oliveira, José A. A\*\*, Rossato, Maria\*\*\*.

\*Médico Assistente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

\*\*Professor Titular do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

\*\*\*Técnica de laboratório do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

Trabalho desenvolvido no Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. Endereço para correspondência: Hospital das Clínicas da USP-Ribeirão Preto, 12 andar, Av dos Bandeirantes, 3900, Campus Universitário. Monte Alegre. Cep: 14048-900. Ribeirão Preto - São Paulo. E-mail: rmlessa@terra.com.br.

## RESUMO

**Introdução:** A irradiação pode causar lesão de graus variados na orelha interna podendo provocar surdez sensorineural e inclusive levar à anacusia. A amifostina é uma substância citoprotetora seletiva de tecidos saudáveis, amplamente utilizado durante a radio e quimioterapia de tumores malignos, especialmente os localizados em região de cabeça e pescoço. Nessa localização é descrito que a amifostina pode reduzir a radiotoxicidade nas glândulas salivares, mucosa esofágica e cavidade oral normais, diminuindo a incidência de mucosite e minimizando os efeitos adversos da xerostomia.

**Objetivo:** Verificar o efeito antioxidante e radioprotetor da amifostina no órgão de Corti de cobaias albinas irradiadas em região de cabeça e pescoço.

**Material e Método:** O estudo realizado envolveu três grupos de animais: Um grupo foi submetido à lesão imediata de células ciliadas pela irradiação em dose única de 350cGy e outros dois passaram pelo mesmo procedimento, porém receberam doses de 100 e 200mg/kg de amifostina 30 minutos antes da irradiação. Todas as cobaias foram sacrificadas 30 dias após o experimento e suas bulas retiradas para estudo em microscópio de varredura. Durante a microscopia de varredura foi realizada a contagem de células ciliadas externas lesadas e obtido os percentuais de lesão em cada espira da cóclea das cobaias, de cada grupo isoladamente. **Conclusão:** O grau de lesão das células ciliadas externas foi menor nos dois grupos que receberam a amifostina que no grupo apenas irradiado. Essa diferença ocorreu principalmente nas segundas e terceiras espiras das cócleas onde a diferença foi estatisticamente significativa.

Não foi encontrada diferença de proteção entre os grupos que receberam doses de 100 e 200mg/kg de amifostina.

## Introdução

A radioterapia constitui uma das formas de tratamento mais utilizada nos tumores malignos localizados na região da cabeça e pescoço. O seu mecanismo de ação sobre as células cancerígenas se baseia na desestruturação da seqüência de seus nucleotídios, desta forma, modificando as moléculas, proteínas e DNA (ácido desoxirribonucléico) das células, comprometendo o seu metabolismo e o mecanismo de divisão celular, impedindo assim, o crescimento tumoral.

Um dos grandes inconvenientes da radioterapia em cabeça e pescoço é fato de o osso temporal e as estruturas da orelha interna se encontrarem no campo de irradiação da maioria dos tumores, tal como ocorre nos tumores da rinofaringe, onde o aparelho auditivo pode ser inevitavelmente envolvido no campo de irradiação e o paciente poder evoluir com de perda auditiva de variados graus de intensidade, podendo inclusive tornar-se anacúsico<sup>1</sup>.

Ao atingir o órgão vestibulococlear, distúrbios auditivos e do equilíbrio podem surgir; dentre eles, a perda auditiva sensorineural é a complicação mais comum e está em maior freqüência associada à lesão e perda de células ciliadas externas do órgão de Corti<sup>2-9</sup>.

Muitos esforços têm sido feitos na tentativa de minimizar ou neutralizar a ação da irradiação na orelha interna, porem os maiores avanços têm sido notados apenas no campo do desenvolvimento de novas técnicas e equipamentos emissores de radiação e fontes de energia tipo prótons, os quais têm reduzido os efeitos da radiação sobre o órgão auditivo<sup>10,11</sup>.

---

Poucos estudos na literatura buscaram descobrir drogas citoprotetoras contra os efeitos lesivos da radiação em tecidos normais irradiados. Uma das principais drogas em evidência no momento, pela sua baixa toxicidade e por se tratar de um potente citoprotetor seletivo de tecidos normais contra os efeitos adversos da radioterapia é a amifostina. Trata-se de uma pró-droga, o WR-2721, um análogo da cisteína que após a administração sofre desfosforilação pela fosfatase alcalina presente nos tecidos transformando-se em seu metabólito ativo, o WR-1065, um tiol. O WR-1065, como os outros tióis endógenos, exerce o seu efeito quimio e radioprotetor através do bloqueio de radicais livres, doação de hidrogênio e inativação de radicais reativos<sup>12</sup>.

A amifostina já foi amplamente testada e mostrou efeito citoprotetor na hematotoxicidade da ciclofosfamida e carboplastina, na neurotoxicidade, nefrotoxicidade, hematotoxicidade e ototoxicidade da cisplatina e na hematotoxicidade e toxicidade mucosa da radioterapia<sup>13-15</sup>. Quando se trata de citoproteção da orelha interna contra os efeitos lesivos da radioterapia praticamente inexistem trabalhos que abordem esse tema.

O objetivo deste estudo foi verificar se a amifostina, administrada nas doses de 100 e 200mg/Kg previamente a radiação da orelha interna na dose de 350cGy, desempenha função citoprotetora na orelha interna e se, existindo essa proteção, ela se faz de forma diferenciada e seletiva privilegiando determinadas espiras ou grupos de células ciliadas dentro de uma mesma espira.

## Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e envolveu 51 cobaias albinas, do sexo masculino pesando entre 300 e 450g, todas oriundas do biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e que passaram na triagem auditiva pelo reflexo de Preyer positivo<sup>19</sup> e presença de Emissões otoacústicas – produtos de distorção previamente ao início do estudo realizados em equipamento da marca ILO 92 CAE System Otodynamics LTD e a intensidade do estímulo desencadeante foi de 70dB NPS tanto para F1 quanto para F2, seguindo a relação de frequências 2F1-F2 com proporção F1:F2 = 1,22 e resolução dois pontos por oitava.

