

THOMAZ JOSÉ MARRA DE AQUINO

**Ototoxicidade e otoproteção em orelha interna de cobaias utilizando gentamicina e amicacina: aspectos ultra-estruturais e funcionais.**

Tese apresentada ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular. Orientador: Prof. Dr. José Antônio Aparecido de Oliveira

Ribeirão Preto (SP)

2007

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Thomaz José Marra de Aquino

Ototoxicidade e otoproteção em orelha interna de cobaias [...]

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Data da Defesa da Tese: 01/11/2007.

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. Clemente Isnard Ribeiro de Almeida

Instituição: Faculdade de Medicina de Jundiaí

Faculdade de Ciências Médicas da S. Casa de Misericórdia de São Paulo

Prof. Dr. José Fernando Colafêmina

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppolito

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. José Antônio Aparecido de Oliveira

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

## **DEDICATÓRIA**

A Mara Lúcia Bulkool de Souza Aquino, minha esposa, pelo apoio incondicional, amor, compreensão e paciência durante toda a realização deste trabalho.

Aos meus filhos Tiago Bulkool Aquino e Marcela Bulkool Aquino, pelo amor, carinho, pela presença e esperança no dia de amanhã.

A Narciza Marra de Aquino, minha mãe, pelo amor, simplicidade, carinho, pela luta incondicional pela família e pelos ensinamentos de vida e Gláucio Lara de Aquino, meu pai, pela serenidade, bondade, amizade que sempre me marcou enquanto esteve presente nesta vida.

A Deus, fonte criadora e inspiradora, por me abençoar dando-me força e inspiração para tentar ser uma pessoa cada vez melhor.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Antônio Aparecido de Oliveira, professor titular do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo incentivo a pesquisa, amizade, ensinamentos e confiança. Pela orientação durante a realização deste estudo.

A Profa. Dra. Wilma Terezinha Anselmo-Lima, professora doutora do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo idealismo, confiança, apoio e pelos sábios ensinamentos na disciplina de otorrinolaringologia e na pós-graduação.

A Maria Rossato, técnica do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela amizade e dedicação à pesquisa e ao trabalho, pelo grande apoio e ensinamentos que me repassou durante toda a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Maria Claret Marra de Aquino, professor doutor e docente da Disciplina de Otorrinolaringologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), pelo incentivo e idealismo, pelo exemplo de grande profissional que sempre demonstrou ser e pelo apoio incondicional em todas as fases de minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. José Fernando Colafêmina, professor doutor do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto, pela amizade, simplicidade e ensinamentos. Pelo incentivo a pesquisa e convívio fraterno.

A professora Eliza Rosa de Aquino Frigo, professora da disciplina de Português do Colégio LUMEN de São José do Rio Pardo (SP), pela revisão ortográfica e gramatical e pelas sugestões apresentadas.

A Flávia Fiacadori Salata, técnica do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio na parte experimental do estudo.

A Maria Cecília Onofre, secretária do Setor de Pós-Graduação do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela amizade, apoio e solicitude durante a realização deste trabalho.

A Francisco Holanda, técnico do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela amizade e apoio na parte experimental do estudo.

A Rita Amâncio Guedes, Amélia Baruffi, Edson Berágua e Rogério Mazzucato Castania, funcionários do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela

amizade e apoio e por sempre atenderem com presteza e eficiência às minhas solicitações.

Ao estatístico Geraldo Cássio dos Reis, pelas sugestões e auxílio na análise dos dados e cálculos estatísticos.

À equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial às técnicas Maria Dolores Seabra Ferreira (Tuca), Maria Tereza Piccinoto Maglia, ao técnico José Augusto Maulin e aos responsáveis pelo laboratório, Prof. Dr. Roy Edward Larson e Prof. Dr. Gutemberg M. Rocha, pelo apoio e por colocar à disposição a microscopia eletrônica, a área experimental e o laboratório.

À equipe do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial aos técnicos Sebastião Assis Mazzeto, José Carlos Vanni, Paulo Alves Júnior e Wagner Andrade, ao bioterista Paulo Roberto Castilho e aos responsáveis pelo laboratório, Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior e Prof. Dr. Haylton Jorge Suaid, pelo apoio e por colocar à disposição o biotério, a área experimental e o laboratório.

Aos demais colegas e funcionários do Hospital das Clínicas e do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP-USP que,

de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e a Universidade de São Paulo, pela oportunidade da realização deste trabalho.

A todos meus sinceros agradecimentos.



“Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve uma satisfação e um triunfo que poucos homens conhecerão”.

*Thomas Wolfe*

## RESUMO

AQUINO, T.J.M. **Ototoxicidade e otoproteção em orelha interna de cobaias utilizando gentamicina e amicacina: aspectos ultra-estruturais e funcionais.** 2007. 103f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A ototoxicidade ainda é um grande desafio para a medicina nos dias atuais, seja pela freqüente irreversibilidade das lesões, como no caso dos aminoglicosídeos, seja pelo uso não descontinuado dos mesmos devido à alta eficácia e ao baixo custo. A descoberta dos mecanismos endógenos de autoproteção das células ciliadas externas (CCE) associados a métodos de avaliação funcional e ultra-estrutural das mesmas, em experimentação animal, abriu nova perspectiva de entendimento e controle destes mecanismos. O presente estudo foi desenvolvido com os objetivos de determinar se subdoses de gentamicina protegia contra doses ototóxicas de amicacina, baseado no mecanismo de autoproteção da cóclea e ainda determinar se a amplitude das respostas das emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) teria correlação com o nível de integridade das CCE, em cobaias. Utilizando-se 31 cobaias albinas macho, divididas em 4 grupos, administrou-se soro fisiológico 0,9% (grupo 1), gentamicina (grupo 2), amicacina (grupo 3) e gentamicina + amicacina (grupo 4), intramuscular, por 12, 30 e 42 dias. Alterações funcionais e ultra-estruturais nas cócleas (n=60) das cobaias foram avaliadas ao fim do experimento através da realização do teste de EOAPD e análise da integridade das CCE à microscopia eletrônica de varredura. Os resultados revelaram que subdoses de gentamicina não protegem a orelha interna contra ação lesiva da amicacina e que a amplitude das respostas no teste de EOAPD tem correlação estatística com o grau de lesão de CCE. Estes resultados são discutidos no âmbito do entendimento dos mecanismos de ototoxicidade e otoproteção da orelha interna em cobaias e também como determinantes de uma nova visão de que não somente a presença, mas também a variação da intensidade das EOAPD tem importância clínica no

acompanhamento das lesões de CCE, com possível aplicação no monitoramento de ototoxicidade por drogas em humanos.

Palavras-chave: orelha interna [lesões], aminoglicosídeos [toxicidade], citoproteção [efeito de drogas], emissões otoacústicas, microscopia eletrônica de varredura.

## ABSTRACT

AQUINO, T.J.M. **Ototoxicity and otoprotection in the inner ear of guinea pigs using gentamicin and amikacin: ultrastructural and functional aspects.** 103 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Ototoxicity continues to be a great challenge for medicine both because of the frequent irreversibility of the injuries, as is the case with the use of aminoglycosides, and because of the non-discontinued use of these drugs due to their high efficacy and low cost. The discovery of endogenous self-protective mechanisms of the outer hair cells (OHC) associated with methods of functional and ultrastructural evaluation of these cells in animal experimentation has opened new perspectives for the understanding and control of these mechanisms. The objective of the present study was to determine whether subdoses of gentamicin protect against ototoxic doses of amikacin based on the self-protective mechanism of the cochlea and also to determine whether the amplitude of distortion product otoacoustic emission (DPOAE) responses are correlated with the degree of OHC integrity in guinea pigs. Thirty-one male albino guinea pigs were divided into four groups respectively receiving intramuscularly 0.9% physiological saline (group 1), gentamicin (group 2), amikacin (group 3) and gentamicin + amikacin (group 4) for 12, 30 and 42 days. Functional and ultrastructural changes in the cochlea (n=60) of the animals were evaluated at the end of the experiment by the DPOAE test and by the analysis of OHC integrity by scanning electron microscopy. The results revealed that subdoses of gentamicin did not protect the inner ear against the damaging action of amikacin and that the amplitude of the DPOAE response was statistically correlated with the intensity of OHC injuries. These results are discussed. In terms of the understanding of the mechanisms of ototoxicity and otoprotection of the inner ear of guinea

pigs and also as the determinants of a new viewpoint indicating that not only the presence but also the variation in amplitude of the DPOAE is of clinical importance in the monitoring of OHC injuries, with a possible application to the monitoring of drug ototoxicity in humans.

Key-words: inner ear[injuries], aminoglycosides[toxicity], cytoprotection[drug effect], otoacoustic emissions, scanning electron microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte ao nível da cóclea -----	31
Figura 2 – Corte ao nível do órgão de Corti -----	32
Figura 3 – Porta-espécime preparado para estudo -----	53
Figura 4 – Microscópio eletrônico JEOL JSM 5200 -----	54
Figura 5 – Cocleograma -----	55
Figura 6 – Fotomicrografia de órgão de Corti referente a figura 5 -----	55
Figura 7 - Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cóclea do grupo 1 -----	60
Figura 8 – Teste de emissões otoacústicas com respostas de cobaia do grupo 1 --	61
Figura 9 - Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cóclea do grupo 2 -----	61
Figura 10 – <i>Close</i> de órgão de Corti normal de cobaia do grupo 2 -----	62
Figura 11 - Teste de emissões otoacústicas com respostas de cobaia do grupo 2 -	62
Figura 12 - Fotomicrografia de órgão de Corti lesado de cóclea grupo 3 -----	65
Figura 13 - Teste de emissões otoacústicas de cobaia do grupo 3 -----	67
Figura 14 - Fotomicrografia de órgão de Corti lesado de cóclea grupo 4 -----	68
Figura 15 - Teste de emissões otoacústicas (EOA) de cobaia do grupo 4 -----	69
Figura 16 – Fotomicrografia de estereocílios de CCE lesada (1) -----	72
Figura 17 - Fotomicrografia de estereocílios de CCE lesada (2) -----	72
Figura 18 - Fotomicrografia de estereocílios de CCI -----	73
Figura 19 – Teste de EOA com redução de amplitude de respostas -----	76

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Células ciliadas externas normais nos 4 grupos -----	70
Gráfico 2 - Células ciliadas externas normais nas espiras nos 4 grupos -----	70
Gráfico 3 – Emissões otoacústicas presentes e ausentes nos grupos 3 e 4 -----	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Células ciliadas externas normais nas espiras nos 4 grupos -----	63
Tabela 2 – Total de células ciliadas externas normais nos 4 grupos -----	63
Tabela 3 - Células ciliadas externas normais (CCE) no grupo 3 -----	64
Tabela 4 - Células ciliadas externas normais (CCE) no grupo 4 -----	64
Tabela 5 – Emissões otoacústicas presentes e ausentes nos 4 grupos -----	65
Tabela 6 – Células ciliadas normais vs emissões presentes e ausentes -----	66
Tabela 7 – Total de células ciliadas externas analisadas nos 4 grupos -----	68
Tabela 8 – Análise estatística entre CCE normais entre grupos 3 e 4 -----	74
Tabela 9 - Análise estatística entre CCE normais nas espiras entre grupos 3 e 4 --	75
Tabela 10– Análise estatística entre EOA presente e ausente entre grupos 3 e 4 --	75
Tabela 11 – Análise estatística entre amplitude de EOA e lesão de CCE -----	77
Tabela 12 – Análise estatística entre valores das respostas de EOA -----	77
Tabela 13 - Análise estatística entre os tipos de respostas de EOA -----	77
Tabela 14 – Análise estatística entre tipos de respostas de EOA e CCE normais ----	78



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BD</b>	Bencton & Dickinson <sup>®</sup>
<b>CCE</b>	Célula Ciliada Externa
<b>CCI</b>	Célula Ciliada Interna
<b>CETEA</b>	Comissão de Ética em Experimentação Animal
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>DPGRAM</b>	<i>Distortion product graphic audiogram</i> . Audiograma produzido pelo teste de emissões otoacústicas.
<b>EGF</b>	Fator de Crescimento Epidérmico
<b>EOA</b>	Emissões Otoacústicas
<b>EOAPD</b>	Emissões Otoacústicas por Produtos de Distorção
<b>F(1)</b>	Frequência 1
<b>F(2)</b>	Frequência 2
<b>FGF-2</b>	Fator de Crescimento Fibroblástico - 2
<b>FMRP</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<b>GDNF</b>	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
<b>GSH</b>	Glutathiona
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>NGF</b>	Fator de crescimento neuronal
<b>NPS</b>	Nível de Pressão Sonora
<b>NT 3</b>	Neurotrofina 3
<b>PAG</b>	Página
<b>REF</b>	Referente

<b>SF 0,9%</b>	Soro Fisiológico 0,9%
<b>TGFa</b>	Fator Transformante de Crescimento Alfa
<b>TGFb</b>	Fator Transformante de Crescimento Beta
<b>UNAERP</b>	Universidade de Ribeirão Preto
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>VS</b>	<i>Versus</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>dB</b>	decibel
<b>g</b>	grama
<b>Hz</b>	hertz
<b>KHz</b>	kiloHertz
<b>Kg</b>	kilograma
<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	miligrama
<b>ml</b>	mililitro
<b>mV</b>	milivolt
®	marca registrada
<b>X̄</b>	média

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>27</b>
3.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA AUDIÇÃO	28
3.2 OTOTOXICIDADE	33
3.3 OTOPROTEÇÃO	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>43</b>
4.1 MATERIAL	44
4.2 MÉTODO	44
4.2.1 Seleção dos animais experimentais e critérios de inclusão	44
4.2.2 Formação dos Grupos de Estudo	46
4.2.3 Avaliação Funcional Auditiva	48
4.2.4 Preparação do Material para Avaliação Morfológica	51
4.2.4.1 Fixação	51
4.2.4.2 Desidratação	52
4.2.4.3 Secagem	52
4.2.4.4 Metalização de estruturas	52
4.2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura	53
4.2.5 Análise Estatística dos Dados	56
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>59</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>79</b>

<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO</b>	<b>102</b>



## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A ototoxicidade ainda é um grande desafio para a medicina nos dias atuais. Não obstante o grande número de pesquisas que são realizadas sobre o tema pelos mais renomados pesquisadores e centros de pesquisa em todo o mundo e pelo gradual avanço no conhecimento da fisiopatologia da ototoxicose, ainda não se conseguiu o satisfatório controle sobre o processo lesivo da orelha interna provocado pelos agentes ototóxicos em seres humanos. Eleva-se a importância do tema o fato de que muitas drogas potencialmente ototóxicas, como os antibióticos aminoglicosídeos, e quimioterápicos, como a cisplatina, ainda são largamente utilizados na prática médica, seja pelo custo acessível e eficácia, seja pela não existência de outra droga de eficácia similar para determinadas patologias. A irreversibilidade da lesão em grande parte dos casos é o outro ponto crítico do processo de ototoxicidade, levando a um problema social importante em consequência do estabelecimento da surdez.

Dentre as drogas ototóxicas, indubitavelmente os aminoglicosídeos são os mais largamente utilizados. Indicados primariamente no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas aeróbicas, vêm sendo largamente utilizados desde a sua descoberta, em 1943, devido à sua alta eficácia antimicrobiana e baixo custo. No entanto apresentam ação ototóxica importante, havendo aqueles predominantemente cocleotóxicos (amicacina, canamicina, neomicina, paramomicina, aminosidina, netilmicina) e outros predominantemente vestibulotóxicos (gentamicina, estreptomicina) (OLIVEIRA; BERNAL, 2003). A ototoxicidade é em grande parte irreversível e resulta da destruição progressiva das células sensoriais vestibulares e

ou cocleares, que são altamente sensíveis à lesão provocada pelos aminoglicosídeos (BRUMMET, 1983).

Se a reversibilidade das lesões ainda é um desafio não vencido, recentemente vários estudos estão sendo desenvolvidos visando encontrar mecanismos de proteção da orelha interna contra estes agentes lesivos, mostrando resultados promissores e vislumbrando um caminho na direção da solução deste grave problema. Drogas como a deferoxamina, salicilato, fatores de crescimento, ginkgo biloba, tiosulfato de sódio e outras têm se mostrado eficazes na redução das lesões provocadas por aminoglicosídeos ou quimioterápicos quando administradas previamente e ou concomitantemente aos ototóxicos.

Uma nova linha de pesquisa, que a cada dia aumenta sua importância, é a que estuda os mecanismos endógenos de proteção da orelha interna. Sabe-se que na cóclea adulta várias enzimas de destoxificação e enzimas antioxidantes têm sido demonstradas, como: catalase, superóxido-dismutase, glutathione-peroxidase, glutathione-reductase, glutathione-S-transferase (EL BARBARY; ALTSCHULER; SCHACHT, 1993; RYBAK ET AL, 1997). Sabe-se também que a presença de glutathione (GSH), um tripeptídeo presente em todas as células de mamíferos, protege as células ciliadas externas *in vitro* contra citotoxicidade do metabólito tóxico da gentamicina (GARETZ; SCHACHT, 1992; GARETZ; LATSCHULER; SCHACHT, 1994), assim como a sua depleção potencializa ototoxicidade induzida por droga *in vivo* (HOFFMAN ET AL, 1988). Recentemente descobriu-se também que pequenas doses não tóxicas de amicacina ou gentamicina, administradas durante alguns dias previamente a administração de doses efetivamente ototóxicas, protegem a cóclea do efeito lesivo desta mesma droga, o que poderia ser explicado pelo



desencadeamento destes mecanismos endógenos de autodefesa (CANEDO, 1999; OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002; MAUDONNET, 2005). Notam-se, nestes estudos, a utilização da microscopia eletrônica de varredura e das emissões otoacústicas como método predominante de avaliação da orelha interna, nas lesões induzidas por drogas.

A necessidade do aprofundamento dos estudos para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos de lesão da orelha interna e, sobretudo, dos mecanismos endógenos de auto-proteção do Órgão de Corti é essencial para se evitar dano irreversível e surdez, evitando-se desta forma suas repercussões psicossociais.



## **2 OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

- 2.1. Determinar se a administração prévia de doses não tóxicas de gentamicina protege a cóclea contra doses tóxicas de amicacina, baseado no mecanismo de autodefesa, em cobaias.
  
- 2.2. Determinar se a amplitude das respostas das emissões otoacústicas por produtos de distorção têm correlação com o grau de integridade morfológica das células ciliadas externas, em cobaias.



### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Anatomofisiologia da Audição

A audição é um dos mais sensíveis e importantes sentidos do organismo humano. Para que o processamento auditivo ocorra de forma perfeita é necessária a integridade de todo o sistema auditivo, composto pelas orelhas externa, média e interna, e pelas vias auditivas centrais e periféricas.

A orelha externa é composta de duas partes: o pavilhão auditivo externo e o conduto auditivo externo. Estando situada de ambos os lados da cabeça apresenta as funções de proteger a orelha média, amplificar e localizar os sons no espaço (SEVIN; ANDRIEU-GUITRANCOURT; DEHESDIN, 2000). O pavilhão, principalmente a concha, pode amplificar em até 20 dB a intensidade de sons de frequências entre 5.000Hz e 6.000Hz. O conduto auditivo externo pode aumentar em até 10 dB a intensidade de sons entre 2.000Hz e 5.000Hz (*op. cit.*). A localização do som se realiza pela diferença de amplitude e de fase registrada por cada orelha. Este fenômeno forma parte da audição binaural, onde a orelha externa parece ter grande importância (SHAW, 1974; DANGER, 1979; SEVIN; ANDRIEU-GUITRANCOURT; DEHESDIN, 2000).

A orelha média é uma cavidade aérea tripartida, situada entre as três porções do osso temporal. Sua parte central, comumente chamada de caixa timpânica, contém o sistema tímpano-ossicular que transporta a onda sonora do mundo exterior

até a orelha interna. Sobre uma mesma linha reta se encontram, em direção posterior, os anexos mastoídeos e, em direção anterior, a tuba auditiva, que se comunica com a rinofaringe (THOMASSIN; BELLUS, 2000). Separando as orelhas média e externa encontra-se a membrana timpânica que, através dos ossículos martelo, bigorna e estribo, comunica-se com a orelha interna através da janela oval.

