



UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

MESTRADO ACADÊMICO EM CIRURGIA

MARCOS JULLIAN BARRETO MARTINS

**EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO À DISTÂNCIA NA
OTOTOXICIDADE EM RATOS INDUZIDA POR CISPLATINA**

FORTALEZA – CEARÁ

2015

MARCOS JULLIAN BARRETO MARTINS

EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO À DISTÂNCIA NA
OTOTOXICIDADE EM RATOS INDUZIDA POR CISPLATINA

Dissertação submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rabelo de Freitas.
Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

FORTALEZA
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M341e Martins, Marcos Jullian Barreto.
 Efeito do pré-condicionamento isquêmico à distância na ototoxicidade em ratos induzida por cisplatina / Marcos Jullian Barreto Martins. – 2015.
 81 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2015.
 Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.
 Orientação: Prof. Dr. Marcos Rabelo de Freitas.
 Coorientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.
1. Audição. 2. Perda Auditiva - Prevenção & Controle. 3. Cisplatino. 4. Precondicionamento Isquêmico. I. Título.

CDD 617.0076

MARCOS JULLIAN BARRETO MARTINS

EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO À DISTÂNCIA NA
OTOTOXICIDADE EM RATOS INDUZIDA POR CISPLATINA

Dissertação submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Diógenes Pinheiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppolito
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP-RP)

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Marcos Rabelo de Freitas
Universidade Federal do Ceará – UFC

A minha esposa Kathiane, luz de meu caminho e companheira de todos os momentos.

A meus pais Quintino (*in memoriam*) e Maria Augusta, responsáveis pela formação de meu caráter.

A meus irmãos Quintino Filho, Francisco Neto e Márcia Lidiane, meus verdadeiros e maiores amigos.

A minhas tias Glorinha (*in memoriam*), Taisinha, Gracinha e Lilia, por sua ajuda por toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, criador de tudo, e responsável pela iluminação de nosso caminho, nos permitindo alcançar nossos sonhos.

Ao Professor Doutor Marcos Rabelo de Freitas, mais que um orientador, o maior responsável pela concretização deste trabalho, não apenas por sua ajuda valiosa na realização de todas as fases deste estudo, mas também por seu exemplo como professor, médico e grande amigo e ainda pela oportunidade a mim concedida de buscar o grau de Mestre na instituição onde terminei a graduação.

Ao Professor Doutor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, coorientador da dissertação, pelos conselhos, ideias, sugestões, pela forma respeitosa e atenciosa.

À Professora Doutora Gerly Anne de Castro Brito, coorientadora da dissertação, sem cuja orientação e extrema disponibilidade tornaria inviável a realização dos estudos morfológicos e imuno-histoquímicos.

Ao Prof. Dr. José Huygens Parente Garcia, pelos valiosos apontamentos na qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sebastião Diógenes Pinheiro, pelos valiosos apontamentos na qualificação deste mestrado, pelo exemplo para todos como pessoa e profissional.

Ao Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, sem cuja orientação e extrema disponibilidade tornaria inviável a realização dos estudos imuno-histoquímicos.

À funcionária do Departamento de Morfologia Maria do Socorro França Monte, conhecida de todos por sua dedicação e solicitude, que compartilhou todas as fases de elaboração da parte morfológica do experimento e corroborou diretamente com o seu trabalho e ideias para o resultado final.

À colega de pós-graduação Maria da Conceição Silva (Josy), que me auxiliou em todas as fases de elaboração da parte morfológica do experimento.

Aos futuros colegas de profissão Avner Marcos Alves Batista e Yuri Neyson Ferreira Brito, que me auxiliaram na realização do experimento, e que não abandonaram este trabalho nem mesmo quando, em alguns momentos, pensamos que não iríamos conseguir atingir nossos objetivos.

Ao funcionário do biotério da cirurgia Bento Francisco de Oliveira, pela sua disponibilidade e cuidados com animais que se sacrificaram para a realização deste estudo.

À Professora Viviane Carvalho, que me incentivou a buscar o grau de Mestre, e pelas valiosas orientações como minha professora na graduação e depois como colega de pós-graduação.

Aos doutores Francisco Tiago Barroso Chagas, Anastácio Rodrigues, João Paulo de Almeida Silva e Robson Silvestre da Silva, pelo incentivo, companheirismo e verdadeira amizade,

substituindo-me em minhas ausências na Clínica Otorrinos e Hospital São Carlos com a compreensão de quem só deseja o bem.

Ao colega de trabalho João Joadson Duarte Teixeira, pela amizade e companheirismo, e pela compreensão de minha redução de trabalho junto à Prefeitura Municipal de Fortaleza.

Aos colegas do LAFICA (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer) Francisco Fábio de Oliveira e Lívia Talita C. Mourão pelo auxílio na confecção do estudo e das técnicas de realização do pré-condicionamento isquêmico.

À colega de pós-graduação Isabelle Jataí por seu incentivo e apoio na realização do experimento e na dissecação das cócleas.

Às senhoras Luciene e Magda, secretárias da Pós-Graduação em Cirurgia, por sua completa dedicação ao trabalho que realizam, compartilhando com a coordenação, professores e alunos o mérito de manter o programa com avaliações cada vez mais positivas.

Ao colega de LAFICA Francisco Fábio de Oliveira, pela assistência na utilização do Programa GraphPad Prism.

Ao casal Maria Silvandira F. Pinheiro (Vandinha) e Antônio Haroldo P. Ferreira, por sua disponibilidade em vários momentos em que foram por mim importunados.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Federal do Ceará, por ter me graduado como médico, realizando um sonho de infância, e por agora me permitir buscar a realização de um sonho acalentado desde a graduação.

“A cegueira nos separa das coisas, mas a surdez nos separa das pessoas”.

Immanuel Kant

RESUMO

A ototoxicidade pode ser descrita como a perda da função auditiva e ou vestibular decorrente de lesões celulares das estruturas da orelha interna por substâncias químicas. Apesar do potencial ototóxico de algumas drogas antineoplásicas, como a cisplatina, não se deve desprezá-las como uma alternativa terapêutica para o paciente portador de neoplasia maligna, devido a sua eficácia e escassez de opções para protocolos terapêuticos. O pré-condicionamento isquêmico à distância (dPCI) foi proposto a partir do estudo de que o pré-condicionamento isquêmico (PCI) de uma área vascular cardíaca poderia proteger outra totalmente distinta. Dentre os estudos com dPCI, os estudos com indução de isquemia em animais através da isquemia e reperfusão de patas anteriores ou posteriores é bastante utilizado, devido à sua fácil aplicabilidade e ao baixo custo. Baseando-se nesses conhecimentos, propôs-se um estudo com indução de ototoxicidade em ratos por cisplatina na dose de 32mg/kg, dividida em 04 aplicações de 08mg/kg/dia, que mostrou ser uma dose tóxica e com baixa mortalidade a partir da experiência de nosso grupo de pesquisa, e otoproteção com pré-condicionamento isquêmico em pata traseira direita. Os ratos Wistar foram submetidos à anestesia. Aqueles com otoscopia normal realizaram avaliação auditiva por meio do potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PAETE). Após essa avaliação, administraram-se cisplatina via intraperitoneal, grupo 1 (n=08 animais), e salina via intraperitoneal, grupo 2 (n=08 animais). Nos grupos 3 (n=09 animais) e 4 (n=07 animais), realizou-se uma isquemia de pata traseira direita por 10 minutos seguida de reperfusão por 30 minutos, quando após administraram-se via intraperitoneal cisplatina (grupo 3) e salina (grupo 4). Ao final (D4), todos foram avaliados por PAETE. Foi removido o osso temporal direito, após eutanásia. A cóclea foi dissecada para realização das técnicas de microscopia óptica e imuno-histoquímica. Baseado nos resultados deste estudo, encontrou-se que o dPCI, mecanismo já amplamente estabelecido, protegeu de forma significativa a lesão funcional na cóclea por cisplatina, através da avaliação funcional por PAETE ($p=0,0477$). Não se observou diferença estatística na análise por microscopia óptica ($p>0,05$). Foi observado reversão de imunomarcção, no grupo 3, de fator de necrose tumoral α e óxido nítrico sintase induzida da lesão em estria vascular por cisplatina. Obteve-se proteção na ototoxicidade sistêmica da cisplatina. Concluiu-se que o dPCI protegeu a ototoxicidade por cisplatina na avaliação funcional por PAETE e protegeu a toxicidade sistêmica pela avaliação do peso.

PALAVRAS-CHAVE: audição – efeito de drogas; perda auditiva – prevenção e controle; cisplatino; condicionamento isquêmico.

ABSTRACT

Ototoxicity can be described as a loss of auditory or vestibular function as a consequence of injury in cells of the inner ear. Despite of this effect, some antineoplastic drugs, as cisplatin, can not be excluded as an option for the patient with a malignant tumor, because of its efficiency and the lack of options for therapeutic protocols. Remote ischemic preconditioning (RIPC) was proposed from the study that the ischemic preconditioning (IPC) of a cardiac vascular area could protect another completely different. Among the studies with RIPC, studies on the induction of ischemia in animals by ischemia and reperfusion of anterior or posterior paws is widely used, due to its easy application and low cost. Based on these knowledge, a study was proposed with induction by cisplatin ototoxicity in rats at a dose of 32mg / kg, divided in 04 applications of 08 mg / kg / day, which proved to be a toxic dose and low mortality from the experience of our research group, and otoprotection with ischemic preconditioning in the right hind paw. The Wistar rats were anesthetized. Those with normal otoscopy were evaluated by hearing tests through auditory brainstem response (ABR). After this evaluation, cisplatin was administered intraperitoneally, group 1 (n=08 rats), and saline intraperitoneally, group 2 (n=08 rats). In groups 3 (n=09 rats) and 4 (n=07 rats), there was a right hind paw ischemia for 10 min followed by reperfusion for 30 minutes, when it was administered after intraperitoneal cisplatin (group 3) and saline (group 4). At the end (D4), all were evaluated by ABR. The right temporal bone was removed after euthanasia. The cochlea was dissected for the techniques of optical microscopy and immunohistochemistry. Based on the results of this study, it was found that the RIPC, a mechanism already largely established, protects significantly the functional damage in the cochlea by cisplatin, through functional evaluation ABR ($p = 0.0477$). There was no statistical difference in the analysis by optical microscopy ($p > 0.05$). Reversal immunostaining was observed in group 3, tumor necrosis factor α and nitric oxide synthase induced lesion stria vascularis of cisplatin. It was obtained protection of the systemic toxicity of cisplatin. This study found that the RIPC protected the cisplatin-induced ototoxicity in functional assessment by ABR and protected systemic toxicity by the evaluation of weight measures.

Key-words: hearing – drug effects; hearing loss – prevention and control; cisplatin; ischemic preconditioning

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Variação do peso entre D0 e D4 nos grupos 1, 2, 3 e 4.	46
TABELA 2 – Teste de Logrank entre os grupos 1, 2, 3 e 4.	47
TABELA 3 – Variação do limiar por PAETE nos grupos 1, 2, 3 e 4.	49
TABELA 4 – Resultado de p para o teste de Fisher (2 x 2) na comparação intergrupos para estria vascular.	52
TABELA 5 – Resultado de p na comparação intergrupos para imunohistoquímica de TNF- α na estria vascular.	57
TABELA 6 – Resultado de p na comparação intergrupos para imunohistoquímica de iNOS na estria vascular.	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fotomicrografia da cóclea de rato.	18
FIGURA 2 – Desenho esquemático representando as principais estruturas que compõem o órgão espiral de Corti.	19
FIGURA 3 – Fotomicrografia do órgão espiral de Corti de rato representando os escores de lesão nas células ciliadas externas.	24
FIGURA 4 – Fotomicrografia da estria vascular (seta) de ratos representando os escores de lesão após tratamento com cisplatina.	25
FIGURA 5 – Esquema do Experimento nos grupos 1 e 2.	34
FIGURA 6 – Esquema do Experimento nos grupos 3 e 4.	35
FIGURA 7 – Fotografia mostrando isquemia de pata traseira direita com fita elástica em rato após anestesia com ketamina e xilazina.	35
FIGURA 8 – Fotografia mostrando a injeção intravenosa em veia dorsal peniana de azul de Evans.	36
FIGURA 9 – Fotografia mostrando detalhe das quatro patas, revelando que apenas a pata isquemiada (traseira direita) não corou após a injeção de Azul de Evans.	36
FIGURA 10 – Fotografia mostrando detalhe das patas traseiras no momento da reperusão, demonstrado pela coloração da pata traseira direita, que estava anteriormente isquemiada, por Azul de Evans.	37
FIGURA 11 – Fotografia mostrando o posicionamento dos eletrodos em rato anestesiado com ketamina e xilazina para realização do potencial auditivo evocado de tronco encefálico (PAETE).	38
FIGURA 12 – Traçado eletrofisiológico do potencial auditivo evocado de tronco encefálico (PAETE).	39
FIGURA 13 – Fotomicrografia de estria vascular em aumento de 400x.	41
FIGURA 14 – Gráfico de variação de peso. Diferença entre peso final e peso inicial (D4-D0).	45
FIGURA 15 – Gráfico Curva de sobrevivência.	47
FIGURA 16 – Gráfico média dos limiares do PAETE dos grupos 1, 2, 3 e 4.	48
FIGURA 17 – Gráfico média dos limiares auditivos dos grupos experimentais.	49
FIGURA 18 – Fotomicrografias em aumento 400x da estria vascular (EV) nos diversos grupos.	51
FIGURA 19 – Gráfico de lesão de estria vascular (EV), demonstrando que não	52

houve diferença estatística entre os grupos.

FIGURA 20 – Fotomicrografias em aumento 400x do órgão de Corti nos diversos grupos. 53

FIGURA 21 – Gráfico de lesão de célula ciliada externa (CCE), demonstrando que não houve diferença estatística entre os grupos. 54

FIGURA 22 – Gráfico do percentual de área imunomarcada por área total para TNF- α nos diversos grupos. 55

FIGURA 23 – Fotomicrografias em aumento 400x da imunomarcção do TNF- α na estria vascular nos diversos grupos de animais. 56

FIGURA 24 – Gráfico do percentual de área imunomarcada por área total para iNOS nos diversos grupos. 57

FIGURA 25 – Fotomicrografias em aumento 400x da imunomarcção do iNOS na estria vascular nos diversos grupos de animais. 58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α – alfa

β – beta

γ – gama

ALT – alanina transaminase

AST – aspartato transaminase

Akt – serina-treonina quinase

CCE – células ciliadas externas

CCI – células ciliadas internas

CDDP – cisdiaminodicloroplatinum ou cisplatina

cGMP/PKG proteína cinase dependente de guanosina monofosfato cíclico

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação animal

dB NA – decibél nível de audição

DNA – ácido desoxirribonucleico

dPCI – pré-condicionamento isquêmico remoto ou à distância

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM – erro padrão da média

g – gramas

GDP – guanosina difosfato inativa

GTP – guanosina trifosfato ativa

HE – coloração hematoxilina-eosina

Hz – Hertz

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-6 – interleucina 6

iNOS – óxido nítrico sintase induzida

IRI – injúria de isquemia-reperfusão

JAK – janus kinase

Kg – kilograma

L-NAME – N -nitro-L-arginina metil éster

Máx – máximo

Md – mediana

MED – média

mg – miligrama

Mín – mínimo

mseg – milissegundo

n – número de animais

NF κ b – fator nuclear Kappa B

PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase

PAETE – potencial auditivo evocado de tronco encefálico

PCI – pré-condicionamento isquêmico

PG – proteína G

ROS – espécies reativas de oxigênio

SNS – sistema nervoso simpático

STAT – transdutores de sinais e na ativação de moléculas de transcrição

TNF- α – fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 AUDIÇÃO	17
1.2 CÓCLEA	17
1.3 OTOTOXICIDADE	19
1.4 CISPLATINA	20
1.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL	22
1.6 MICROSCOPIA ÓPTICA	23
1.7 PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO	25
1.8 PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO À DISTÂNCIA	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 ANIMAIS	32
3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	32
3.3 DROGAS	32
3.4 GRUPOS DE ANIMAIS	33
3.5 PROCEDIMENTO	33
3.6 POTENCIAIS AUDITIVOS EVOCADOS DE TRONCO ENCEFÁLICO	37
3.7 TÉCNICA DE MICROSCOPIA ÓPTICA	39
3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (iNOS) e TNF - α	41
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
3.9.1 Análise de variância (ANOVA) com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de tukey	42
3.9.2 Teste de Logranks	42
3.9.3 Análise de variância (ANOVA) com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de mann-witney	42
3.9.4 Teste exato de Fisher	43

3.9.5 Teste de Kruskal-Wallis com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de Dunn	43
3.9.6 Análise de variância (ANOVA) com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de Bonferroni	43
4 RESULTADOS	44
4.1 ALTERAÇÕES DE ORELHA MÉDIA OU EXTERNA	44
4.2 TOXICIDADE SISTÊMICA DA CISPLATINA	44
4.2.1. Curva de peso	44
4.2.2. Curva de sobrevida	46
4.3 AVALIAÇÃO AUDITIVA FUNCIONAL	47
4.4 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA	50
4.4.1 Escore de microscopia óptica da estria vascular	50
4.4.2 Escore de microscopia óptica das células ciliadas externas	53
4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TNF – α E iNOS	54
5. DISCUSSÃO	59
5.1 COMENTÁRIOS GERAIS	59
5.2 EFEITO SOBRE A TOXICIDADE SISTÊMICA	60
5.3 EFEITO SOBRE A OTOTOXICIDADE	61
6. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICE A – PESO DOS ANIMAIS NOS DIVERSOS GRUPOS	74
APÊNDICE B – LIMIARES DOS ANIMAIS POR PAETE NO INÍCIO E FIM DO EXPERIMENTO NOS GRUPOS EM dB NA	76
APÊNDICE C – ESCORES DA ANÁLISE DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE ESTRIA VASCULAR (EV) E DECÉLULA CILIADA EXTERNA (CCE) NOS DIVERSOS GRUPOS	78
APÊNDICE D – MÉDIAS DOS PERCENTUAIS DE ÁREA IMUNOMARCADA POR ÁREA TOTAL PARA TNF – α E iNOS NOS DIVERSOS GRUPOS	80
ANEXO – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 AUDIÇÃO

A audição constitui um sentido importante no relacionamento social humano. Durante o desenvolvimento, desde o período neonatal até a idade adulta, este sentido é essencial na aquisição da linguagem e, portanto, para a comunicabilidade entre os indivíduos de uma sociedade (PIMPERTON; KENNEDY, 2012), sendo também de extrema importância para orientação e sobrevivência no meio ambiente nas mais diferentes classes de animais. O filósofo Immanuel Kant (1724-1804) chegou a escrever: “a cegueira nos separa das coisas, mas a surdez nos separa das pessoas”; demonstrando já o reconhecimento da audição como sentido essencial à nossa espécie (FRIAUF, 2014).

A sistema auditivo consiste, de uma forma simplificada, na transformação da energia da onda sonora para energia elétrica, sendo, portanto, um sistema mecanorreceptor. O sistema é composto por orelha externa, orelha média, orelha interna e vias auditivas centrais. A orelha externa, responsável pela captação e direcionamento do estímulo sonoro, é composta por duas partes: o pavilhão auricular, fixado lateralmente à cabeça, e um canal, o conduto auditivo externo, que se estende do pavilhão até a membrana timpânica, determinando esta o limite entre as orelhas externa e média. A orelha média é formada por uma pequena cavidade pneumática, que se comunica anteriormente com a nasofaringe, através da tuba auditiva, e posteriormente com a cavidade mastoidea (processo mastóide do osso temporal). Ainda encontra-se uma cadeia ossicular formada por 03 ossículos (martelo, bigorna e estribo) que conecta a membrana timpânica à orelha interna, tendo este complexo membrana-cadeia ossicular a função de transferir a energia do meio aéreo (onda sonora) para o meio líquido onde se encontram as células auditivas primárias da orelha interna. A orelha interna é formada por um conjunto de canais e canalículos dentro da porção petrosa do osso temporal (labirinto ósseo). Dentro desse conjunto, encontram-se ductos e vesículas membranáceas (labirinto membranoso) responsáveis pela audição e pelo equilíbrio. O labirinto ósseo é composto por vestíbulo, canais semicirculares ósseos e cóclea óssea, que se assemelha a um caracol (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

1.2 CÓCLEA

A cóclea (FIGURA 1) é a estrutura neurosensorial fundamental no processo auditivo periférico da mensagem acústica. É formada por uma série de estruturas epiteliais

complexas, com células sensoriais e de sustentação, situadas sobre a membrana basilar. Ela converte a energia mecânica do meio líquido do labirinto membranoso em energia elétrica (impulso elétrico auditivo). Como uma concha marinha, ela se espirala em torno de uma estrutura central, denominada modíolo, que transporta ramos do nervo coclear para o ducto coclear por duas voltas e três quartos, ficando progressivamente menor em direção ao ápice. Ela consiste em três tubos espiralados: a rampa vestibular, a rampa média e a rampa timpânica. Na medida em que se espirala, a lâmina espiral é levantada do modíolo. Dentro dessa, encontra-se o ducto coclear entre a rampa do vestíbulo e a rampa do tímpano. O ducto coclear é separado da rampa do vestíbulo pela membrana vestibular (membrana de Reissner) e da rampa do tímpano pela membrana basilar. Tem formato triangular com a base formada pelo endóstio do canal, chamado de ligamento espiral e pela estria vascular (DANIELS et al, 1996).