Os animais foram divididos em quatro grupos distintos a saber: Grupo amifostina - composto de quatro animais, recebeu isoladamente amifostina na dose de 200mg/Kg de peso e serviu com um controle negativo do experimento, uma vez que não se encontra descrito na literatura nenhum efeito ototóxico dessa droga; Grupo Irradiação (Irr) – formado por 11 cobaias que receberam apenas a irradiação na região de cabeça e pescoço na dose de 350cGy simetricamente em cada orelha; Grupo amifostina 100mg+Irradiação (Irr+100mg)– composto de 18 cobaias que receberam amifostina na dose de 100mg/kg de peso 30 minutos antes da irradiação na dose de 350cGy; Grupo amifostina 200mg+Irradiação (Irr+200mg) – composto de 18 cobaias que receberam amifostina na dose de 200mg/kg de peso 30 minutos antes da irradiação na dose de 350cGy. Todos os grupos permaneceram no laboratório de cirurgia experimental do Hospital das Clínicas da USP-RP atendendo as

---

exigências de alimentação e confinamento preconizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sendo sacrificados 30 dias após a data do experimento.

O método utilizado para comparação do grau de lesão do órgão de Corti foi a contagem das células ciliadas externas que se encontravam ausentes nas três fileiras de três espiras da cóclea: basal, E2, E3. O parâmetro para classificação de lesão considerado foi a ausência total de cílios, ou seja, a perda completa da projeção filamentar dos cílios sobre a placa cuticular. O local escolhido para contagem das células foi o seguimento médio de cada espira obtendo-se o maior número de células possível dentro de um campo microscópico fotográfico a um aumento de 350 a 700 vezes. Todas as espiras foram fotografadas e os negativos revelados para posterior processo de análise. Os números resultantes desta contagem celular foram transformados em frações do número total de células ausentes dividido pela população total de células daquele campo fotográfico analisado.

Para a comparação entre os grupos de estudo foram feitas três análises: a primeira comparou o percentual de células lesadas entre os grupos (Irr, Irr+100mg e Irr+200mg) levando-se em consideração o percentual do somatório de células ciliadas externas lesadas nas três espiras (Basal, E2 e E3) de cada grupo; a segunda comparou o percentual de células ciliadas externas lesadas em cada espira (Basal, E2 e E3) entre os três grupos estudados; a terceira comparou o percentual de células ciliadas externas lesadas em cada fileira (F1, F2 e F3) entre os três grupos.

Os resultados então foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa Statistical Package for Social Sciences – (SPSS). Na comparação dos valores entre os três grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com teste post hoc de Dunn quando verificado a existência de diferença significativa. Para esta análise estatística foi adotado como nível de significância um valor de  $p \leq 0,05$ .

## **Resultados**

O presente trabalho envolveu um total de 51 cobaias, sendo que ocorreram sete mortes, dessas; duas foram do grupo Irr+200mg, quatro do grupo Irr+100mg, e uma do grupo amifostina. Todas as mortes ocorreram por conta de diarreia de provável causa viral. Das 44 cobaias restantes resultaram 88 cócleas, sendo que no final do estudo foram computadas apenas 84, pois três cócleas foram excluídas do trabalho, pois as cobaias apresentaram sinais de inflamação/infecção na orelha média e 1 cóclea foi perdida por ficar extremamente danificada após a sua dissecação.

### **3.1 Comparação do percentual do total de CCE entre os grupos**

Na comparação dos totais de CCE lesadas em cada grupo do estudo observou-se que, no grupo Irr o percentual total de lesões das CCE foi significativamente maior que nos grupos Irr+100mg e Irr+200mg, que se equivaleram (Figura 1) (Tabela 1).

### **3.2. Comparação do percentual de células ciliadas externas lesadas em cada espira (basal, E2 e E3) entre os grupos**

#### *3.2.1. Espira Basal*

Na espira basal quase não foram observadas lesões em nenhum dos 3 grupos estudados e quando elas ocorreram foram de forma isolada e inconstante. Aplicando-se o teste estatístico não houve diferença significativa entre os grupos que receberam amifostina (100mg/kg e 200mg/kg) antes da irradiação e o que foi irradiado isoladamente na dose de 350cGy (Figura 2 e 3) (Tabela 2).

#### *5.2.2. Espira 2*

Na segunda espira observou-se um aumento nas falhas nas fileiras de células ciliadas externas principalmente ocorrida no grupo que não usou amifostina previamente à irradiação. O maior grau de lesão ocorrida neste grupo foi estatisticamente significante quando comparados os totais de células lesadas desta espira com os outros dois grupos que receberam amifostina antes da irradiação. Entre os grupos que receberam amifostina não existiu diferença significante (Figuras 4 e 5) (Tabela 3).

#### *5.2.3. Espira 3*

Na terceira espira, em comparação com a E2, observou-se uma maior tendência de lesão nos três grupos. Aqui, também a os grupos Irr+100mg e Irr+200mg também mostraram valores significativamente inferiores ao grupo irradiado isoladamente. Os dois grupos que usaram amifostina se equivaleram e não mostram diferença significante (Figuras 6 e 7) (Tabela 4).

### **5.3. Comparação do percentual de células ciliadas externas lesadas em cada fileira(F1,F2 eF3) entre os grupos.**

#### *5.3.1 Espira Basal – Fileiras 1, 2 e3*

Na comparação feita entre as fileiras da espira basal não houve diferença significativa entre o percentual de CCE lesadas nos três grupos (Tabelas 5, 6 e 7) (Figura 8).

#### *5.3.2. Espira 2 – Fileiras 1,2 e 3*

Na comparação do percentual de CCE lesadas entre as fileiras isoladamente nos três grupos observou-se que, apesar de as maiores médias de lesão ocorrerem na segunda (F2) e terceira(F3) fileiras, apenas na primeira fileira (F1) foi notada diferença significativa pelo teste *post hoc* de Dunn, onde o grupo irradiado isoladamente(Irr) apresentou valores significativamente superiores de lesão aos dos grupos Irr+ 100mg e Irr+200mg, que se equivaleram (Tabelas 8, 9 e 10) (Figura 9).