A orelha média desempenha um papel de amplificação sonora. Esta amplificação se dá por dois mecanismos: 1º - efeito de superfície, onde a área móvel de membrana timpânica de aproximadamente 55 mm<sup>2</sup> transmitida e aplicada sobre a base do estribo com aproximadamente 3,2 mm<sup>2</sup> leva a uma amplificação da onda sonora em aproximadamente 17 vezes (relação 55/3,2); 2º - efeito de alavanca dos ossículos, visto que o martelo sendo 1,3 vezes mais longo que a bigorna provoca um aumento da amplitude ao nível da articulação incudo-estapedial também de 1,3. O conjunto da amplificação então é de  $17 \times 1,3 = 22$  vezes (ALBERNAZ ET AL, 1997). A tuba auditiva exerce uma função de otimização da pressão aérea entre os dois lados da membrana timpânica, para que este sistema de amplificação funcione de forma eficiente. O músculo do estribo, ao se contrair, aumenta a rigidez da cadeia ossicular protegendo o ouvido de sons muito altos, não explosivos (*op. cit.*).

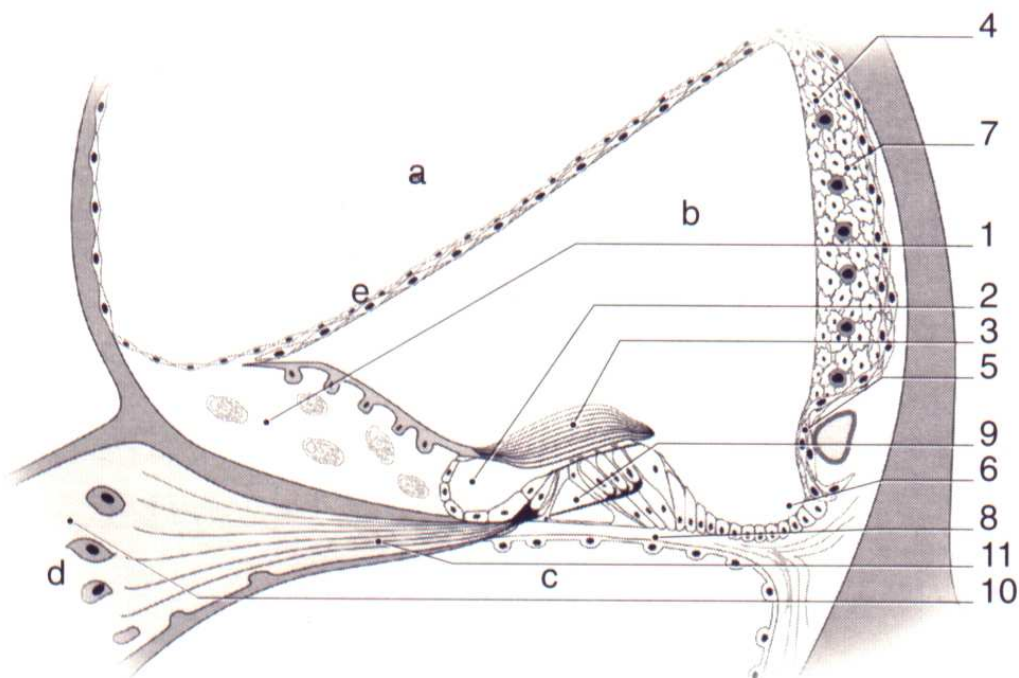
A orelha interna é composta pela cóclea e pelo sistema vestibular. O sistema vestibular constitui-se dos canais semicirculares, utrículo e sáculo. O utrículo e sáculo possuem máculas, estruturas onde os estereocílios das células sensoriais receptoras estão imersos em uma matriz gelatinosa, a otocônia, sobre a qual se encontram pequenas cristas de carbonato de cálcio, os otólitos. Os canais semicirculares, em número de três, possuem uma extremidade dilatada, a ampola, onde se encontra a crista ampular. As células receptoras localizadas no ápice da crista com seus cílios

estão imersas na estrutura gelatinosa, a cúpula. A movimentação da endolinfa, de acordo com a mudança de posição ou aceleração da cabeça, movimenta a cúpula e ou os otólitos, o que, devido à disposição espacial dos canais, fornece a noção de posição e movimento. De maneira genérica, o sáculo e o utrículo respondem às acelerações lineares, enquanto os canais semicirculares às acelerações angulares. As informações sensoriais vestibulares são levadas aos nervos vestibular superior e inferior que estabelecem sinapses com quatro núcleos vestibulares situados no assoalho do IV ventrículo. A partir daí ocorrem conexões com o sistema óculo-motor e proprioceptivo, fundamentais para a coordenação geral do equilíbrio.

A cóclea, motivo principal de nosso estudo, é um tubo dividido em três partes: escala vestibular, escala média (ducto coclear) e escala timpânica, e enrolado em torno de um eixo central, o modíolo. Ela tem a forma de uma espiral com duas espiras e meia. Possui dois pontos de contato com a orelha média: a janela oval ou vestibular, onde se encontra o estribo e que comunica a orelha média com a escala vestibular; a janela redonda ou coclear, obliterada por uma membrana que separa a orelha média da escala timpânica. As escalas vestibulares e cocleares contêm perilinfã, líquido de mesma composição do líquor, e se comunicam no ápice da cóclea através do helicotrema. Desta forma, as ondas sonoras que atingem a escala vestibular, através do estribo, criam ondas de propagação na perilinfã da escala vestibular que continuam na escala timpânica através do helicotrema.

A escala média ou ducto coclear contém endolinfa, cuja composição é semelhante à do líquido intracelular (rico em potássio e pobre em sódio). Possui potencial elétrico positivo de 80mV, denominado potencial endococlear, que é um fator de amplificação adicional para as células receptoras. A escala média é separada

da escala vestibular pela membrana de Reissner, e da escala timpânica pela membrana basilar, sobre a qual se encontra o órgão de Corti (Figura 1). A diferente dimensão da membrana basilar ao longo da cóclea faz com que, ao ser exposta às ondas de propagação sonora da perilinfa, ela vibre com maior amplitude na área correspondente à frequência de cada som. Este princípio mecânico de distribuição de frequências é denominado de princípio da localização.

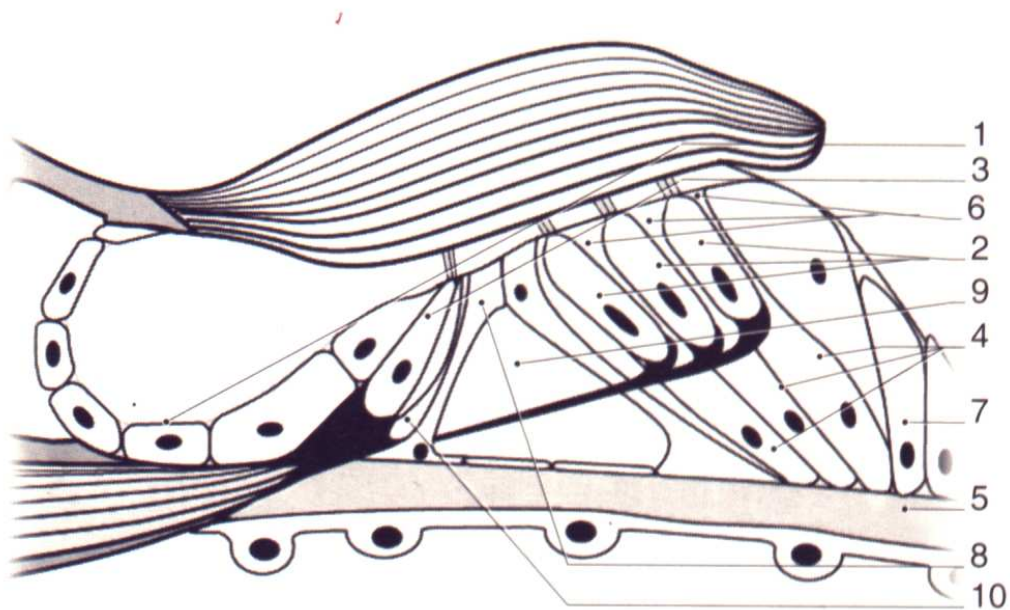


**Figura 1** Corte ao nível da cóclea mostrando as escalas timpânica, média e vestibular: a. rampa vestibular; b. canal coclear (escala média); c. rampa timpânica; d. gânglio espiral; e. membrana de Reissner; 1. limbo espiral; 2. sulco espiral interno; 3. membrana tectória; 4. estria vascular; 5. círculo espiral; 6. sulco espiral externo; 7. ligamento espiral; 8. membrana basilar; 9. túnel de Corti; 10. lâmina espiral; 11. nervo coclear. Fonte: Sauvage et al, 2000.

No órgão de Corti as células ciliadas internas (CCI) estão dispostas em única fileira, medialmente ao túnel de Corti, estando conectadas a terminações neurais aferentes que levam informações ao nervo coclear, sendo as verdadeiras células receptoras auditivas. As células ciliadas externas (CCE), dispostas em três fileiras



lateralmente ao túnel de Corti, são células altamente especializadas cuja função é amplificar a vibração da membrana basilar e aprimorar a discriminação de frequências do sistema (Figura 2). Possuem sinapses aferentes e eferentes, sendo estas últimas a maioria, provenientes do trato olivo-coclear. Desta forma realizam uma função também de ajuste sob influência do sistema auditivo central.



**Figura 2** Órgão de Corti: 1. sulco espiral interno; 2. células ciliadas externas; 3. célula ciliada interna; 4. células de Deiters; 5. membrana basilar; 6. prolongamentos digitais das células de Deiters; 7. células de Hensen; 8. pilares; 9. túnel de Corti; 10. espaço de Nuel. Fonte: Sauvage et al, 2000.

A membrana tectória se apóia sobre os cílios das CCE. Os cílios das CCI, com o sistema em repouso, não tocam a membrana tectória. Os cílios das CCE, porém, estão imersos na mesma. Quando surgem as ondas de propagação na perilinfa, determinadas áreas da membrana basilar, começam a vibrar e os cílios das CCE correspondentes são flexionados. Estas flexões dos cílios levam as CCE a contraírem-se ativamente, trazendo a membrana tectória de encontro aos cílios das CCI, flexionando-os e ativando-as. A despolarização desta CCI envia sinais para o nervo

coclear. O número de CCE em contração é ajustado pela inervação eferente. Um princípio fisiológico ligado às células receptoras é o da periodicidade, em que várias células transmitem informações seriadas para aprimorar a discriminação de frequência por localização (ALBERNAZ ET AL, 1997).

Os impulsos nervosos que atingem as fibras do nervo coclear ao nível da cóclea atingem sequencialmente o gânglio espiral, os núcleos cocleares no tronco cerebral, o complexo olivar, o colículo inferior, o leminisco lateral, o complexo geniculado medial e área auditiva cortical do lobo temporal. Em todos estes níveis ocorre uma distribuição tonotópica das frequências graves, médias e agudas (*op. cit.*).

### **3.2. Ototoxicidade**

As ototoxicoses são afecções iatrogênicas provocadas por drogas que alteram a orelha interna. Podem afetar o sistema coclear, o sistema vestibular ou ambos, afetando a audição e ou equilíbrio. Considera-se ototoxicose quando há perda auditiva sensorio-neural de 25 dB em uma ou mais frequências de 250 a 8.000 Hz e ou manifestações vestibulares como vertigem ou desequilíbrio (OLIVEIRA; BERNAL, 2003).

Várias drogas têm sido descritas como potencialmente ototóxicas, como eritromicina, cloranfenicol, ampicilina, minociclina, cefalosporina, viomicina, capreomicina, polimixinas, actinomicina, frameticina, lincomicina, ácido nalidíxico, vancomicina e espectinomicina. Também drogas não antibióticas como

quimioterápicos (cisplatina, vincristina), clorexedina, benzalcônio, iodo, etanol, propilenoglicol e substâncias como o mercúrio e solventes orgânicos (OLIVEIRA, 1989; ALMEIDA; ALMEIDA; DUPRAT, 1993; OLIVEIRA; BERNAL, 2003). Diuréticos como o ácido etacrínico e furosemida têm ação ototóxica reversível e potencializam a ototoxicidade dos aminoglicosídeos. Também com ação ototóxica reversível estão os antiinflamatórios não esteroidais como o ibuprofeno, salicilatos, monofenilbutazona e indometacina. Os contraceptivos orais, da mesma forma, podem provocar em alguns casos perdas auditivas uni ou bilaterais progressivas e irreversíveis (OLIVEIRA, 1989, 1990).

Porém, indubitavelmente, dentre as drogas de maior potencial ototóxico, as mais utilizadas, pesquisadas e estudadas são os antibióticos aminoglicosídeos.

O nome aminoglicosídeo tem origem na sua base estrutural composta por dois ou mais aminoaçúcares unidos por uma ligação glicosídica a um núcleo de hexose (aminociclitol) e com três a cinco grupos amino primários ou secundários distribuídos em um sistema de anéis (ROSA-GALVÉZ; JAUREGUI-RENAUS; HERNANDEZ-GORIBAR, 1998; CHAMBERS, 2003).

O primeiro aminoglicosídeo descoberto foi a estreptomicina, em 1943, fruto da busca por medicamentos antibacterianos contra microrganismos gram-negativos. Com o seu uso, inicialmente para tratar tuberculose, rapidamente notaram-se os seus efeitos tóxicos renais e cócleo-vestibulares. Com o tempo também se verificaram os primeiros casos de resistência bacteriana, o que impulsionou a busca por outras alternativas. Surgiram então a neomicina em 1949, a canamicina em 1957, a gentamicina em 1964 e a tobramicina em 1967 (SANDE; MANDELL, 1989). A

amicacina, descrita em 1972, é um derivado da canamicina, e a netilmicina é um derivado da sisomicina (CHAMBERS, 2003).

Os aminoglicosídeos são compostos catiônicos fortemente polares, hidrossolúveis, muito pouco absorvidos no trato gastrointestinal, excretados por filtração glomerular renal com vida média no plasma de 2 a 3 horas (SANDE; MANDELL, 1989). Atuam interferindo na síntese de proteínas dos microrganismos susceptíveis, sendo bactericida dose-dependente (CHAMBERS, 2003), atuando principalmente contra bactérias aeróbicas gram-negativas. Apesar dos efeitos tóxicos, ainda são largamente utilizadas em todo o mundo devido ao seu baixo custo e alta eficácia.

A ototoxicidade por aminoglicosídeos tem sido observada em animais e seres humanos. Fee, em 1980, relata uma incidência de 2 a 25% de ototoxicidade em pacientes submetidos a antibioticoterapia por aminoglicosídeo. Matz, em 1993, descreveu alterações da orelha interna em 20% dos pacientes expostos a estreptomicina, 13.9% a amicacina, 8.6% a gentamicina, 6.1% a tobramicina e 2.4% a netilmicina. Parece existir também uma susceptibilidade genética à ototoxicidade pelos aminoglicosídeos (FISHEL-GHODSIAN, 2005). Na Ásia tem sido identificado que esta susceptibilidade pode ser hereditária por uma mutação do gen mitocondrial para o RNA ribossomal 12S (HIGASHI, 1989; HU ET AL, 1991; PANDYA ET AL, 1997; LI ET AL, 2005; DAI ET AL, 2006; XING ET AL, 2006). Rodrigues-Ballesteros et al (2006) também mostraram a presença da mesma mutação do gen rRNA 12S em uma família espanhola, levando a uma maior susceptibilidade de perda auditiva, demonstrando que a mesma não se limitava à população oriental. Almeida, Almeida e Duprat (1993), relatam que esta hereditariedade parece ser autossômica

dominante, podendo haver ainda a sensibilidade destas famílias aos outros ototóxicos. McCracken (1986) e Matz (1993) descreveram uma menor incidência de toxicidade coclear por estreptomicina, canamicina, gentamicina, amicacina e netilmicina em neonatos. No entanto este dado ainda é controverso visto à dificuldade de avaliação auditiva nesta faixa etária.

Apesar de todos os aminoglicosídeos exercerem toxicidade tanto coclear como vestibular, existe uma seletividade tóxica. Assim, enquanto estreptomicina e gentamicina têm uma toxicidade predominantemente vestibular, canamicina e amicacina são predominantemente cocleotóxicos. Não existe consenso sobre a tobramicina. Shulman (1976) afirma que a mesma é predominantemente cocleotóxica, Oliveira e Bernal (2003) que é predominantemente vestibulotóxica e Chambers (2003) que exerce a mesma toxicidade na cóclea e no sistema vestibular. Existe também um sinergismo dos aminoglicosídeos com outras drogas específicas que potencializam os efeitos tóxicos de ambas. Assim acontece quando se administra um aminoglicosídeo e logo em seguida um diurético de alça (exemplo: ácido etacrínico). Quando a ordem de administração se inverte, a toxicidade é a mesma das duas drogas isoladamente. Acredita-se, neste caso, que os aminoglicosídeos atuam nas membranas celulares da orelha interna aumentando a permeabilidade e facilitando a entrada e toxicidade destes diuréticos (MATZ, 1993).

Histologicamente, o dano inicial na cóclea acontece predominantemente na espira basal, seguindo posteriormente em direção à espira apical. A 1ª fileira de CCE (mais interna) é também a primeira a ser acometida pelo aminoglicosídeo, seguida pela segunda e terceira fileiras dentro da mesma espira. Somente em situações de toxicidade severa vemos lesões de células ciliadas internas (CCI). Estria vascular,

ligamento espiral e membrana de Reissner também podem estar lesadas (HUGRES; KOEGEL, 1985; OLIVEIRA, 1989).

Os aminoglicosídeos têm afinidade pelos polifosfoinosídeos e alteram a permeabilidade da membrana celular, provocando vários efeitos intracelulares: na síntese de proteínas, DNA, RNA, metabolismo energético, transporte iônico, síntese ou degradação de prostaglandinas, gangliosídeos, mucopolissacarídeos e lipídeos (SCHACHT, 1993).

Após a penetração nas células sensoriais, a sua eliminação é lenta, o que pode explicar o seu efeito tardio mesmo depois do término do tratamento com o aminoglicosídeo (HIEL ET AL, 1992). Existe evidência também que o agente tóxico não seja o composto original, mas um metabólito do mesmo (NISHIDA; TAKUMIDA, 1996; ROSA-GALVÉZ; JAUREGUI-RENAUS; HERNANDEZ-GORIBAR, 1998), provavelmente oriundo de uma ligação com o  $Fe^3$  produzindo reações de redução com liberação de substâncias oxigênio reativas (OLIVEIRA; BERNAL, 2003). Também a susceptibilidade genética como a relação com a síntese de proteínas mitocondriais e a deficiência do complexo mitocondrial I, em portadores de mutação 1555<sup>G</sup>, levando a dano oxidativo, tem sido considerado (HUTCHIN; CORTOPASSI, 1994).

A ototoxicidade é em grande parte irreversível, fruto da destruição progressiva das células sensoriais cocleares e ou vestibulares, que são altamente sensíveis à lesão causada pelos aminoglicosídeos (BRUMMETT, 1983; CHAMBERS, 2003). Se a dose é aumentada e a exposição prolongada, a lesão progride na cóclea da base para o ápice e segue-se uma degeneração retrógrada do nervo coclear (CHAMBERS, 2003).

### 3.3. Otoproteção

As tentativas de proteção da orelha interna contra a agressão dos ototóxicos, sobretudo aminoglicosídeos e quimioterápicos, iniciaram-se desde que estas drogas começaram a ser utilizadas e este seu efeito deletério foi identificado.

Inúmeras drogas já foram identificadas e estudos publicados mostrando terem efeito protetor ou atenuador contra lesão por drogas ototóxicas, porém nenhuma com ação totalmente eficaz.