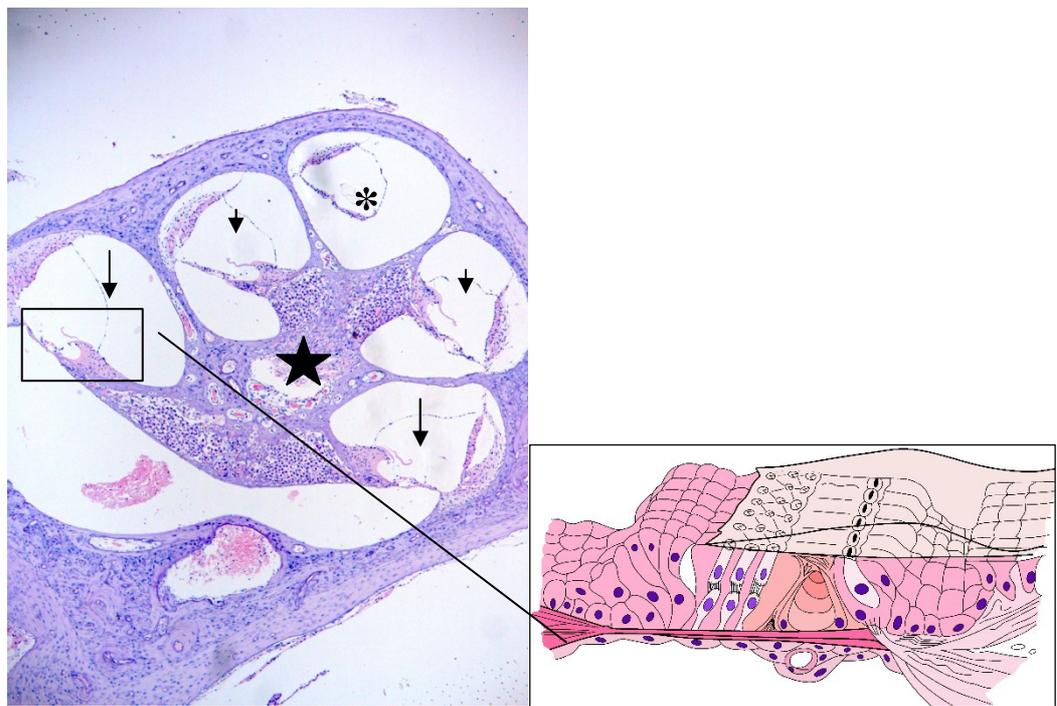


FIGURA 1 – Fotomicrografia da cóclea de rato mostrando os giros basal (setas), médio (cabeças de seta) e apical (asterisco), em torno do modíolo (estrela) (Coloração HE, 100X). Em destaque, desenho esquemático do órgão espiral de Corti, adaptado, com autorização de FREITAS, M. R. (FREITAS, 2006)

Na superfície da membrana basilar encontra-se o órgão de Corti (FIGURA 2), que contém células eletromecanicamente sensíveis: as células ciliadas, que constituem os receptores finais que geram impulsos nervosos em resposta às vibrações nervosas. Encontram-se três fileiras de células ciliadas externas (CCE) e uma fileira de células ciliadas internas (CCI). As fibras nervosas estimuladas pelas células ciliadas levam ao gânglio espiral de Corti localizado no modíolo. As células ciliadas internas chegam e recebem cerca de 90%

das fibras nervosas do nervo vestibulo-coclear, oitavo par craniano, mas lesões das células ciliadas externas geram grandes perdas auditivas, sendo proposto que, de certa forma, elas regulem a sensibilidade das células ciliadas internas, funcionando na verdade como amplificadoras do som (BREUEL; SANCHEZ; BENTO, 2001).

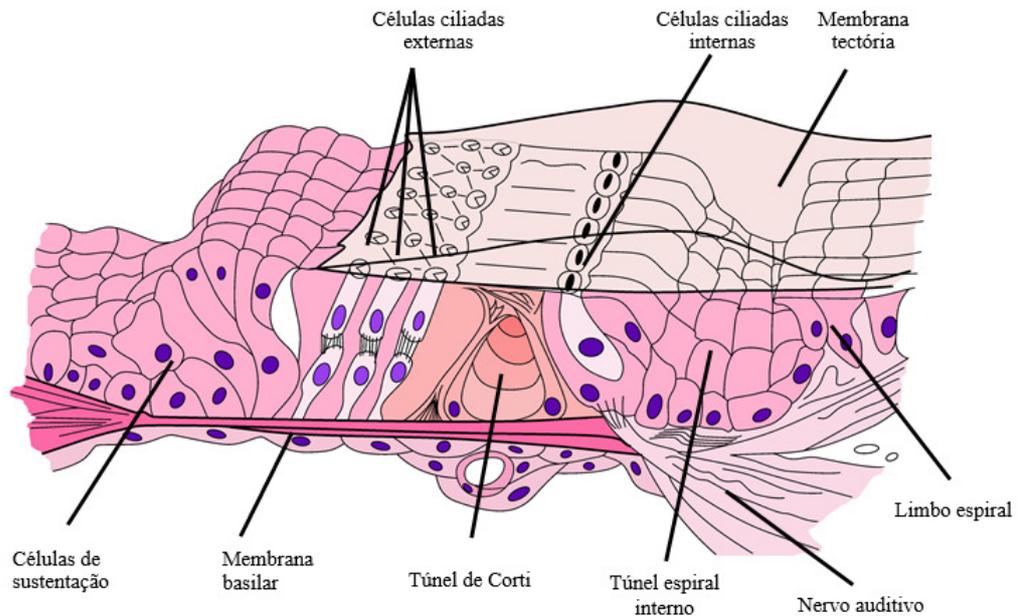


FIGURA 2 – Desenho esquemático representando as principais estruturas que compõem o órgão espiral de Corti, adaptado com autorização de FREITAS, M. R. (FREITAS, 2006).

Os animais de pequeno porte são os mais utilizados para a pesquisa médica em geral (SHANAIDER; SILVA, 2004). Dentre esses, os ratos e as cobaias são bastante utilizados pelas semelhanças de sua orelha com a humana. Para os experimentos que visam estudar a orelha média as cobaias são preferidas por sua menor incidência de otite e pela característica do rato apresentar a artéria estapediana passando sobre a janela redonda e passando entre os ramos do estribo, podendo gerar complicações hemorrágicas em procedimento cirúrgico nesse animal. Já no estudo coclear, ambos os animais mostram-se valiosos tanto para o uso de microscopia eletrônica de varredura como o de microscopia óptica de luz (ALBUQUERQUE et al, 2009).

1.3 OTOTOXICIDADE

A ototoxicidade pode ser descrita como a perda da função auditiva e ou vestibular oriunda de lesões celulares das estruturas da orelha interna, decorrente de substâncias químicas. Essa perda de função pode ser parcial ou total, simétrica ou não, temporária ou permanente; a depender da composição química da substância, da dose, do tempo de

exposição, da via de administração, da característica/susceptibilidade individual e ainda da associação com ruído excessivo (FAUSTI et al, 2005).

As classes de drogas com potencial ototóxico comuns em uso clínico incluem: antibióticos aminoglicosídeos, quimioterápicos platinados, diuréticos de alça, antibióticos macrolídeos e antimaláricos (ARSLAN; ORZAN; SANTARELLI, 1999). Aminoglicosídeos e quimioterápicos platinados causam as mais intensas e irreversíveis perdas auditivas nesse grupo (RYBAK; RAMKUMAR, 2007).

A influência da farmacodinâmica e da farmacocinética das drogas também deve ser considerada. A farmacodinâmica refere-se ao mecanismo de ação da droga, quando uma droga tem sua ação interferida por outra: por efeito oposto ou não; por ação em um mesmo sistema ou por queda de efetividade por competição por um mesmo receptor. A farmacocinética refere-se à absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco (CIANFORNE et al, 2011).

Por outro lado, apesar do potencial ototóxico de algumas drogas antineoplásicas, como os compostos platinados: cisplatina e carboplatina, não se deve desprezá-las como uma alternativa terapêutica para o paciente portador de uma neoplasia maligna, devido a sua eficácia e escassez de opções para protocolos terapêuticos (LANGER et al, 2013). Daí a importância de se determinar com exatidão os mecanismos através dos quais ocorrem os efeitos ototóxicos de tais drogas, para se buscar estratégias de redução dessa toxicidade, sem comprometer seu efeito terapêutico antineoplásico (BROCK et al, 2012).

1.4 CISPLATINA

Cisplatina, cisdiaminodicloroplatinum (CDDP), é um agente quimioterápico frequentemente usado para o tratamento de várias linhagens de neoplasias como as de cabeça e pescoço, de pulmão, de bexiga, de ovário, de testículo e do sistema gastrointestinal. Foi sintetizada, em 1845 por Peyrone, recebendo inicialmente seu nome e apenas a partir de 1960 passou a ser usado como antineoplásico (SCHACHT; TALASKA; RYBAK, 2012). O mecanismo de ação antineoplásico está relacionado à inibição seletiva e persistente da síntese de ácido desoxiribonucleico (DNA) (VAN RUIJVEN et al, 2005a). Seus efeitos colaterais incluem ototoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, supressão medular e distúrbios gastrointestinais. Esses tipos de toxicidade podem interferir com o tratamento ao reduzir a dosagem, frequência e duração da quimioterapia em muitos pacientes (RYBAK et al, 2009). Enquanto a nefrotoxicidade, por exemplo, pode ser atenuada por hidratação salina adequada,

não existe cura ou tratamento preventivo para a ototoxicidade e para a neurotoxicidade que podem ocorrer nos pacientes (CHANG et al, 2014).

A ototoxicidade por cisplatina foi primeiramente descrita por Rossof et al., em 1972, e tem sido amplamente estudada desde então (BORGES et al, 2001); entre 11 e 97% dos pacientes tratados apresentam perda auditiva (MARSHAK et al, 2014) frequentemente acompanhada por zumbido. Alterações na audiometria de alta frequência podem ser evidenciadas na quase totalidade dos casos (FREITAS et al, 2009a; OZKIRIS et al, 2013). Os fatores de risco compreendem tratamento associado com outras drogas ototóxicas, como aminoglicosídeos ou furosemida; dose e dose acumulada; irradiação crânio-facial; extremo de faixa etária e sexo masculino (LI; WOMER; SILBER, 2004; YANCEY et al, 2012; REDNAM et al, 2013).

O mecanismo molecular de ação da cisplatina consiste em vias dependentes e independentes de lesão ao DNA, sendo as vias independentes importantes na lesão coclear (MANDIAC et al, 2003). A via de lesão ao DNA ocorre por dano oriundo da ativação do sistema caspase (CHOI et al, 2013) e a via independente ocorre por formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), depleção do sistema glutatona, aumento da peroxidação lipídica, modificação oxidativa de proteínas e nitrosilação de proteínas cocleares (CHIRTES; ALBU, 2014). O estresse oxidativo, via independente, é o principal mecanismo de lesão de células ciliadas. Em culturas celulares do órgão de Corti, os níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio elevam-se imediatamente após a exposição à cisplatina, enquanto os níveis de glutatona e enzimas antioxidantes, tais como: superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase, decrescem. Essas alterações funcionam como um gatilho para peroxidação lipídica (KIM et al, 2009). Outra via seria o sistema enzimático da tioredoxina (GROMER; URIG; BECKER, 2004).

Os sítios de lesão da cisplatina na cóclea compreendem o órgão de Corti, gânglio espiral, estria vascular e ligamento espiral (VAN RUIJVEN et al, 2005b). Uma vez em meio intracelular, ela induz a morte celular por apoptose por dois processos principais: inflamação e estresse oxidativo (RYBAK et al, 2007). Os tipos celulares principais que sofrem injúria são CCE, células de suporte e células marginais da estria vascular (CHIRTES; ALBU, 2014). A lesão é mais evidente nas células da espira basal, apresentando lesão ocasional de CCI (HINOJOSA et al, 1995) e degeneração de órgãos vestibulares (MEECH et al, 1998). A lesão se inicia nos giros basais da cóclea, estendendo-se progressivamente até atingir o giro apical (HYPPOLITO et al, 2005).

As citocinas envolvidas na lesão da cisplatina são as pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral α (TNF- α) (WAISSBLUTH et al, 2013), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) (SO et al, 2008). Observa-se também uma elevação nos níveis de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e fator nuclear Kappa B (NF κ b) (RYBAK et al, 2007; WATANABE et al, 2002; SO et al, 2007; CHUNG et al, 2008).

Apoptose é uma forma ativa de morte celular que ocorre durante o desenvolvimento normal, bem como quando células são expostas a determinados tipos de agentes agressores tais como isquemia/hipóxia, radiação ou toxinas (HUANG et al, 2000) e este mecanismo de lesão parece ser a base fisiopatológica da ototoxicidade da cisplatina (FREITAS et al, 2009b).

A otoproteção à ototoxicidade por CDDP já foi descrita por vários autores em estudos de alguns compostos: melatonina (LOPEZ-GONZALEZ et al, 2000), dexametaxona (DALDAL; ODABASI; SRBETCIOGLU, 2007), vitamina E (KALKANIS; WHITWORTH; RYBAK, 2004), N-acetilcisteína (FEGHALI; LIU; VAN DE WATER, 2001), alopurinol-ebsele (LYNCH et al, 2005), D-metionina (CAMPBELL et al, 1999), aminoguanidina (KELLY et al, 2003), ginkgo biloba (HYPPOLITO et al, 2003; HUANG; WHITWORTH; RYBAK, 2007), trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) (TERANISHI; NAKASHIMA, 2003), metformina (CHANG et al, 2014) e silymarin (CHO; LEE; DO, 2014).

A amifostina promoveu proteção contra ototoxicidade causada por cisplatina tanto na avaliação funcional quanto na morfológica em um estudo realizado com ratos Wistar nas doses de 16mg/Kg e de 24mg/kg. Não apresentou interferência no efeito sistêmico da CDDP (FREITAS, 2006)

1.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

Como descrito, as alterações em células ciliadas e no gânglio espiral no giro basal da cóclea são acompanhadas por alterações auditivas. Testes de alta frequência permitem um diagnóstico precoce de ototoxicidade. Audiometria estendida de alta frequência e emissões otoacústicas produto de distorção são testes aplicáveis e de diagnóstico precoce, mesmo no paciente assintomático (FAUSTI et al, 1999; KNIGHT et al, 2007; ABUJAMARA et al, 2013).

O potencial auditivo evocado de tronco encefálico (PAETE), outro método objetivo de avaliação da via auditiva, também é utilizado para avaliação e seguimento de ototoxicidade em pacientes (Dille et al, 2013). Os potenciais auditivos evocados de tronco

encefálico consistem em fenômenos bioelétricos oriundos da passagem do estímulo auditivo através do tronco encefálico. Essa atividade elétrica pode ser filtrada e capturada por eletrodos de superfície e é representada por 5 a 7 ondas (I, II, III, IV, V, VI e VII), cada uma delas referindo-se a um local específico da via auditiva central. Em roedores, os prováveis geradores das ondas são: onda I, nervo auditivo; onda II, núcleos cocleares; onda III, complexo olivar superior; onda IV, lemnisco lateral e colículo inferior; onda V, corpo geniculado medial e radiações talamocorticais (HENRY, 1979). À medida que se decresce a intensidade do estímulo, as ondas vão progressivamente aumentando em latência e reduzindo em amplitude até seu completo desaparecimento. Desta forma, o examinador é capaz de determinar o limiar eletrofisiológico da audição, que é diretamente proporcional ao limiar de audição psicoacústico, mas, ao contrário deste, não necessita da colaboração do examinado para sua determinação, sendo, portanto, um método objetivo de avaliação. Pode-se ainda estabelecer a presença ou ausência de lesões da via auditiva ao nível do tronco encefálico pela análise do tempo de condução do estímulo entre locais mais proximais e distais da via auditiva retrococlear (FREITAS, 2006).

O PAETE consiste em um método de avaliação mais fidedigno que emissões otoacústicas para determinação de ototoxicidade por cisplatina a partir da análise eletrofisiológica do limiar auditivo baseado na onda II, apresentando menor variabilidade em estudos com ratos e fáceis execução e aplicabilidade (FREITAS et al, 2009a).

1.6 MICROSCOPIA ÓPTICA

A ototoxicidade por cisplatina a nível histológico já foi amplamente estudada através de microscopia eletrônica de varredura, que apesar de sua aplicabilidade, apresenta como desvantagem o alto custo, sendo então ausente na maioria dos centros de pesquisa em nosso país. O estudo histológico por microscopia óptica pode ser realizado com menor custo e encontra-se amplamente disponível. Na microscopia eletrônica de varredura observa-se com facilidade as alterações cocleares como desarranjo do padrão das células ciliadas externas e ou internas com distorção ou ausência ciliar (HYPPOLITO et al, 2005).

A análise histológica da ototoxicidade por cisplatina foi descrita por nosso grupo de pesquisa em outro estudo (FREITAS et al, 2009c) através de um sistema de 04 escores avaliando no giro basal da cóclea a presença das células ciliadas externas (CCE) e o grau de retração celular da camada média da estria vascular (EV). Para CCE: escore 0: presença de 3 CCE com núcleos bem delimitados; escore 1: presença de 2 CCE; escore 2: presença de 1 CCE; escore 3: ausência total de CCE com espaço preenchido por células de sustentação com

alteração evidente da arquitetura do órgão espiral de Corti (FIGURA 3 A, B, C e D). Para EV: escore 0: ausência de retração; escore 1: retração leve; escore 2: retração moderada e escore 3: retração grave (FIGURA 4 A, B, C e D).

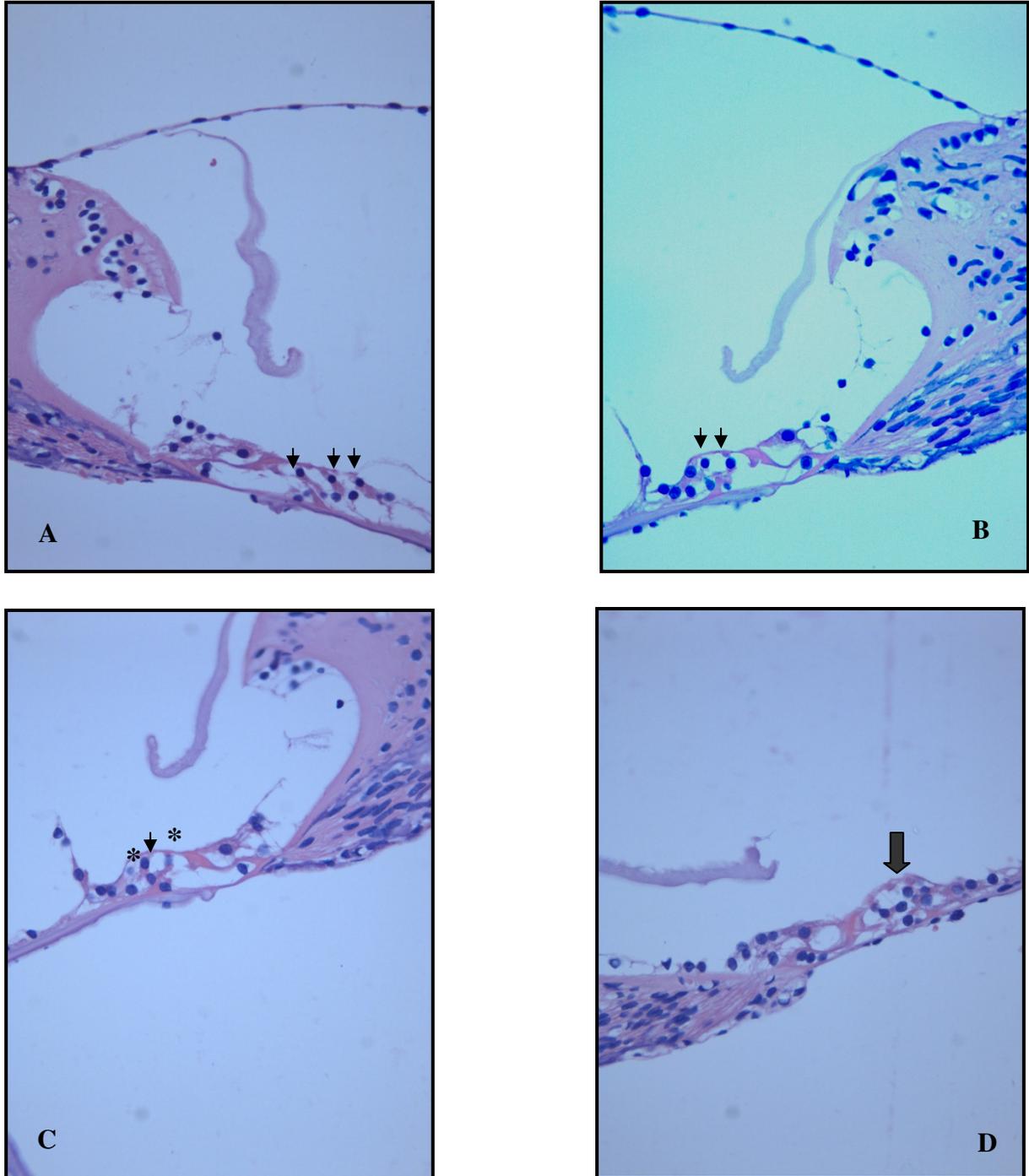


FIGURA 3 – Fotomicrografia do órgão espiral de Corti de rato representando os escores de lesão nas células ciliadas externas. A. Escore 0: presença de 3 células ciliadas externas, com núcleos bem delimitados (CCE) (cabeças de seta); B. Escore 1: presença de 2 CCE (cabeças de seta); C. Escore 2: presença de 1 CCE (cabeça de seta) com as demais apresentando núcleo degenerado e pouco evidente (asterisco). D. Escore 3: ausência total de CCE, cujo espaço encontra-se preenchido por células de sustentação, com alteração evidente da arquitetura do órgão espiral de Corti (seta larga) (adaptado com permissão de FREITAS, 2006).