#### *5.3.3. Espira 3 – Fileiras 1,2 e 3*

Comparando-se os percentuais de CCE lesadas entre as fileiras isoladamente nessa espira notou-se uma tendência de maiores medias de lesões na segunda (F2) e terceira (F3) fileiras, repetindo o que ocorreu na espira 2, porém aqui apenas na terceira (F3) fileira houve aumento estatisticamente significativo de lesão no grupo irradiado isoladamente comparado aos outros dois grupos que receberam amifostina nas doses de 100mg e 200mg/kg, que se equivaleram (Tabelas 11,12 e 13) (Figura 10).

#### 4. Discussão

A perda auditiva induzida pela radioterapia apesar de ser um assunto da maior relevância ainda é pouco conhecida nos dias atuais e, de certa forma, pouco prevenida no meio dos profissionais envolvidos com esta modalidade de tratamento. Este fato se deve, em parte, a não concomitância dos avanços obtidos nas últimas décadas, dos novos esquemas terapêuticos radio e quimioterápicos que têm aumentado substancialmente a sobrevida dos pacientes oncológicos e o aparecimento de novas descobertas de drogas com potencial radioprotetor do órgão auditivo.

Quanto aos tipos de disacusias induzidos pela radioterapia, é sabido que podem ser condutivas, sensorineurais e mistas. A perda auditiva sensorineural é, sem dúvida, a mais freqüente, segundo alguns autores podendo ocorrer em até 75% dos pacientes irradiados na região do osso temporal, e costuma desenvolver-se pela lesão ao órgão de Corti e em menor freqüência uma degeneração do VIII par craniano, visto que as estruturas do sistema nervoso central têm uma maior resistência a essa modalidade de tratamento<sup>2,6,8</sup>.

Quanto à dose lesiva para o órgão de Corti, quanto maior a dose de irradiação na orelha interna, maior é a probabilidade de dano auditivo<sup>16-20</sup>. Em geral, a dose total de radiação necessária para produzir uma lesão ao sistema auditivo varia entre 3000 e 6000 rad. Em nosso estudo a dose utilizada suficiente para provocar lesão imediata às células ciliadas foi 350cGy e baseou-se em estudo piloto previamente realizado em nosso Departamento

devido à falta de informações na literatura sobre a dose média lesiva ao órgão de Corti de cobaias albinas.

A perda da audição após a radioterapia pode instalar-se de forma imediata ou tardia<sup>16,21</sup>. A complicação imediata resulta da injúria celular direta pela radiação sobre estruturas do órgão de Corti e da estria vascular. Já os efeitos tardios ocorrem pela ação indireta da radiação sobre os vasos da orelha interna, gerando o processo de endoarterite obliterante, que progressivamente interrompe o aporte sanguíneo a estruturas vitais como o neuroepitélio da cóclea e o VIII par craniano<sup>22,23</sup>.

Com referência à faixa de freqüências mais atingida, as freqüências graves e médias raramente são comprometidas. Já os tons agudos são os mais afetados destacando-se a faixa de freqüências entre 4000 a 8000Hz<sup>8</sup>. Os nossos achados apontaram para a lesão preferencialmente ocorrendo nas segunda e terceira espiras, com a preservação da espira basal e apical. Na comparação do grau de lesão entre a E2 e E3 notou-se que os percentuais de lesão foram superiores na terceira espira ultrapassando, na maioria dos casos, em duas vezes o que ocorrera na segunda espira. Esse mecanismo de seletividade para as espiras e conseqüentemente para as freqüências auditivas é provável que se deva ao maior consumo de oxigênio e à maior atividade metabólica existente nas células ciliadas e estria vascular mais próximas da base da cóclea<sup>4,9,24</sup>.

Outro dado que também pudemos observar foi que houve uma tendência a um aumento dos percentuais de células lesadas na segunda e terceira espiras principalmente nas duas últimas fileiras mais externas, com

preservação da primeira e mais interna. Este fato também notado em outros estudos experimentais envolvendo a radioterapia é decorrente, provavelmente, de diferenças anatômicas e de constituição bioquímica de cada setor de células ciliadas em particular<sup>9,25</sup>.

No tocante ao emprego de drogas otoprotetoras na radioterapia, Atlas et al. (2006) conseguiram reduzir os danos cocleares induzidos pela radiação no gânglio espiral, estria vascular, células ciliadas internas e externas de cobaias que foram tratadas com piracetam uma hora antes da irradiação na dose de 60Gy, pelo mecanismo de inibição da apoptose celular<sup>26</sup>.

A amifostina é uma pró-droga que é convertida pela fosfatase alcalina na molécula ativa WR-1065. O WR-1065 interage com radicais livres doando íons hidrogênio que se ligam às moléculas de oxigênio e aos metabólitos ativos dos agentes anti-neoplásicos<sup>27</sup>. Isso confere a amifostina o status de um eficiente citoprotetor na hematotoxicidade da ciclofosfamida e carboplastina, na neurotoxicidade, nefrotoxicidade, hematotoxicidade e ototoxicidade da cisplatina<sup>15,28-30</sup>. GLOVER et al. (1984) estudaram o efeito da amifostina na orelha interna de pacientes que receberam quimioterapia pela cisplatina e constataram redução dos índices de disacusia em pacientes recebendo cisplatina na dose de 150mg/m<sup>2</sup>. HYPOLITO et al. (2005) compararam o número de células ciliadas externas lesadas e o comportamento das EOAPD em cobaias tratadas com e sem amifostina e que receberam a cisplatina. Concluíram que a perda de células ciliadas externas foi menor no grupo amifostina e que as emissões otoacústicas encontravam-se presentes em todos os animais deste grupo após uso do ototóxico<sup>31</sup>.