Estudos recentes têm associado a presença de metabólitos oxigênio-reativos (radicais livres) como uma via de lesão tecidual droga-induzida na orelha interna (WU; SHA; SCHACHT, 2002; OLIVEIRA; BERNAL, 2003). Diferentes drogas e xenobióticos são convertidas ou estimulam a formação de substâncias oxigênio-reativas. Estes radicais livres são compostos altamente agressivos que alteram membranas biológicas, proteínas, lipídios, carboidratos e são implicadas em reações adversas às drogas (KNIGHT, 1995) podendo provocar até a morte celular. Minami, Sha e Schacht (2004) demonstraram a participação de processos oxigênio reativos no mecanismo de ototoxicidade por cisplatina, sugerindo que o uso de antioxidantes poderia diminuir a toxicidade celular.

Sabendo-se que nas reações de ototoxicidade por aminoglicosídeos há participação de ferro com formação do complexo aminoglicosídeo- $\text{Fe}^3$  que após reduzido pode continuar a catalizar a formação de radicais livres superóxidos de moléculas de  $\text{O}_2$  (HUANG; SCHACHT, 1990; CRANN ET AL, 1992), era de se esperar que quelantes, menos tóxicos, poderiam interferir diretamente na proteção, ao

competir com o aminoglicosídeo na ligação com o ferro, impedindo a formação do complexo aminoglicosídeo-Fe e liberação de radicais livres, prevenindo ou diminuindo os danos teciduais.

De fato, o uso de quelantes do ferro, como a deferoxamina e 2-3 diidroxibenzoato tem se mostrado eficaz para atenuar os efeitos ototóxicos dos aminoglicosídeos (SONG; ANDERSON; SCHACHT, 1997; CONLON; PERRY; SMITH, 1998; SINSWAT ET AL, 2000; OLIVEIRA; BERNAL, 2003). O salicilato é outra droga que age como quelante do ferro e também como anti-oxidante. É uma droga muito utilizada na prática médica na forma de ácido acetil salicílico, que é convertido em salicilato no corpo. Apesar das doses altas poderem causar acúfenos e perda transitória da audição, a proteção é alcançada com doses moderadas de salicilato contra doses de gentamicina até 50 vezes maiores que as usadas em humanos (OLIVEIRA; BERNAL, 2003; HYPPOLITO; OLIVEIRA; ROSSATO, 2006; CHEN ET AL, 2007).

As substâncias anti-radicais livres também têm sido muito utilizadas com sucesso parcial na proteção da orelha interna contra ototóxicos. Dentre elas podemos citar o ácido alfa-lipóico. O ácido alfa-lipóico é um anti-radical livre lipofílico que também pode aumentar a concentração celular de vitamina "C", "E" e glutatona, considerado anti-oxidantes naturais das células. Em trabalho publicado foi demonstrada sua ação protetora contra doses ototóxicas de amicacina (CONLON ET AL, 1999).

Outra droga anti-oxidante com efeitos estudados é o alfa-tocoferol, cujas publicações têm mostrado ação otoprotetora contra ototoxicidade por gentamicina (FETONI ET AL, 2003; 2004a) e por cisplatina (FETONI ET AL, 2004b).



A própria glutathione, um tripeptídeo encontrado em todas as células de mamíferos e que tem um papel chave na proteção celular contra substâncias oxigênio-reativas (JACOBY ET AL, 1978; MEISTER ET AL, 1991), se administrado previamente ao aminoglicosídeo, pode reduzir significativamente as lesões produzidas por este último, segundo trabalho publicado por Nishida e Takumida (1996). Ruiz et al (2006) mostrou que a glutathione (GSH) também protege as células ciliadas contra lesão por produtos do estresse celular oxidativo. Sabe-se também que a depleção de glutathione potencializa a ototoxicidade por drogas *in vivo* (HOFFMAN ET AL, 1988) enquanto a sua presença protege as células ciliadas externas *in vitro* contra a citotoxicidade do metabólito tóxico da gentamicina (GARETZ; SCHACHT, 1992; GARETZ; LATSCHULER; SCHACHT, 1994). As enzimas relacionadas à glutathione representam agentes endógenos de proteção contra metabólitos tóxicos. A glutathione S-transferase cataliza a conjugação da glutathione formando compostos sulfídricos (glutathione ditioeritritol) que previnem a ação citotóxica da gentamicina. Whitworth et al (2004) aplicando agonistas de adenosina junto à janela redonda de chinchilas obteve efeito protetor contra ototoxicidade pela cisplatina. A aplicação de agonista de adenosina na janela redonda resulta, segundo este autor, em significativo aumento coclear de glutathione peroxidase e superóxido desmutase. Segundo Oliveira e Bernal (2003), é então possível que a glutathione inative o metabólito da gentamicina em uma reação enzimática com a participação da glutathione-transferase e glutathione-peroxidase, permanecendo, no entanto, apenas no campo especulativo.

A ginkgo biloba também tem sido demonstrada como agente protetor de lesão de células ciliadas externas quando administradas concomitantemente à droga

ototóxica. A ginkgo biloba teria uma ação antioxidante protegendo as células dos metabólitos oxidativos. Esta ação protetora foi demonstrada por Hyppolito et al. (2003) para a cisplatina e por Miman, Sha e Schacht (2002) para amicacina.

Entre inúmeras outras drogas pesquisadas como protetoras de lesão induzidas por aminoglicosídeos podemos citar os fatores neurotróficos, como a neurotrofina-3 (NT-3) (DUAN ET AL, 2000) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (YAGI ET AL, 1999), que podem proteger as células ciliadas do trauma tóxico. Também os fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator transformante de crescimento (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) apresentam ação protetora contra ototoxicidade (ROMAND; CHARDIN, 1999). Da mesma forma, o fator de crescimento fibroblástico (FGF-2) que teria uma ação protetora contra as CCE e o gânglio espiral, e o metilcatecol, que estimula a síntese do fator de crescimento neuronal (NGF). Nesta mesma linha, Corbacella et al. (2004) e Wei et al. (2005) publicaram trabalhos demonstrando que a minociclina, um antibiótico derivado da tetraciclina, que tem uma ação protetora contra várias desordens neurodegenerativas, também apresenta uma ação protetora contra ototoxicidade induzida por gentamicina.

Nos últimos anos, especial atenção tem sido dada aos mecanismos endógenos de auto-proteção celular ao nível da orelha interna. Como já explicitado, a cóclea adulta possui várias enzimas anti-oxidantes capazes de transformar metabólitos tóxicos em substâncias menos lesivas. As principais são a glutathione-transferase, glutathione-peroxidase, glutathione-redutase, superóxido-dismutase e catalase. Outras substâncias antioxidantes como a vitamina C também podem estar presentes. Baseado nestes conhecimentos, Canedo (1999) e Oliveira, Canedo e Rossato (2002) demonstraram que a exposição da orelha interna de cobaias a pequenas doses não

tóxicas de amicacina, por um determinado tempo, protegiam a cóclea quando era sequencialmente exposta à mesma droga em doses ototóxicas, sugerindo que o estímulo não tóxico prévio induziria as células da orelha interna de cobaias a produzirem substâncias endógenas de autodefesa que as deixariam melhor preparadas para enfrentar as doses potencialmente lesivas. Experimento com resultados semelhantes foi publicado por Maudonnet (2005) que utilizou a gentamicina, sendo este um campo ainda aberto para novos estudos por tratar-se de um fenômeno biológico que, estudado com maior profundidade, poderá esclarecer os mecanismos de ototoxicidade e otoproteção induzida por drogas.



## **4 MATERIAL E MÉTODO**

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 MATERIAL**

Para o estudo foram utilizadas 31 cobaias albinas macho, espécie *Cavia porcellus*, linhagem inglesa, com peso entre 400g e 600g., divididas em quatro grupos: grupos 1 (soro fisiológico) com 6 cobaias, grupo 2 (gentamicina) com 5 cobaias, grupos 3 (amicacina) e 4 (gentamicina + amicacina) com 10 cobaias cada.

### **4.2 MÉTODO**

#### **4.2.1 Seleção dos animais experimentais e critérios de inclusão**

Escolhemos como animal experimental cobaias albinas, pela facilidade de manejo, dissecação coclear e manipulação e ainda pela igual facilidade de infusão de drogas anestésicas e drogas em experimentação, pela via intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea, quando comparados a outros animais experimentais.

Os cuidados seguiram as diretrizes do Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, DC. (1996).

O protocolo experimental seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi submetido à análise e aprovação prévia da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto com o título preliminar de "Estudos dos mecanismos de otoproteção cruzada da orelha interna de cobaias", sob protocolo número 086/2004 (Anexo A).

Os animais foram selecionados no Biotério Central da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, através da presença do Reflexo de Preyer (JERO; COLING; LALWANI, 2001; PREYER, 1882) e peso variando entre 400 e 600 gramas, por serem animais mais resistentes aos efeitos colaterais sistêmicos das altas doses de amicacina utilizadas.

Após um repouso auditivo de 24 horas, os animais foram avaliados e submetidos à otoscopia externa através da visualização do conduto auditivo externo com otoscópio. Os animais que apresentavam sinais de otite externa ou otite média aguda, cerume de difícil remoção, alterações inflamatórias do conduto auditivo externo ou mesmo conduto auditivo muito estreito para acomodar adequadamente a sonda do equipamento de emissões otoacústicas (EOA), foram descartados do experimento. Os que apresentavam rolha de cerume e tinham a mesma removida foram mantidos.

Todos os animais incluídos foram então submetidos a uma triagem auditiva pela pesquisa da presença de emissão otoacústica por produto de distorção (EOAPD) em cabine com isolamento acústico e sob anestesia com ketamina (65 mg/Kg). As que apresentavam EOAPD presentes nas duas orelhas foram selecionadas para o experimento e as demais excluídas. Os animais foram mantidos no Biotério do

Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

.....

#### **4.2.2. Formação dos Grupos de Estudo**

Dentre as 31 cobaias incluídas no trabalho, duas cobaias do grupo 3 apresentaram problemas técnicos em uma das duas cócleas, na preparação para análise à microscopia eletrônica, sendo estas duas cócleas com problemas excluídas do estudo, mantendo-se as cócleas preservadas. Desta forma, ficou o grupo 1 com seis cobaias e doze cócleas, o grupo 2 com cinco cobaias e dez cócleas, o grupo 3 com dez cobaias e dezoito cócleas e o grupo 4 com dez cobaias e vinte cócleas. As características de cada grupo estão abaixo descritas:

##### **GRUPO 1 – CONTROLE – SORO FISIOLÓGICO**

- Seis animais - doze cócleas, com administração de SF 0,9% intramuscular em dose única diária, no mesmo volume correspondente à dose de amicacina para o peso da cobaia, durante 30 dias consecutivos.

##### **GRUPO 2 – CONTROLE – GENTAMICINA**

- Cinco animais – dez cócleas, com administração intramuscular de Gentamicina na dose única diária de 10 mg/kg/dia intramuscular durante 30 dias consecutivos.

#### GRUPO 3 – CONTROLE – AMICACINA

- Dez animais – dezoito cócleas, com administração intramuscular de Amicacina na dose única diária de 400 mg/kg/dia intramuscular, por doze dias consecutivos<sup>1</sup>.

#### GRUPO 4 – ESTUDO - GENTAMICINA + AMICACINA

- Dez animais – vinte cócleas, com administração de intramuscular de Gentamicina na dose única diária de 10 mg/kg/dia do 1º ao 30º dia, seguido pela de administração intramuscular sequencial de Amicacina na dose única diária de 400 mg/kg/dia, por mais doze dias (31º ao 42º dia).

A dose utilizada de gentamicina, incapaz de provocar lesão significativa na orelha interna, foi a mesma utilizada em um estudo prévio realizado por Maudonnet (2005) e confirmado pelo nosso grupo controle 2. A utilização de tal dose teve por objetivo tentar promover o fenômeno da habituação das CCE expostas previamente a uma droga potencialmente ototóxica - a amicacina.

---

<sup>1</sup> No grupo 3, duas cócleas de animais distintos foram excluídas do estudo por problemas técnicos na preparação para MEV, reduzindo-se o número de cócleas estudadas de 20 para 18, neste grupo.



A dose utilizada de amicacina, considerada potencialmente ototóxica, foi a mesma utilizada em estudos prévios de Canedo (1999) e Oliveira, Canedo e Rossato (2002), confirmado pelo nosso grupo de estudo 3. A decisão da reprodução deste grupo 3, seguindo o mesmo modelo dos trabalhos citados, foi tomada como forma de confirmação dos resultados obtidos pelos autores citados e solidificação do achados do grupo 4.

No grupo 4 buscou-se testar um possível aumento da resistência das CCE à lesão provocada pela amicacina quando expostas a doses prévias, não lesivas, de gentamicina.

Para cálculo correto das doses, as cobaias eram pesadas diariamente, imediatamente antes da administração das drogas. Para a aplicação controlada das drogas em teste, foram utilizadas seringas descartáveis de 1cc, milimetradas, para cada animal. Para a aplicação intramuscular utilizou-se de agulhas descartáveis BD<sup>®</sup> tamanho 21G1 (25 X 8 – 0.8 x 25 milímetros) e para aplicação subcutânea agulhas descartáveis BD<sup>®</sup> tamanho 19G1 (25 X 10 - 1,00 x 25 milímetros).

A gentamicina utilizada foi Garamicina<sup>®</sup> Schering Plough – ampolas de 60 mg com 1,5ml. A amicacina utilizada foi Novamin<sup>®</sup> Bristol-Myers Squibb – ampolas de 500mg com 2 ml.

#### **4.2.3 – Avaliação Funcional Auditiva**

A avaliação funcional auditiva foi realizada através do Teste de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção, utilizando-se o Equipamento ILO 92 CAE

System Otodynamics LTD (Hatfield, UK). As cobaias eram sedadas com ketamina para serem submetidas aos testes. Antes da realização do registro das EOAPD eram submetidas à otoscopia para avaliação do conduto auditivo externo e membrana timpânica. Somente as cobaias com emissões otoacústicas (EOA) presentes foram incluídas no estudo.

No Grupo 1 (Controle com SF 0,9%), Grupo 2 (Controle com Gentamicina) e Grupo 3 (Amicacina), as EOAPD foram realizadas no 1º dia de administração e 24 horas após o término da administração das drogas ou solução salina. No Grupo quatro (Gentamicina+Amicacina) as EOAPD foram realizadas no 1º dia de administração da Gentamicina, no 31º dia quando se interrompia o uso de gentamicina e iniciava-se o uso de Amicacina e no 43º dia, 24 horas após a última dose de amicacina, imediatamente antes do sacrifício.

O teste de EOAPD foi realizado seguindo a relação de frequências  $2F(1) - F(2)$  com relação  $F(1)/F(2) = 1,22$ . Consideramos as EOA a partir de 1,5 kHz, pois as dimensões do conduto auditivo externo da cobaia fazem com que haja uma dificuldade de detecção das EOA abaixo desta frequência, obtendo respostas que coincidem com as respostas do ruído (HYPPOLITO ET AL, 2005). Estes dados estão de acordo com trabalho de Liang e Zhong (1998) que encontraram maiores amplitudes de EOAPD acima de 2 kHz, em cobaias.

Desta forma, ao analisarmos a frequência de 2 kHz, oferecemos um tom puro um pouco acima e um pouco abaixo, de tal modo que a relação entre eles seja de 1,22, obtendo assim, automaticamente, uma resposta de frequência resultante seguindo a relação  $2F(1)-F(2)$  (abaixo da frequência avaliada) e  $2F(2)-F(1)$  (acima da frequência resultante) (HYPPOLITO ET AL, 2003). Deve-se ainda levar em

consideração que as intensidades de F(2) e F(1) podem ser iguais ou diferentes. Na literatura, em trabalhos utilizando cobaias, encontramos estímulos que variam de 30 a 120 dB (WITHNELL;SHAFFER;TALMADGE, 2003; LUKASHKIN;RUSSEL, 2005). Em humanos, a intensidade do estímulo desencadeante pode variar numa faixa de 0 a 70 dB NPS e pode ser medida na faixa de 500 a 8000Hz (HE; SCHMIEDT, 1993). Michaelis et al (2004) pesquisando os níveis tonais para se conseguir as maiores amplitudes de EOAPD em cobaias, concluíram que a relação de intensidade L1 e L2 para estes animais é similar aos humanos. Baseado nos estudos destes autores e de Hyppolito et al (2005), Maudonnet (2005) e Iha et al (2007), no presente trabalho utilizamos intensidades iguais de 70 dB NPS para F(1) e F(2). A metodologia utilizada é a mesma descrita por outros autores (WITHNELL; SHAFFER; TALMADGE, 2003; HYPOLITO ET AL, 2003,2005; MAUDONNET,2005; LUKASHKIN; RUSSELL, 2005).

As otoemissões resultantes costumam ser aproximadamente 55 dB NPS menos intensas que o estímulo provocante (RASMUSSEN ET AL, 1993). O conjunto destas respostas, colocadas em um gráfico, forma o chamado "DPGRAM", o audiococleograma, onde se tem o estímulo que é o som e a resposta que também é um som e que fornece a função das células ciliadas externas cocleares responsáveis pelas frequências analisadas (LOPES FILHO; CARLOS; REDONDO, 1995).

Neste estudo consideramos mais importante as EOAPD nas frequências mais agudas, que avaliam qualitativamente o estado funcional das células ciliadas externas na espira basal da cóclea. Foram consideradas as EOAPD como presentes ou ausentes. Foi também analisada a variação da amplitude das EOAPD entre o início e o fim do experimento e comparado com o resultado da análise morfológica da orelha interna em cada cobaia.

#### **4.2.4 – Preparação do Material para Avaliação Morfológica**

No dia seguinte a última dose da droga ou solução salina administrada em cada um dos quatro grupos e, depois de realizada as EOAPD, os animais foram sacrificados com injeção letal de tiopental sódico (Thionembutal®) intraperitoneal e as bulas imediatamente retiradas bilateralmente e abertas, expondo-se as cócleas. A partir daí uma série de passos foram tomados para preparação do material para o estudo morfológico, que foi realizado sob microscopia eletrônica de varredura.

##### **4.2.4.1. Fixação**

Em seguida à abertura da Bula Timpânica era injetada solução de fixação de glutaraldeído a 2,5% lentamente através da janela redonda para que não houvesse lesão de estruturas cócleo-vestibulares. Após esta fixação inicial com glutaraldeído, o material era submetido a cinco ou seis lavagens com solução tampão-fosfato 0,1M e submetido à microdissecção expondo-se as espiras cocleares. Então era novamente imerso em tampão-fosfato 0,1M por 12 horas depois de lavado exaustivamente com a mesma solução. Depois era refixado em solução constituída de tetróxido de ósmio a 1% em tampão-fosfato 0,1M durante 1 hora a 4°C. Em seguida o material era lavado em 3 banhos de água bidestilada por 2 a 3 minutos cada e então imerso em solução de ácido tânico aquosa a 1% por 1 hora também a 4°C.

#### **4.2.4.2 - Desidratação**

A desidratação das estruturas era então realizada com banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% e 95% durante 10 minutos cada. A seguir utilizou-se etanol a 100% em 3 banhos de 20 minutos cada, deixando-se as estruturas imersas no último banho à temperatura ambiente por 12 horas.

#### **4.2.4.3. Secagem**

A secagem da água ainda presente nas amostras, após desidratação, foi realizada utilizando-se equipamento especial. O aparelho utilizado foi o BAL-TEC – CPD 030 – Criptical Point Dryer (Balzers, Liechtenstein), sendo a secagem realizada pelo método do ponto crítico com as amostras sendo transferidas para a câmara do aparelho e recobertas por dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) líquido.

#### **4.2.4.4 – Metalização de estruturas**

Para adequada observação à microscopia eletrônica de varredura (MEV), as cócleas dissecadas e parcialmente preparadas foram fixadas pela base em um porta-espécime cilíndrico de metal com pasta condutiva de carbono. Eram então cobertas por uma fina camada de ouro, através de um vaporizador BAL-TEC SCD 050 (Balzers, Liechtenstein), desta forma tornando-se eletricamente bem

condutivos, requisito para análise à microscopia de varredura (Figura 3), conforme procedimento seguido por Saito et al (1995), Cardinaal et al. (2000), Demarco (2001), Oliveira , Canedo e Rossato (2002) e Hyppolito et al (2003).