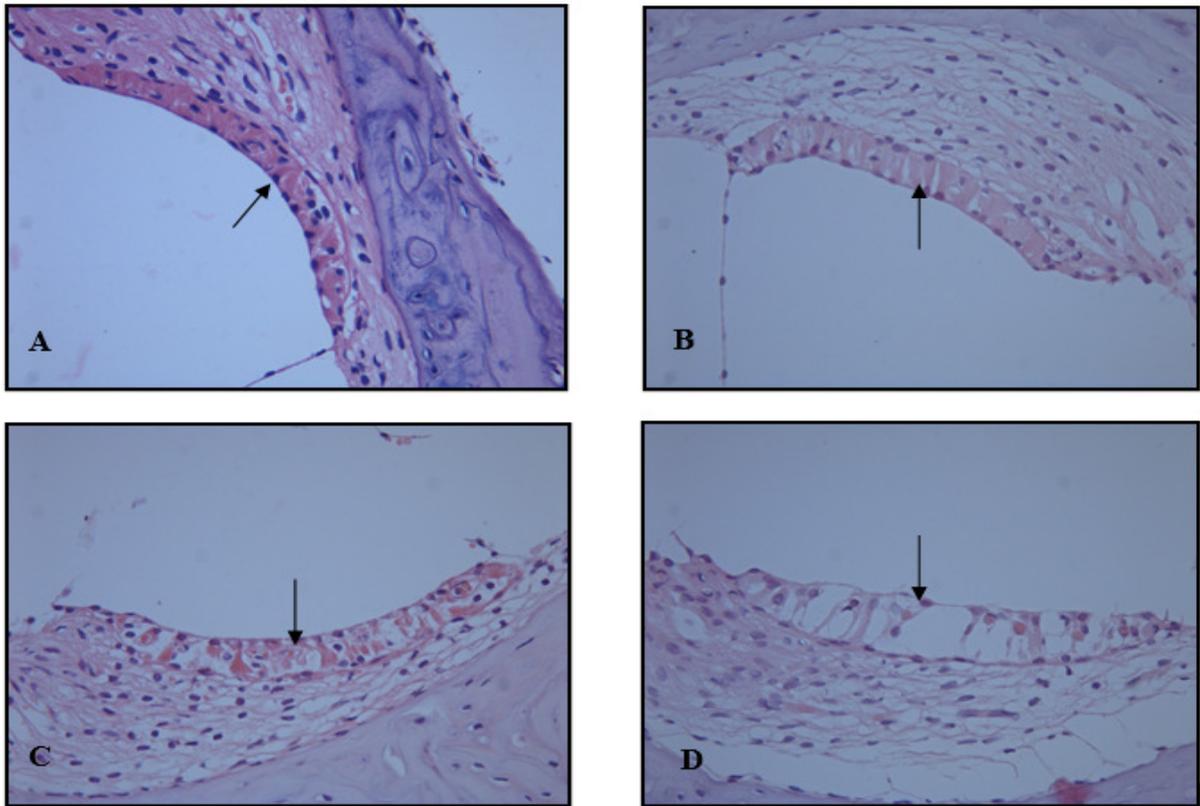


FIGURA 4 – Fotomicrografia da estria vascular (seta) de ratos representando os escores de lesão após tratamento com cisplatina. A. Escore 0. B. Escore 1. C. Escore 2. D. Escore 3. Coloração HE, 400x. (adaptado com permissão de FREITAS, 2006).

1.7 PRÉ-CONDIONAMENTO ISQUÊMICO

A injúria de isquemia-reperfusão (IRI) foi originalmente descrita em 1960 em um estudo em miocárdio canino que revelou que a proporção de infarto em grupo submetido a 24 horas de isquemia isolada era semelhante ao grupo exposto a 30 minutos de isquemia seguidos por 60 minutos de reperfusão (JENNINGS et al, 1960). A IRI ocorre após a restauração de fluxo sanguíneo para um órgão ou tecido após uma isquemia prolongada, podendo ser deletéria e prejudicando procedimentos nobres como os de transplante de órgãos. A fisiopatologia consiste na formação de ROS. Após um período de metabolismo anaeróbio adaptativo (isquemia) ao qual se segue um período de excesso de suprimento de oxigênio (reperfusão), ocorre ativação macrofágica. (TAPURIA et al, 2009). A duração da isquemia parece ser o fator crítico na determinação da gravidade da injúria ao tecido ou órgão (HOTCHKISS et al, 2009). O estudo da IRI é importante no entendimento e prevenção de lesão em procedimentos nobres como o transplante de órgãos, tais como o renal (KOSIERADZKI; ROWINSKI, 2008) e o hepático (TSAI et al, 2014).

O pré-condicionamento isquêmico (PCI) foi primeiramente descrito em 1986. Demonstrou-se o conceito de PCI em estudo em miocárdio de cães, através de um protocolo de 04 períodos de isquemia de 05 minutos intercalados com 04 períodos de 05 minutos de reperfusão e após estes ciclos uma isquemia sustentada de 40 minutos em um grupo e 03 horas em outro. Os grupos controle foram realizados respectivamente com isquemias sustentadas de 40 minutos e de 03 horas sem os ciclos de isquemia reperfusão, mostrando redução da área de infarto de 25% no grupo de PCI após isquemia sustentada de 40 minutos e reavaliação no quarto dia (MURRY; JENNINGS; REIMER, 1986). PCI consiste em um mecanismo de proteção para a injúria de isquemia-reperfusão, através de curtos períodos de isquemia, seguidos por reperfusão, anteriormente a um insulto isquêmico prolongado (PRZYKLENK et al, 1993).

O estudo do PCI vem sendo realizado, desde então, em diversos órgãos como forma de atenuação ou abolição das lesões de IRI como o fígado (SILVA; REFINETTI; EULÁLIO, 2006). Boyko et al demonstrou a redução do dano hepático em um modelo de PCI. A partir de 40 coelhos, divididos em 04 grupos, um grupo com isquemia sustentada de 30 minutos; outro com 15 minutos de isquemia, 05 minutos de reperfusão e 15 minutos de isquemia; terceiro grupo com 05 minutos de isquemia, 05 minutos de reperfusão, 10 minutos de isquemia, novos 05 minutos de reperfusão e por fim 15 minutos de isquemia; um quarto grupo sem isquemia ou reperfusão, apenas mobilização de ligamento hepático sem qualquer oclusão arterial. Demonstrou-se menor lesão hepática estrutural (menos núcleos de hepatócitos hipercromáticos e menor grau cariopícnose) e funcional (presença de depósitos de glicogênio, mostrando funcionalidade do hepatócito) no terceiro grupo, o qual foi submetido ao PCI 5/5/10/5/15 (BOYKO et al, 2014).

Outro estudo sobre IRI em tecido hepático revela alguns possíveis mediadores e vias de proteção envolvidas no PCI. Foi realizado um estudo em ratos com $n = 30$, divididos em três grupos de 10, um grupo controle (sham), um grupo de isquemia de plexo hepático de 60 minutos seguidos de 03 horas de reperfusão (IRI) e um grupo de 03 ciclos de 10 minutos de isquemia e de reperfusão (PCI) precedendo a mesma isquemia/reperfusão sustentada do grupo 2; após a eutanásia dos animais, foram coletadas amostras de sangue e de tecido hepático. Nas amostras de sangue e/ou tecido hepático foram avaliados: alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST), malondeído (produto derivado da peroxidação lipídica), glutathiona reduzido, glutathiona oxidado, relação nitrito/nitrato plasmática, superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, IL1 β , TNF- α , caspase 3 e concentração de glicogênio. Foi observado que um aumento de ALT, AST, IL-1 β e TNF- α

séricos no grupo com IRI quando comparado ao controle, enquanto que o grupo PCI mostrou queda nesses parâmetros, exceto em TNF- α sérico que se elevou mais neste que nos outros dois grupos. IL-1 β tissular elevou-se nos grupos IRI e PCI e TNF- α tissular elevou-se mais no grupo submetido à PCI. Os parâmetros de estresse oxidativo mostraram malondeído e relação nitrito/nitrato aumentadas e glutathione reduzido e glutathione oxidado diminuídos no grupo IRI comparado ao sham, enquanto no grupo PCI malondeído, a relação nitrito/nitrato e glutathione reduzido estavam aumentados em relação ao controle e diminuídos em relação ao grupo IRI e glutathione oxidado estavam aumentado em relação aos outros dois grupos. Superóxido dismutase e caspase 3 estava aumentada no grupo PCI em relação aos outros grupos e glutathione peroxidase diminuída. Em relação ao metabolismo de glicogênio, foi encontrado aumento significativo de glicogênio fosforilase no grupo IRI e glicogênio sintase no grupo PCI. O estudo mostrou, portanto, a atuação do PCI na regulação do sistema endógeno oxidante-antioxidante (ADAM, 2014).

Outro órgão estudado em PCI é o intestino, por ser um órgão bastante envolvido nas lesões de IRI em procedimentos cirúrgicos abdominais, com prejuízo em preservação de enxertos (NEVES et al, 2011; ERLING-JÚNIOR et al, 2013).

Um estudo de análise de parâmetros hematimétricos em ratos mostrou alterações significantes após uso de PCI em IRI intestinal. Esse trabalho foi realizado a partir do estudo de quarenta animais divididos em quatro grupos de 10, sendo o primeiro controle, o segundo o grupo sham, o terceiro o grupo de IRI com isquemia intestinal por oclusão da artéria mesentérica superior por 45 minutos seguidos de 120 minutos de reperfusão e um quarto grupo PCI onde foi realizado uma isquemia intestinal de 10 minutos seguida de uma reperfusão de 10 minutos imediatamente antes da mesma isquemia/reperfusão prolongada do grupo 3. Foi avaliado sangue coletado da cauda do animal antes e após o procedimento cirúrgico. Os parâmetros hematimétricos avaliados foram a contagem total de eritrócitos, total de leucócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio do eritrócito, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, plaquetas, volume plaquetário médio, padrão de distribuição plaquetária, plaquetócrito e contagem diferencial de leucócitos. Os resultados mostraram que o grupo PCI apresentou maior contagem de linfócitos e redução de granulócitos quando comparado ao grupo IRI, além de menor contagem plaquetária, plaquetócrito e maior volume plaquetário médio. Dos parâmetros eritrocitários o hematócrito alterou de modo significativo no grupo IRI. Esses achados corresponderam a um efeito anti-inflamatório protetor na resposta intestinal a IRI (TAHIR et al, 2015).

O estudo da lesão renal por IRI e suas formas de proteção também são amplamente descritos na literatura. Um dos tratamentos da insuficiência renal crônica consiste no transplante renal, sendo este procedimento associado à IRI no procedimento em si (ERPICUM; KRESINSKI; JOURET, 2014).

Um estudo mostra o papel protetor do PCI em IRI renal por redução da ativação do sistema nervoso simpático (SNS), provavelmente através da produção de óxido nítrico. Vinte e quatro ratos machos Sprague-Dawley, todos submetidos à nefrectomia direita 02 semanas antes dos experimentos, foram divididos em 4 grupos de 6 animais; um grupo sham, um grupo com IRI com isquemia não traumática de 45 minutos de pedículo vascular renal esquerdo e após reperfusão por 24 horas, um grupo com PCI de três ciclos de 2 minutos intercalados por períodos de 5 minutos de reperfusão imediatamente antes da IRI, e um grupo tratado com N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) intravenoso antes dos ciclos PCI/IRI idêntico ao do grupo anterior. Amostras urinárias e sanguíneas foram coletadas para análise de função renal e no final desses grupos os tecidos renais foram submetidos à análise histológica. Em um segundo conjunto de grupos do mesmo experimento, 18 animais com nefrectomia unilateral da mesma forma foram divididos em 3 grupos de 6 animais. Um grupo submetido à mesma IRI, o segundo grupo exposto à IRI/PCI e um terceiro com IRI/PCI/L-NAME. Avaliou-se as alterações na atividade no SNS, através do ramo do nervo renal esquerdo a partir da inserção de eletrodos por incisão no flanco, nos momentos antes e durante a isquemia renal de 45 minutos. Os achados foram aumento da atividade de SNS no grupo IRI logo após o início da isquemia, sendo abolida completamente pelo PCI (grupo PCI/IRI) e essa atenuação do PCI atenuada pelo L-NAME. Os níveis séricos de norepinefrina aumentaram no grupo IRI quando comparado ao sham, sendo suprimidos de forma significativa pelo PCI e essa supressão atenuada pelo L-NAME. O grupo IRI apresentou aumento de uréia e creatinina séricos e quedas no clearance de creatinina e na osmolaridade urinária quando comparado ao grupo sham, com proteção dessas alterações pelo PCI e inibição dessa proteção pelo L-NAME. Nas alterações histológicas de congestão medular, necrose tubular e depósitos protéicos, os mesmos achados de proteção e atenuação foram encontrados (TSUTSUI et al, 2013).

A fisiopatologia do PCI permanece não esclarecida, mas parece estar relacionada a modulação da resposta orgânica ao insulto, envolvendo algumas vias como modulação de citocinas inflamatórias, resposta leucocitária e estresse oxidativo, conferindo uma resposta favorável a IRI (OTANI, 2008). Observa-se uma proteção precoce imediatamente e em até 3 horas e uma tardia entre 18 e 24 horas, como ainda um interessante efeito remoto,

denominado pré-condicionamento isquêmico remoto ou à distância (dPCI), onde se observa a proteção, com a mesma intensidade de órgãos ou membros totalmente distintos dos submetidos diretamente ao PCI (KHARBANDA et al, 2002; SCHMIDT; SLOTH; JOHNSEN, 2012). A fase tardia do PCI está relacionada à via da cicloxigense-2 (COX-2)/receptor de prostaciclina (PGI₂), como demonstrado em estudo de miocárdio de camundongos com e sem depleção genética de COX-2 e do receptor de PGI₂ (GUO et al, 2012).

1.8 PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO À DISTÂNCIA

O dPCI foi proposto inicialmente em 1993, a partir do estudo de que o PCI de uma área vascular cardíaca poderia proteger outra totalmente distinta (PRZYKLENK et al, 1993). Dentre os estudos com dPCI, aqueles com indução de isquemia em animais através da isquemia e reperfusão de membros anteriores ou posteriores é bastante utilizado, devido à sua fácil aplicabilidade e ao baixo custo (KUNTSCHER et al, 2002).

Um estudo em musculatura esquelética revelou que a fase precoce do dPCI é a mais efetiva na proteção da IRI. A partir de experimento realizado 49 ratos fêmeas Sprague-Dawley, os animais foram divididos em 7 grupos com 7 cada: grupo 1 foi submetido ao tratamento sham; grupo 2 isquemia isolada de 6 horas; grupo 3 submetido a 03 horas de isquemia e 03 horas de reperfusão; grupo 4 indução de 03 ciclos de PCI de 10 minutos de isquemia/reperfusão imediatamente antes da IRI sustentada 3/3 horas; grupo 5 indução de PCI 24 horas antes da IRI e grupo 6 indução de dPCI em pata traseira contralateral em 03 ciclos de 10/10 minutos imediatamente antes da IRI e grupo 7 realização de dPCI 24 horas antes da IRI. Os grupos controle foram submetidos à amputação subtotal de pata traseira direita com exposição de vasos femorais e submetidos às respectivas isquemias e reperfusões. Os grupos experimentais de PCI à mesma amputação/exposição e prática do PCI nos próprios vasos; os grupos experimentais dPCI foram submetidos além da amputação/exposição ao torniquete da pata traseira esquerda. A partir de coleta de músculo gastrocnêmio da pata traseira direita, foram avaliados os níveis de malondeído, mieloperoxidase, catalase e produtos de óxido nítrico; e ainda a histopatologia. Foi observado queda de malondeído, mieloperoxidase e produtos de óxido nítrico em todos os grupos PCI com queda maior em dPCI imediatamente antes do IRI, assim como maior aumento de catalase nesse grupo, menor grau de dano histopatológico e menor quantidade de caspase-3 na imunohistoquímica (KOCMAN et al, 2015).

O mecanismo de citocinas envolvidas no dPCI, parece estar relacionado a TNF- α , IL-1 e iNOS. Um estudo foi realizado em ratos a partir da avaliação de PCI e dPCI para proteção contra edema de pata direita, induzida por carragenina ou dextran, com redução de edema com PCI em pata ipsilateral e também em outro grupo com dPCI em pata esquerda protegendo pata contralateral. O edema por dextran ocorre por degranulação de mastócitos com baixa concentração protéica no fluido e poucos neutrófilos. O mecanismo da carragenina consiste num exsudato com elevada concentração protéica e muitos neutrófilos. Portanto, o PCI e o dPCI atuam tanto no edema dependente de polimorfonucleares como de mastócitos. Esta ação está relacionada à redução de quimiotáticos: TNF- α e de IL-1 e ainda a produção de pequenas quantidades de óxido nítrico que podem inibir a ação da carragenina. Ainda neste estudo, foi avaliado o papel do dPCI para proteção de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, cuja toxicidade é atribuída ao seu metabólito acroleína. O mecanismo de lesão consiste em edema, ulceração, neovascularização, hemorragia e necrose. O dPCI protege a lesão da ifosfamida por atuar na redução de TNF- α e IL-1 e aumento de óxido nítrico (SOUZA-FILHO et al, 2009). O modelo de proteção por dPCI também mostrou efetividade contra injúria miocárdica durante intervenção coronária percutânea (ZOGRAFOS et al, 2014) e contra lesão hepática por IRI (WANG et al, 2014). O dPCI mostrou proteção da função renal em estudos com pacientes diabéticos submetidos a cineangiocoronariografia (SAVAJ et al, 2014).

O dPCI encontra-se em estudo para neuroproteção em pacientes submetidos à revascularização miocárdica. A partir de um estudo controlado randomizado duplo cego, pacientes coronariopatas foram submetidos no grupo experimental a 03 ciclos de isquemia de 05 minutos seguida de 05 minutos de reperfusão em membro superior, num total de 30 minutos, antes do procedimento cirúrgico de revascularização miocárdica. A avaliação da proteção está sendo realizada com um teste neurocognitivo e neuroimagem por ressonância nuclear magnética (GASPAROVIC et al, 2014).

Baseando-se nestes conhecimentos, propusemos um estudo com indução de ototoxicidade em ratos por cisplatina na dose de 32mg/kg, que mostrou ser uma dose ototóxica e com baixa mortalidade a partir da experiência de nosso grupo de pesquisa, e otoproteção com pré-condicionamento isquêmico em pata traseira direita e o estudo dos possíveis mediadores envolvidos nesse processo.

2 - OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito otoprotetor do pré-condicionamento isquêmico à distância contra ototoxicidade induzida por cisplatina.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o papel do pré-condicionamento isquêmico à distância na toxicidade sistêmica da cisplatina.

Analisar o efeito do pré-condicionamento isquêmico à distância nos limiões auditivos de ratos submetidos a tratamento com cisplatina, através do potencial auditivo evocado de tronco encefálico.

Avaliar o papel do dPCI na lesão histopatológica da cisplatina na cóclea, através da análise das células ciliadas externas e da estria vascular de ratos.

Avaliar o papel do fator de necrose tumoral α e da óxido nítrico sintase induzida no efeito do dPCI na ototoxicidade da cisplatina, através da avaliação por imunohistoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados para o estudo ratos Wistar machos, mantidos em gaiolas com livre acesso a alimentos e água, em ciclos naturais de sono e vigília, e manuseados segundo as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), encontradas no sítio www.cobea.org.br.

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Animais fora da faixa de peso previamente estabelecida (200 a 275g).

Animais com sinais, ao exame otoscópico, de doença de orelha externa, tais como edema e hiperemia de conduto auditivo externo, tumorações ou rolha de cerume impactada.

Animais com sinais de doença de orelha média, tais como opacificação, abaulamento e hiperemia de membrana timpânica ou perfuração desta membrana.

Animais com limiar eletrofisiológico estabelecido por potencial auditivo evocado de tronco encefálico maior que 20 dB NA, antes do início da administração das drogas.

3.3 DROGAS

Cisplatina

- Faudlcispla – Laboratório Libbs 50 mg – pó liofilizado para solução injetável.
- Preparo: 50 mg do pó liofilizado diluídos em 50 ml de solução salina, constituindo uma concentração final de 1 mg/ml.

Solução salina fisiológica 0,9%

Ketamina

- Vetarnacol – Laboratório König 50mg/ml.

Xilazina

- Kensol – Laboratório König 20 mg/ml.

Azul de Evans 2,5%

- Preparo: Azul de Evans 2,5g (laboratório SIGMA) diluído em 100 ml de água destilada.

3.4 GRUPOS DE ANIMAIS (n = número de animais)

- Grupo 1: Cisdiaminodichloroplatinum – CDDP (n=8).

Ratos tratados com cisplatina em dose única diária de 8 mg/kg/dia, num total 32mg/kg divididos em quatro doses. Avaliados antes do tratamento (D0) e quatro dias (D4) após o seu início por potenciais auditivos evocados de tronco encefálico (PAETE).

- Grupo 2: Controle – C (n=8).

Ratos tratados com solução salina em dose única diária de 8 ml/kg/dia. Avaliados antes do tratamento (D0) e quatro dias (D4) após o seu início por potenciais auditivos evocados de tronco encefálico (PAETE).