Na radioterapia a amifostina protege várias linhagens celulares dos efeitos da irradiação. Esta droga já foi testada amplamente e mostrou ser efetiva na radioproteção da medula óssea reduzindo os índices de hematotoxicidade minimizando a trombocitopenia, anemia e leucopenia<sup>15,30,32</sup>. Em tumores de cabeça e pescoço acredita-se que a amifostina possa reduzir a radiotoxicidade às glândulas salivares, mucosa esofágica e da cavidade oral, minimizando os efeitos adversos da mucosite e xerostomia que comprometem substancialmente a qualidade de vida dos pacientes pós-irradiados<sup>13,33-35</sup>.

Em nosso estudo ficou evidente que a amifostina protegeu de maneira significativa os grupos Irr+100mg e Irr+200mg que receberam a droga pela via intra-peritoneal 30 minutos antes da irradiação da orelha interna, porém não se observou diferença significativa de proteção apenas com a variação da dose de 100 para 200mg/kg. Essa proteção foi visivelmente marcada nas proporções de células ciliadas lesadas e representou uma redução de até 40% dos percentuais de lesão nas CCE dos grupos que receberam a amifostina. Essa redução, provavelmente se deveu às diferenças de lesão ocorridas na segunda e terceira espiras que, na comparação entre os grupos apontou para uma redução no percentual de lesão ocorridas nos grupos Irr+100mg e Irr+200mg quando comparados ao grupo Irr. Na comparação dos percentuais de lesão da espira basal entre os grupos, não houve diferença significativa de lesão em nenhum dos três grupos. Isso pode ser explicado pelo baixo nível de lesão ocorrida pela radiação neste setor da cóclea em particular.

Quando comparados os grupos em termos de fileiras, apenas a primeira fileira da E2 e a terceira fileira da E3 mostraram valores inferiores e

estatisticamente significantes de lesão ciliada nos grupos Irr+100mg e Irr+200mg. Esse, sem dúvida, é um achado desse trabalho mas que mereceria aguardar novos experimentos para se verificar se foi um fenômeno casual ou uma especificidade para a droga utilizada.

### **Conclusões**

A amifostina utilizada previamente a radiação da orelha interna protegeu significativamente as células ciliadas externas do órgão de Corti de Cobaias irradiadas em região de cabeça e pescoço pelo Cobalto 60, na dose de 350cGy e de maneira significativa protegeu a segunda e terceira espiras da cóclea, fato que não se repetiu na espira basal. Apenas a primeira fileira da segunda espira e a terceira fileira da terceira espira mostraram valores significativamente inferiores de lesão ciliada nos grupos que receberam o citoprotetor e não houve diferença significativa na resposta protetora das células ciliadas externas quando se aumentou a dose da amifostina de 100mg para 200mg/kg.

### **6. Referências Bibliográficas**

- 1- NYLÉN, C.O.; ENGFELDT, B.; LARSSON, B. The effect of irradiation of the labyrinth in the rat with ionizing particles. *Acta Otolaryngol. Suppl.*, 158: 217-8, 1960.
- 2- ANTEUNIS, L.J.C.; HENDRIKS, J.J.T.; MANNI, J.J. A prospective longitudinal study on radiation-induced hearing loss. *Am. J. Surg.*, 168: 408-11, 1994.

- 
- 3- CHEN, W.; LIAO, C.; WANG, C.; TSAI, H.; TANG, S.G.; YEH, J.; HONG, J. Radiation-induced hearing impairment in patients treated for malignant parotid tumor. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 108: 1159-64, 1999.
  - 4- FONG, R.S.; BESTE, D.J.; MURRAY, K.J. Pediatric sensorineural hearing loss after temporal bone radiation. *Am. J. Otol.*, 16: 793-6, 1995.
  - 5- HUANG, E.; TEH, B.S.; STROTHER, D.R.; DAVIS, Q.G.; CHIU, J.K.; LU, H.H.; CARPENTER, L.S.; MAI, W.Y.; CHINTAGUMPALA, M.M.; SOUTH, M.; GRANT, W.H.; BUTLER, E.B.; WOO, S.Y. Intensity-modulated radiation therapy for pediatric medulloblastoma: early report on reduction of ototoxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 52: 599-605, 2002.
  - 6- KOUKOURAKIS, M.I.; DANIELIDIS, V. Preventing radiation induced xerostomia. *Cancer. Treat. Rev.*, 31(7):546-54, 2005.
  - 7- LIST, A.F.; HEATON, R.; GLINSMANN G.B.; CAPIZZI, R.L. Amifostine stimulates formation of multipotent and erythroid bone marrow progenitors. *Leukemia.*, 12: 1590-1602, 1998.
  - 8- SATALOFF, R.T. & ROSEN, D.C. Effects of irradiation on hearing acuity: a review of the literature. *Am. J. Otol.*, 15: 772-80, 1994.
  - 9- WASSERMAN, H.T.-Radiotherapeutic Studies With Amifostine. *Semin Oncol.*, 5(suppl 11): 21-25, 1994.
  - 10- HO, W.K.; WEI, W.I.; KWONG, D.L.W.; SHAM, J.S. T.; TAI, P.T.H.; YUEN, A.P. W.; AU, D.K.K. – Long-term sensorineural hearing deficit following radiotherapy in patients suffering from nasopharyngeal carcinoma: a prospective study. *Head Neck*, 21: 447-53, 1999.