**Figura 3** Porta-espécime mostrando cóclea preparada para estudo em microscópio eletrônico

#### **4.2.4.5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

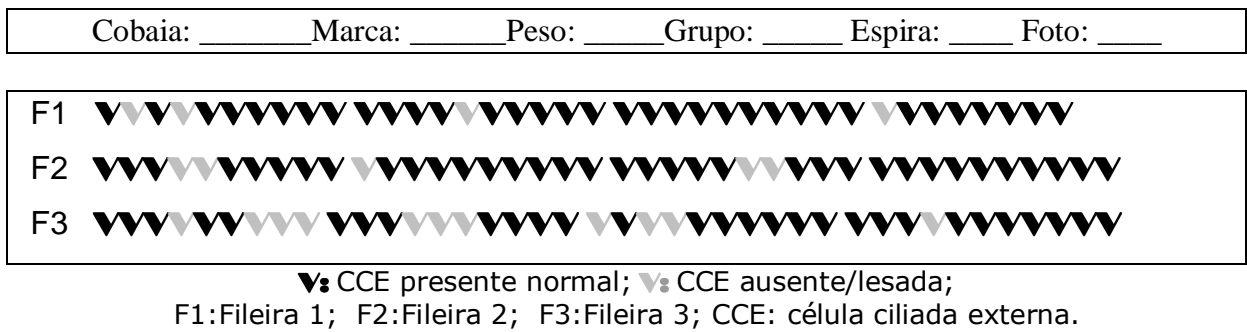
Terminados os processos anteriores, as estruturas foram levadas para análise à microscopia eletrônica de varredura (MEV). O microscópio eletrônico utilizado foi o JEOL SCANNING MICROSCOPE – JSM 5200 (Tokyo, Japan) (Figura 4).



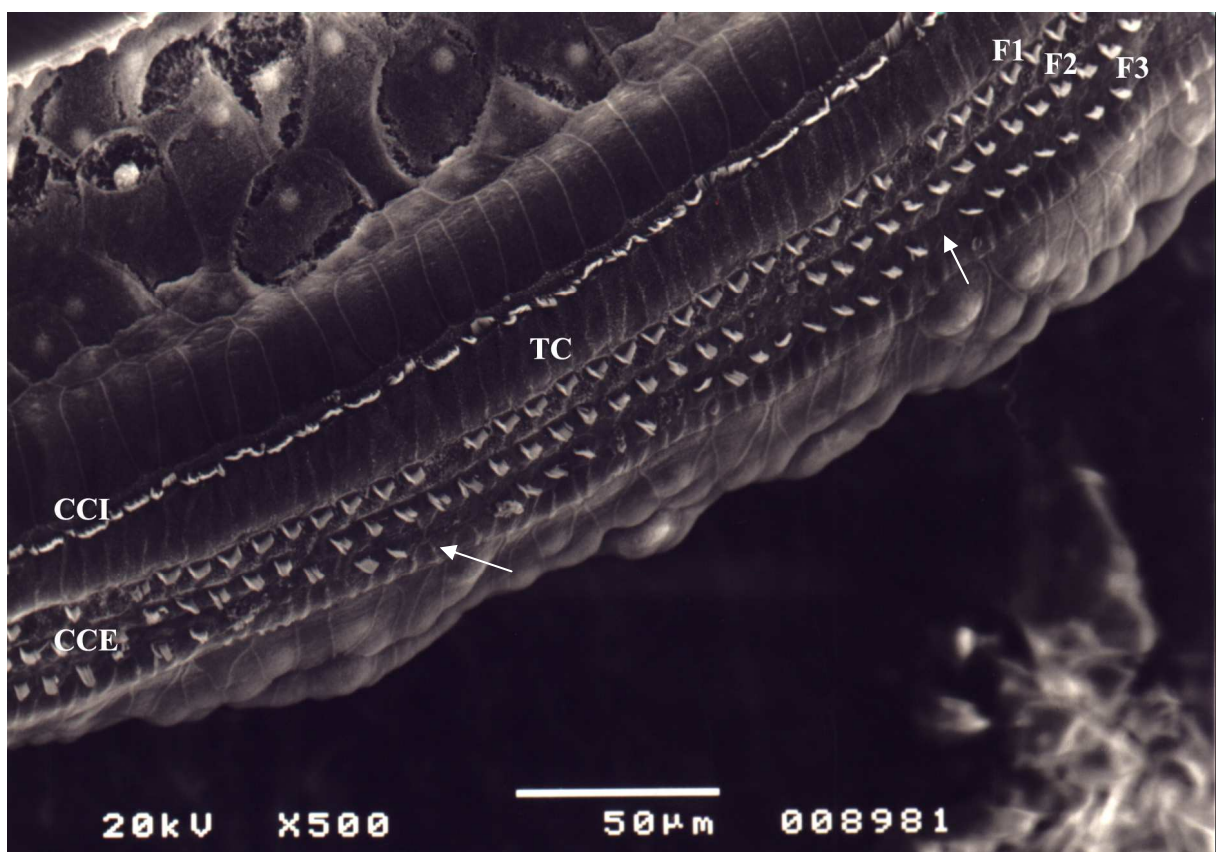
**Figura 4** Microscópio Eletrônico Jeol Scanning Microscope – JSM 5200

A análise estrutural foi padronizada pelo estudo do terço médio das quatro espiras cocleares em um campo com aumento de 500 vezes. Uma vez que a varredura era feita na superfície do órgão de Corti, a imagem era congelada, fotografada e estudada através de um cocleograma (Figuras 5 e 6). O cocleograma pode ser descrito como a reprodução da imagem fotográfica do campo da MEV, onde as CCE são marcada como íntegras ou lesadas e depois é realizada a contagem das mesmas pela visualização de seus estereocílios. No nosso estudo o cocleograma representou a imagem do terço médio das três primeiras espiras, com a contagem da totalidade

das células visualizadas no referido campo fotográfico, no aumento citado (500 vezes).



**Figura 5** Cocleograma representativo das células ciliadas externas visualizadas na Figura 6.



**Figura 6** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia, correspondente ao cocleograma mostrado na figura 5, onde se vê: CCI-célula ciliada interna; CCE-célula ciliada externa; TC-túnel de Corti; F1- fileira 1; F2- fileira 2; F3- fileira 3; setas- exemplos de locais com ausência de estereócilios (lesão de CCE). Aumento de 500x



Nesta padronização cada campo apresentou aproximadamente 40 CCE por fileira, ou seja, aproximadamente 120 CCE por campo. A condição de integridade ou não das células ciliadas externas foi definida pela análise dos estereocílios das mesmas. Células que apresentaram estereocílios com forma e disposição perfeitas foram consideradas íntegras (normais). Células com estereocílios ausentes ou disformes foram consideradas lesadas (OLIVEIRA;BERNALL, 2003; HYPPOLITO ET AL, 2003; 2005). As células ciliadas externas (CCE) normais (íntegras) e lesadas foram então tabuladas para análise estatística comparativa entre os grupos. As células ciliadas internas (CCI), apesar de observadas, não foram consideradas para este estudo em função da menor incidência de lesão por ototoxicidade e pela dificuldade de individualização e contagem das mesmas. Também a espira apical não foi incluída no estudo visto que o desarranjo natural da mesma dificulta uma análise técnica criteriosa da presença e integridade das CCE. Quando problemas técnicos na preparação impediam a visualização das células da espira, esta espira era desprezada na contagem geral da cóclea. Se duas espiras apresentavam problemas técnicos na mesma cóclea que impediam a perfeita análise das CCE, esta cóclea era desprezada por inteiro.

O percentual de células normais e lesadas nas três primeiras espiras de cada cóclea foi registrado para estudo nos diferentes grupos e posteriormente comparados com as emissões otoacústicas por produtos de distorção.

#### **4.2.5 Análise Estatística dos Dados**

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se os programas SPSS. – Statistical Package for Social Scienses - Versão 10.0 e R Program Statistical Computing – Versão 2.2.1.

Para efeitos estatísticos foi considerada na comparação dos resultados e padronizada para análise a contagem das CCE normais e lesadas no terço médio das três primeiras espiradas cocleares, em um campo com aumento de 500 vezes à microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Quanto às EOAPD, para efeito estatístico, foi considerada a situação de presença ou ausência de respostas. Foi também realizado um estudo estatístico das respostas para determinar possível correlação entre redução da amplitude das EOAPD e grau de lesão de CCE. O cálculo da amplitude foi realizado através da medida da intensidade média das respostas das EOAPD nas frequências de 2 KHz a 5 KHz, nos exames inicial e final e classificados em 4 tipos, lembrando que todas as cobaias apresentavam EOAPD presentes no exame inicial. Os tipos de respostas determinados para estudo foram:

Resposta A : EOA presentes no exame final com amplitude (intensidade) média ( $\bar{X}$ ) de respostas variando de 0% até 25% em relação ao exame inicial. Exemplo:  $\bar{X}_{(\text{exame inicial})}=30$  dB e  $\bar{X}_{(\text{exame final})}=27$  dB. Variação: 10%.

Resposta B : EOA presentes no exame final com amplitude ( $\bar{X}$ ) de respostas variando de mais de 25% até 50% em relação ao exame inicial.

Exemplo:  $\bar{X}_{(\text{exame inicial})}=30$  dB e  $\bar{X}_{(\text{exame final})}=18$  dB. Variação: 40%.

Resposta C : EOA presentes no exame final com amplitude ( $\dot{X}$ ) de respostas variando mais que 50% em relação ao exame inicial. Exemplo:  $\dot{X}_{(\text{exame inicial})}=30$  dB e  $\dot{X}_{(\text{exame final})}=12$  dB. Variação: 60%.

Resposta D: Ausência de EOA no exame final.

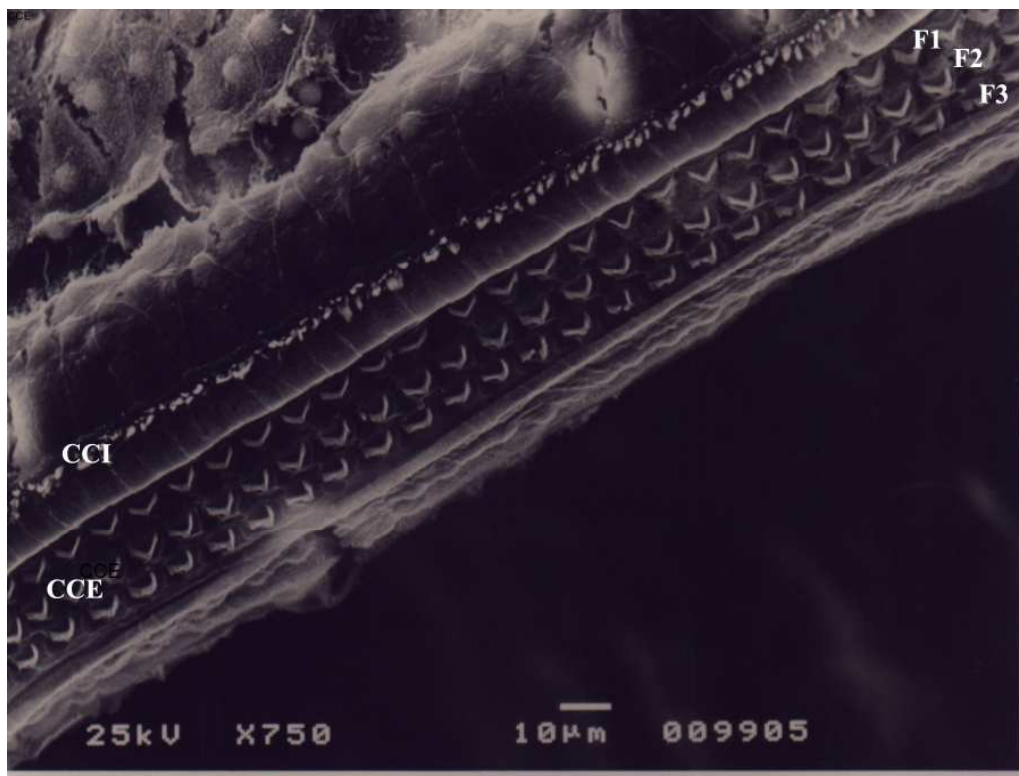
Os quatro tipos de respostas foram comparados com os achados morfológicos (CCE normais e lesadas à MEV) e a correlação entre estes dados analisada estatisticamente.



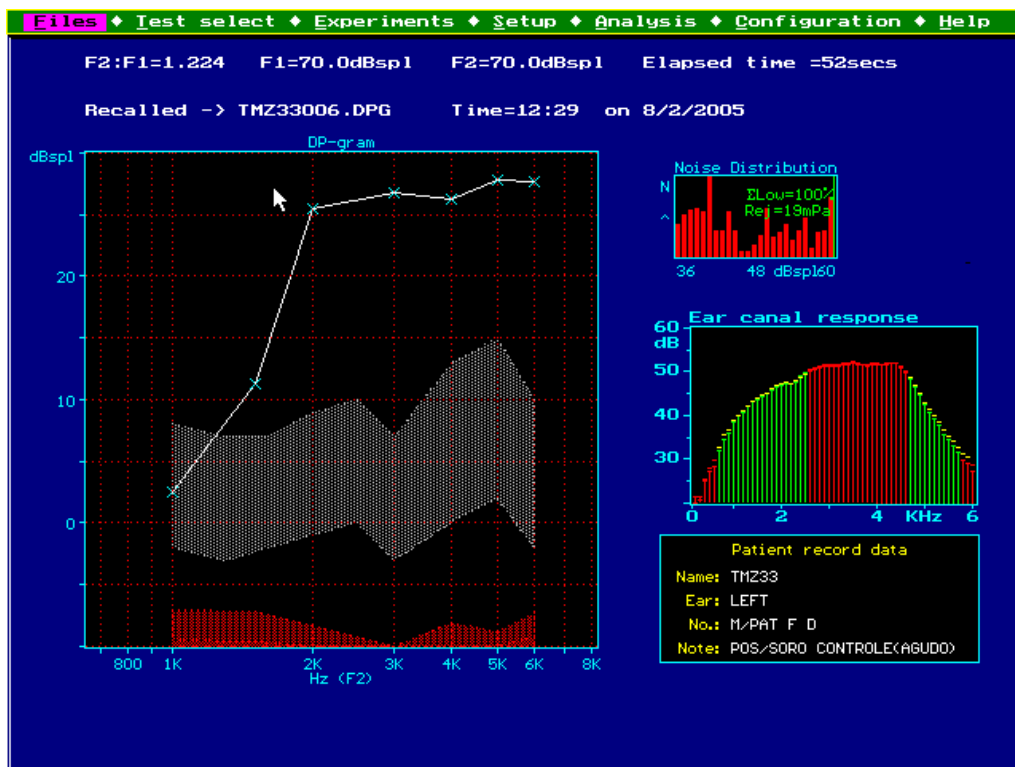
## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

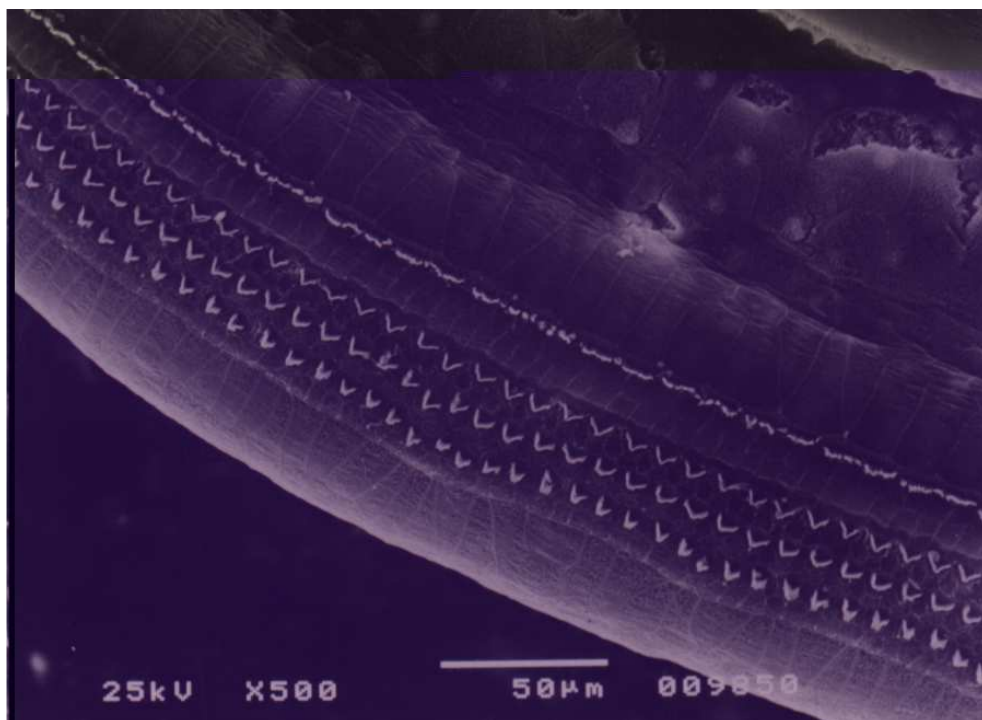
No Grupo 1 (Soro Fisiológico 0,9% - 30 dias) e no Grupo 2 (Gentamicina 10 mg/kg/dia - 30 dias) não houve lesões significativas de células ciliadas externas à MEV em nenhuma cóclea (Figuras 7, 9 e 10). No Grupo 1, 100% das CCE mantiveram-se normais ao final do experimento, enquanto no Grupo 2, 94,2% das CCE também se mantiveram normais (Tabelas 1 e 2). A avaliação funcional através das EOAPD mostrou presença de resposta após os 30 dias de experimentos em ambas as orelhas em todas as cobaias incluídas nestes dois grupos (Figuras 8 e 11).



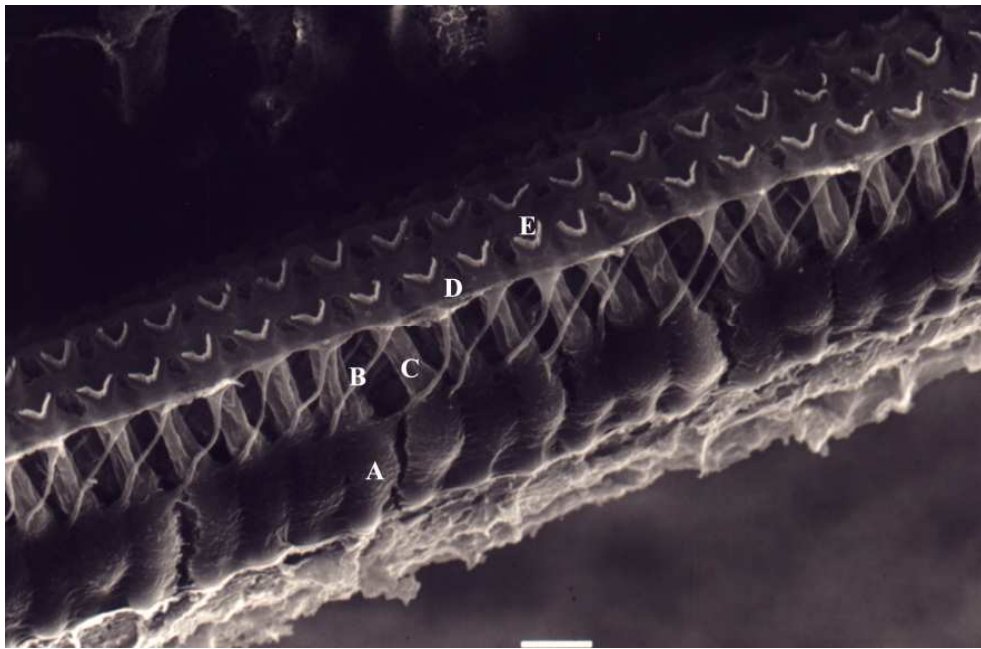
**Figura 7** Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do Grupo 1. CCI: célula ciliada interna; CCE: célula ciliada externa; F1: fileira 1; F2: fileira 2; F3: fileira 3. Aumento de 750x.