- Grupo 3: Pré-condicionamento isquêmico à distância + cisdiaminodichloroplatinum – dPCI + CDDP (n=9).

Ratos submetidos a pré-condicionamento isquêmico em pata traseira direita no primeiro e no segundo dia, e tratados com cisplatina em dose única diária de 8 mg/kg/dia, num total 32mg/kg divididos em quatro doses. Avaliados antes do tratamento (D0) e quatro dias (D4) após o seu início por potenciais auditivos evocados de tronco encefálico (PAETE).

- Grupo 4: Pré-condicionamento isquêmico à distância + controle – dPCI + C (n=7).

Ratos submetidos a pré-condicionamento isquêmico em pata traseira direita no primeiro e no segundo dia, e tratados com solução salina em dose única diária de 8 ml/kg/dia. Avaliados antes do tratamento (D0) e quatro dias (D4) após o seu início por potenciais auditivos evocados de tronco encefálico (PAETE).

3.5 PROCEDIMENTO

Experimento (FIGURAS 5 e 6)

Os ratos Wistar foram submetidos à anestesia profunda com ketamina 80mg/kg e xilazina 10mg/kg. Uma otoscopia prévia foi realizada e os animais com alterações de orelha externa e média foram excluídos do trabalho (critérios de exclusão). Aqueles com otoscopia normal realizaram avaliação auditiva por meio do potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE), imediatamente antes da aplicação das drogas. Após essa avaliação, foi administrado cisplatina via intraperitoneal (grupo 1) e salina via intraperitoneal (grupo 2). Foi

realizado nos grupos 3 e 4 isquemia de pata traseira direita com fita elástica (FIGURA 7), seguida de injeção intravenosa (veia dorsal peniana) de azul de Evans na dose de 2,5mg/Kg (FIGURA 8), confirmando a isquemia, com a não coloração de azul da pata isquemiada pela fita (FIGURA 9). Após 10 minutos, soltou-se a fita elástica e se iniciou a reperfusão por 30 minutos, confirmada pelo azul de Evans (FIGURA 10). Depois, então, era administrado via intraperitoneal cisplatina (grupo 3) e salina (grupo 4). O mesmo procedimento foi realizado no primeiro e segundo dia (D0 e D1), e no terceiro e quarto dias apenas as administrações intraperitoneais (D2 e D3), ou seja, dois primeiros dias com indução isquêmica e reperfusão antes da aplicação intraperitoneal da CDDP e dois dias sem isquemia-reperfusão. Ao final (D4), todos foram submetidos à avaliação auditiva por PAETE e, imediatamente após a última avaliação auditiva dos animais, removeu-se o osso temporal direito, após eutanásia por decapitação com guilhotina de fabricação própria. A cóclea foi dissecada para realização das técnicas de microscopia óptica. Após o experimento, as carcaças dos ratos foram incineradas.

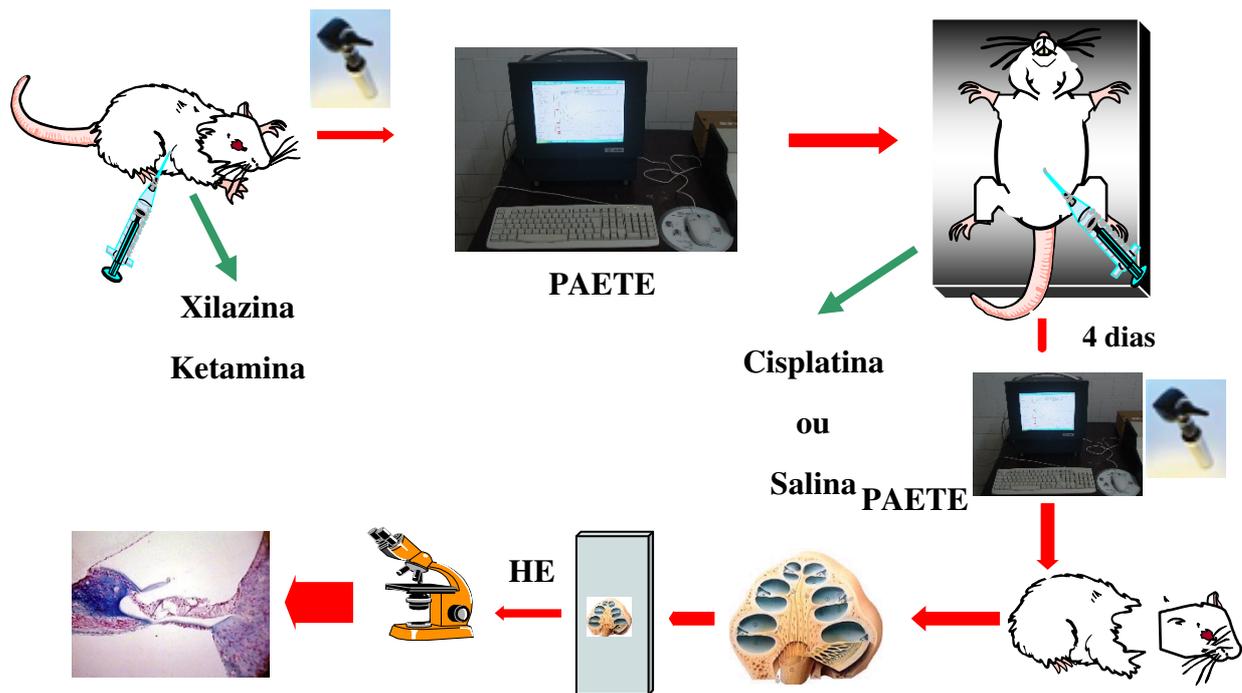


FIGURA 5 – Esquema do Experimento nos grupos 1 e 2. Avaliação da ototoxicidade da cisplatina por potenciais auditivos evocados de tronco encefálico (PAETE), coloração com hematoxilinaeosina (HE).

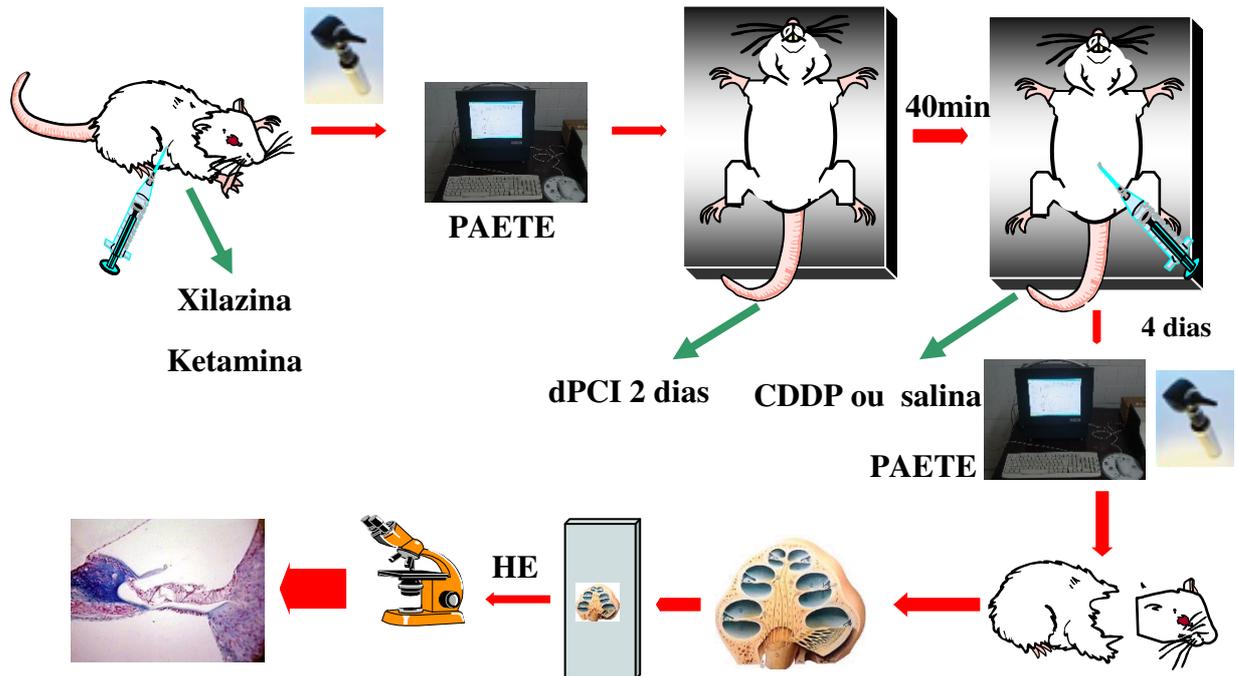


FIGURA 6 – Esquema do Experimento nos grupos 3 e 4. Avaliação da otoproteção do pré-condicionamento isquêmico (dPCI) contra a ototoxicidade da cisplatina por potenciais auditivos evocados de tronco encefálico (PAETE), coloração com hematoxilinaeosina (HE).



Figura 7 – Fotografia mostrando isquemia de pata traseira direita com fita elástica em rato após anestesia com ketamina e xilazina.



Figura 8 – Fotografia mostrando a injeção intravenosa em veia dorsal peniana de azul de Evans na dose de 2,5mg/Kg.

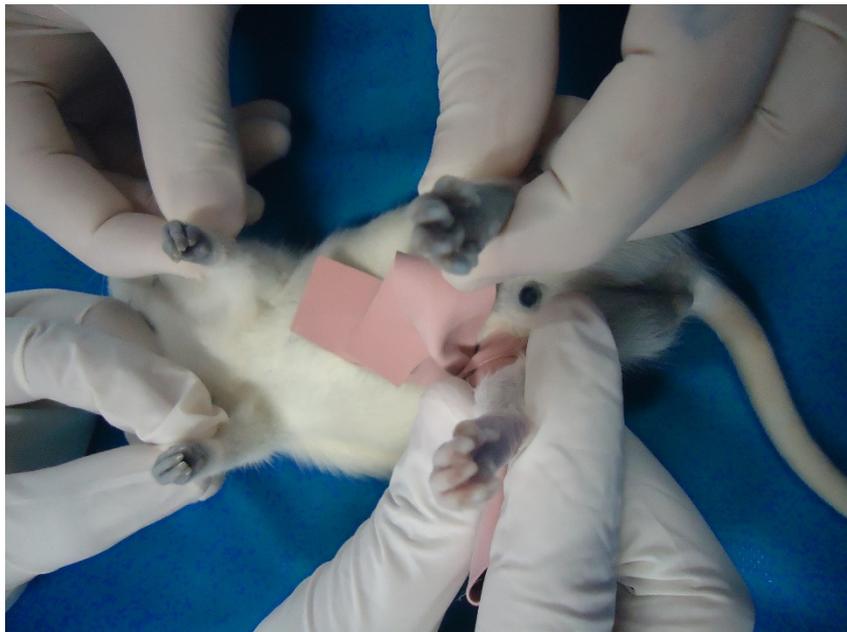


Figura 9 – Fotografia mostrando detalhe das quatro patas, revelando que apenas a pata isquemiada (traseira direita) não corou após a injeção de Azul de Evans.



Figura 10 – Fotografia mostrando detalhe das patas traseiras no momento da reperfusão, demonstrado pela coloração da pata traseira direita, que estava anteriormente isquemiada, por Azul de Evans.

3.6 POTENCIAIS AUDITIVOS EVOCADOS DE TRONCO ENCEFÁLICO

Utilizou-se, para realização do exame, aparelho ICS CHARTR EP 200 da marca Otometrics-Dinamarca, localizado em ambiente silencioso. Com os animais anestesiados, eletrodos subdérmicos de platina foram posicionados no vértex (positivo), região retroauricular direita (negativo) e pata dianteira direita (terra) (FIGURA 11). Fones de inserção ER- 3A acoplados a uma sonda utilizada para avaliação auditiva de recém-nascidos foram introduzidos no conduto auditivo externo direito dos ratos. Os estímulos empregados foram cliques de rarefação, liberados a uma taxa de 15 por segundo, com um total máximo de 1000 promediações e um tempo de análise de 15mseg. A banda passante utilizada foi de 0 a 2000 Hz. Os estímulos foram iniciados em 80 dB NA e diminuídos progressivamente até o desaparecimento completo das ondas. Para o limiar auditivo eletrofisiológico, foi considerada a menor intensidade de estímulo em que se evidencia onda II (FIGURA 12 A E B).

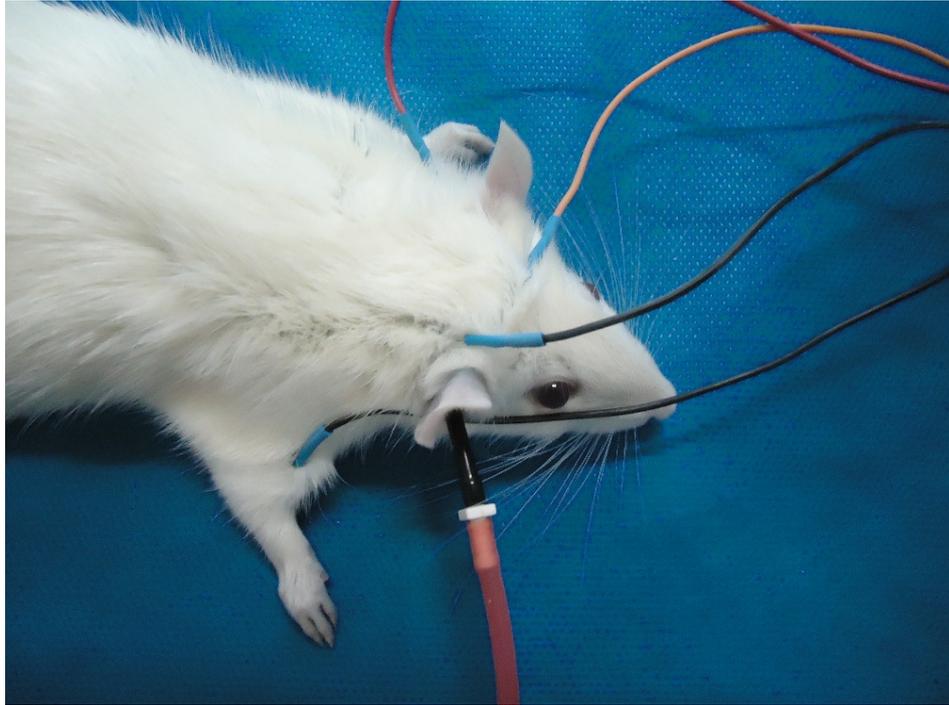


Figura 11 – Fotografia mostrando o posicionamento dos eletrodos em rato anestesiado com ketamina e xilazina para realização do potencial auditivo evocado de tronco encefálico (PAETE). Eletrodos subdérmicos de platina foram posicionados no vértex-positivo (fio amarelo), região retroauricular direita-negativo (fio preto), pata dianteira direita-terra (fio preto) e fone de inserção em orelha direita.

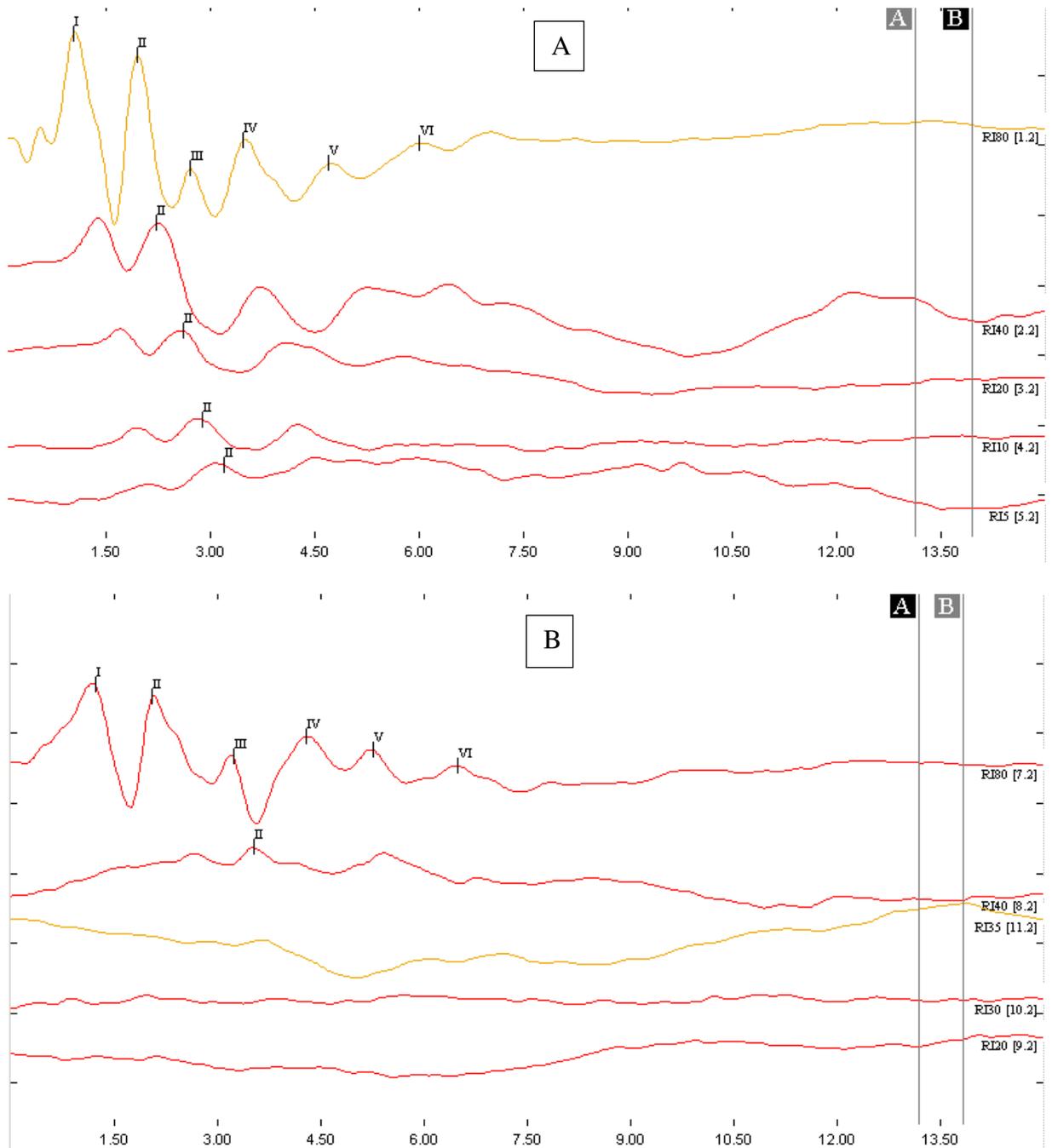


Figura 12 – Traçado eletrofisiológico do potencial auditivo evocado de tronco encefálico (PAETE). A Visualizam-se as ondas de I a V em 80 dB NA e o limiar em 5 dB NA (avaliação da onda II) antes de injeção de cisplatina. B Visualizam-se as ondas de I a V em 80 dB NA e o limiar em 40 dB NA (avaliação da onda II) após a injeção de cisplatina.

3.7 TÉCNICA DE MICROSCOPIA ÓPTICA

O osso temporal removido foi imediatamente imerso em uma placa de Petri contendo uma solução de formaldeído a 10% tamponada. Sob a visão de um microscópio cirúrgico de marca DF Vasconcelos, com a objetiva na posição 16, a membrana timpânica e a

cadeia ossicular (martelo, bigorna e estribo) foram eliminadas e a cápsula óptica exposta. Um pequeno orifício foi feito no ápice da cóclea com o auxílio de uma seringa BD Plastipak de 1ml, acoplada a uma agulha de 13mm de comprimento e 4,5mm de espessura. Um estilete curvo foi introduzido nas janelas oval e redonda através das quais e com a mesma seringa descrita anteriormente se injetou a solução fixadora (formaldeído 10% tamponado). As cócleas dissecadas dos ossos temporais permaneceram imersas em solução de formaldeído 10% tamponado por 24 horas. Depois da fixação, foram descalcificadas sob a ação de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10% por 14 dias. Em seguida, lavadas em água corrente por 24 horas e desidratadas em concentrações crescentes de álcool a 70%, 80%, 90% e absoluto por 1 hora cada. Pouco antes da impregnação por parafina e com o auxílio de uma lupa binocular, os tecidos remanescentes extracocleares foram removidos com bisturi de lâmina 15, para facilitar o posicionamento do material longitudinal ao plano de corte no momento da inclusão. A clarificação foi procedida por meio de xilol durante 1 hora. O tecido foi impregnado com parafina por 3 horas a 60° e em seguida incluído também em parafina. Foram feitos cortes de 20 micrometros, com micrótomo de marca OLYMPOS CUT 4055, até se atingir a região do modíolo, com identificação das espiras basal, média e apical, o que foi possível com o auxílio de um microscópio OLYMPUS BX 41 sob aumento de 40 vezes. A partir de então, 4 cortes de 4 micrometros foram feitos para avaliar o giro basal da cóclea e encaminhados para o estudo histopatológico. Os cortes fixos em lâmina com ovoalbumina permaneceram em estufa a 37°C durante 24h para secagem. A seguir, desparafinados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 90%, 80% e 70%) e lavados em água corrente. Após, foram imersos em hematoxilina, lavados com água comum, imersos em eosina, novamente lavados, desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto), imersos em xilol para clareamento e montados com lamínulas fixas com ENTELLANR.