- 
- 11- LEIGHTON, S.E.J.; KAY, R.; LEUNG, S.F.; WOO, J.K.S.; HASSELT, C.A.V. Auditory brainstem responses after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Otolaryngol.*, 22: 350-4, 1997.
- 12- COSTA, R.N. -Amifostina: começo de uma nova era do tratamento oncológico? *Rev. Bras. Med.*, 54: 210-214, 1997.
- 13- BUENTZEL, J.; MICKE, O.; ADAMIETZ, I. A.; MONNIER, A.; GLATZEL, M.; VRIES, A. Intravenous amifostine during chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: a randomized placebo controlled phase III study. *Int. J. Oncol. Biol. Phys.*, 64(3): 684-91, 2006.
- 14- LIN, R.; HUG, E.B.; SCHAEFER, R.A.; MILLER, D.W.; SLATER, J.M.; SLATER, J.D. Conformal proton radiation therapy of the posterior fossa: a study comparing protons with three-dimensional planned photons in limiting dose to auditory structures. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 48: 1219-26, 2000.
- 15- SCHOT, L.J.; HILGERS, F.J.M.; KEUS, R.B.; SCHOUWENBURG, P.F.; DRESCHLER, W.A. Late effects of radiotherapy on hearing. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 249: 305-8, 1992.
- 16- BERG, N.O & LINDGREN, M. Dose factors and morphology of delayed radiation lesions of the internal and middle ear in rabbits. *Acta Radiol.*, 56: 305-19, 1961.
- 17- EVANS, R.A.; LIU, K.C.; AZHAR, T.; SYMONDS, R.P. Assessment of permanent hearing impairment following radical mega voltage radiotherapy. *J. Laryngol. Otol.*, 102: 588-9, 1988.

- 
- 18- GLOVER, D.; NEGENDANK, W.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; GLICK, J.H. Alterations in oxygen transport following WR-2721. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 10(9): 1565-8, 1984.
- 19- JERO, J.; COLING, D.E; LALWANI, A.K. The use of preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. *Acta Otolaryngol.*, 121(5): 586-9, 2001.
- 20- STOLARSKA, M.; MLYNARSKI, W.; ZELEWSKA-SZEWCZYK, B.; BOBALSKI, J. Cytoprotective effect of amifostine in the treatment of childhood neoplastic diseases-a clinical study including the pharmacoeconomic analysis. *Pharmacol. Rep.*, 58:30-34, 2006.
- 21- ONDREY, F.G.; GREIG, J.R.; HERSHER, L. Radiation dose to the otologic structures during head and neck cancer radiation therapy. *Laryngoscope*, 110: 217-21, 2000.
- 22- TALMI, Y.P; FINKELSTEIN, Y.; ZOHAR, Y. Post irradiation Hearing loss. *Audiology.*, 28: 121-6, 1989.
- 23 WINTHER, F.O. X Ray irradiation of the inner ear of the guinea pig, early degenerative changes in the cochlea. *Acta Otolaryngol.*, 68: 98-117, 1969.
- 24- GRAU, C.; MÖLLER, K.; ELBRÖND, O.; OVERGAARD, M. OVERGAARD, J. - Sensory-neural hearing loss in patients treated with irradiation for nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 21: 723-8, 1991.
- 25- JOHANNESSEN, T.B.; RASMUSSEN, K.; WINTHER, F.O.; HALVORSEN, U.; LOTE, K. Late radiation effects on hearing, vestibular function and taste in brain tumor patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 53: 86-90, 2002.

- 
- 26- ATLAS, E.; ERTEKIN, M.V.; KUDUBAN, O.; GUNDOGDU, C.;DEMIRCI,E.; SUTBEYAZ, Y. Effects of piracetam supplementation on cochlear damage occurring in guinea pigs to irradiation. *Biol.Pharm.Bull.*, 29(7):1460-1465, 2006.
- 27- CAPIZZI, R.L. & OSTER, W. Chemoprotective and radioprotective effects of amifostine: an update of clinical trials. *Int J Hematol.*, 72: 425-35, 2000.
- 28- CALHOUN, E.A. & BENNET, C.L. Pharmacoeconomics of amifostine in ovarian cancer. *Semin Oncol.*, 26(Suppl 7): 102-107, 1999.
- 29- HULTCRANTZ, M.; ANNIKO, M.; BORG, E. The influence of prenatal gamma irradiation on the ageing of the cochlea. *Acta Otolaryngol.*, 108: 414-23, 1989.
- 30- LIST, A.F.; HEATON, R.; GLINSMANN, G.B. Amifostine protects primitive human hematopoietic progenitors against cytotoxicity from diverse antineoplastics. *Proc. Am.Soc.Clin Oncol.*, 15: 448-50, 1996.
- 31- HYPPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, J.A.; LESSA, R.M.; ROSSATO, M. Otoproteção da Amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina:estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de varredura. *Rev Bras Otorrinolaringol.*, 71(3): 268-273, 2005.
- 32- CAPIZZI, R.L. Amifostine: The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapy .*Semin Oncol.*, 23(Suppl 8): 2–17, 1996.

33- KIM, C.S. & SHIN, S.O. Ultrastructural changes in the cochlea of the guinea pig after fast neutron irradiation. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 110: 419-27, 1994.

34- VARGHESE, G.; SAHOTA, J.S.; HAZARIKA, P.; RAJASHEKAR, B. Hearing anomalies following radiation therapy for head and neck cancers. *Indian J. Exp. Biol.*, 34: 878-9, 1996.

35- KONINGS, A.W.; FABER, H.; VISSINK, A.; COPPES, R.P. Radioprotective effect of amifostine on parotid gland functioning is region dependent. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 63(5): 1584-91, 2005.