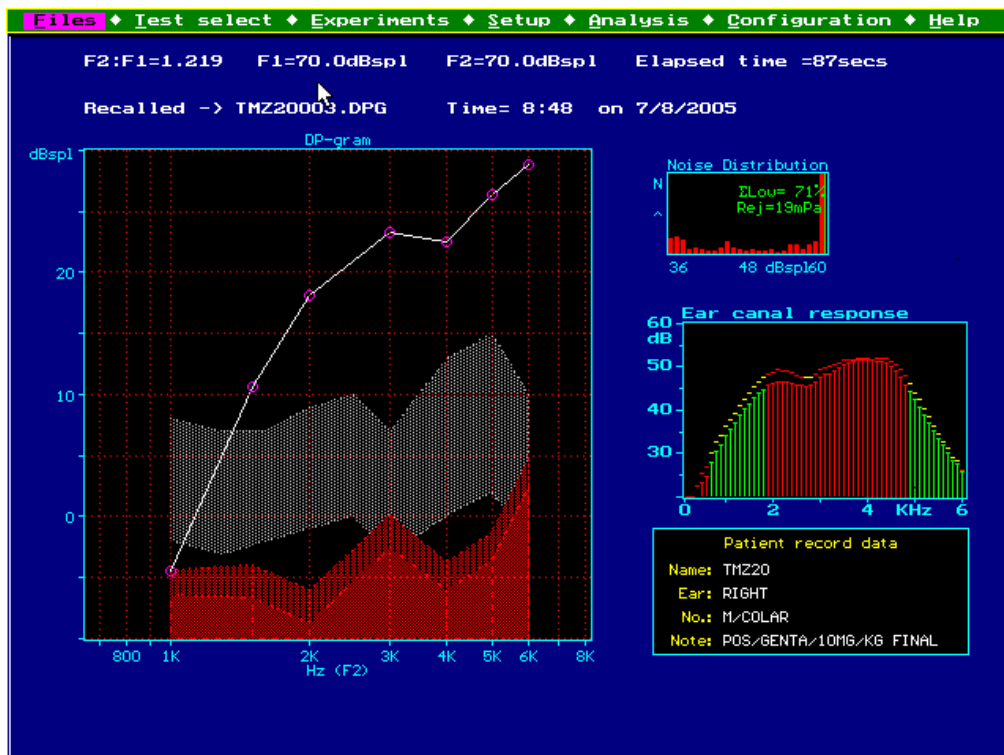
**Figura 8** Teste de EOAPD (emissão otoacústica por produto de distorção) de cobaia do Grupo 1, mostrando presença de respostas.



**Figura 9** Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do Grupo 2. Aumento de 500 vezes.



**Figura 10** Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do grupo 2, dissecado, em “close”, mostrando: A - células de Deiters; B: prolongamento digital da célula de Deiters; C – CCE; D – membrana reticular; E- estereocílio da CCE. Aumento de 1000 vezes.



**Figura 11** Teste de EOAPD (emissão otoacústica por produto de distorção) de cobaia do Grupo 2, com presença de respostas.

Com relação às cobaias do Grupo 3 (amicacina 12 dias) e do Grupo 4 (gentamicina 30 dias + amicacina 12 dias) houve lesão de CCE em todas as cócleas examinadas nos dois grupos, em graus variados.

No Grupo 3 as lesões variaram de 4,3% a 96,9%, com média de 46,4% de lesão de CCE (53,6% de células normais) para as 18 cócleas do grupo (Tabela 2). As lesões ocorreram predominantemente nas 2 primeiras espiras que, desta forma, apresentaram um menor número de CCE normais do que a espira 3. As lesões foram também mais intensas na 1ª fileira de CCE, seguido pela 2ª fileira (Tabela 3).

**Tabela 1** – Células ciliadas externas normais ao final do experimento, nas diferentes espiras, nos grupos estudados,

	Espira 1	Espira 2	Espira 3
<b>GRUPO 1</b>	100%	100%	100%
<b>GRUPO 2</b>	100%	100%	88,4%
<b>GRUPO 3</b>	51,9%	49,9%	57,8%
<b>GRUPO 4</b>	45,0%	47,2%	50,1%

**Tabela 2** – Média de células ciliadas externas normais nos diferentes grupos.

<b>GRUPO 1</b>	<b>GRUPO 2</b>	<b>GRUPO 3</b>	<b>GRUPO 4</b>
100%	94,2%	53,6%	46,8%



**Tabela 3** – Média de células ciliadas externas normais (íntegras) nas diferentes fileiras e espiras, no Grupo 3.

	Fileira 1	Fileira 2	Fileira 3
<b>ESPIRA 1</b>	51,7%	52,1%	52,4%
<b>ESPIRA 2</b>	33,0%	54,6%	61,9%
<b>ESPIRA 3</b>	29,0%	76,0%	68,6%

No Grupo 4 as lesões variaram de 5,7% a 100%, com média de 53,2% de lesão de CCE (46,8% de CCE normais) para as 20 cócleas do grupo (Tabela 2). As lesões ocorreram predominantemente nas duas primeiras espiras que, desta forma apresentaram um menor número de CCE normais. Foi também mais intensa na 1ª fileira de CCE, seguido pela 2ª fileira (Tabela 4). No Apêndice "A" encontra-se a tabulação dos dados com a proporção de CCE normais em todos as cócleas.

**Tabela 4** – Média de células ciliadas externas normais (íntegras) nas diferentes fileiras e espiras, no Grupo 4.

	Fileira 1	Fileira 2	Fileira 3
<b>ESPIRA 1</b>	43,8%	44,7%	44,2%
<b>ESPIRA 2</b>	41,0%	46,3%	50,4%
<b>ESPIRA 3</b>	24,7%	58,8%	66,2%

Nos grupos 1 (soro fisiológico) e 2 (gentamicina), sem lesões morfológicas significativas, como já comentado, as EOAPD estavam presentes e normais. No grupo 3 (n=18; lesão aguda por amicacina) elas estavam presentes em 11 orelhas, cuja média de CCE normais para estas 11 orelhas foi de 75,5%. Estavam ausentes ao fim do experimento em 7 orelhas, cuja média de CCE íntegras foi de 21,6% (Tabela 5, Figuras 12 e

13). Já no grupo 4 (n=20; uso de subdoses de gentamicina previamente a amicacina) as EOAPD estavam presentes em 12 orelhas, cuja média de CCE íntegras para estas orelhas foi de 68%. Estavam ausentes ao fim do experimento em 8 orelhas, cuja média de CCE íntegras foi de 18,9% (Figuras 14 e 15).

**Tabela 5** – Orelhas com emissões otoacústicas presentes e ausentes ao final do experimento nos diferentes grupos.

	<b>Presentes</b>	<b>Ausentes</b>	<b>TOTAL</b>
<b>GRUPO 1</b>	11	00	11
<b>GRUPO 2</b>	10	00	10
<b>GRUPO 3</b>	11	07	18
<b>GRUPO 4</b>	12	08	20
<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>15</b>	<b>59</b>



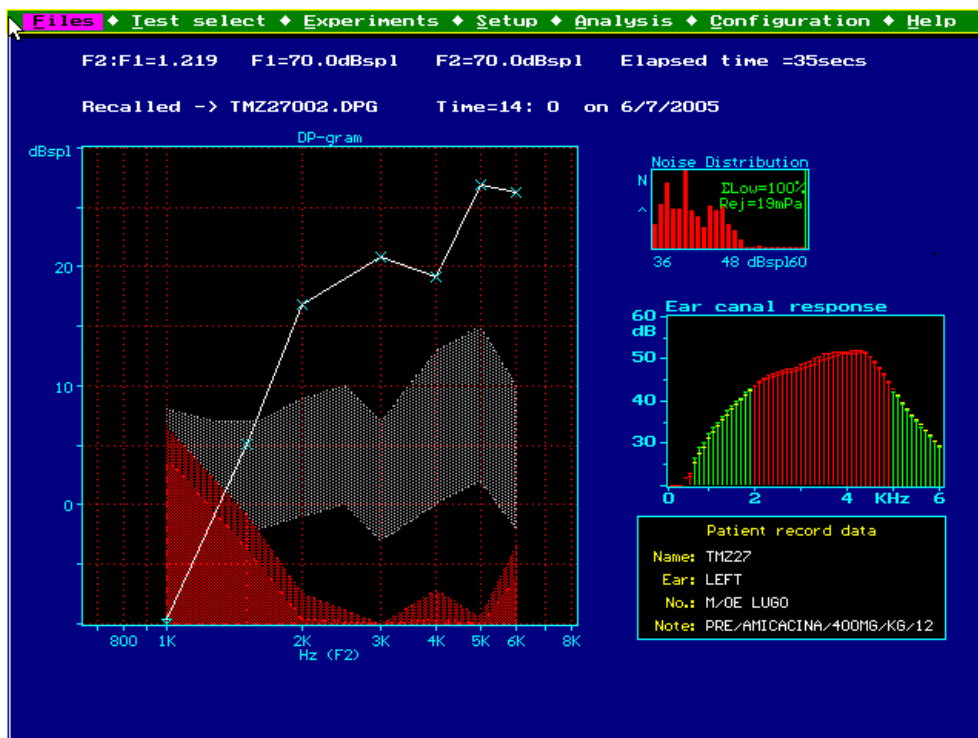
**Figura 12** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do Grupo 3 mostrando lesão extensa, nas 3 fileiras, com ausência de quase todas as CCE. Aumento de 500 vezes.

O estudo comparativo entre a proporção de CCE normais, ao fim do estudo, entre os 4 grupos está demonstrado no Gráfico 1. Já o estudo entre as variações dentro da mesma espira entre os Grupos 3 e 4 está ilustrado no Gráfico 2.

O estudo comparativo das EOAPD (presença ou ausência) entre os grupos 3 e 4 está ilustrado no Gráfico 3. A proporção média de CCE normais ou lesadas nas orelhas com presença ou ausência de EOAPD está demonstrada na Tabela 6.

**Tabela 6** – Média de células ciliadas externas (CCE) normais (íntegras) nas orelhas com emissões otoacústicas (EOA) presentes e ausentes ao final do experimento, nos grupos 3 e 4.

	<b>Média de CCE normais – Grupo 3.</b>	<b>Média de CCE normais – Grupo 4</b>
Orelhas com EOA presentes.	75,5%	68,0%
Orelhas com EOA ausentes.	21,6%	18,9%

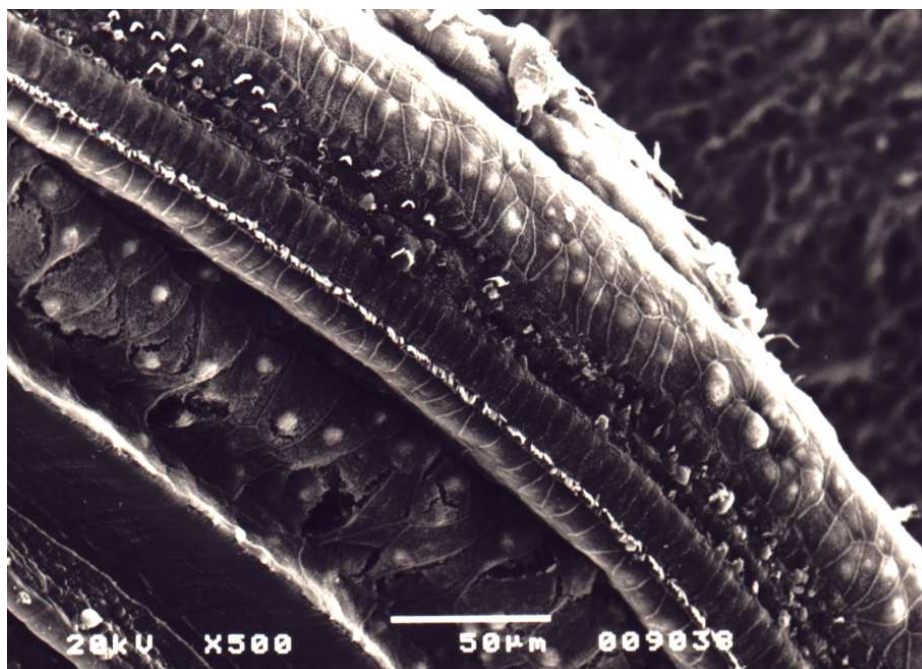


13A



13B

**Figuras 13 A e 13 B** - Teste de EOAPD (emissão otoacústica produto de distorção) de uma mesma cobaia do Grupo 3 mostrando presença de respostas normais antes de iniciar aplicação de amicacina (13A) e ausência de respostas após aplicação da mesma (13B).

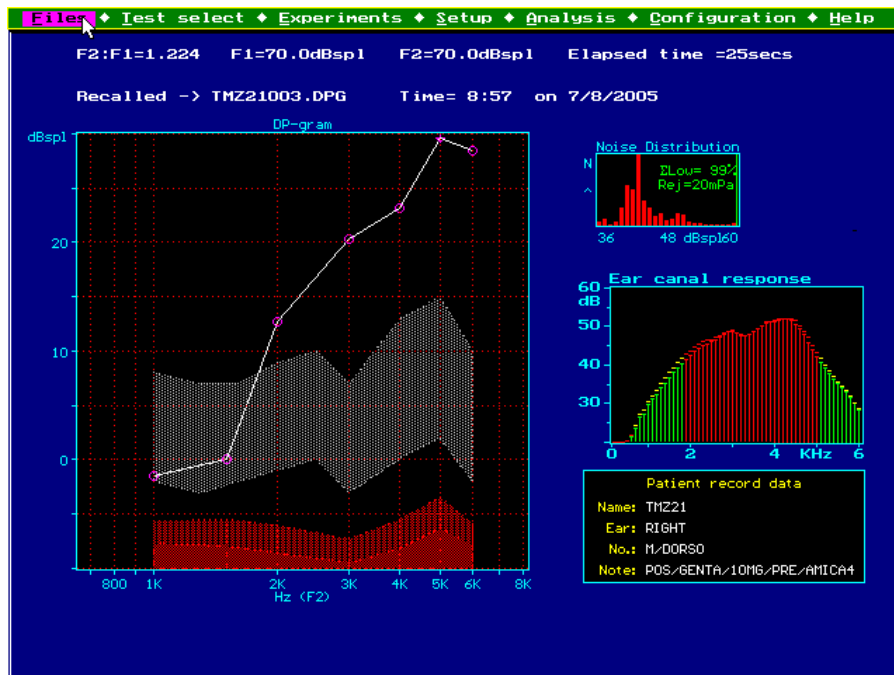


**Figura 14** - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do Grupo 4 mostrando lesão extensa, com ausência de quase todas as CCE. Aumento de 500 vezes.

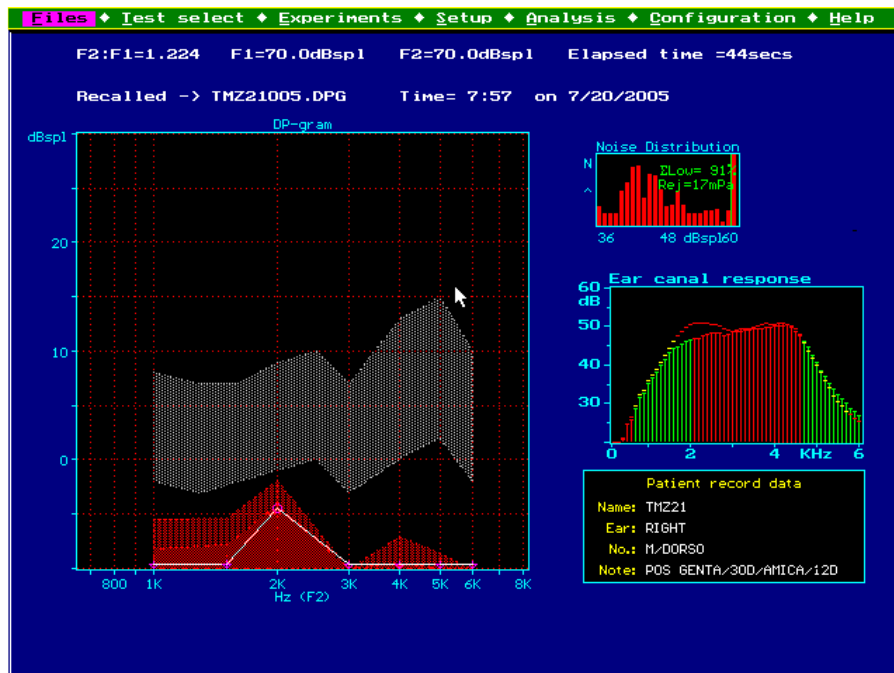
No total foram avaliadas 20.100 células ciliadas externas em 60 cócleas divididas nos 4 grupos, uma média de 335 CCE por cóclea (Tabela 7).

**Tabela 7** – Total de células ciliadas externas (CCE) analisadas à microscopia eletrônica de varredura nos quatro grupos.

	<b>CÓCLEAS</b>	<b>CCE NORMAIS</b>	<b>CCE LESADAS</b>	<b>CCE TOTAL</b>
GRUPO 1	12	4.011 (100%)	00 (0%)	4.011
GRUPO 2	10	3.349 (95,9%)	142 (4,1%)	3.491
GRUPO 3	18	3.229 (53,6%)	2.800 (46,4%)	6.029
GRUPO 4	20	3.076 (46,8%)	3.493 (53,2%)	6.569
<b>TOTAL</b>	<b>60</b>	<b>13.665</b>	<b>6.435</b>	<b>20.100</b>