Foram utilizados escores (0, 1, 2 e 3) para avaliação do grau de lesão na estria vascular e órgão espiral de corti, visibilizados com um aumento de 400 vezes no microscópio óptico Leica DMLS 2. Fotomicrografias foram feitas com auxílio do material de captura digital LEICA 320. Na estria vascular, esses escores representavam o grau de retração celular da camada média; no órgão espiral de corti, o número de células ciliadas externas ausentes, tendo como parâmetro de identificação dessas células a presença e integridade do núcleo (FREITAS et al, 2009c). Neste estudo, realizou-se uma modificação no escore de EV, sendo ausência de lesão, equivalente ao escore 0 e escore 1 da classificação original, e presença de

lesão, equivalente então aos escores 2 e 3 anteriores (FIGURA 13 A E B). A classificação de escore para CCE foi mantida.

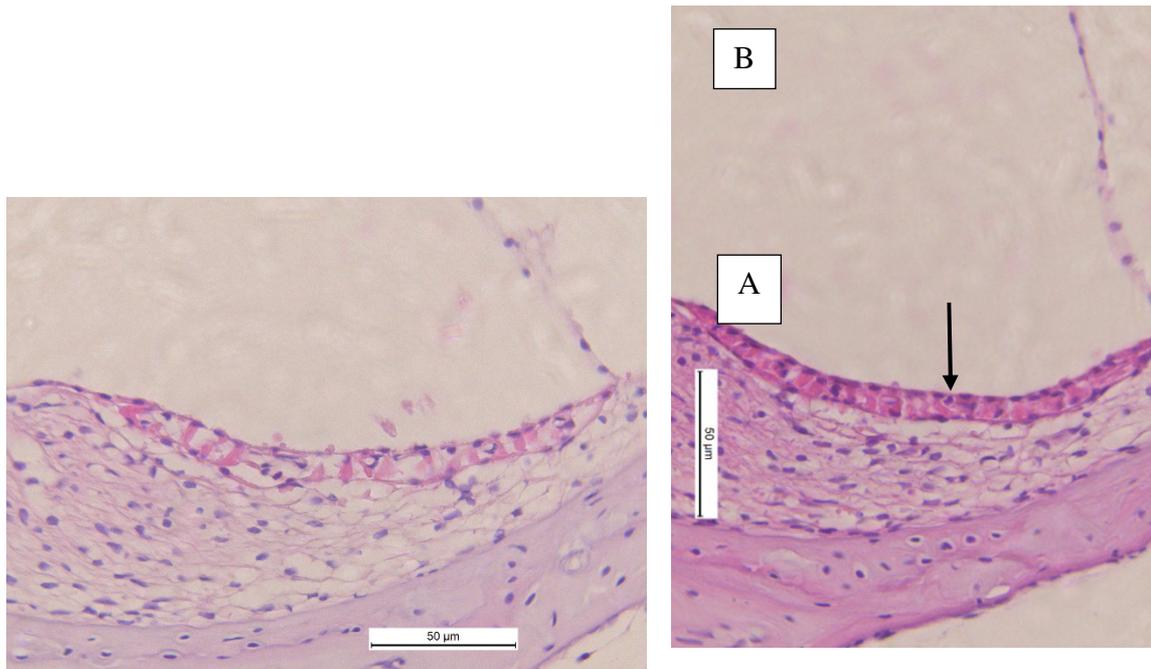


FIGURA 13 – Fotomicrografia de estria vascular em aumento de 400x. A estria vascular com retração evidente (seta longa) equivalente ao escore 2. B ausência de lesão em estria vascular (seta longa) equivalente ao escore 0.

3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (iNOS) e TNF- α .

A imunohistoquímica para iNOS e TNF- α foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). No 5º dia, os animais foram sacrificados e suas cócleas foram removidas, fixadas em formol a 10% durante 24 horas. Posteriormente, submetidas a tratamento com EDTA 10% para a desmineralização por 14 dias. A seguir, as cócleas foram lavadas, processadas e incluídas em parafina. Após esse procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 μ m em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilissina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram

desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em banho maria, por 20 minutos, para a recuperação antigênica a 65 °C. Após o resfriamento obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS) intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (20 minutos). Os cortes foram incubados por duas horas (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-iNOS diluído 1:100, com anticorpo policlonal primário de coelho TNF- α 1:200 diluído em antibody diluente (DAKO). Após a lavagem, foi feita a incubação com o polímero HRP (DAKO), por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e a montagem das lâminas. Os controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por antibody diluente (DAKO). Para aquisição das imagens foi utilizado microscópio NIKON acoplado a câmera com software de imagem MOTIC 2.0 e o aumento foi de 400X para todas as imagens. Para quantificação da imunohistoquímica foi utilizado o programa Image J, programa de processamento de fonte aberta.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado, para confecção dos gráficos e análise estatística, o programa GraphPad Prism 5.00.288. Foi avaliada a distribuição normal da amostra através do teste de Komogorov-Smirnov. Os resultados foram expressos como média \pm o erro padrão da média (MED \pm EPM), para os dados contínuos, e como mediana (Md) e valores mínimo (Min) e máximo (Max) para os dados ordinais. A significância mínima aceita foi ao nível de 5%. Os vários procedimentos experimentais foram comparados utilizando-se os seguintes testes:

3.9.1 Análise de variância (ANOVA) com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de tukey

- Comparar a variação do peso dos animais nos grupos, até o quinto dia do experimento.

3.9.2 Teste de Logranks

- Comparar as curvas de sobrevivência entre os diversos grupos dois a dois.

3.9.3 Análise de variância (ANOVA) com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de Mann-Witney

- Comparar as médias dos limiares eletrofisiológicos dos animais obtidos através de potencial auditivo evocado de tronco encefálico entre o primeiro (D0) e quinto (D4) dias da avaliação.

3.9.4 Teste exato de Fisher

- Comparar os escores das alterações morfológicas da estria vascular nos diversos grupos do estudo.

3.9.5 Teste de Kruskal-Wallis com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de dunn

- Comparar as medianas dos escores das alterações morfológicas das células ciliadas externas nos diversos grupos.

3.9.6 Análise de variância (ANOVA) com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de Bonferroni

- Comparar as médias dos percentuais das áreas coradas pela análise da imunohistoquímica obtida pelo programa Image J nos diversos grupos.

4 - RESULTADOS

4.1 ALTERAÇÕES DE ORELHA MÉDIA OU EXTERNA

Um animal no grupo 3 (CDDP + dPCI) apresentou alterações de orelha média à otoscopia após o início do experimento. Um animal do grupo 4 (C + dPCI) apresentou alteração de orelha externa durante o experimento. Foram, assim, eliminados do estudo.

4.2 TOXICIDADE SISTÊMICA DA CISPLATINA

4.2.1 Curva de peso

Avaliou-se a distribuição dos dados a partir do teste de Koromonov-Smirnov, o qual demonstrou que os dados seguiam distribuição normal ($p > 0,10$ nos grupos C, CDDP, CDDP + dPCI e $p = 0,595$ no grupo C + dPCI). Observou-se diferença significativa entre todos os grupos na variação de peso (peso de D4 – peso de D0) com $p < 0,05$ pelo teste oneway-ANOVA, pós-teste de Tukey (TABELA 1). O peso decresceu em todos os grupos, exceto no grupo C + dPCI onde houve aumento de peso (FIGURA 14).

VARIAÇÃO DE PESO D4-D0

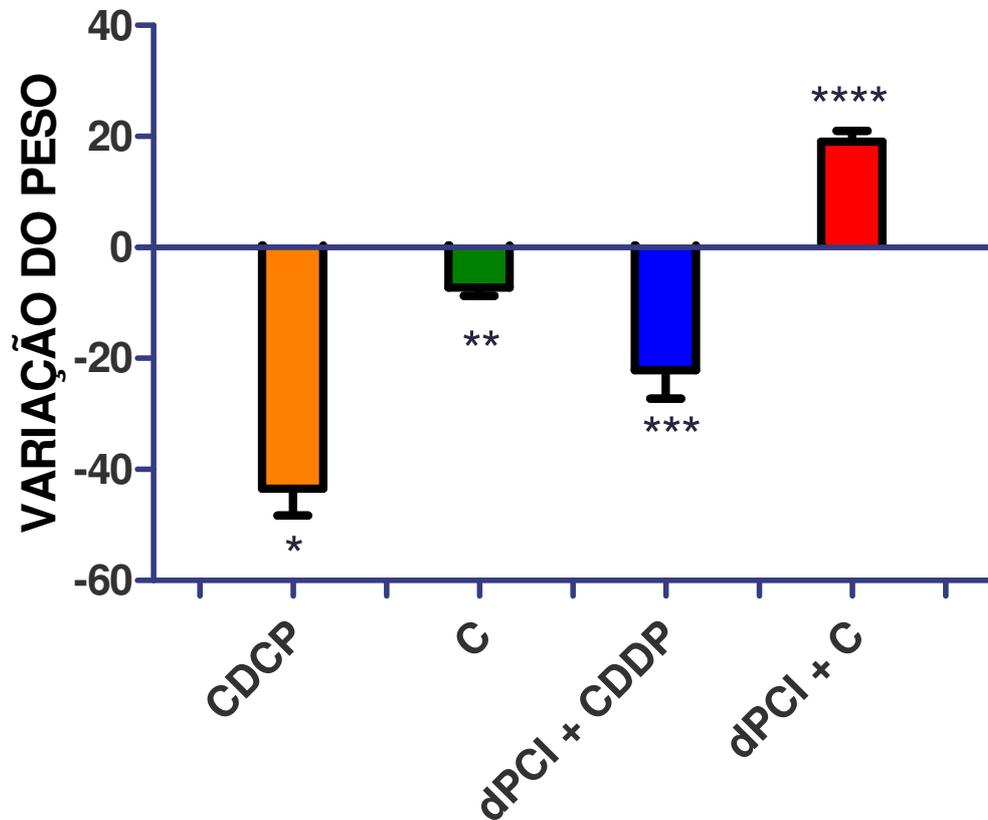


FIGURA 14 – Gráfico de variação de peso. Diferença entre peso final e peso inicial (D4-D0). Observa-se o aumento de peso de forma significativa no grupo dPCI + C. Análise pelo teste oneway-ANOVA (teste de Tukey). Os asteriscos representam diferença estatística significativa entre todos os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,05$, **** $p < 0,05$, C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

TABELA 1 – Variação do peso entre D0 e D4 nos grupos 1, 2, 3 e 4.

GRUPOS	DIFERENÇA PESO FINAL MENOS INICIAL D4 – D0	
	MED	EPM
1. CDDP	-43,50 *	13,67
2. C	-7,250 **	4,062
3. dPCI + CDDP	-22,13 ***	14,44
4. C + Dpci	19,00 ****	4,940

MED=Média, EPM=erro padrão da média. Os asteriscos representam diferença estatística significativa entre todos os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,05$, **** $p < 0,05$. Análise pelo teste oneway-ANOVA (teste de Tukey).

4.2.2 Curva de sobrevida

A curva de sobrevida revelou perda de 01 animal no grupo CDDP + dPCI (FIGURA 15). Não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste de Logranks (TABELA 2).

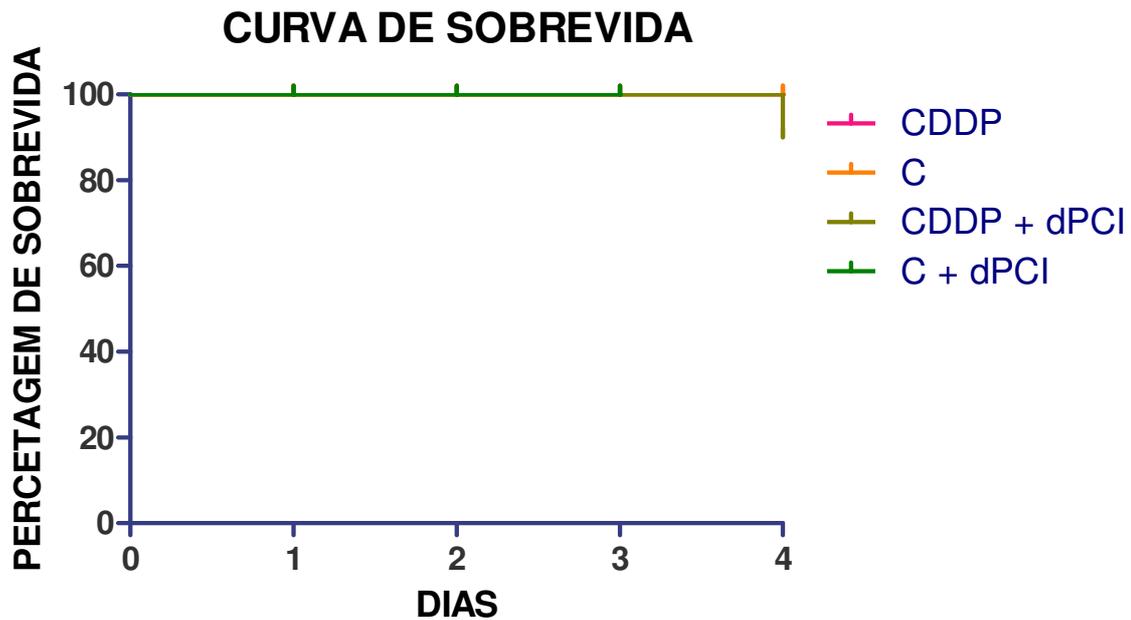


FIGURA 15 – Gráfico Curva de sobrevida, demonstrando perda de 01 animal apenas no grupo CDDP + dPCI. C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

TABELA 2 – Teste de Logrank entre os grupos 1, 2, 3 e 4.

GRUPOS	1.	2.	3.	4.
1. CDDP	–	1,0000	0,3711	1,0000
2. C	1,0000	–	0,3711	1,0000
3. dPCI + CDDP	0,3711	0,3711	–	0,4028
4. dPCI + C	1,0000	1,0000	0,4028	–

Os números correspondem ao valor de p. Não houve diferença estatística entre os grupos. C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

4.3 AVALIAÇÃO AUDITIVA FUNCIONAL

Avaliou-se a distribuição dos dados de limiar auditivo obtidos pelo PAETE a partir do teste de Koromonov-Smirnov, o qual demonstrou que os dados não seguiam distribuição normal ($p=0,0002$). Aplicou-se então o teste de Mann-Whitney e a avaliação por PAETE revelou diferença estatística entre o início (D0) e o fim do experimento (D4) apenas

no grupo cisplatina ($p=0,0477$), não apresentando diferença significativa os outros grupos ($p>0,05$) (FIGURAS 16 e 17 e TABELA 3).

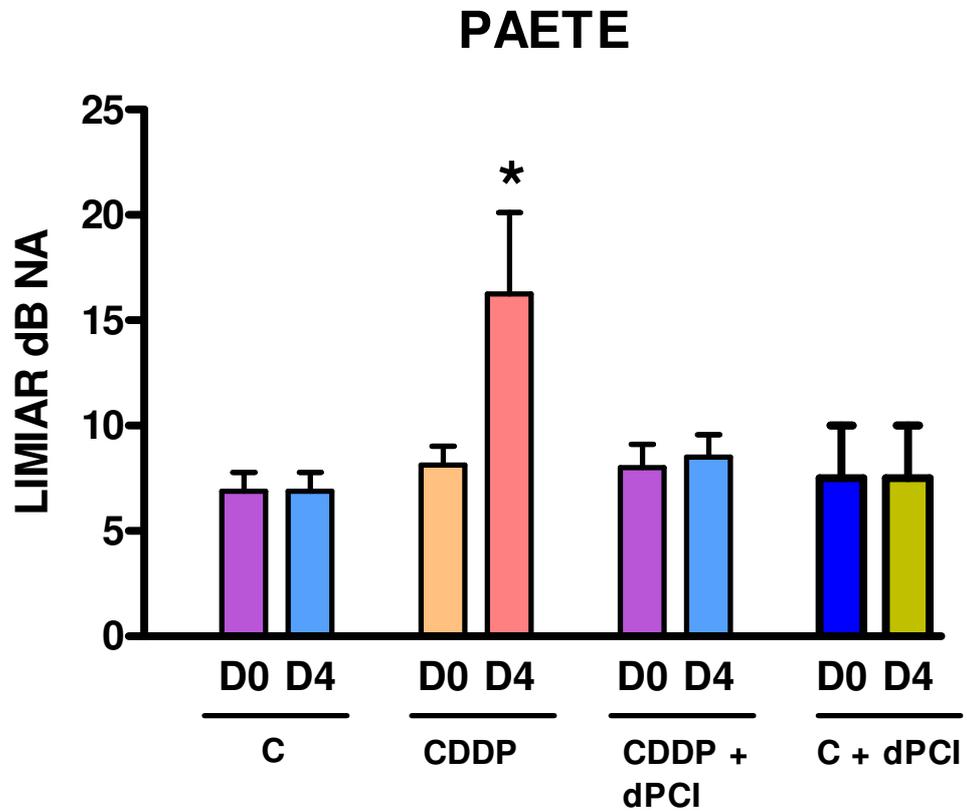


FIGURA 16 – Gráfico – média dos limiars do PAETE dos grupos 1, 2, 3 e 4.*Diferença significativa entre D0 e D4 no grupo cisplatina. C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância; PAETE = potencial auditivo evocado de tronco encefálico.

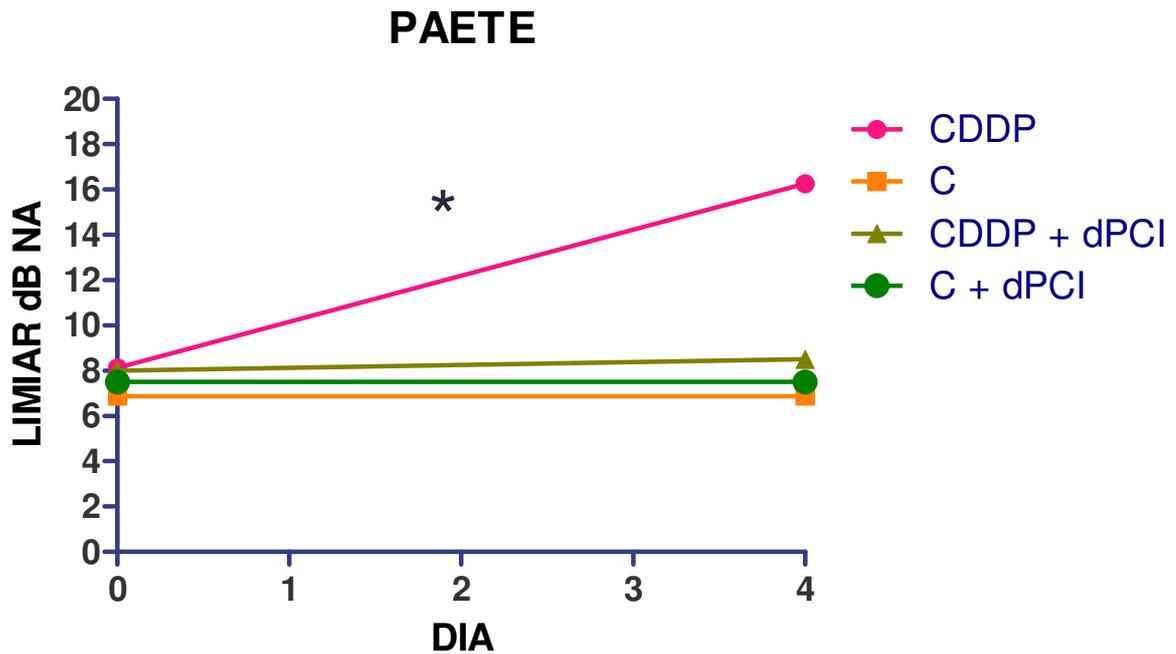


FIGURA 17 – Gráfico média dos limiares auditivos dos grupos experimentais. * Grupo CDDP foi o único com diferença estatística entre os dias D0 e D4. C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

TABELA 3 – Variação do limiar por PAETE nos grupos 1, 2, 3 e 4.

GRUPOS	LIMIAR (dB NA)				Valor de p
	D0		D4		
	MED	EPM	MED	EPM	
1. CDDP	8,125	2,588	16,25*	10,94	0,0477
2. C	6,875	2,588	6,875	2,588	0,9502
3. dPCI + CDDP	8,000	3,496	8,500	3,375	0,7383
4. C + dPCI	7,500	6,124	7,500	6,124	0,9016

MED=média, EPM=erro padrão da média. O asterisco representa diferença estatística significativa. $p < 0,05$ (D4 x D0 no grupo CDDP). Aplicado o teste de Mann-Whitney para o cálculo de p. C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

4.4 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Neste estudo, foram perdidas as cócleas de 06 animais por erro de inclusão: um do grupo CDDP, dois do grupo C, dois do grupo dPCI + CDDP e um do grupo dPCI + C. A análise, portanto, foi feita por 24 lâminas: sete do grupo CDDP, seis do grupo C, seis do grupo dPCI + CDDP e cinco do grupo dPCI + C.

4.4.1 Escore de microscopia óptica da estria vascular

A análise dos dados de microscopia óptica revelou para estria vascular, sem lesão equivalente aos escores 0 e 1 de Freitas et al e com lesão os escores 2 e 3 de Freitas et al (Freitas et al, 2009c) (FIGURA 18), que não houve diferença estatística entre os grupos (através do teste exato de Fisher 2x2, obteve-se valor $p > 0,05$) (FIGURA 19). A tabela demonstra os valores de p obtidos no teste de Fisher entre os grupos (TABELA 4).