**Legendas de Figuras**

**Figura 1.** Percentuais de CCE lesadas em cada grupo

**Figura 2.** Percentuais de CCE lesadas na espira basal

**Figura 3.** Seguimento sem lesões da espira basal do grupo Irr

**Figura 4.** Percentuais de CCE lesadas na espira 2

**Figura 5.** Espira 2 do grupo Irr+200mg mostrando preservação CCE

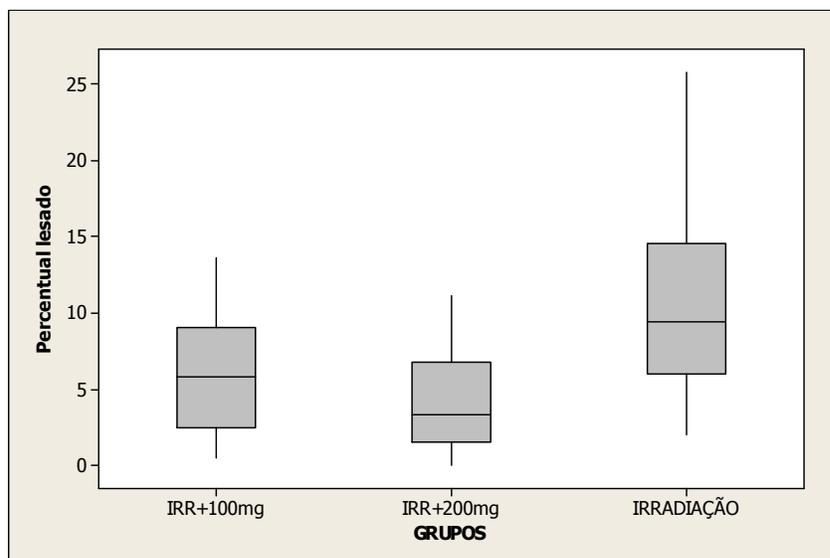
**Figura 6.** Percentuais de CCE lesadas na Espira 3