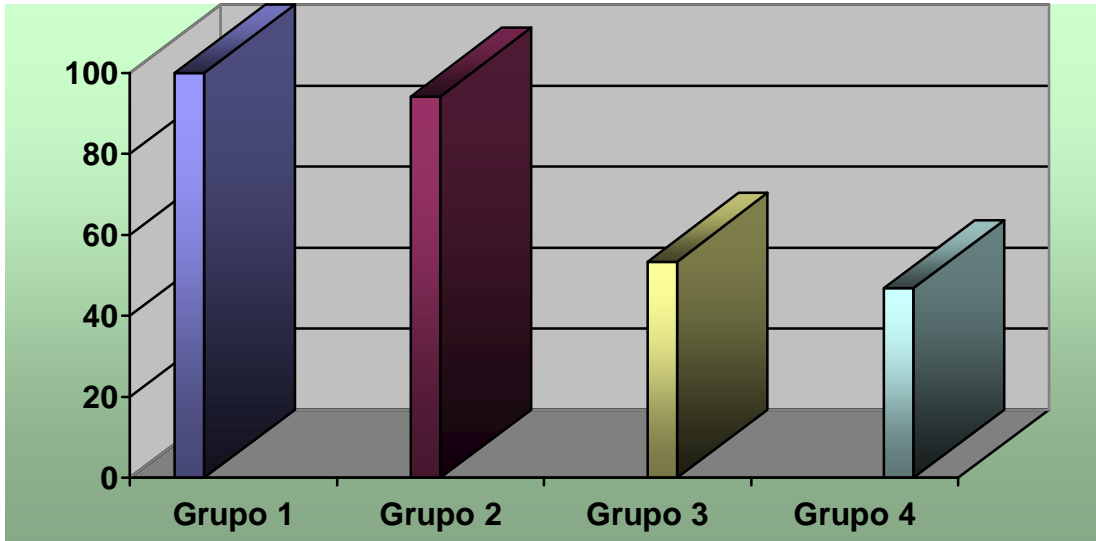


15A

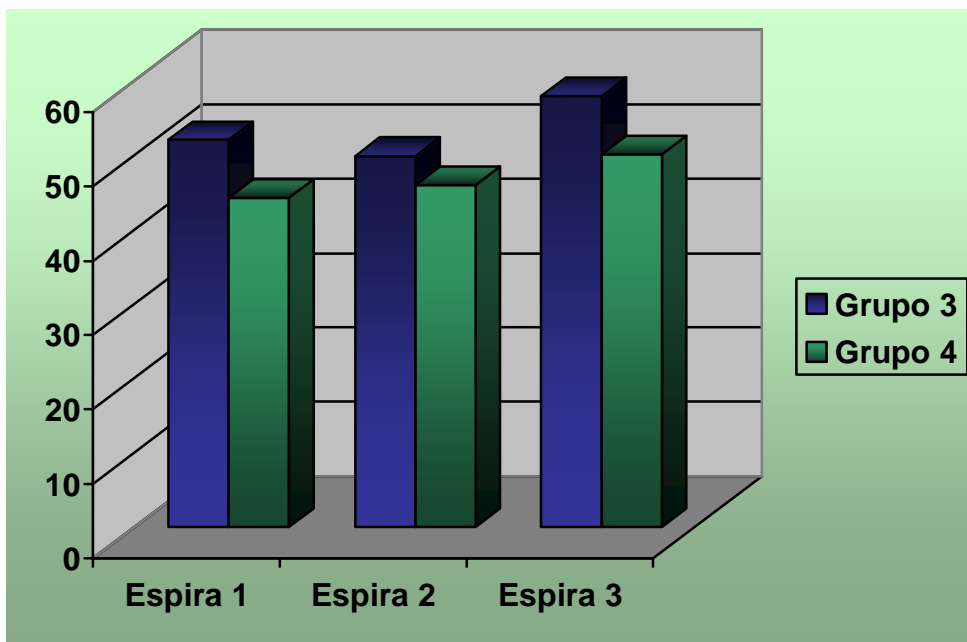


15B

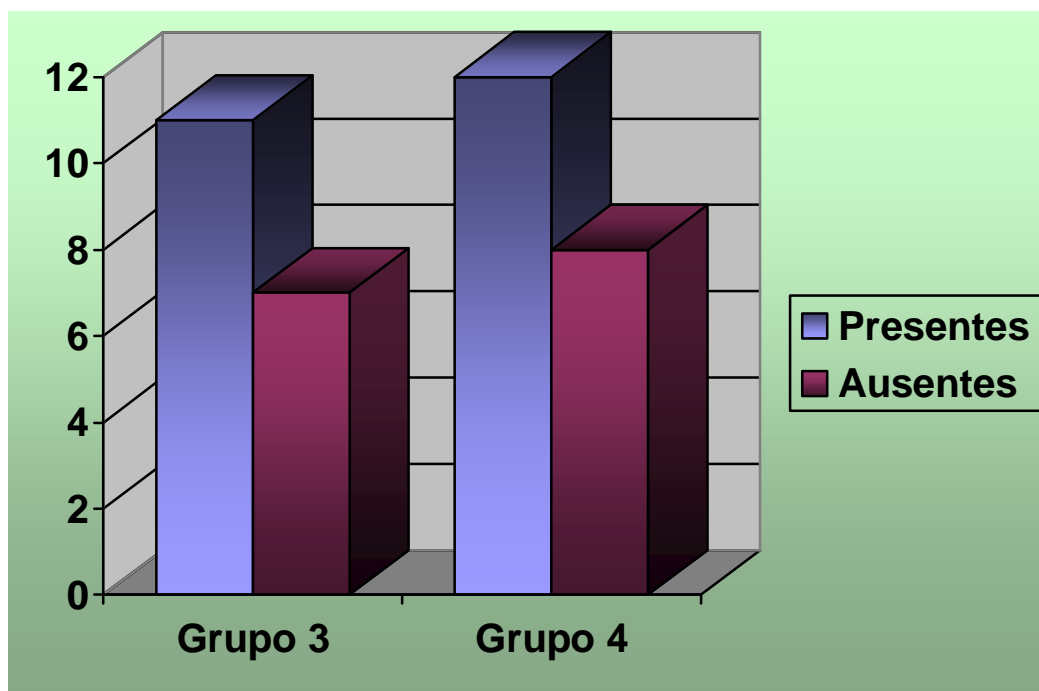
**Figura 15 A e 15 B** - Teste de EOAPD (emissão otoacústica por produto de distorção) de uma mesma cobaia do Grupo 4 mostrando presença de respostas ao fim do período de aplicação de gentamicina (15A) e ausência de respostas após aplicação de amicacina (15B).



**Gráfico 1** – Células Ciliadas Externas Normais (Íntegras) nos 4 Grupos Estudados (Percentual).



**Gráfico 2** – Estudo Comparativos de Células Ciliadas Externas Normais (íntegras) na mesma Espira Entre os Grupos 3 e 4.

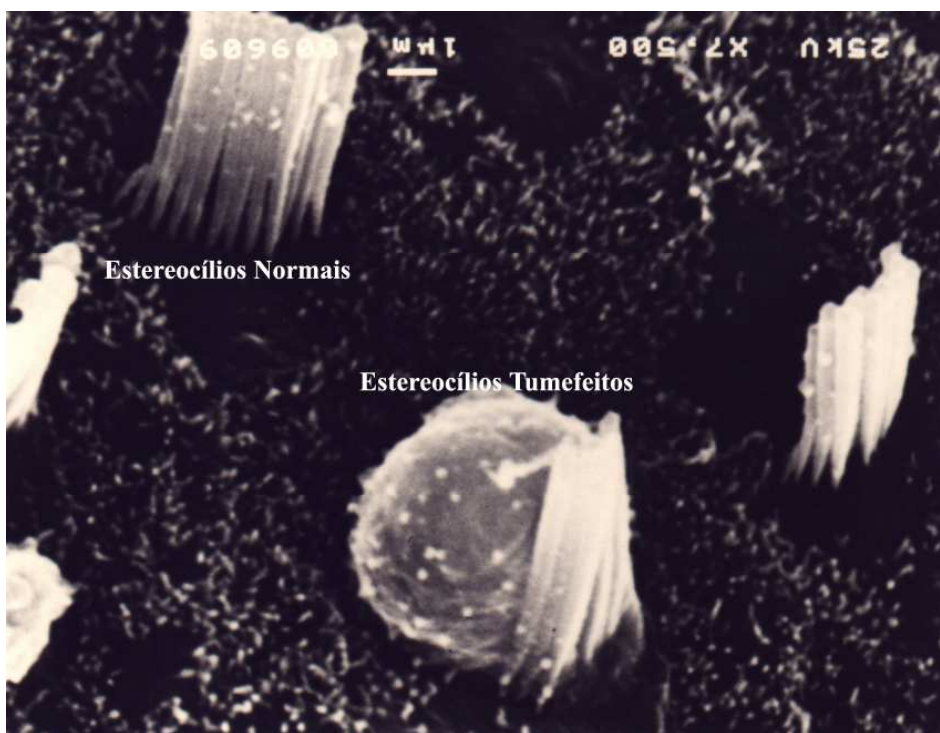


**Gráfico 3** – Número de cócleas com emissões otoacústicas presentes e ausentes nos Grupos 3 e 4.

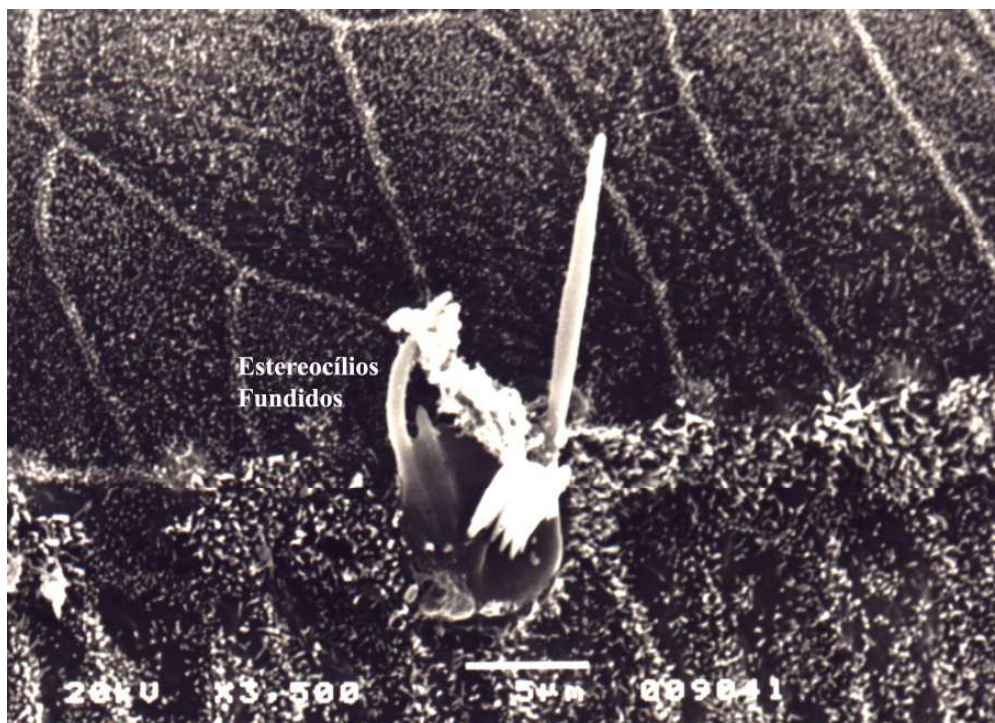
Com relação à manutenção da arquitetura ciliar verificamos que nas células ciliadas externas lesadas havia os seguintes tipos mais comuns de alterações: ausência de cílios (alteração mais comum), distorção do padrão em “v” para “w” e tumefação ou fusão ciliar (Figuras 16 e 17).

As lesões ocorreram em padrão decrescente de gravidade da 1ª e 2ª espiras para o ápice e da 1ª fileira de CCE para a 3ª. Não houve diferença significativa entre o grau de lesão entre as duas primeiras espiras no nosso trabalho. As células ciliadas internas (CCI), observadas, mas não consideradas para este estudo, apresentaram-se pouco lesadas nos grupos (Figura 18).

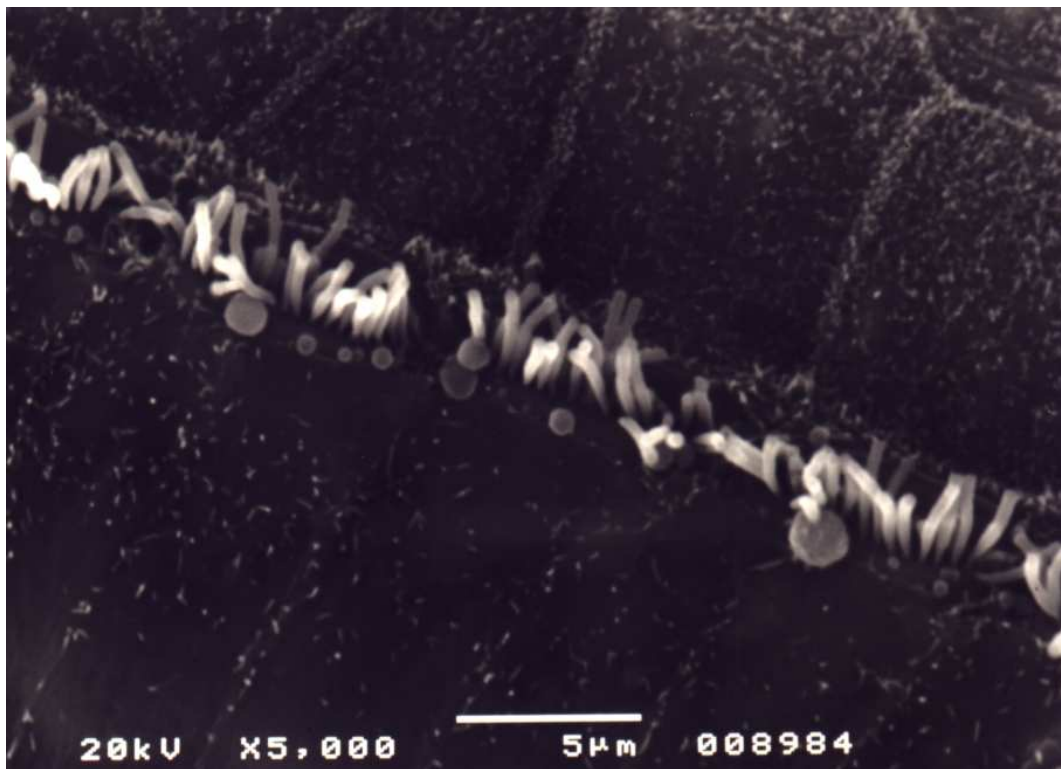




**Figura 16** - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia mostrando estereocílios normais ao lado de célula com estereocílios alterados, tumefeitos. Aumento de 7.500x



**Figura 17** - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia mostrando estereocílios fundidos. Aumento de 3.500x



**Figura 18** - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia mostrando estereocílios de células ciliadas internas (CCI). Aumento de 5.000x

Não consideramos a espira apical por ser um local responsável pela detecção de sons graves e os ototóxicos comprometem principalmente os sons agudos e, principalmente porque esta espira tem um desarranjo natural das células ciliadas que dificultam uma análise anatômica criteriosa. Da mesma forma não foram consideradas para efeito de estudo as CCI por serem células menos lesadas à exposição por ototóxico e também por serem de difícil individualização e contagem, comparativamente com as CCE.

Um dos objetivos deste estudo era comparar o Grupo 3 (dose ototóxica de amicacina) com o Grupo 4 (dose ototóxica de amicacina precedida de dose não lesiva de gentamicina) para avaliar se havia

otoproteção pela gentamicina contra a ototoxicidade da amicacina neste último grupo.

Previamente à análise estatística, estes dois grupos (3 e 4) foram submetidos a um teste de distribuição de normalidade (Shapiro-Wilk Test). Neste teste o grupo 3 não apresentou distribuição normal. Por este motivo foi optado pela utilização do teste não paramétrico U – Mann Whitney. As hipóteses em estudo eram:

H0 – os resultados são semelhantes estatisticamente.

H1 – os resultados diferem significativamente.

O teste comparativo entre CCE normais e lesadas nos grupos 3 e 4 encontrou  $p=0,501$  aceitando-se desta forma a hipótese da nulidade (H0), ou seja, não havia diferença estatística entre os dois grupos (Tabela 8).

**Tabela 8** – Análise Estatística\* Referente ao Número de CCE Normais, ao Final do Experimento, entre os Grupos 3 e 4.

	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	MEDIANA	P
<b>GRUPO 3</b>	54,60	33,59	59,80	
<b>GRUPO 4</b>	48,35	37,82	47,20	
				<b>0,50</b>

\* Teste U – Mann Whitney. Statistical Package for Social Scienses.

Portanto a gentamicina não protegeu as CCE da cobaia contra a ação ototóxica da amicacina. Realizamos também uma análise estatística do resultado encontrado nas espiras 1 entre os dois grupos e repetimos o teste para as espiras 2 e 3. Da mesma forma não houve diferença estatística entre os dois grupos ( $p=0,65$  entre as espiras 1;  $p=0,83$  entre as espiras 2;  $p=0,36$  entre as espiras 3) (Tabela 9).

**Tabela 9** – Análise Estatística\* Referente ao Número de CCE Normais (Íntegras), ao Final do Experimento, entre as Mesmas Espiras nos Grupos 3 e 4.

	<b>ESPIRAS 1</b>	<b>ESPIRAS 2</b>	<b>ESPIRAS 3</b>
<b>Z</b>	-0,445	-0,211	-0,907
<b>P</b>	<b>0,656</b>	<b>0,833</b>	<b>0,364</b>

\* Teste U-Mann Whitney. Statistical Package for Social Sciences.

Finalmente realizamos um teste estatístico comparativo entre presença ou ausência de EOAPD entre os Grupos 3 e 4. Neste caso, como se tratava de variável categórica, utilizamos o teste do Qui-Quadrado. O resultamos foi:  $p = 0,793$  mostrando também não haver diferença entre os grupos 3 e 4 com relação a avaliação funcional das orelhas por EOAPD, coincidindo com a análise morfológica (Tabela 10).

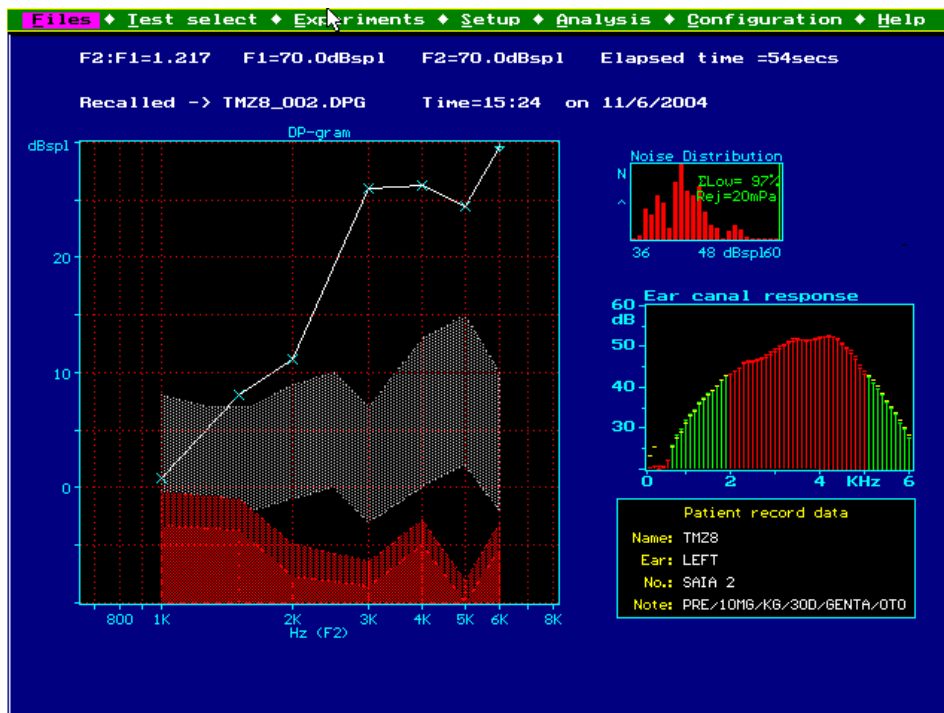
**Tabela 10** – Análise Estatística\* Referente às EOA Presentes ou Ausentes, ao Final do Experimento, entre os Grupos 3 e 4.

	<b>GRUPO 3</b>	<b>GRUPO 4</b>	<b>TOTAL</b>	<b>P</b>
<b>EOA PRESENTE</b>	11	12	23	
<b>EOA AUSENTE</b>	07	08	15	
<b>TOTAL</b>	18	20	38	
<b>P</b>				<b>0,793</b>

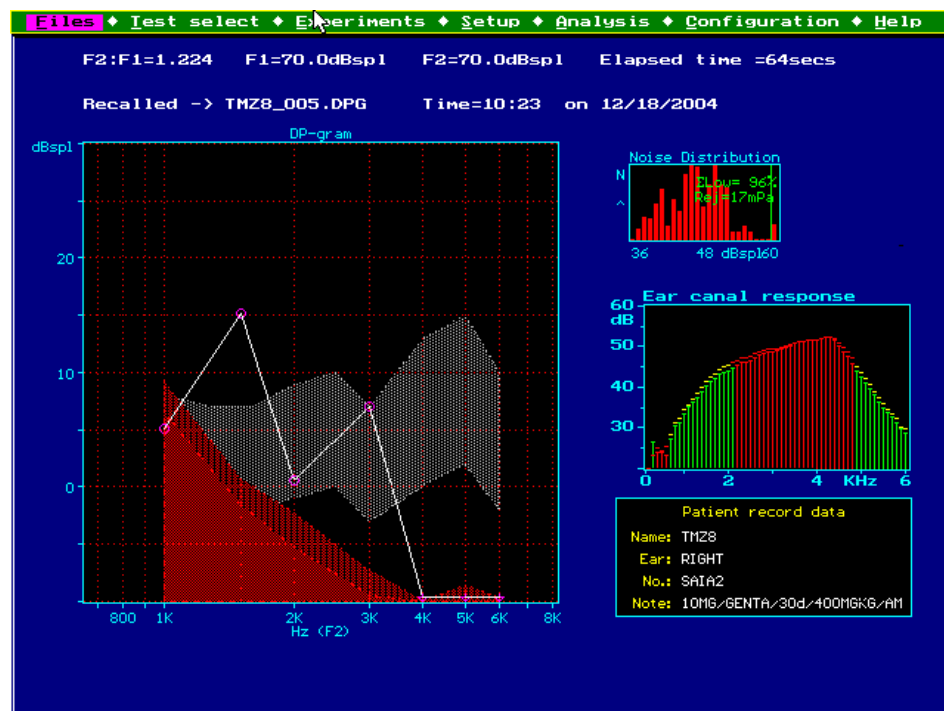
\* - Teste Qui-Quadrado. R Program Statistical Computing. Versão 2.2.1.