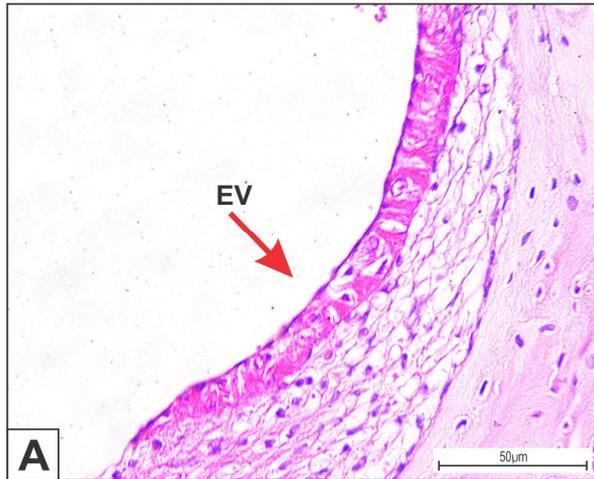
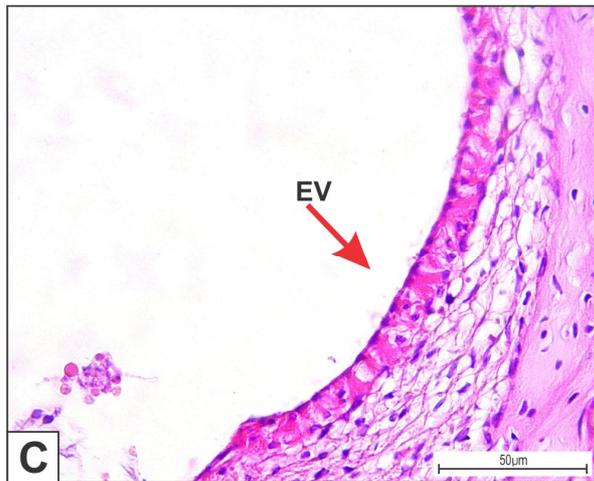
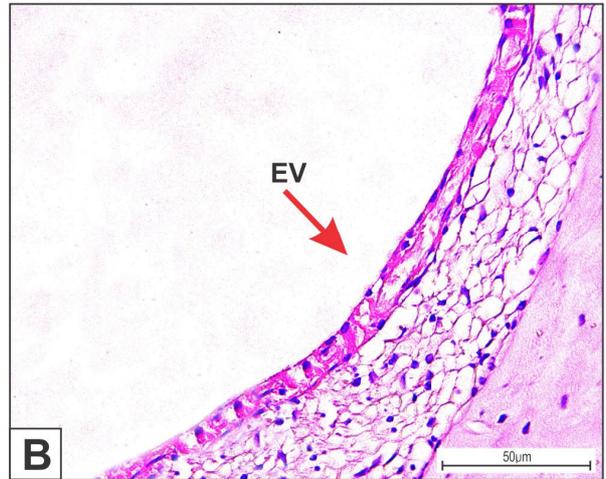
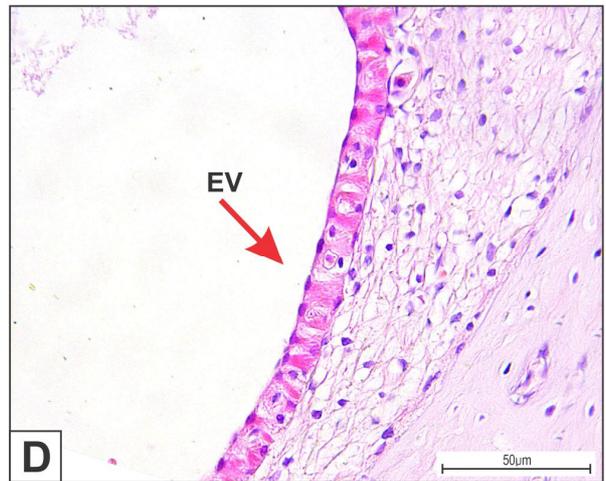
CONTROLE**CDDP****CDDP+dPCI****C+dPCI**

FIGURA 18 – Fotomicrografias em aumento 400x da estria vascular (EV) nos diversos grupos. A grupo controle sem lesão de EV. B grupo cisplatina com lesão de EV. C grupo cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância sem lesão de estria vascular. D grupo controle + pré-condicionamento isquêmico à distância sem lesão de estria vascular. C = controle; CDDP =cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

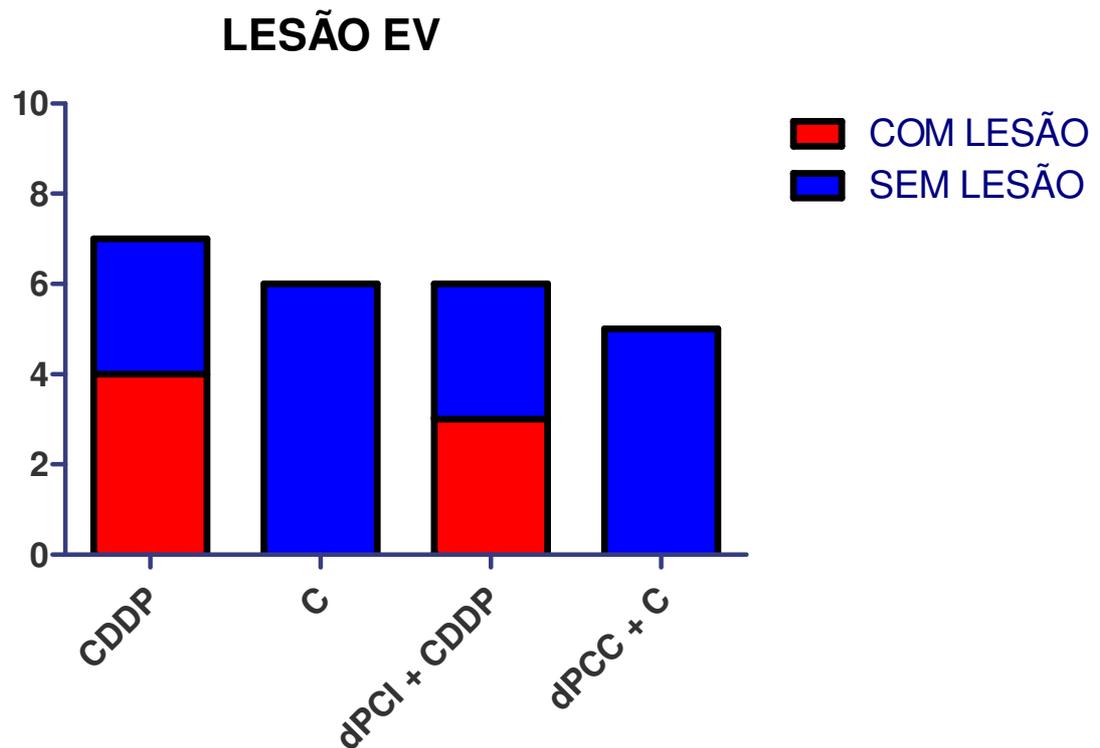


FIGURA 19 – Gráfico de lesão de estria vascular (EV), demonstrando que não houve diferença estatística entre os grupos. C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

TABELA 4 – Resultado de p para o teste de Fisher (2 x 2) na comparação intergrupos para estria vascular.

Grupos avaliados	Valor de p
CDDP x C	0,0699
CDDP x CDDP + dPCI	0,9999
CDDP x C + dPCI	0,0800
C x CDDP + dPCI	0,1818
C x C + dPCI	1,0000
CDDP + dPCI x C + dPCI	0,1818

Obteve-se o valor de p para a análise do escore modificado de estria vascular, observa-se o valor $p > 0,05$, não tendo havido significância estatística na comparação entre os grupos pelo teste de Fisher. C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

4.4.2 Escore de microscopia óptica das células ciliadas externas

A análise dos dados de microscopia óptica revelaram para células ciliadas externas que não houve diferença estatística entre os grupos. Observou-se que houve lesão apenas nos grupos submetidos à injeção intraperitoneal por cisplatina, com lesão mais frequente no grupo CDDP. Obteve-se que as medianas (Md) para os grupos foi de 0 para os quatro grupos. O valor máximo (Máx) foi de: 1 no grupo CDDP, 0 no grupo C, 1 no grupo dPCI + CDDP e 0 no grupo dPCI + C. O valor mínimo (Mín) foi de: 0 no grupo CDDP, 0 no grupo C, 0 no grupo dPCI + CDDP e 0 no grupo dPCI + C (FIGURA 20 e 21). Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn e não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

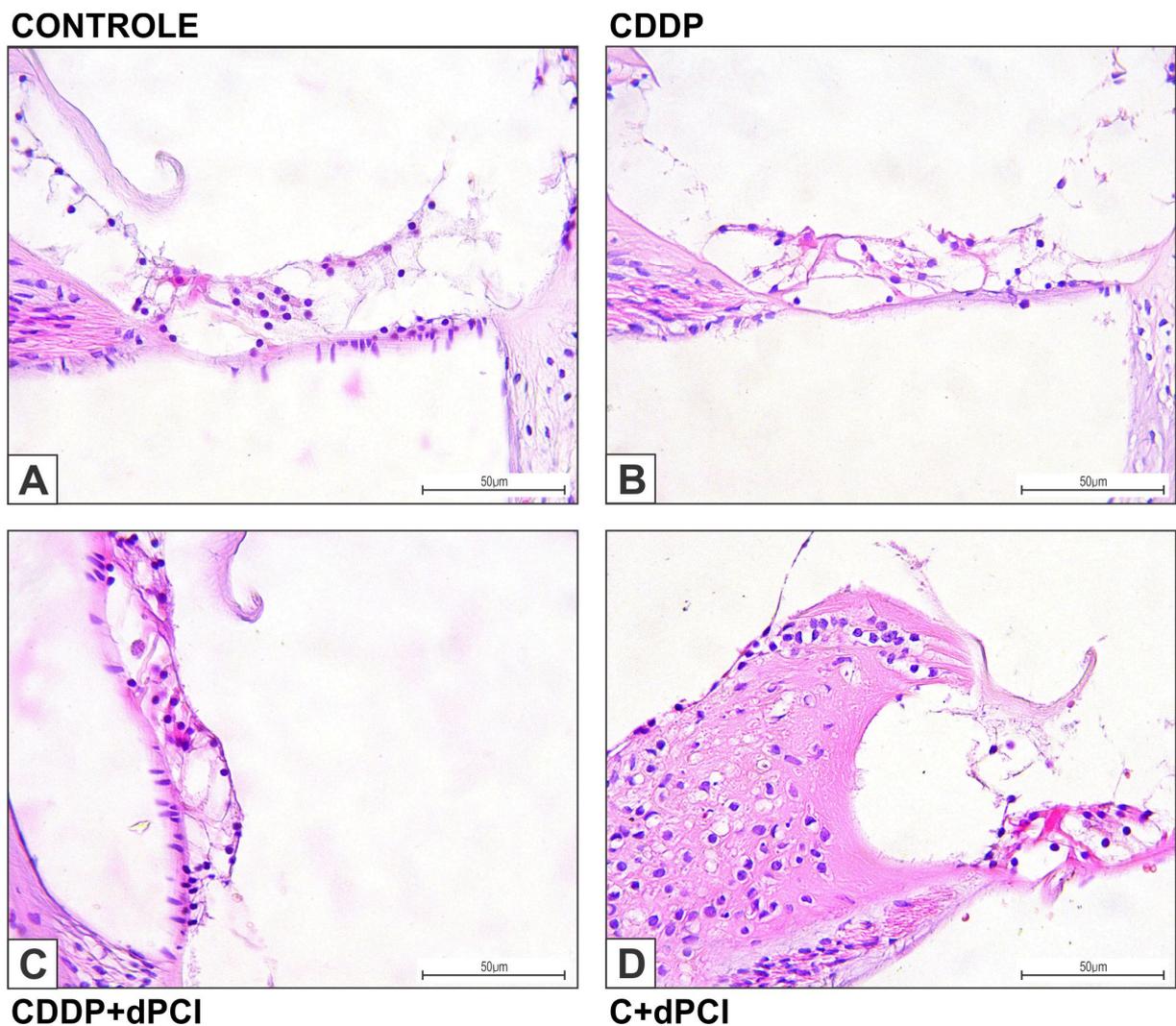


FIGURA 20 – Fotomicrografias em aumento 400x do órgão de Corti nos diversos grupos. A grupo controle com escore 0. B grupo cisplatina com escore 1. C grupo cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância com escore 0. D grupo controle + pré-condicionamento isquêmico à distância com escore 0. C =

controle; CDDP =cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

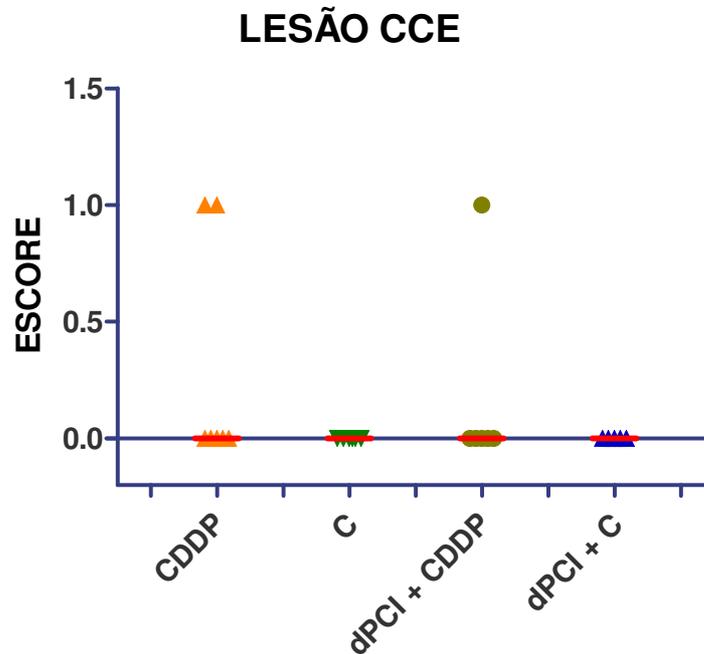
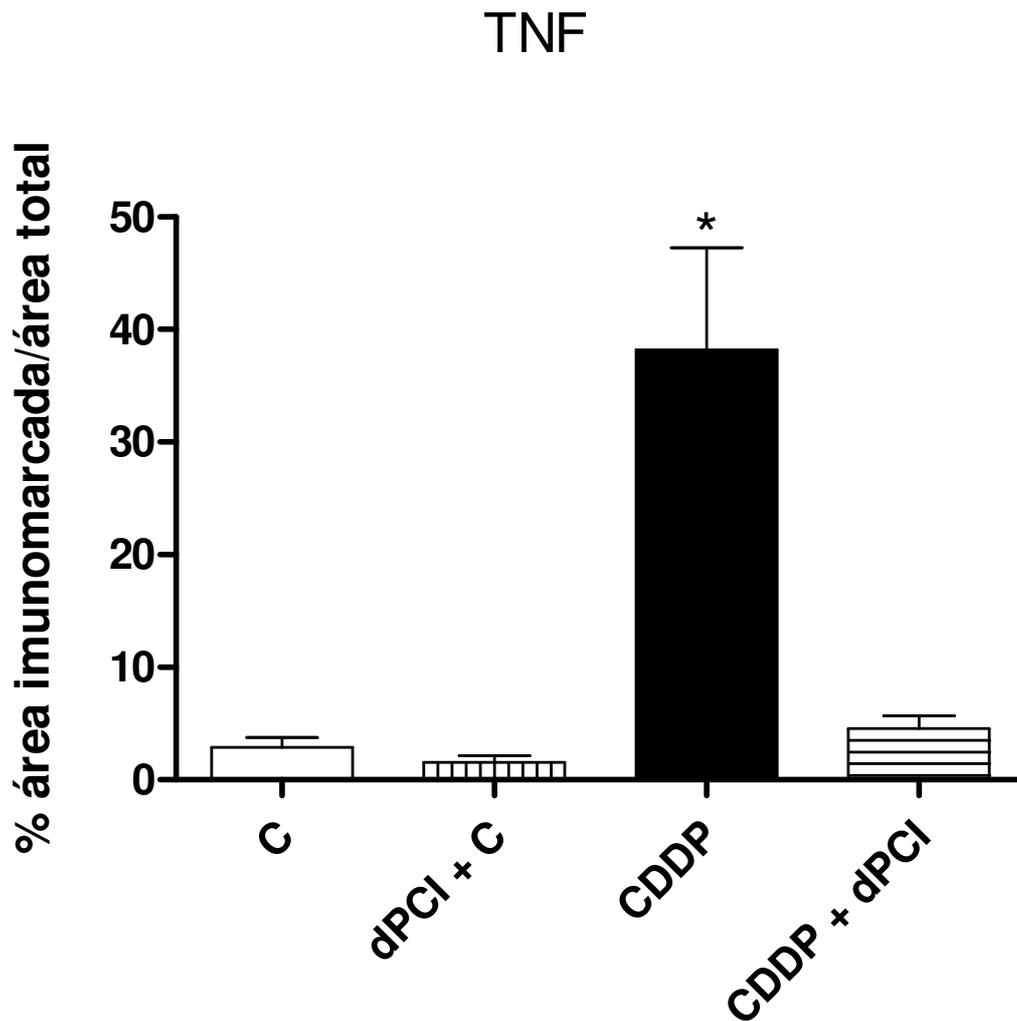


FIGURA 21 – Gráfico de lesão de célula ciliada externa (CCE), demonstrando que não houve diferença estatística entre os grupos. Observa-se que as medianas para os grupos foi de 0 para os quatro grupos. O valor máximo foi de: 1 no grupo CDDP, 0 no grupo C, 1 no grupo dPCI + CDDP e 0 no grupo dPCI + C. O valor mínimo foi de: 0 no grupo CDDP, 0 no grupo C, 0 no grupo dPCI + CDDP e 0 no grupo dPCI + C. C = controle; CDDP =cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TNF- α E iNOS

A análise dos dados de imunohistoquímica revelou, na estria vascular a partir da análise do programa Image J, que o pré-condicionamento isquêmico à distância reverteu a imunomarcção de forma significativa para TNF- α ($p < 0,05$) (FIGURA 22 e 23, TABELA 5). A imunomarcção para iNOS também foi revertida no grupo CDDP + dPCI quando comparado ao grupo CDDP ($p < 0,05$) (FIGURA 24 e 25, TABELA 6). Os grupos controle não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$).



*CDDP vs CDDP + dPCI

FIGURA 22 – Gráfico do percentual de área imunomarcada por área total para TNF- α nos diversos grupos. Demonstrou-se a reversão da imunomarcaco do TNF- α pelo dPCI. * $p < 0,05$ na comparao entre os grupos CDDP e CDDP + dPCI. C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico  distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento  distância.

TNF- α

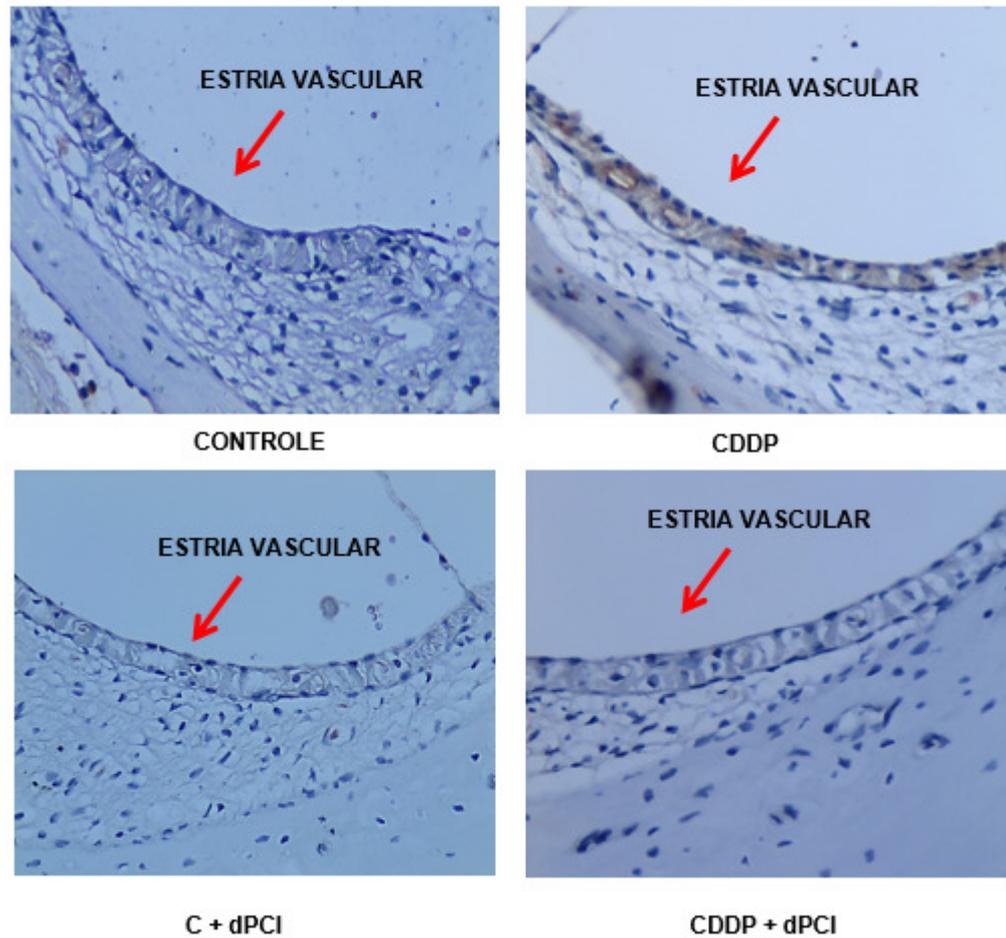


FIGURA 23 – Fotomicrografias em aumento 400x da imunomarcção do TNF- α na estria vascular nos diversos grupos de animais. A grupo C com imunomarcção discreta de TNF- α . B grupo CDDP com imunomarcção aumentada de TNF- α . C grupo CDDP + dPCI com imunomarcção discreta (reversão) de TNF- α . D grupo C + dPCI com imunomarcção discreta de TNF- α . C = controle; CDDP = cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância; TNF- α = fator de necrose tumoral α .