**Figura 7.** Espira 3 do grupo Irr+200mg com preservação CCE

**Figura 8.** Espira basal do grupo Irr+200mg sem lesões.

**Figura 10.** Espira 3 do grupo Irr com lesões em F2 e F3

**Figura 1**



**Figura 2**

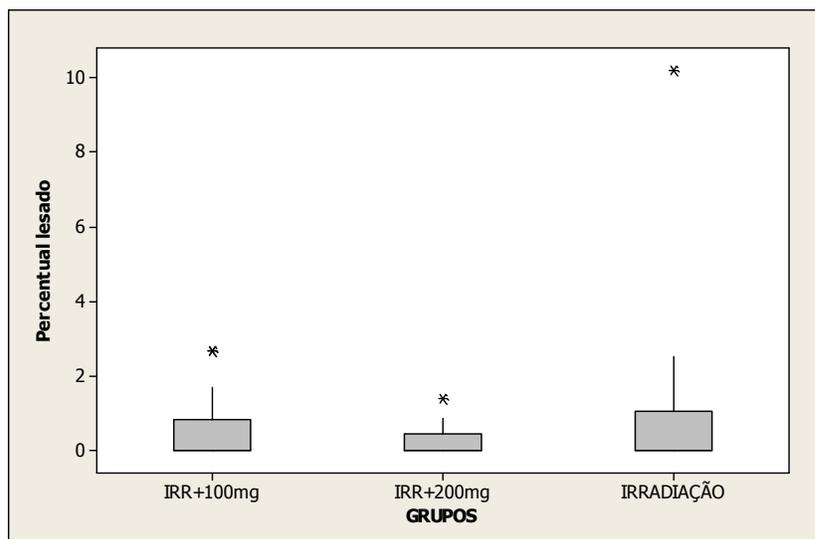


Figura 3

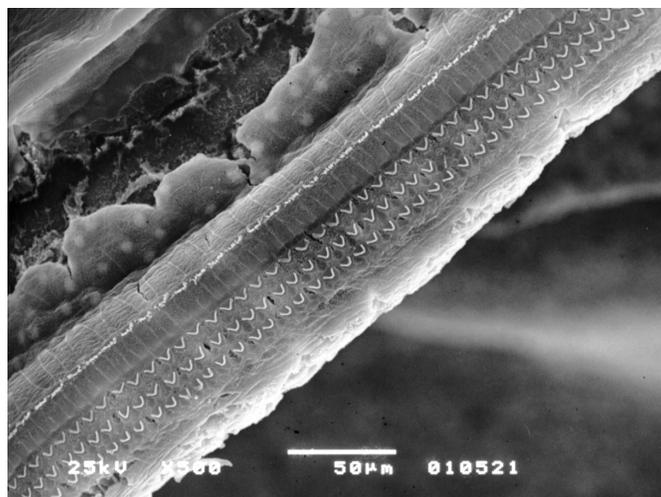


Figura 4

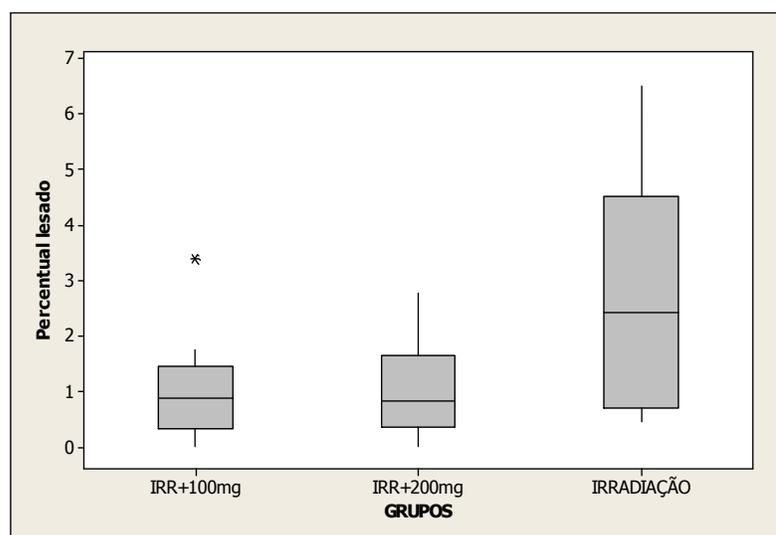


Figura 5

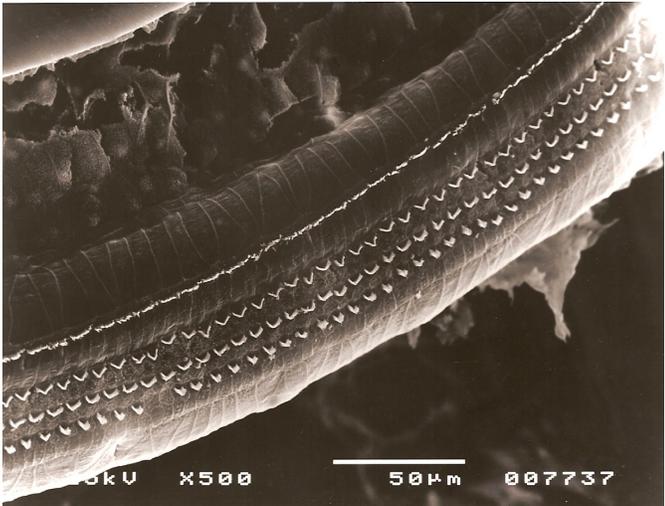
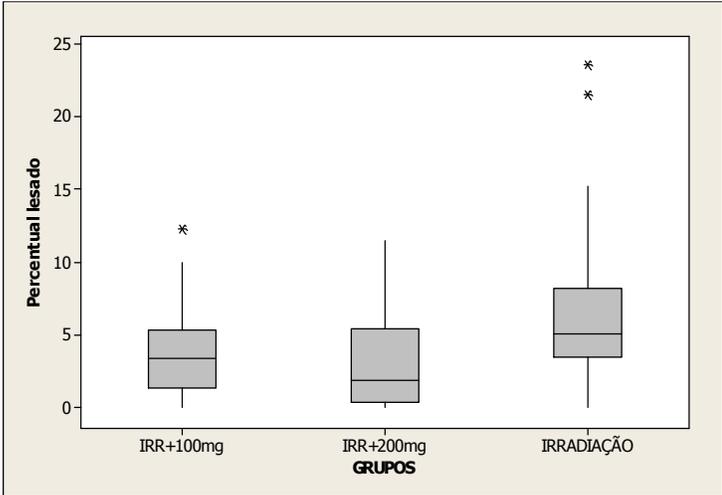
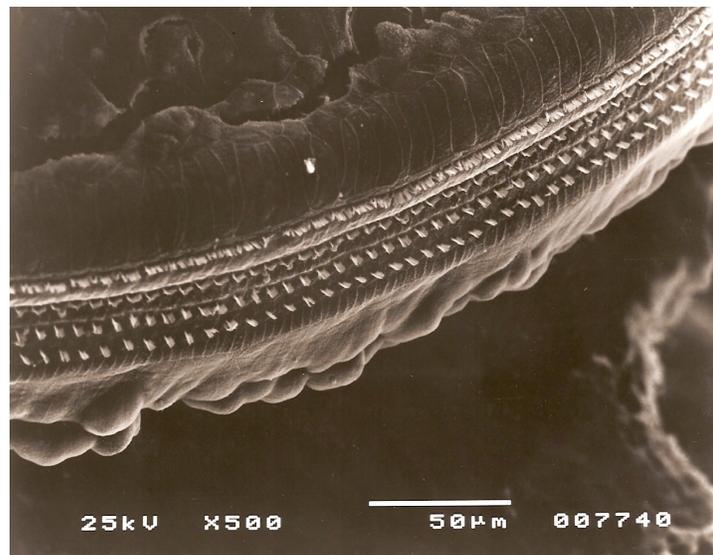