Para determinarmos se havia correlação estatisticamente significativa entre a diminuição da amplitude (intensidade) das respostas de EOAPD (Figura 19) e o aumento do grau de lesão de CCE, cujos dados encontram-se no Apêndice B, aplicamos o cálculo do coeficiente não paramétrico de Spearman, cujo resultado ( $r = 0,81$ ) mostrou haver

correlação alta e significativa ( $p < 0,001$ ) entre a diminuição da amplitude das EOAPD e a diminuição do número de CCE normais na orelha interna da cobaia (Tabela 11).



19A



19B

**Figuras 19A e 19B** Testes de EOAPD mostrando redução na amplitude das respostas no 2º teste (19B) em comparação com o 1º teste (19A), após aplicação de gentamicina + amicacina.

Tabela 11 – Cálculo do Coeficiente de Correlação de Spearman entre Variação de Intensidade de EOA e Grau de Lesão de CCE.<sup>2</sup>

			VAR 0001	VAR 0002
Spearman's Rho	VAR 0001	Coeficiente de Correlação	1,000	0,812
		Sig (Bi caudal)	0,0	0,000
		N	59	59
	VAR 0002	Coeficiente de Correlação	0,812	1000
		Sig (Bi caudal)	0,00	
		N	59	59

A comparação dos valores morfológicos entre as categorias de respostas de EOA foi realizada através da aplicação do Teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) que mostrou  $X^2 = 39,75$  ( $p < 0,001$ ), portanto, com diferença significativa entre os valores morfológicos dos diferentes tipos de respostas (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 – Teste de Kruskal-Wallis dos valores morfológicos entre as categorias de respostas de EOA.

	Resposta EOA	N	Mean Rank
CCE Normais	A	32	41,58
	B	4	35,88
	C	8	18,25
	D	15	10,00
	Total	59	

Statistical Package for Social Scienses - Versão 10.0

Tabela 13 - Teste de Kruskal-Wallis <sup>a,b</sup> - análise estatística entre os tipos de respostas

CCE normais	
Chi-Square	39,74
Df	3
Assymp. Sig.	0,000

a. Teste Kruskal Wallis; b. Grupo Variável: Resposta EOA  
Statistical Package for Social Scienses - Versão 10.0

<sup>2</sup> Em uma das cobaias do grupo 1 não foi possível a realização do Teste de EOAPD em uma das orelhas, no fim do experimento, por acúmulo de cerume de difícil remoção. Desta forma, o número total de Testes foi reduzido de 60 para 59. A MEV mostrou que nesta orelha que não foi realizada a pesquisa de EOAPD havia 100% de CCE íntegras.

Para verificarmos quais diferenças eram significativas entre os diferentes tipos de respostas utilizamos o Teste *Post Hoc* de Dunn. Constatamos que a Resposta A possui valor equivalente a Resposta B e ambas são significativamente superiores às Respostas C e D, e que a Resposta C tem valores significativamente superiores aos de D: (A=B)>C>D (Tabela 14).

Tabela 14 – Teste *Post Hoc* de Dunn. Análise de significância entre as Respostas de EOAPD e as CCE normais.

		VAR CCE normais		
		alfa = 0,05		
VAR RESP EOA	N	1	2	3
D	15	20,20		
C	18		45,86	
B	4			87,12
A	32			93,43

var: variável; resp: resposta; Statistical Package for Social Scienses - Versão 10.0



## 6 DISCUSSÃO



## 6 DISCUSSÃO

Apesar de não haver dados fidedignos sobre a incidência de perda auditiva induzida por drogas na população mundial, sabemos que ainda hoje ela é significativa, principalmente pelo uso continuado dos aminoglicosídeos e quimioterápicos. Não obstante, a hipoacusia provocada por grande parte destas drogas tem um caráter de irreversibilidade, o que traz graves conseqüências sociais e psicológicas à população acometida, motivo este que justifica a continuidade das pesquisas que abordam ototoxicidade e otoproteção.

Dentre as drogas ototóxicas, os aminoglicosídeos são os mais estudados (OLIVEIRA;BERNAL, 2003), seja por razões históricas ou por sua importância clínica (DAUMAN; DULON, 2000). Os inúmeros trabalhos de pesquisa sobre ototoxicidade utilizando estas drogas nos possibilitaram aprimorar o conhecimento sobre anatomofisiologia e bioquímica da orelha interna, sendo este o passo inicial para a descoberta de drogas menos tóxicas e meios de prevenção e proteção mais eficientes do Órgão de Corti.

Segundo Oliveira e Bernal (2003), as lesões provocadas pelos aminoglicosídeos no órgão de Corti são predominantemente nas células ciliadas externas (CCE) e progridem da base para o ápice da cóclea. Nas espiras basais, a primeira fileira de CCE é também a primeira a ser lesada, seguindo-se para a segunda e terceira fileiras. Esta seqüência de lesões

também coincide com a altura das CCE, sendo a espira basal a primeira a ser lesada, seguindo a segunda, terceira e por último as células apicais (OLIVEIRA, 1989; ALMEIDA; ALMEIDA; DUPRAT, 1993). A estria vascular também pode estar envolvida, podendo haver mudança estrutural das células marginais (FORGE; FRADE, 1985).

Um dos passos para o entendimento dos mecanismos de ototoxicidade por aminoglicosídeos foi o descobrimento da participação de radicais livres no processo, fruto da ligação do mesmo com o  $Fe^3$ , seguido de reações químicas redutoras com liberação de radicais tóxicos. Este conhecimento possibilitou o uso de substâncias antioxidantes previamente e concomitantemente aos aminoglicosídeos, minorando os efeitos lesivos do mesmo sobre a orelha interna.

No entanto, no nosso entendimento, uma das descobertas de grande importância foi a identificação de mecanismos endógenos de autodefesa das células sensoriais do órgão de Corti. Como já referido, na cóclea adulta têm sido demonstradas várias enzimas de destoxificação e enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido-dismutase, glutationa-peroxidase, redutase e S-transferase (EL BARBARY; ALTSCHULER; SCHACHT, 1993; RYBAK ET AL 1997). Também a glutationa, encontrada em todas as células dos mamíferos exerce importante papel de desintoxicação de xenobióticos e proteção contra substâncias oxigênio-reativas (LISTOWSKY ET AL, 1988; MEISTER, 1991). De fato, tem sido demonstrado que o grau de ototoxicidade é inversamente proporcional à quantidade de glutationa (GSH) presente

(GARETZ; SCHACHT, 1992; GARETZ; LATSCHULER; SCHACHT 1994; HOFFMAN ET AL, 1988).

A mais recente descoberta na área de anátomofisiologia da orelha interna foi que, em cobaias, pequenas doses não lesivas de um aminoglicosídeo administrado previamente à exposição a uma dose sabidamente ototóxica da mesma droga utilizada, protegem a cóclea contra o efeito lesivo desta. Este efeito foi comprovado para a amicacina (CANEDO, 1999; OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002) e para gentamicina (MAUDONNET, 2005). A explicação inferida foi de que pequenas doses não tóxicas de um agente potencialmente ototóxico estimulariam a cóclea a produzir substâncias endógenas de autodefesa de tal maneira que quando ela recebesse a dose tóxica ela estaria melhor preparada para se defender, desta forma conseguindo reduzir as lesões. Nestes estudos foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura para exame do Órgão de Corti após administração das drogas, associado ao estudo funcional por emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD).

Neste trabalho buscou-se pela primeira vez analisar, aos moldes destes últimos estudos, identificar o efeito do uso de um aminoglicosídeo utilizado em doses não lesivas, sobre a ação potencialmente lesiva de outro aminoglicosídeo que não o mesmo utilizado previamente, sendo este o ponto divergente em relação às pesquisas realizadas anteriormente por Canedo (1999), Oliveira, Canedo e Rossato (2002) e Maudonnet (2005). As drogas utilizadas em nossa pesquisa foram a gentamicina, um

aminoglicosídeo predominantemente vestibulotóxico, como droga de estímulo, e a amicacina, uma droga predominantemente cocleotóxica, como agente lesivo agudo. A avaliação funcional foi realizada através do estudo das emissões otoacústicas por produto de distorção, ao final do tratamento, seguindo a metodologia de trabalhos anteriores (HYPPOLITO ET AL, 2003; MAUDONNET, 2005). Na avaliação morfológica, as lesões nas células ciliadas externas eram identificadas pela ausência ou deformações de estereocílios, após análise à microscopia eletrônica de varredura, fotografadas, transferidas para um cocleograma e contadas. A análise da integridade das CCE pelo estudo da também integridade dos estereocílios é utilizada tanto para a cóclea como para o vestíbulo e encontra embasado em publicações prévias (CANEDO, 1999; OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002; DEMARCO, 2003; HYPPOLITO ET AL, 2003; MAUDONNET, 2005) e pela confirmação dos resultados do estudo funcional realizado no nosso trabalho. Divergentemente das publicações citadas anteriormente, não encontramos no nosso trabalho diferença estatisticamente significativa entre o grupo que utilizou apenas amicacina (lesão aguda) e o grupo que utilizou gentamicina previamente a amicacina, tanto na análise geral da cóclea como na análise individualizadas das espiras 1, 2 e 3, comparativamente entre os dois grupos. A média de lesão de CCE foi de 46,4% (53,6% normais) para o Grupo 3 (tratado apenas com amicacina) e de 53,2% (46,8% normais) para o Grupo 4 (tratado com subdoses de gentamicina previamente à amicacina), o que, estatisticamente, não mostra diferença significativa

( $p=0,501$ ). Não houve, portanto, proteção pela gentamicina contra a ototoxicidade da amicacina. A análise individualizada de cada espira comparativamente entre os dois grupos também não mostrou diferença estatística significativa ( $p=0,656$  entre espiras 1;  $p=0,833$  entre espiras 2;  $p=0,364$  entre espiras 3). A explicação entendida pela divergência de resultados foi a combinação de drogas utilizadas. Ao utilizarmos a gentamicina como droga de habituação, sendo ela predominantemente vestibulotóxica, a mesma não teria conseguido estimular a orelha interna a produzir substâncias endógenas autoprotetoras em quantidade suficiente para se proteger contra as doses altamente lesivas da amicacina, predominantemente cocleotóxico, contra o Órgão de Corti. Uma grande variabilidade no grau de lesão de CCE entre cobaias dos grupos 3 e 4 foi verificado, apesar da metodologia ter sido rigorosamente igual para todos os animais. Tal fato pode ser explicado por maior ou menor sensibilidade individual de cobaias ao aminoglicosídeo, assim como acontece nos humanos. Analisamos um total de 60 cócleas e 20.100 CCE (média de 335 CCE por cóclea). No nosso estudo, diferentemente de outras publicações (OLIVEIRA; BERNAL, 2003), não houve predomínio de lesão na espira basal em relação à espira 2 nos Grupos 3 e 4. A explicação para tal achado deve-se ao alto grau de lesão apresentado nestes dois grupos já que à medida que progride a intensidade das lesões perde-se este padrão, havendo espiras com 100% de lesão das CCE nas 3 fileiras, chegando a acometer também, em alguns casos e em menor intensidade, as células ciliadas internas (CCI).

A análise morfológica mostrou que o tipo de lesão de CCE mais comum encontrado foi a ausência de estereocílios, seguido pela deformidade do mesmo (fusão e tumefação). Este achado coincide com aqueles descritos em outras publicações (OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002; HYPOLITO ET AL, 2005; MAUDONNET, 2005).

As EOAPD vêm sendo utilizadas como método de avaliação da função auditiva em cobaias há algum tempo (GUNERI ET AL, 2001; WITHNELL; SHAFFER; TALMADGE, 2003; SCHNEIDER; PRIJS, SCHOONHOVEN, 2003; GOODMAN; WITHNELL; SHERA, 2003; NUTTAL ET AL, 2004; HYPOLITO ET AL, 2005; LUKASHKIN; RUSSEL, 2005). Trata-se de método de fácil execução, baixo custo e alta reprodutibilidade. Adicionalmente, quando comparado com a análise morfológica do Órgão de Corti, tem mostrando grande correlação.

O estudo funcional da orelha interna das cobaias pesquisadas, por emissão otoacústica produto de distorção (EOAPD) de fato mostrou uma grande fidelidade com os achados morfológicos à microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nos grupos 1 (soro fisiológicos) e 2 (gentamicina), sem lesões morfológicas significativas, as EOAPD estavam presentes em todos os casos. No grupo 3 (n=18; lesão aguda por amicacina) elas estavam presentes em 11 orelhas, cuja média de CCE normais foi de 75.5%. Estavam ausentes ao fim do experimento em sete orelhas, cuja média de CCE íntegras foi de 21,6%. Já no grupo 4 (n=20; uso de subdoses de gentamicina previamente a amicacina) as EOAPD estavam presentes em 12 orelhas, cuja média de CCE íntegras foi de 68% para

este subgrupo. Estavam ausentes ao fim do experimento em oito orelhas, cuja média de CCE íntegras foi de 18,9%.

Verificamos também que entre as cobaias que apresentavam EOAPD presentes ao término do experimento havia, em parte deste grupo, uma diminuição da amplitude (intensidade) das respostas de EOA no exame final, comparativamente com o inicial. E que estas cobaias que apresentavam diminuição da amplitude das EOA também apresentavam um grau de lesão de CCE maior que aquelas sem esta variação. Classificados em 4 tipos de respostas, conforme esta variação da amplitude das EOA e comparados com a análise de integridade das CCE, verificamos haver uma correlação alta e significativa entre diminuição da amplitude de EOA e aumento do número de CCE lesadas. Este achado é de grande importância por mostrar a existência de forte correlação entre estas duas variáveis, o que significa dizer que não só a presença mas também a diminuição da amplitude deve ser observada. Acreditamos que tal fato reveste-se de grande importância clínica se consideramos a possível aplicação no monitoramento de ototoxicidade por drogas em humanos.

A coincidência observada entre normalidade das EOAPD com boa integridade morfológica e redução ou ausência das emissões com lesões celulares extensas fortalecem os resultados encontrados e vão de encontro também com a afirmação de Chambers (2003) quando diz que “o grau de disfunção permanente correlaciona-se com o número de células “pilosas” sensoriais destruídas ou alteradas”.

O modelo experimental utilizado foi a cobaia por ser um animal dócil, de fácil manejo, com orelha média e interna de bom tamanho e acesso, facilitando a dissecação e estudo. Por estes motivos, em otologia vem sendo um dos animais mais utilizados como modelo experimental (TIRADO ET AL, 1997; CANEDO, 1999; OLIVEIRA; CANEDO;ROSSATO, 2002; HYPPOLITO ET AL, 2003; MAUDONNET, 2005).

Acreditamos que a linha de pesquisa que estuda os mecanismos endógenos de autodefesa das células ciliadas do órgão de Corti, concomitantemente com as pesquisas genéticas e avaliação funcional, é o caminho mais racional para chegarmos a resultados concretos que nos possibilitem ter um melhor controle sobre a lesão e a prevenção da toxicidade na orelha interna.





## 6 CONCLUSÃO

## **6 CONCLUSÃO**

1. Gentamicina, em doses não lesivas, como estímulo aos mecanismos de autodefesa celular, não protege as células ciliadas externas da orelha interna da cobaia contra a ototoxicidade da amicacina.
2. Redução na amplitude das emissões otoacústicas por produtos de distorção correlaciona-se com aumento do número de células ciliadas externas lesadas de forma estatisticamente significativa, em cobaias.

—



## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, P.L.M.; GANANÇA, M.M.; FUKUDA, Y.; MUNHOZ, M.S.L. **Otorrinolaringologia para o Clínico Geral**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1997. p. 23-26.
- ALMEIDA, C.I.R.; ALMEIDA, R.R.; DUPRAT, A.C. Ototoxicidade. **Folha Med.** v.160, n.3, p.79-84, 1993.
- BRUMMETT, R.E. Animal models of aminoglycoside antibiotic ototoxicity. **Rev. Infect. Dis.** v.5(supl.2), p.294-303, 1983.
- CANEDO, D.J.M. **Resistência a ação ototóxica de antibióticos aminoglicosídeos**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, 1999, 66p.
- CARDINAAL, R.M.; GROOT, J.C.M.J.; HUIZING, E.H.; VELDMAN, J.E.; SMOORENBURG, G.F. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. **Hear. Res.** v.144, p. 135-146, 2000.
- CHAMBERS, H.F.; Antimicrobianos – os aminoglicosídeos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. Edits; **Godman & Gilman – As Bases Farmacológicas da terapêutica**. 10ª edição, Rio de Janeiro, Editora MacGraw-Hill, 2003. p.913-927.
- CHEN, Y.; HUANG, W.G.; ZHA, D.J.; QIU, J.H.; WANG, J.L.; SHA, S.H.; SCHACHT, J. Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity: From the laboratory to the clinic. **Hear Res.** v.226, p.178-182, 2007.
- CONLON, B.J.; PERRY, B.P.; SMITH, D.W. Attenuation of neomycin ototoxicity by iron chelation. **Laryngoscope.** v.108, p.284-287, 1998.
- CONLON, B.J.; ARAN, J.M.; ERRE, J.P.; SMITH, D.W. Attenuation of aminoglycoside-induced cochlear damage with the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. **Hear. Res.** v.128, p.40-44, 1999.
- CORBACELLA, E.; LANZONI, I.; DING, D.; PREVIATI, M.; SALVI, R.; Minocycline attenuates gentamicin induced hair cell loss in neonatal cochlear cultures. **Hear. Res.** v.197, p.11-18, 2004.
- CRANN, S.A.; HUANG, M.Y.; McLAREN, J.D.; SCHACHT, J. Formation of a toxic metabolite from gentamicin by a hepatic cytosolic fraction. **Biochem. Pharmacol.** v. 43, p. 1835-1839, 1992.

DAI, P.; LIU, X.; HAN, D.; QIAN, Y.; HUANG, D.; YUAN, H.; LI, W.; YU, F.; ZHANG, R.; LIN, H.; HE, Y.; YU, Y.; SUN, Q.; QIN, H.; LI, R.; ZHANG, X.; KANG, D.; CAO, J.; YOUNG, W.Y.; GUAN, M.X. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA mutation in 16 Chinese families: implication for early detection and prevention of deafness. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.340, n.1, p.194, 2006.

DANGER, A. **Transmission et analyse du stimulus acoustique au niveau du percepteur périphérique. Ici, les récepteurs cochléaires.** Monographie du groupement des acousticiens de la langue française. Paris, 1979. p. 43-68.

DAUMAN, R.; DULON, D. Ototoxicidad medicamentosa. In: Vercken, S.(edit.) **Encyclopédie Médico-Chirurgicale - Otorrinolaringología.** v.II, Paris: Editions Scientifiques et Médicales Elsevier, 2000. p. 20.184.B-10.

DEMARCO, R.C. **Uso da gentamicina intra-timpânica para induzir ablação vestibular unilateral em cobaias.** Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, 2001, 99p.

DUAN M., AGERMAN K., ERNFORS P., CANLON B. Complementary roles of neurotrophin 3 and a N-methyl-D-aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside-induced ototoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.97, p.7597-7602, 2000.

EL BARBARY, A.; ALTSCHULER, R.A.; SCHACHT, J. Glutathione S-transferases in the Organ of Corti of the rat: enzymatic activity, subunit composition and immunohistochemical localization. **Hear. Res.** v.71, p.80-90, 1993.

FEE, W.E. Jr. Aminoglycoside ototoxicity in the human. **Laryngoscope.** v.90(Suppl 24), p.1-19, 1980.

FETONI, A.R.; SERGI, B.; SCARANO, E.; FERRARESI, A.; TROIANI, D. Protective effects of alpha-tocopherol against gentamicin-induced oto-vestibulo toxicity: an experimental study. **Acta Otolaryngol.** v.123, p.192-197, 2003.

FETONI, A.R.; SERGI, B.; FERRARESI, A.; PALUDETTI, G.; TROIANI, D. Alpha-tocopherol protective effects on gentamicin ototoxicity: a experimental study. **Int. J. Audiol.** v.43, p.166-71, 2004a.

FETONI, A.R.; SERGI, B.; FERRARESI, A.; PALUDETTI, G.; TROIANI, D. Protective effects of alpha-tocopherol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity. **Hear. Res.** v.124, p.421-426, 2004b.

FISCHEL-GHODSIAN N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. **Pharmacogenomics.** v.6, n.1, p.27-36, 2005.

FORGE, A.; FRADE, M. Structural abnormalities in the stria vascularis following chronic gentamicin treatment. **Hear. Res.** v. 20, p.233-244, 1985.

GARETZ, S.; SCHUACHT, J. Sulfhydryl compounds reduce gentamicin-induced hair cell damage in vitro. **Assoc. Res. Otolaryngol.** v.15, p.110, 1992.

GARETZ, S.L.; LATSCHULER, R.A.; SCHUACHT, J. Attenuation of gentamicin ototoxicity by glutathione in the guinea pigs *in vivo*. **Hear. Res.** v.86, p.81-87, 1994.

GOODMAN SS, WITHNELL RH, SHERA CA. The origin of SFOAE microstructure in the guinea pig. **Hear. Res.** v. 183, p. 07-17, 2003.

GUNERI, E.A.; SERBETCIOGLU, B.; IKIZ, A.O.; GUNERI, A.; CERYAN, K. TEOAE monitoring of Cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs: the protective effect of vitamin B treatment. **Auris Nasus Larynx.** v. 28, p. 09-14, 2001.

HE, N.J.; SCHMIEDT, R.A. Fine structure of the 2F1-F2 acoustic distortion product: changes with primary level. **J. Acoust. Soc. Am.**, Lancaster, v.94, n.5, p. 2659-2669, 1993.

HIEL, H.; BENNANI, H.; ERRE, J.P.; AUROUSSEAU, C.; ARAN, J.M. Kinetics of gentamicin in cochlear hair cells after chronic treatment. **Acta Otolaryngol.** v.112, n.2, p.272-277, 1992.

HIGASHI, K. Unique inheritance of streptomycin-induced deafness. **Clin. Genet.** v.35, n.6, p.433-436, 1989.

HOFFMAN, D.W.; JONES-KING, K.L.; WHITWORTH, C.A.; RYBAK, L.P. Potentiation of ototoxicity by glutathione depletion. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.** v.97, p.36-41, 1988.

HU, D.N.; QUI, W.Q.; WU, B.T.; FANG, L.Z.; ZHOU, F.; GU, Y.P.; ZHANG, Q.H.; YAN, J.H.; DING, Y.Q.; WONG, H; Genetic aspects of antibiotic induced deafness: mitochondrial inheritance. **J. Med. Genet.** v.28, n.2, p.79-83, 1991.

HUANG, M.Y.; SCHACHT, J. Formation of a citotoxic metabolite from gentamicin by liver. **Biochem. Pharmacol.** v. 40, p. 11-40, 1990.

HUGHES, G.B.; KOEGEL, L.; Ototoxicity. In: HUGHES, G. editors. **Textbook of Clinical Otolaryngology.** Nova York: Thieme-Stratton Inc. 1985. p.347-356.

HUTCHIN, T; CORTOPASSI G. Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.38, n. 11, p.2517-2520, 1994.

HYPPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, J.A.A.; CANEDO, D.M.; ROSSATO, M.; HOLANDA, F.; Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. **Rev. Brasil. Otorrinol.** v.69, n.4, p. 504-511, 2003.

HYPPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, A.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. Otorrinol.** v. 71, p. 268-273, 2005.

HYPPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, J.A.; ROSSATO, M. Cisplatin ototoxicity and otoprotection with sodium salicylate. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.** v.263, n.9, p.798-803, 2006.

IHA; L.; KASSE, C; ALMEIDA, C.I.R; CRUZ, O.L.M. Ototoxicidade induzida pela cisplatina em cobaias: efeito dose-dependente – avaliação funcional. **Acta ORL.** v.25, p. 112-118, 2007.

INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESEARCH, COMMISSION ON LIFE SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL **The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.** 7. Ed. National Academy of Sciences. Washington, D.C., 1996.

JACOBY, W.B. The glutathione-S-transferases: a group of multi-functional detoxification proteins. **Adv. Enzymol.** v.46, p.383-414, 1978.

JERO, J.; COLING, D.E.; LALWANI, A.K. The use of Preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. **Acta Otolaryngol.** v.121, n.5, p. 585-9, 2001

KNIGHT, J.A. Diseases related to oxygen-derived free radicals. **Ann. Clin. Lab. Sci.** v.25, p.111-121, 1995.

LI, Z.; LI, R.; CHEN, J.; LIAO, Z.; ZHU, Y.; QIAN, Y.; XIONG, S.; HEMAN-ACKAH, S.; WU, J.; CHOO, D.I.; GUAN, M.X. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Hum. Genet.** v.117, n.1, p.9-15, 2005.

LIANG, Y.; ZHAN, N. Determination of normal values and analysis of their relation for distortion product otoacoustic emission in guinea pigs. **Lin. Chuang Er. Bi. Yan. Hou. Ke. Za. Zhi.** v.12, n.3, p.124-127, 1998.

LISTOWSKY, I.; ABRAMOVITZ, M.; HOMMA, H.; NIITSU, Y. Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases. **Drug. Metab. Rev.** v.19, n.3-4, p.305-318, 1988.

LOPES FILHO, O.; CARLOS, R.; REDONDO, M.C. Produtos de distorção das emissões otoacústicas. **Rev. Brasil. Otorrinol.** v.61, n.6, p.485-494, 1995.

LUKASHKIN, A.N.; RUSSELL, I.J. Dependence of the DPOAE amplitude pattern on acoustical biasing of the cochlear partition. **Hear. Res.** v. 203, p. 45-53, 2005.

MATZ, G.J. Aminoglycoside cochlear ototoxicity. **Otolaryngol. Clin. North. Am.** v.26, n.5, p.705-712, 1993.

MAUDONNET, E.N. **Autoproteção contra ototoxicidade da gentamicina.** Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, 2005, 82p.

MCCRACKEN, G.H. JR. Aminoglycoside toxicity in infants and children. **Am. J. Med.** v.80, n.6B, p.172-178, 1986.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal: application in research and therapy. **Pharmacol. Ther.** v.55, p.155-194, 1991.

MICHAELIS, C.E.; GEHR, D.D.; DEINGRUBER, K.; ARNOLD, W.; LAMM, K. Optimum primary tone level setting for measuring high amplitude DPOAEs in guinea pigs. **Hear. Res.** v.189, n.1-2, p.58-62, 2004.

MIMAN, M.C.; OZTURAN, O.; IRAZ, M.; ERDEM, T.; OLMEZ, E. Amikacin ototoxicity enhanced by Ginkgo biloba extract (EGb 761). **Hear. Res.** v.169, p.121-129, 2002.

MINAMI, S.B.; SHA, S.H.; SCHACHT, J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. **Hear. Res.** v.198, p.137-143, 2004.

NISHIDA, I.; TAKUMIDA, M. Attenuation of aminoglycoside ototoxicity by glutathione. **ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.** v.58, p.68-73, 1996.

NUTTALL, A.L.; GROSH, K.; ZHENG, J.; DE BOER, E.; ZOU, Y.; REN, T. Spontaneous basilar membrane oscillation and otoacoustic emission at 15 kHz in a guinea pig. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.** v. 5, p. 337-348, 2004.

OLIVEIRA, J.A.A. **Audiovestibular toxicity of drugs.** v.I e v.II, Flórida, Boca Raton CRC Press, 1989.

OLIVEIRA, J.A.A. Ototoxicité. **Rev. Laryngol. Otol. Rhinol.(Bourd.)** v.111, p.491-496, 1990.

OLIVEIRA, J.A.A.; CANEDO, D.M.; ROSSATO, M.; Autodefesa contra a ototoxicidade de antibióticos aminoglicosídeos. **Rev. Bras. Otorringol.**, v.68, n.1, p. 7-13, 2002.

OLIVEIRA, J.A.A.; BERNAL, T.M.O.; Ototoxicidade de Aminoglicídeos e Otoproteção. In: CAMPOS, C.A.H.; COSTA, H.O.O.; **Tratado de Otorrinolaringologia, Vol. II,** São Paulo, Editora Roca, 2003. págs. 148-167.



PANDYA, A.; XIA, X.; RADNAABAZAR, J.; BATSUURI, J.; DANGAANSUREN, B.; FISCHER-GHODSIAN, N.; NANCE, W.E. Mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two families from Mongolia with matrilineal aminoglycoside ototoxicity. **J. Med. Genet.** v.34, n.2, p.169-172, 1997.

PREYER, W. **Die Seele des Kindes**. Grieben – Verlag. Leipzig, 1882.

RASMUSSEN, A.N.; POPELKA, G.R. OSTERHAMMEL, P.A.; NIELSEN, L.H. Clinical significance of relative probe tone levels on distortion products otoacoustic emissions. **Scand Audiol**, Copenhagen, v.22, n.4, p. 223-229, 1993.

RODRIGUEZ-BALLESTEROS, M.; OLARTE, M.; AGUIRRE, L.A.; GALAN, F.; GALAN, R.; VALLEJO, L.A.; NAVAS, C.; VILLAMAR, M.; MORENO-PELAYO, M.A.; MORENO, F.; DEL CASTILLO, I. Molecular and clinical characterisation of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C->T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. **J. Med. Genet.** v.43, n.11, p.e54, 2006.

ROMAND, R.; CHARDIN, S. Effects of growth factors on the hair cells after ototoxic treatment of the neonatal mammalian cochlea in vitro. **Brain Res.** v.825, n.1-2, p.46-58, 1999.

ROSA-GALVEZ, A.; JAUREGUI-RENAUS, K.; HERNANDEZ-GORIBAR, M. Aminoglucósidos, su efecto ototóxico. **Gac. Med. Mex.** v.134, n.6, p.705-711, 1998.

RUIZ, J.W.; GUZMAN, J.; POLAK, M.; ESHRAGHI, A.A.; BALKANY, T.J.; VAN DE WATER, T.R. Glutathione ester protects against hydroxynonenal-induced loss of auditory hair cells. **Otolaryngol. Head Neck Surg.** v.135, n.5, p.792-797, 2006.

RYBAK, L.P.; HUSAIN, K.; EVENSON, L.; MORRIS, C.; WHITWORTH, C.; SOMANI, S.M. Protection by 4-methylthiobenzoic acid against cisplatin – induced ototoxicity audioxican system. **Pharmacol. Toxicol.** v.81, p.173-179, 1997.

SAITO, T.; MANABE, Y.; HONDA, N.; YAMADA, T.; YAMAMOTO, T.; SAITO, H. Semi quantitative analysis by scanning electron microscopy of cochlear hair cell damage by ototoxic drugs. **Scanning Microsc.**, Chicago, v.9, n.1, p. 271-80, 1995

SANDE, M.A.; MANDELL, G.L. Agentes Antimicrobianos. Los Aminoglucósidos. In: GOODMAN, A.; GOODMAN, L.; GILMAN, A. Edits. **Goodman & Gilman - Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**. Buenos Aires, Editorial Panamericana, 1989. pp. 1097-1111.

SAUVAGE, J.P.; PUYRAUD, S.; ROCHE, O.; RAHMAN, A. Anatomia del Oído Interno. In: Vercken, S.(edit.) **Encyclopédie Médico-Chirurgicale - Otorrinolaringología. v.I**, Paris: Editions Scientifiques et Médicales Elsevier, 2000. p.20.020.A.10.

SCHACHT, J. Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. **Otolaryngol. Clin. North Am.** v.26, n.5, p.845-856, 1993.

SCHNEIDER, S.; PRIJS, V.F.; SCHOONHOVEN, R. Amplitude and phase of distortion product otoacoustic emissions in the guinea pig in an (f1 ,f2) area study. **J. Acoust. Soc. Am.** v. 113, p. 3285-3296, 2003.

SEVIN, E.; ANDRIEU-GUITRANCOURT, J.; DEHESDIN, D. Anatomia del Oído Externo. In: Vercken, S.(edit.) **Encyclopédie Médico-Chirurgicale - Otorrinolaringología. v.I**, Paris: Editions Scientifiques et Médicales Elsevier, 2000. p.20.010.A.10.

SINSWAT, P.; WU, W.J.; SHA, S.H.; SCHACHT, J. Protection from ototoxicity of intraperitoneal gentamicin in guinea pig. **Kidney Int.** v.58, p.2525-2532, 2000.

SHAW, F.A.G. The external ear. In: KEIDEL, W.D.; NETT, W.D. (eds). **Handbook of sensory physiology.** Berlin: Springer-Verlag, 1974. p.455-490.

SHULMAN, J.B. Ototoxicidad. In: GOODHILL, V. Editor. **El Oído: enfermedades, sordera y vértigo.** Barcelona, Salvat Editores, 1976. pp. 703-716.

SONG, B.B.; ANDERSON, D.J.; SCHACHT, J. Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pigs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.282, p.369-377, 1997.

THOMASSIN, J.M.; BELLUS, J.F.; Anatomia del Oído Médio. In: Vercken, S.(edit.) **Encyclopédie Médico-Chirurgicale - Otorrinolaringología. v.I.** Paris: Editions Scientifiques et Médicales Elsevier, 2000. p.20.015.A.10.

TIRADO, E.A.; MARTINEZ, J.J.M.; OAXACA, J.S.; CORONADO, I.Z.; LICONA, J. El cobayo como modelo de estudios audiológicos. **Ann. ORL. Mex.** v. 42, p. 71-74, 1997.

WEI, X.; ZHAO, L.; LIU, J.; DODEL, R.C.; FARLOW, M.R.; DU, Y. Minocycline prevents gentamicin-induced ototoxicity by inhibiting p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. **Neuroscience.** v.131, p.513-521, 2005.

WITHNELL, R.H.; SHAFFER, L.A.; TALMADGE, C.L. Generation of DPOAEs in the guinea pig. **Hear. Res.** v. 178, p. 106-117, 2003.

WHITWORTH, C.A.; RAMKUMAR, V.; JONES, B.; TSUKASAKI, N.; RYBAK, L.P. Protection against cisplatin ototoxicity by adenosine agonists. **Biochem. Pharmacol.** v.67, p.1801-1807, 2004.

WU, W.J., SHA, S.H., SCHACHT, J. Recent advances in understanding aminoglycoside ototoxicity and its prevention. **Audiol. Neurootol.** v.7, p.171-174, 2002.

XING, G.; CHEN, Z.; WEI, Q.; TIAN, H.; LI, X.; ZHOU, A.; BU, X.; CAO, X. Mitochondrial 12S rRNA A827G mutation is involved in the genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.346, n.4, p.1131-1135, 2006.

YAGI, M.; MAGAL, E.; SHENG, Z.; ANG, K.A.; RAPHAEL, Y. Hair cell protection from aminoglycoside ototoxicity by adenovirus-mediated overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor. **Hum. Gene Ther.** v.10, n.5, p.813-823, 1999.



## **APÊNDICE**

**APÊNDICE A****QUADRO 1 – TABULAÇÃO DA PROPORÇÃO DE CCE NORMAIS À MEV NAS DIFERENTES CÓCLEAS E GRUPOS DE ESTUDO**

CÓCLEA	GRUPO	CCE NORMAIS	CÓCLEA	GRUPO	CCE NORMAIS
850	1	100,0%	838E	3	57,2%
850E	1	100,0%	877	3	91,7%
895	1	100,0%	877E	3	79,1%
895E	1	100,0%	878	3	81,7%
910	1	100,0%	878E	3	27,9%
910E	1	100,0%	879	3	95,6%
911	1	100,0%	879E	3	62,4%
911E	1	100,0%	880	3	3,1%
911	1	100,0%	880E	3	7,4%
911E	1	100,0%	881	3	41,8%
950	1	100,0%	881E	3	22,3%
950E	1	100,0%	840	4	50,0%
951	1	100,0%	840E	4	44,3%
951E	1	100,0%	841	4	8,3%
832	2	100,0%	841E	4	78,1%
832E	2	100,0%	842	4	94,2%
833	2	100,0%	842E	4	90,5%
833E	2	94,2%	843	4	18,0%
885	2	96,6%	843E	4	4,1%
885E	2	89,1%	844	4	13,0%
886	2	94,1%	844E	4	16,6%
886E	2	100,0%	889	4	85,8%
887	2	93,3%	889E	4	93,3%
887E	2	91,3%	890	4	0,0%
834	3	11,1%	890E	4	9,7%
834E	3	13,6%	891	4	21,8%
835	3	46,5%	891E	4	83,4%
835E	3	89,8%	892	4	88,0%
836	3	90%	892E	4	0,0%
837E	3	95,0%	894	4	88,4%
838	3	66,3%	894E	4	79,3%

CCE: célula ciliada externa; MEV: microscopia eletrônica de varredura

**APÊNDICE B****QUADRO 2 - TABULAÇÃO DE INTENSIDADE DE RESPOSTA DE EOAPD E PROPORÇÃO DE CCE NORMAIS À MEV NAS DIFERENTES CÓCLEAS**

CÓCLEA	RESPOSTA	CCE NORMAIS	CÓCLEA	RESPOSTA	CCE NORMAIS
850	A	100,0%	877	C	91,7%
850E	A	100,0%	877E	A	79,1%
895	A	100,0%	878	A	81,7%
895E	A	100,0%	878E	D	27,9%
910	A	100,0%	879	A	95,6%
910E	A	100,0%	879E	A	62,4%
911	A	100,0%	880	D	3,1%
911E	A	100,0%	880E	D	7,4%
950 *	*	100,0%	881	D	41,8%
950E	A	100,0%	881E	C	22,3%
951	A	100,0%	840	C	50,0%
951E	A	100,0%	840E	C	44,3%
832	A	100,0%	841	C	8,3%
832E	A	100,0%	841E	D	78,1%
833	A	100,0%	842	B	94,2%
833E	A	94,2%	842E	A	90,5%
885	A	96,6%	843	D	18,0%
885E	A	89,1%	843E	D	4,1%
886	A	94,1%	844	D	13,0%
886E	B	100,0%	844E	D	16,6%
887	A	93,3%	889	A	85,8%
887E	A	91,3%	889E	A	93,3%
834	D	11,1%	890	D	0,0%
834E	D	13,6%	890E	C	9,7%
835	D	46,5%	891	D	21,8%
835E	A	89,8%	891E	C	83,4%
836	A	90%	892	B	88,0%
837E	A	95,0%	892E	D	0,0%
838	B	66,3%	894	A	88,4%
838E	C	57,2%	894E	A	79,3%

CCE: célula ciliada externa; MEV: microscopia eletrônica de varredura  
EOAPD: emissões otoacústicas produto de distorção

\* OBS: na cobaia/cóclea 950 não foi possível realização do Teste de EOA final pela presença de cerume no CAE do ouvido direito de difícil remoção.



**ANEXO**

## ANEXO

### Folha de aprovação do CETEA - Comissão de Ética em Experimentação Animal



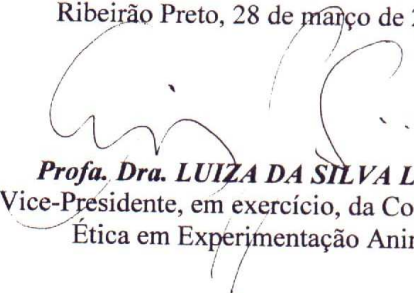
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
"CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO  
TELEFONE: PABX 602.3000 – FAX: (0XX16) 633.1586  
14049-900 – RIBEIRÃO PRETO – ESTADO DE SÃO PAULO

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 086/2004, sobre o projeto intitulado "*Estudo dos mecanismos de otoproteção cruzada da orelha interna em cobaias*", 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 **28 de março de 2005**.

(We certify that the protocol nº 086/2004, about "*Cross otoprotection mechanism on inner ear in guinea pigs*" 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 **03/28/2005** meeting.).

Ribeirão Preto, 28 de março de 2005.

  
**Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES**  
Vice-Presidente, em exercício, da Comissão de  
Ética em Experimentação Animal



# 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](#)