TABELA 5 – Resultado de p na comparação intergrupos para imunohistoquímica de TNF- α na estria vascular.

Grupos avaliados	Valor de p
CDDP x C	p<0,05
CDDP x CDDP + dPCI	P<0,05
C x C + dPCI	p>0,05
CDDP + dPCI x C + dPCI	p>0,05

Obteve-se o valor de p para a análise da imunomarcção de TNF- α na estria vascular, observa-se o valor p<0,05, tendo havido significância estatística na comparação entre os grupos pelo teste de Bonferroni. C = controle; CDDP =cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

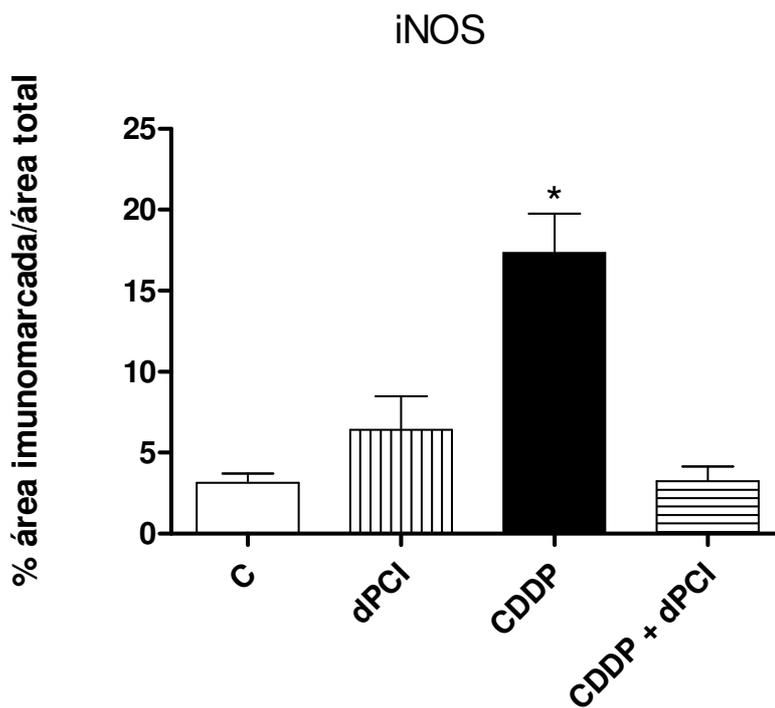


FIGURA 24 – Gráfico do percentual de área imunomarcada por área total para iNOS nos diversos grupos. Observou-se a reversão da imunomarcção do iNOS pelo dPCI. * p < 0,05 na comparação entre os grupos CDDP e CDDP + dPCI. C = controle; CDDP =cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

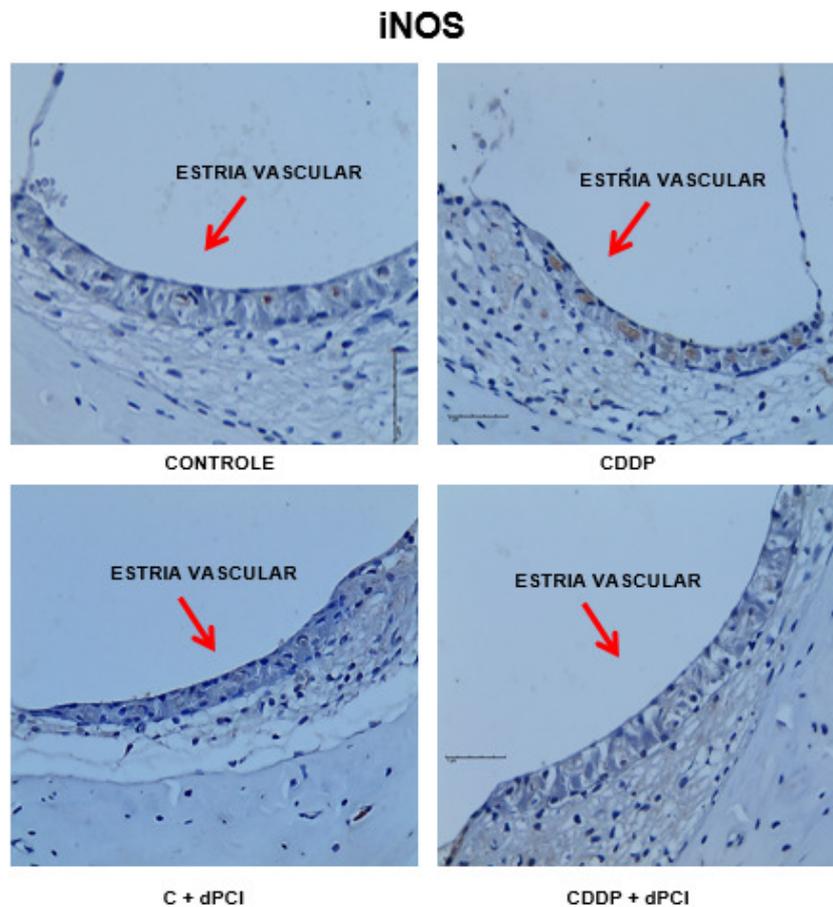


FIGURA 25 – Fotomicrografias em aumento 400x da imunomarcção do iNOS na estria vascular nos diversos grupos de animais. A grupo C com imunomarcção discreta de iNOS. B grupo CDDP com imunomarcção aumentada de iNOS. C grupo CDDP + dPCI com imunomarcção discreta (reversão) de iNOS. D grupo C + dPCI com imunomarcção discreta de iNOS. C = controle; CDDP =cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância; iNOS = óxido nítrico sintase induzida.

TABELA 6 – Resultado de p na comparação intergrupos para imunohistoquímica de iNOS na estria vascular.

Grupos avaliados	Valor de p
CDDP x C	p<0,05
CDDP x CDDP + dPCI	P<0,05
C x C + dPCI	p>0,05
CDDP + dPCI x C + dPCI	p>0,05

Obteve-se o valor de p para a análise da imunomarcção de iNOS na estria vascular, observa-se o valor p<0,05, tendo havido significância estatística na comparação entre os grupos pelo teste de Bonferroni. C = controle; CDDP =cisplatina; CDDP + dPCI = cisplatina + pré-condicionamento isquêmico à distância; C + dPCI = controle + pré-condicionamento à distância.

5 DISCUSSÃO

5.1 COMENTÁRIOS GERAIS

A cisplatina é um agente quimioterápico bastante utilizado na prática atual. Essa droga participa de muitos protocolos antineoplásicos, como para as neoplasias malignas de cabeça e pescoço, de pulmão, de bexiga, de ovário, de testículo e do sistema gastrointestinal (SCHACHT; TALASKA; RYBAK, 2012). Seus efeitos colaterais de ototoxicidade e de neurotoxicidade são irreversíveis (RYBAK et al, 2009). Vários estudos na literatura buscam substâncias capazes de reduzir os efeitos colaterais da CDDP, tais como melatonina (LOPEZ-GONZALEZ et al, 2000), dexametaxona (DALDAL; ODABASI; SRBETCIOGLU, 2007), vitamina E (KALKANIS; WHITWORTH; RYBAK, 2004), N-acetilcisteína (FEGHALI; LIU; VAN DE WATER, 2001), alopurinol-ebesen (LYNCH et al, 2005), D-metionina (CAMPBELL et al, 1999), aminoguanidina (KELLY et al, 2003), ginkgo biloba (HYPPOLITO et al, 2003; HUANG; WHITWORTH; RYBAK, 2007), trolox (TERANISHI; NAKASHIMA, 2003), metformina (CHANG et al, 2014) e silymarin (CHO; LEE; DO, 2014).

Um agente otoprotetor ideal para prevenção de lesão ototóxica da cisplatina seria o que unisse algumas características: não ser um composto tóxico, ou seja, com muitos efeitos colaterais; atingir concentrações suficientemente altas na orelha interna e não interferir na ação sistêmica da CDDP (RYBAK et al, 2009).

A revisão de literatura realizada sugeriu que um estudo envolvendo proteção de ototoxicidade por cisplatina com pré-condicionamento isquêmico à distância ainda não tinha sido realizado. O pré-condicionamento isquêmico é um mecanismo de proteção de injúria de isquemia-reperfusão com várias aplicabilidades, tanto experimentais quanto clínicas. Portanto, a ideia de proteção de lesão da cisplatina pareceu ser bastante viável e de realização sem dificuldades que inviabilizassem o estudo.

No início deste estudo, observou-se que a dose de 24mg/kg utilizada em estudos anteriores e na fase piloto deste demonstrava uma ototoxicidade muito discreta na avaliação por potencial auditivo evocado de tronco encefálico. Observou-se então, que se aumentando a dose para 32mg/kg, dividido em quatro aplicações de 08mg/kg a ototoxicidade se tornou mais evidente. A baixa mortalidade da dose anterior permaneceu inalterada, revelando-se uma dose plausível. Na literatura, a dose acumulada de 16mg/kg de cisplatina em cobaia foi capaz de ocasionar grave lesão celular (SCHWEITZER, 1993; CARDINAL et al, 2000). Em ratos, a

dose acumulada de 24mg/kg revelou lesão evidente por cisplatina na cóclea (FREITAS et al, 2009b), mas muitos trabalhos ainda utilizam doses de 16mg/kg (CELEBI et al, 2013; FANG; XIAO, 2014; JAMESDANIEL, 2014) ou ainda 14mg/kg intraperitoneal (OZTURK et al, 2013) ou endovenoso (LORITO et al, 2011).

Um desafio encontrado nos experimentos foi a alta incidência de otite média nos animais provenientes do biotério, o que dificultou a seleção dos animais pelos critérios de exclusão. Contudo, a incidência de doenças de orelha média e de orelha externa durante a realização do experimento foi muito baixa, apenas dois animais.

O dPCI é um modelo de proteção utilizado em vários órgãos com êxito contra a IRI (SOUZA-FILHO et al, 2009; ZOGRAFOS et al, 2014; WANG et al, 2014; SAVAJ et al, 2014; GASPAROVIC et al, 2014). O estudo de seus mediadores na elucidação de seu mecanismo é objetivo de diversos grupos, mas ainda não esclarecido. Mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 e iNOS estão relacionados à ação do dPCI (SOUZA-FILHO et al, 2009), assim como à lesão induzida por cisplatina (WAISSBLUTH et al, 2013; SO et al, 2008).

Baseado nos resultados deste estudo, encontrou-se que o dPCI, mecanismo já amplamente estabelecido, protegeu de forma significativa a lesão funcional na cóclea por CDDP na dose de 32mg/Kg, através da avaliação funcional por PAETE. Modelos de estudo já haviam demonstrado proteção lesão por IRI pelo dPCI através de redução ou abolição de estresse oxidativo em diversos órgãos como: fígado, rim, pulmão, músculo esquelético e coração.

5.2 EFEITO SOBRE A TOXICIDADE SISTÊMICA

Na análise da toxicidade sistêmica da cisplatina, através da análise de variação dos pesos nos grupos, observou-se dois fatores importantes sobre o dPCI, os quais foram: a redução de forma significativa na queda de peso no CDDP + dPCI quando comparado ao grupo CDDP e o aumento de forma significativa do peso dos animais do grupo C + dPCI quando comparado aos outros grupos. Uma explicação plausível ao achado seria o efeito anti-inflamatório como demonstrado em outros estudos com dPCI (TAHIR et al, 2014; SOUZA-FILHO et al, 2009), o que proporcionaria aos animais uma melhor resposta ao estresse quando submetido ao experimento como demonstrado no grupo C + dPCI. A significativa queda de peso no grupo C pode ser explicada provavelmente pelo estresse animal apenas à

exposição ao experimento, reforçando o achado de ganho de peso no grupo controle do pré-condicionamento (grupo C + dPCI).

A redução significativa da queda de peso na exposição à cisplatina observada no grupo submetido à dPCI pode representar um possível efeito do pré-condicionamento isquêmico à distância na ação sistêmica da cisplatina, ou seja, na sua ação anti-neoplásica. No entanto, estudos complementares avaliando a ação sistêmica da CDDP devem ser realizados para melhor elucidação na exata influência do pré-condicionamento nesse efeito.

Outros estudos de ototoxicidade relacionada à cisplatina revelaram que alguns protetores interferem na ação sistêmica e na ototoxicidade, como os antioxidantes tiosulfato de sódio e ácido 4-metil-tiobenzóico aplicados sistemicamente (CAPPAERT et al, 2005), enquanto outros interferem apenas na ação ototóxica da CDDP, por exemplo: ginkgo biloba (CHOI et al, 2013); ebselen, um composto sintético com atividade semelhante à glutathione peroxidase (KIM et al, 2009); amifostina (FREITAS et al, 2009b). Outras substâncias protetoras têm avaliação sobre o efeito antineoplásico desconhecida como metformina (CHANG et al, 2014); silymarin, um extrato lipofílico oriundo da planta *Silybum marianum* (CHO; LEE; DO, 2014). Uma proposta realizada por alguns estudos é a aplicação de agentes protetores diretamente de forma intratimpânica ou ainda pela janela redonda, tais como D-metionina e N-acetil-cisteína, abolindo possíveis efeitos sistêmicos sobre a ação da CDDP (RYBAK et al, 2007), ou ainda vitamina C (CELEBI et al, 2013).

5.3 EFEITO SOBRE A OTOTOXICIDADE

O efeito do dPCI sobre a ototoxicidade revelou papel protetor na avaliação funcional por PAETE, apesar de não ter apresentando diferença na análise histológica dos animais tanto no escore para célula ciliada externa, quanto para estria vascular. O mecanismo de lesão coclear por cisplatina consiste na ação sobre vias dependentes e independentes de lesão ao DNA como já descrito (MANDIAC et al, 2003). As citocinas envolvidas como TNF- α , IL-1 e iNOS na lesão por cisplatina, são influenciadas pelo pré-condicionamento, mostrando uma possível via de ação do dPCI. A queda na geração de radicais livres (ROS), proveniente da ação do dPCI, justificaria a redução na lesão celular por cisplatina na via independente de lesão ao DNA, sendo este o principal mecanismo, através da redução do estresse oxidativo (CHIRTES; ALBU, 2014).

A avaliação por potencial auditivo evocado de tronco encefálico foi utilizada no estudo por ser de fácil execução e apresentar menor variabilidade e maior reprodutibilidade

quando comparado às emissões otoacústicas produtos de distorção (FREITAS et al, 2009a), entretanto, muitos trabalhos ainda utilizam este método (FAUSTI et al, 1999; KNIGHT et al, 2007; ABUJAMARA et al, 2013).

A proteção em quase todos os animais do dPCI sobre os limiares do PAETE demonstra redução significativa na ototoxicidade, assim como demonstrou na redução de queda de peso. Esses achados sugerem um efeito do dPCI sobre a ação de CDDP, tanto sistêmica quanto na ototoxicidade. Estudos mais específicos para avaliar o papel do dPCI na ação anti-neoplásica da cisplatina devem ser realizados.

A microscopia óptica é de fácil realização como já descrito neste trabalho, mas a inclusão da cóclea em parafina em sentido longitudinal ao plano de corte do micrótomo pode ser, por vezes, difícil, gerando perdas em algumas peças de grupos do estudo. Os escores de microscopia óptica não revelaram diferença estatística entre os grupos. Essa avaliação não se encontra diretamente relacionada à avaliação funcional, não a contradizendo, portanto. A microscopia óptica revelou lesão nos animais submetidos à injeção intraperitoneal de cisplatina e ao se avaliar a frequência observa-se que o grupo CDDP apresentou mais lesões que o grupo CDDP + dPCI. Outros estudos com outras drogas, utilizando os critérios de Freitas et al, revelaram diferença com boa aplicabilidade do método (OZKIRIS et al, 2013).

O estudo por microscopia eletrônica de varredura consiste em um método mais sensível quando comparado ao por microscopia óptica. Observa-se com facilidade as alterações cocleares como: desarranjo do padrão das células ciliadas externas e ou internas com distorção ou ausência ciliar (HYPPOLITO et al, 2005). Uma justificativa para a ausência de diferença estatística entre os grupos é a baixa sensibilidade do estudo óptico. Entretanto, a microscopia eletrônica, mais sensível e mais utilizada, é um método caro e ainda não disponível em nosso meio.

As citocinas envolvidas na lesão da cisplatina são as pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral α (TNF- α) (WAISSBLUTH et al, 2013) e interleucina 1 β (IL-1 β) (SO et al, 2008) e a iNOS (RYBAK et al, 2007; WATANABE et al, 2002; SO et al, 2007; CHUNG et al, 2008). A análise da imunohistoquímica demonstrou a reversão da imunomarcagem tanto de TNF- α como de iNOS no grupo CDDP + dPCI ($p < 0,05$), revelando que a proteção do dPCI nos efeitos ototóxicos da cisplatina em ratos está relacionada à modulação destas citocinas, assim como demonstrado em outros órgãos (SOUZA-FILHO et al, 2009). A formação de ROS também é determinante na lesão por CDDP (CHIRTES; ALBU, 2014), sendo

provavelmente reduzida pelo dPCI como demonstrado no estudo em outros órgãos (ADAM, 2014). A importância do estudo do efeito do dPCI na ototoxicidade em ratos induzida por cisplatina baseia-se na interrelação dos mecanismos envolvidos com modulação de citocinas como a óxido nítrico sintase induzida. O óxido nítrico pode sofrer reação química com ROS formando peroxinitrito, composto altamente reativo e tóxico para as células (MODUN; GIUSTARINI; TSIKAS, 2014). Esse mecanismo pode explicar a queda de estresse oxidativo na lesão causada pela CDDP, promovida pelo dPCI através da redução de iNOS.

O mecanismo de proteção do PCI parece ser através de 03 vias principais: fatores iniciadores ou gatilhos liberados ou estimulados localmente no tecido, fatores humorais e vias neurais responsáveis pela ação sistêmica e fatores efetores locais no tecido ou órgão protegido.

A via de iniciação parece estar relacionada a adenosina, bradicinina e opióides endógenos que ativam receptores acoplados à proteína G (PG), que consiste em uma classe de proteínas envolvidas na transdução de sinais celulares. Elas são chamadas de proteínas G porque funcionam como intermediários, alternando entre um estado de ligação com uma guanosina difosfato inativa (GDP) e outro com uma guanosina trifosfato ativa (GTP). A PG é composta por 3 subunidades: alfa (α), beta (β) e gama (γ). A subunidade α possui um sítio de ligação com o GTP ou GDP. As subunidades β e γ permanecem sempre unidas. A PG se localiza na superfície interna da membrana da célula, ligada ao receptor acoplado à PG. Isso leva a regulação dos processos seguintes da célula (YELLON; DOWNEY, 2003), que ativam mediadores segundos mensageiros como moléculas separadas móveis de tirosinocinase (Janus kinase - JAK), resultando na fosforilação de transdutores de sinais e na ativação de moléculas de transcrição (STAT), via JAK/STAT, importante para a fase tardia do efeito do PCI, e como a via fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) importante como papel anti-apoptótico no efeito clássico (HAUSENLOY; YELLON, 2006).

O fator humoral é objetivo de estudo no dPCI. Uma das evidências consiste na observação de que a proteção pode ser transferida de um animal que foi submetido à PCI a um animal que não foi exposto, através de estudo em coelho por transfusão de plasma entre estes (DICKSON et al, 1999).

O fator neural também parece ser crucial na proteção sistêmica, como demonstrado por ausência de proteção em animais com secção de nervo femoral previamente ao PCI em pata. Simulação de efeito do PCI com injeção intraneuronal de adenosina e

ausência deste efeito com injeção sistêmica de adenosina. A administração de um antagonista de adenosina promove a suspensão parcial do efeito protetor do PCI (DONG et al, 2004).

Outro estudo que suporta as vias humoral e neuronal demonstrou em camundongos que o efeito do pré-condicionamento isquêmico à distância realizado em pata é abolido pela oclusão da veia femoral ou pela ressecção conjunta veia femoral e nervo ciático (LIM; YELLON; HAUSENLOY, 2010).

Os efetores locais parecem ser: proteína cinase dependente de guanosina monofosfato cíclico (cGMP/PKG) (BURLEY; FERDINANDY; BAXTER, 2007); cinases de resgate da lesão por reperfusão, que compreendem uma via que inclui o Akt e o sistema de cinases reguladas por sinal extracelular $1/2$ (Erk1/2), (HAUSENLOY; YELLON, 2007); e a via do fator ativador de reforço de sobrevivência, que compreende o TNF- α e o STAT3 (LECOUR, 2009).

6 CONCLUSÕES

- O pré-condicionamento isquêmico à distância de pata traseira protegeu de forma significativa a ototoxicidade induzida por cisplatina em ratos.
- O pré-condicionamento isquêmico à distância protegeu contra a toxicidade sistêmica da cisplatina através da avaliação do peso.
- O pré-condicionamento isquêmico à distância protegeu contra a alteração dos limiares auditivos através do potencial auditivo evocado de tronco encefálico.
- A análise histológica demonstrou lesões induzidas por cisplatina em células ciliadas externas e em estria vascular, mas não houve diferença estatística com os grupos controle.
- A análise por imunohistoquímica revelou que a otoproteção do dPCI na ototoxicidade da cisplatina está relacionado à modulação, na estria vascular, do fator de necrose tumoral α e da óxido nítrico sintase induzida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJAMRA, A. L. et al. The use of high-frequency audiometry increases the diagnosis of asymptomatic hearing loss in pediatric patients treated with cisplatin-based chemotherapy. **Pediatric Blood Cancer**, v. 60, p. 474-478, 2013.