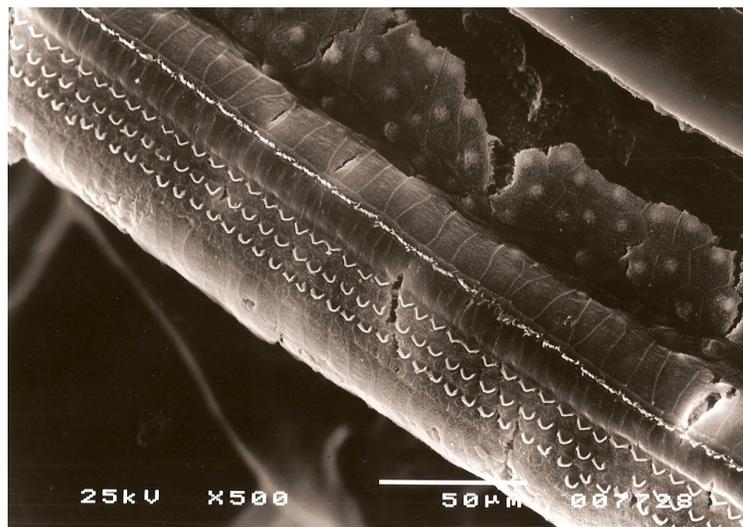
Figura 6



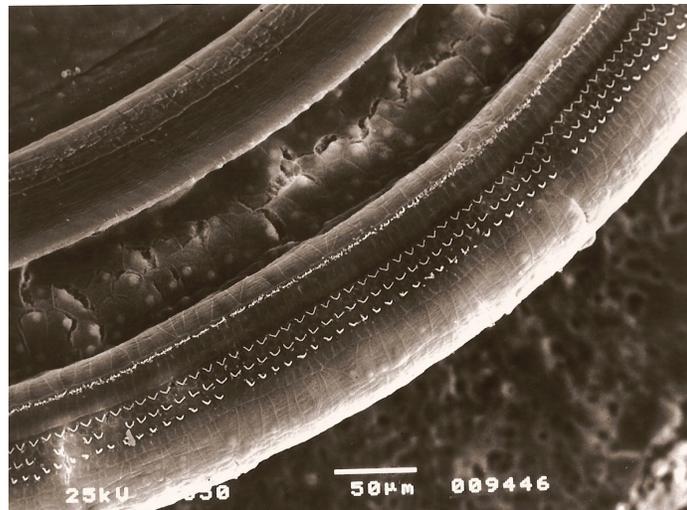
**Figura 7**



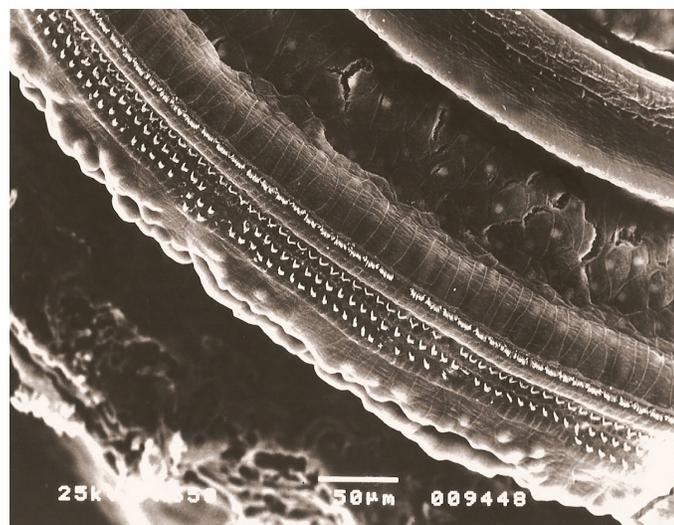
**Figura 8**



**Figura 9**



**Figura 10**



**Tabela 1-** Percentuais de CCE lesadas em cada grupo.

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,45	3,25	6,62	4,10	3,91
Irr+200mg	0,92	2,55	5,31	3,54	3,34
Irradiação	5,28	8,04	13,65	10,10	6,60

$X^2=19,38$   $p<0,001$  \* Irr=Irradiação

**Tabela 2-** Percentuais de CCE lesadas na espira basal.

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,00	0,00	0,83	0,51	0,81
Irr+200mg	0,00	0,00	0,45	0,20	0,34
Irradiação	0,00	0,00	1,03	0,96	2,27

$X^2=1,61$   $p=0,45$  \*Irr=Irradiação

**Tabela 3-** Percentuais de CCE lesadas na espira 2.

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,33	0,89	1,47	1,02	0,91
Irr+200mg	0,34	0,83	1,64	0,99	0,84
Irradiação	0,70	2,43	4,51	2,97	2,07

$X^2=9,98$   $p=0,007$  \* Irr=Irradiação

**Tabela 4 -** Percentuais de CCE lesadas na Espira 3

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	1,38	3,39	5,38	4,16	3,49
Irr+200mg	0,35	1,86	5,44	3,03	3,32
Irradiação	3,46	5,04	8,23	7,20	6,19

$X^2=9,24$   $p=0,01$  \* Irr=Irradiação

**Tabela 5-** Percentuais de CCE lesadas na primeira fileira (F1) da espira basal

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,00	0,00	0,00	0,20	0,60
Irr+200mg	0,00	0,00	0,00	0,16	0,48
Irradiação	0,00	0,00	0,00	0,09	0,42
<b>X<sup>2</sup>=0,65 p=0,72</b>			<b>*Irr=Irradiação</b>		

**Tabela 6-** Percentuais de CCE lesadas na segunda fileira (F2) da espira basal

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,00	0,00	0,29	0,50	1,05
Irr+200mg	0,00	0,00	0,00	0,20	0,63
Irradiação	0,00	0,00	0,00	0,53	1,34
<b>X<sup>2</sup>=1,56 p=0,46</b>			<b>* Irr=Irradiação</b>		

**Tabela 7-** Percentuais de CCE lesadas na terceira fileira (F3) da espira basal

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,00	0,00	1,57	0,85	1,57
Irr+200mg	0,00	0,00	0,00	0,24	0,64
Irradiação	0,00	0,00	2,05	2,24	5,68
<b>X<sup>2</sup>=2,57 p=0,28</b>			<b>* Irr=Irradiação</b>		

**Tabela 8.** Percentuais de CCE lesadas na primeira fileira (F1) da Espira 2

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,00	0,00	0,00	0,27	0,71
Irr+200mg	0,00	0,00	1,19	0,51	0,73
Irradiação	0,00	1,75	3,03	2,30	3,18
<b>X<sup>2</sup>=10,84 p=0,004</b>			<b>* Irr=Irradiação</b>		

**Tabela 9.** Percentuais de CCE lesadas na segunda fileira (F2) da Espira 2

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,00	0,00	1,36	1,02	1,84
Irr+200mg	0,00	0,00	1,37	1,01	1,57
Irradiação	0,00	1,06	6,40	2,85	3,53
<b>X<sup>2</sup>=3,78 p=0,15</b>		<b>* Irr=Irradiação</b>			

**Tabela 10.** Percentuais de CCE lesadas na terceira fileira (F3) da Espira 2

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,00	0,66	3,63	1,73	2,01
Irr+200mg	0,00	1,28	2,64	1,45	1,53
Irradiação	0,00	1,81	6,78	3,60	4,33
<b>X<sup>2</sup>=1,91 p=0,38</b>		<b>* Irr=Irradiação</b>			

**Tabela 11-** Percentuais de CCE lesadas na primeira fileira (F1) da Espira 3

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,00	0,00	4,00	3,02	7,65
Irr+200mg	0,00	0,00	1,30	1,12	2,38
Irradiação	0,00	1,22	3,12	3,84	6,41
<b>X<sup>2</sup>=3,01 p=0,22</b>		<b>* Irr=Irradiação</b>			

**Tabela 12-** Percentuais de CCE lesadas na segunda fileira (F2) da Espira 3

<b>Grupo</b>	<b>1°Quartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3°Quartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	0,00	2,53	3,90	2,51	2,44
Irr+200mg	0,00	1,05	4,31	2,69	4,40
Irradiação	1,17	3,12	8,13	6,14	8,33
<b>X<sup>2</sup>=3,86 p=0,15</b>		<b>* Irr=Irradiação</b>			

**Tabela 13.** Percentuais de CCE lesadas na terceira fileira (F3) da Espira 3

<b>Grupo</b>	<b>1ºQuartil</b>	<b>Mediana</b>	<b>3ºQuartil</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Irr+100mg	1,96	5,13	10,64	6,97	7,48
Irr+200mg	0,65	3,40	9,30	5,27	5,63
Irradiação	6,66	10,16	16,08	11,59	6,89

**X<sup>2</sup>=11,71 p=0,002**                      \* Irr=Irradiação

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)