ADAM, A. N. I. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. **International Journal of General Medicine**, v.7, p. 483-489, 2014.

ALBUQUERQUE, A.A.S. et al. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 75, p. 43-49, 2009.

ARSLAN, E.; ORZAN, E.; SANTARELLI, R. Global problem of drug-induced hearing loss. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.884, p. 1-14, 1999.

BORGES, G.C. et al. Ototoxicidade causada pela cisplatina em crianças: estudo retrospectivo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 67, n. 3, p. 292-295, 2001.

BOYKO, V.V. et al. Role of ischemic preconditioning in hepatic ischemia-reperfusion injury. **Hepatobiliary Surg. Nutr**, v. 3, n. 4, p. 179-184, 2014.

BREUEL, M.L.F.; SANCHEZ, T.G.; BENTO, R.F.; Vias auditivas eferentes e seu papel no sistema auditivo. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 5, n. 2, 2001.

BROCK, P.R. et al. Platinum-induced ototoxicity in children: a consensus review on mechanisms, predisposition, and protection, including a new international society of pediatric oncology Boston ototoxicity scale. **J. Clin. Oncology**, v. 30, No19, p. 2408-2416, 2012.

BURLEY, D.S.; FERDINANDY, P.; BAXTER, G.F. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. **Br J Pharmacol.**, v. 152, n. 6, p. 855–869, 2007.

CAMPBELL, K.C. et al. D-methionine protects against cisplatin damage to the stria vascularis. **Hear Res.**, v.138, p. 13-28, 1999.

CAPPAERT, N. L. et al. Acceleration of cisplatin ototoxicity by perilymphatic application of 4-methylthiobenzoic acid. **Hear Res**, v. 203, p. 80-87, 2005.

CARDINAAL, R.M. et al. Histological effects of co-administration of an ACTH (4-9) analog ORG 2766 on cisplatin ototoxicity in the albino guinea pig. **Hear Res**, v.144, p. 157-167, 2000.

CELEBI, S. et al. The effect of intratympanic vitamin C administration on cisplatin-induced ototoxicity. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 270, p. 1293-1297, 2013.

CHANG, J. et al. Protective effect of metformin against cisplatin-induced ototoxicity in an auditory cell line. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 15, p. 149-158, 2014.

CHIRTES, F.; ALBU, S. Prevention and restoration of hearing loss associated with the use of cisplatin. **BioMed Research International**, v. 14, 2014.

CHO, S.I.; LEE, J.; DO, N.Y. Protective effect of silymarin against cisplatin-induced ototoxicity. **Int. Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 78, p. 474-478, 2014.

CHOI, S.J. et al. Ginkgo biloba extracts protect auditory hair cells from cisplatin-induced ototoxicity by inhibiting perturbation of gap junctional intercellular communication. **J. Neuroscience**, v. 244, p.49-61, 2013.

CHUNG, W.H. Proapoptotic effects of NF-kappaB on cisplatin-induced cell death in auditory cell line. **Acta. Otolaryngol**, v. 128, p. 1063-1070, 2008.

CIANFORNE, G. et al. Pharmacological drugs inducing ototoxicity, vestibular symptoms and tinnitus: a reasoned and updated guide. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v.15, p. 601-636, 2011.

DALDAL, A.; ODABASI, O.; SRBETCIOGLU, B. The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 137, p. 747-752, 2007.

DANIELS, D.L. et al. Hearing, I: the cochlea. **American Journal of Neuroradiology**, v. 17, p. 1237-1241, 1996.

DICKSON, E.W. et al. Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. **Am J Physiol.**, v.277, n. 6, p. 2451-2457, 1999.

DILLE, M.F. et al. ABR obtained from time-efficient train stimuli for cisplatin ototoxicity monitoring. **J. Am. Acad. Audiol.**, v. 24, p. 769-781, 2013.

DONG, J.H. et al. Limb ischemic preconditioning reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats. **Sheng Li Xue Bao**, v. 25, n. 56, p.41-46, 2004.

ERLING-JUNIOR, N. et al. Local and remote ischemic preconditioning protect against intestinal ischemic/reperfusion injury after supraceliac aortic clamping. **Clinics**, v. 68, p. 1548-1554, 2013.

ERPICUM, P.; KRZESINSKI, J.M.; JOURET, F. Place de l'AMP-activated protein kinase dans le préconditionnement ischémique renal. **Néphrologie & Thérapeutique**, v. 10, p. 17-24, 2014.

FANG, B.; XIAO, H. Rapamycin alleviates cisplatin-induced ototoxicity in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 448, p. 443-447, 2014

FAUSTI, S.A. et al. An individualized, sensitive frequency range for early detection of ototoxicity. **Ear Hear**, v. 20, p. 497-505, 1999.

FAUSTI, S.A. et al. Hearing health and care: the need for improved hearing loss prevention and hearing conservation practices. **J. Rehab. Res. Dev.** , v. 42, p. 45-62, 2005.

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

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

FREITAS, M.R. et al. Distortion-product otoacoustic emissions and auditory brainstem responses sensitivity assessment in cisplatin-induced ototoxicity in rats. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.75, n. 4, p. 476-84, 2009a.

FREITAS, M.R. et al. The role of apoptosis in cisplatin-induced ototoxicity in rats. **Braz J Otorhinolaryngol**,v.75, n.5, p.745-752, 2009b.

FREITAS, M.R. et al. Light microscopy study of cisplatin-induced ototoxicity in rats. **The Journal of Laryngology & Otology**, v. 123, p.590-597, 2009c.

FRIAUF, E. Hearing. **Editorial Neuroforum**, v. 5, p. 51-52, 2014.

GASPAROVIC, H. et al. Impact of remote ischemic preconditioning preceding coronary artery by-pass grafting on inducing neuroprotection (RIPCAGE): study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 15, n. 1, p.414-421, 2014.

- GUO, Y. et al. The COX-2/PGI2 receptor axis plays an obligatory role in mediating the cardioprotection conferred by the late phase of ischemic preconditioning. **PLoS ONE**, v.7, n. 7, e41178, 2012.
- GROMER, S.; URIG, S.; BECKER, K. The thioredoxin system – from science to clinic. **Med Res Rev**, v. 24, p. 40-89, 2004.
- HAUSENLOY, D.J.; YELLON, D.M. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. **Cardiovascular Research**, v. 70, p. 240–253, 2006.
- HAUSENLOY, D. J. YELLON, D. M. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*, v. 12, p. 217-234, 2007.
- HENRY, K. R. Auditory Brainstem volume-conducted responses: origins in laboratory mouse. **J. Am. Audit. Soc.**, v. 4, p. 173-178, 1979.
- HINOJOSA, R. et al. Temporal bone histopathology of cisplatin ototoxicity. **American Journal of Otology**, v. 16, p. 731-740, 1995.
- HOTCHKISS, R.S. et al. Cell death. **N. Eng. J. Med.**, v. 361, p. 1570, 2009.
- HUANG, T. et al. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 18, p. 259-270, 2000.
- HUANG, X.; WHITWORTH, C.A.; RYBAK, L.P. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats. **Otol. Neurotol.**, v. 28, p. 828-833, 2007.
- HYPPOLITO, M.A. et al. Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, p. 504-511, 2003.
- HYPPOLITO, M.A. et al. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 3, p. 268-273, 2005.
- JAMESDANIEL, S. Downstream targets of Lmo4 are modulated by cisplatin in the inner ear of Wistar rats. **PLoS ONE**, v.7, n. 9, e115263, 2014.
- JENNINGS, R.B. et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. **Arch Pathol**, v. 70, p. 68-78, 1960.
- KALKANIS, J.G.; WHITWORTH, C.; RYBAK, L.P. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. **Laryngoscope**, v. 114, p. 538-542, 2004.
- KELLY, T.C. et al. Aminoguanidine reduces cisplatin ototoxicity. **Hear Res.**, v. 186, p. 10-16, 2003.

KHARBANDA, R.K. et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. **Circulation**, v. 106, p. 2881-2883, 2002.

KIM, S.J. et al. Ebselen attenuates cisplatin-induced ROS generation through Nrf2 activation in auditory cells. **Hear Res**, v. 251, p. 70-82, 2009.

KNIGHT, K.R. et al. Early changes in auditory function as a result of platinum chemotherapy: use of extended high-frequency audiometry and evoked distortion product otoacoustic emissions. **J. Clin. Oncol.**, v. 25, p. 1190-1195, 2007.

KOCMAN, E.A. et al. Effects of ischemic preconditioning protocols on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. **J. Surg. Research**, v. 193, p. 942-952, 2015.

KOSIERADZKI, M. ROWINSKI, W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention, *Transplantation Proceedings*, v. 40, p. 3279-3288, 2008.

KUNTSCHER, M. V. SCHIRMBECK, E. U. MENKE, H. KLAR, E. GEBHARD, M. M. GERMANN, G. Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 109, p. 2398-2404, 2002.

LANGER, T. et al. Understanding platinum-induced ototoxicity. *Trends in Pharmacological Sciences Aug*, 2013, Vol. 34, No.8.

LECOUR, S. Activation of the protective survivor activating factor enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: does it go beyond the RISK pathway?. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 47, p. 32-40, 2009.

LI, Y.; WOMER, R.B.; SILBER, J.H. Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and cumulative dose. **Eur. J. Cancer**, v. 40, n.16, p. 2445-2451, 2004.

LIM, S. Y.; YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. **Basic Res. Cardiol.**, v. 105, p. 651-655, 2010.

LOPEZ-GONZALEZ, M.A. et al. Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. **J. Pineal Res.**, v. 28, p. 73-80, 2000.

LORITO, G. et al. Dose-dependent protection on cisplatin-induced ototoxicity – an electrophysiological study on the effect of three antioxidants in the Sprague-Dawley rat animal model. **Med. Sci. Monit.**, v. 17, n. 8, p. 179-186.

LYNCH, E.D.; GU, R.; PIERCE, C.; KIL, J. Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. **Hear Res.**, v.201, p. 81-89, 2005.

MANDIAC, A. et al. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. **J. Biol Chem**, v. 278, p. 9100-6, 2003.

MARSHAK, T. et al. Prevention of cisplatin-induced hearing loss by intratympanic dexamethasone: a randomized controlled study. **Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, v. 150, n. 6, p. 983-990, 2014.

MEECH, R.P. et al. A semiquantitative analysis of the effects of cisplatin on the rat stria vascularis. **Hearing Research**, vol. 124, p. 44-59, 1998.

MODUN, D.; GIUSTARINI, D.; TSIKAS, D. Nitric oxide-related oxidative stress and redox status in health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2014, p. 1-3, 2014.

MOORE, K.L.; DALLEY, A.F.; AGUR, A.M. **Anatomia orientada para a clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. Cap. 7, p. 956-969.

MURRY, C.E.; JENNINGS, R.B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v. 74, p. 1174, 1986.

NEVES, J.S. e al. Efeitos do pré-condicionamento isquêmico associado a diferentes soluções de preservação na proteção do enxerto intestinal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, p. 397-403, 2011.

OZTURK, M. et al. Possible protective effect of sertraline against cisplatin-induced ototoxicity: an experimental study. **The Scientific World Journal**, v. 13, p. 1-5, 2013.

OTANI, H. Ischemic preconditioning: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, p. 207-47, 2008.

OZKIRIS, M. et al. The effects of lycopene on cisplatin-induced ototoxicity. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 270, n. 12, p. 3027-3033, 2013.

PIMPERTON, H.; KENNEDY, C. R. The impact of early identification of permanent childhood hearing impairment on speech and language outcomes. **Arch. Dis. Child**, v.97, p. 648-653, 2012.

PRZYKLENK, K.B. et al. Regional ischemic preconditioning protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. **Circulation**, v.87, p. 893-899, 1993.

REDNAM, S. et al. Glutathione S-transferase P1 single nucleotide polymorphism predicts permanent ototoxicity in children with medulloblastoma. **Pediatric Blood Cancer**, v. 60, p. 593-598, 2013.

RYBAK, L.P.; RAMKUMAR, V. Ototoxicity. **Kidney International**, v. 72, p. 931-935, 2007.

RYBAK, L.P. et al. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. **Hear Res**, v. 226, p. 157-167, 2007.

RYBAK, L.P. et al. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. **Tohoku J Exp Med**, v. 219, p.177-186, 2009.

SAVAJ, S. et al. H. Remote ischemic preconditioning for prevention of contrast-induced acute kidney injury in diabetic patients. **Iranian Journal Kidney Diseases**, v. 8, n. 6, p. 457-460, 2014.

SCHACHT, J.; TALASKA, A.E.; RYBAK, L.P. Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. **The Anatomical Record**, vol. 295, No II, p. 1837-1850, 2012.

SCHMIDT, M.R.; SLOTH, A.D.; JOHNSEN, J. Remote ischemic conditioning: The cardiologist's perspective. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 13, p. 667-674, 2012.

SCHWEITZER, V.G. Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. **Laryngoscope**, v. 103, p. 1-52, 1993.

SHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir. Bras.**, v.19, p. 441-447, 2004.

SILVA, F. N.; REFINETTI, R.A.; EULÁLIO, J.M.R. Avaliação bioquímica dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico após isquemia e reperfusão hepática em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 33, p. 393-397, 2006.

SO, H. et al. Cisplatin cytotoxicity of auditory damage is attenuated by downregulation of pro-inflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.**, v.8, p. 338-355, 2007.

SO, H. et al. Evidence that cisplatin-induced auditory damage is attenuated by downregulation of pro-inflammatory cytokines via NRF2/OH-1. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.**, v.9, p. 290-306, 2008.

SOUZA-FILHO, M.V.P. et al. Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-inflammatory response by remote organs in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, p. 921-929, 2009.

TAHIR, M. et al. Evaluation of the effects of ischemic preconditioning on the hematological parameters of rats subjected to intestinal ischemia and reperfusion. **Clinics**, v. 70, n.1, p. 61-68, 2014.

TAPURIA, N. et al. Remote ischemic preconditioning, a novel protective method from ischemia reperfusion injury – a review. **J. Surg. Res.**, v.150, p. 304-330, 2008.

- TERANISHI, M.A.; NAKASHIMA, T. Effects of trolox, locally applied on round window, on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.**, v. 67, p. 133-139.
- TSAI, Y.F. et al. Ischemic reperfusion injury-induced oxidative stress and pro-inflammatory mediators in liver transplantation recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 46, p. 1082-1086, 2014.
- TSUTSUI, H. et al. Protective effect of ischemic preconditioning on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury through sympathetic nervous system in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 718, p. 206-212, 2013.
- VAN RUIJVEN, M.W. et al. Immunohistochemical detection of platinated DNA in the cochlea of cisplatin-treated guinea pigs. **Hear Res**, v. 203, p. 112-21, 2005a.
- VAN RUIJVEN, M.W. et al. The cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. **Hear Res**, v. 205, p. 241-248, 2005b.
- WAISSBLUTH, S.; SALEHI, P.; HE, X.; DANIEL, S.J. Systemic dexamethasone for the prevention of cisplatin-induced ototoxicity. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol**, v. 270, p. 1597-1605, 2013.
- WANG, Y. et al. Remote ischemic preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury via heme oxygenase-1-induced autophagy. **Plos One**, v. 9, e98834, 2014.
- WATANABASE, K. et al. Nuclear-factor kappa B (NF-kappa B)- inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) pathway damages the stria vascularis in cisplatin-treated mice. **Anticancer Res.**, v.22, p. 4081-4085, 2002.
- YANCEY, A. et al. Risk factors for cisplatin-associated ototoxicity in pediatric oncology patients. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 59, p. 144-148, 2012.
- YELLON, D.M.; DOWNEY, J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 1113-1151, 2003.
- ZOGRAFOS, T.A. et al. Effect of one-cycle remote ischemic preconditioning to reduce myocardial injury during percutaneous coronary intervention. **Am. J. Cardiol.**, v. 113, p. 2013-2017, 2014.

APÊNDICE A – PESO DOS ANIMAIS NOS DIVERSOS GRUPOS

Grupo 1

GRUPO CDDP	DIA DO EXPERIMENTO					
RATO	D0	D1	D2	D3	D4	
1	234	236		217	200	178
2	249	249		230	218	199
3	225	223		211	192	192
4	225	220		199	178	169
5	208	Otite média	X		X	X
6	245	239		224	210	189
7	253	257		235	225	208
		Limiar > 20				
8	252	db NA	X		X	X
9	230	233		220	219	210
10	233	234		221	211	201

Grupo 2

GRUPO C	DIA DO EXPERIMENTO					
RATO	D0	D1	D2	D3	D4	
1	250	248		246	238	239
2	248	Otite média	X		X	X
3	229	223		225	220	227
4	241	240		236	233	238
5	249	245		239	235	240
6	250	240		236	235	240
7	231	228		222	217	218
8	247	239		238	236	241
9	254	252		251	248	250

Grupo 3

GRUPO DIA DO EXPERIMENTO

CDDP +

Dpci

RATO	D0	D1	D2	D3	D4
1	224	222	219	225	230
2	237	234	228	223	217
3	217	203	201	197	188
4	222	223	215	211	206
5	237	231	220	222	214 (otite externa)
6	251	238	226	217	206
7	222	otite média	X	X	X
8	202	201	188	180	173
9	238	228	209	208	Morreu
10	230	217	214	213	206
11	207	202	193	187	187

Grupo 4

GRUPO C + DIA DO EXPERIMENTO

Dpci

RATO	D0	D1	D1	D3	D4
1	220	240	230	232	238
2	212	234	228	228	224
3	211	239	229	230	232
4	230	Otite Limar > 20	X	X	X
5	222	dB NA	X	X	X
6	245	273	263	270	264
7	236	261	259	264	263
8	222	Otite	X	X	X
9	242	Otite	X	X	X
10	224	249	249	247	256
11	229	250	241	246	246
12	218	Otite	X	x	X

APÊNDICE B – LIMIARES DOS ANIMAIS POR PAETE NO INÍCIO E FIM DO EXPERIMENTO NOS GRUPOS EM db NA

Grupo 1

GRUPO CDDP	DIA DO EXPERIMENTO		
	D0	D4	
rato			
	1	10	10
	2	10	40
	3	5	20
	4	5	15
	5 Otite média		Excluído
	6	10	20
	7	5	5
	8	60	Excluído (LIMIAR > 20)
	9	10	10
	10	10	10

Grupo 2

GRUPO CONTROLE	DIA DO EXPERIMENTO		
	D0	D4	
Rato			
	1	5	5
	2 Otite média		
	3	10	10
	4	5	5
	5	5	5
	6	10	10
	7	5	5
	8	10	10
	9	5	5

Grupo 3

GRUPO CDDP + Dpci	DIA DO EXPERIMENTO	
-------------------	--------------------	--

RATO	D0	D4	
	1	5	5
	2	10	10
	3	5	5
	4	5	5
	5	15	otite média
	6	5	10
	7	Otite média	X
	8	10	10
	9	10	Morreu
	10	5	5
	11	10	10

Grupo 4

GRUPO C + dPCI

Rato

	DIA DO EXPERIMENTO		
	D0	D4	
	1	20	20
	2	5	5
	3	5	5
	4	Otite média	X
	5	30	x
	6	5	5
	7	5	5
	8	Otite média	x
	9	Otite média	x
	10	10	cisto de CAE
	11	5	5
	12	Otite média	x

APÊNDICE C – ESCORES DA ANÁLISE DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE ESTRIA VASCULAR (EV) E DECÉLULA CILIADA EXTERNA (CCE) NOS DIVERSOS GRUPOS.

Grupo 1

GRUPO CDDP

ESCORES

rato

	CCE	EV	
1		0	1
2		0	2
3		1	0
4		0	2
5	Otite	X	
6		1	2
7	Má inclusão	X	
8	Otite	X	
9		0	2
10		0	1

Grupo 2

GRUPO CONTROLE

ESCORES

Rato

	CCE	EV	
1		0	1
2	Otite	X	
3		0	1
4		0	1
5	Má inclusão	X	
6	Má inclusão	X	
7		0	1
8		0	1
9		0	1

Grupo 3

GRUPO CDDP + Dpci RATO	ESCORES CCE	EV	
1		0	1
2	Má inclusão	X	
3		1	2
4	Má inclusão	X	
5	Otite	X	
6		0	2
7	Otite	X	
8		0	0
9	Otite	X	
10		0	0
11		0	2

Grupo 4

GRUPO C + dPCI Rato	ESCORES CCE	EV	
1	Má inclusão	X	
2		0	1
3		0	1
4	Otite média	X	
5	Otite média	X	
6		0	1
7		0	1
8	Otite média	X	
9	Otite média	X	
10	Otite média	X	
11		0	1
12	Otite média	X	

APÊNDICE D – MÉDIAS DOS PERCENTUAIS DE ÁREA IMUNOMARCADA POR ÁREA TOTAL PARA TNF - α E iNOS NOS DIVERSOS GRUPOS

Grupo	MÉDIA DOS PERCENTUAIS PARA TNF - α	MÉDIA DOS PERCENTUAIS PARA iNOS
1 – CDDP	38,2033	17,3433
2 – C	2,9100	3,1300
3 – CDDP + dPCI	4,5567	3,2466
4 – C + dPCI	1,5750	6,4133

ANEXO – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA