

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIRURGIA

ISABELLE OLIVEIRA JATAÍ CAPELO

**ESTUDO DO EFEITO OTOPROTETOR DA DEXAMETASONA NA
OTOTOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM RATOS**

FORTALEZA-CEARÁ

2017

ISABELLE OLIVEIRA JATAÍ CAPELO

ESTUDO DO EFEITO OTOPROTETOR DA DEXAMETASONA NA
OTOTOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM RATOS

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rabelo de Freitas.

FORTALEZA

2017

C1e CAPELO, ISABELLE.
ESTUDO DO EFEITO OTOPROTETOR DA DEXAMETASONA NA
OTOTOXICIDADE INDUZIDA PELA CISPLATINA EM RATOS / ISABELLE CAPELO. –2017.
91 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós- Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. MARCOS RABELO DE FREITAS.

1. PEATE. 2. CORTICOIDE . 3. MICROSCOPIA OPTICA. I. Título.

CDD 617

ISABELLE OLIVEIRA JATAÍ CAPELO

ESTUDO DO EFEITO OTOPROTETOR DA DEXAMETASONA NA
OTOTOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM RATOS

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Diógenes Pinheiro

Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Raquel Aguiar Tavares

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Marcos Rabelo de Freitas

Universidade Federal do Ceará – UFC

Ao meu esposo Pedro, companheiro de todas as horas.

Ao meu filho João Pedro, luz da minha vida.

Aos meus pais Elísio e Aurilene, responsáveis pela
formação do meu caráter.

Aos meus irmãos Elísio Neto e Ingrid, meus grandes
amigos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, criador de todas as coisas, que nos ilumina e nos conduz pelo caminho do bem.

Ao Professor Doutor Marcos Rabelo de Freitas, que desde o início abraçou esse projeto e ajudou a torná-lo concreto. Além de grande mestre, é um exemplo de caráter e humanidade.

Aos Professores Armênio Aguiar dos Santos, Aldo Melo Filho e Daniel Chung pelas observações imprescindíveis feitas durante a qualificação desse Mestrado.

À Professora Doutora Gerly Anne de Castro Brito, sem cuja orientação e extrema disponibilidade tornaria inviável a realização dos estudos morfológicos.

Ao Professor Doutor João Aragão Ximenes Filho, pela valiosa orientação na análise estatística.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia Maria do Socorro França Monte, Adalberto Nascimento de Lima Junior e Flávia Araújo da Silva que foram fundamentais no processamento das peças histológicas.

À colega de pós-graduação Maria da Conceição Silva (Josy), que me auxiliou na montagem das pranchas histológicas.

Aos futuros colegas de profissão Avner Marcos Alves Batista, Yuri Neyson Ferreira Brito, Krissia Braga Diniz e Laio Ladislau Lopes Lima que me auxiliaram na realização dos experimentos e foram fundamentais na realização desse projeto.

Ao colega de profissão e de pós-graduação Marcos Jullian Barreto, pelo esclarecimento de várias dúvidas ao longo deste trabalho.

À colega de profissão Juliana Soeiro Maia, por ter participado dos experimentos, estando sempre disponível a ajudar como fosse preciso.

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, sempre disponível a ajudar como fosse necessário, foi fundamental na etapa final do trabalho.

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.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Federal do Ceará, por permitir a concretização de um sonho almejado desde a graduação, alcançar o grau de mestre.

“Insanidade é continuar
fazendo sempre a mesma
coisa e esperar resultados
diferentes.”

Albert Einstein

RESUMO

Cisplatina (cisdiaminodicloroplatinum) (CDDP) é um agente quimioterápico frequentemente usado no tratamento de várias linhagens de neoplasias. Entretanto, a ototoxicidade continua sendo um dos efeitos colaterais causadores de significativa morbidade e responsável pela limitação do seu uso. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a capacidade de proteção da dexametasona contra a ototoxicidade da cisplatina através das avaliações funcional por potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) e morfológica, por microscopia óptica. Foram utilizados ratos Wistar machos divididos em quatro grupos: 1. Controle: 06 animais receberam soro, via intraperitoneal (IP), 8ml/kg/dia por quatro dias; 2. DEXA15 + CDDP: 11 animais receberam dexametasona 15mg/kg/dia via IP e, 90 minutos (min) após, receberam 8mg/kg/dia de cisplatina via IP por quatro dias; 3. DEXA20 + CDDP: 07 animais receberam 20 mg/kg/dia de dexametasona via IP e, 90 min após, 8mg/kg/dia de cisplatina via IP por quatro dias; 4. C+CDDP: 11 animais recebem 8ml/kg/dia de soro fisiológico via IP e, 90 min após, 8mg/kg/dia de cisplatina via IP por quatro dias. Baseado nos resultados deste estudo, encontrou-se que a dexametasona não protegeu contra a perda de peso dos animais expostos a cisplatina; a taxa de mortalidade foi compatível com a literatura; os animais do grupo DEXA20+CDDP tiveram o limiar do PEATE alterado de forma estatisticamente significativa; os animais dos grupos DEXA15+CDDP e DEXA20+CDDP tiveram a estria vascular preservada parcialmente após a exposição a cisplatina. Conclui-se que a dexametasona na dose de 15mg/kg/dia protegeu contra a ototoxicidade por cisplatina na avaliação funcional por PEATE e morfológica pela microscopia óptica, mas não protegeu contra a toxicidade sistêmica e que a dexametasona na dose de 20mg/kg/dia protegeu contra a ototoxicidade por cisplatina através da avaliação morfológica, mas não pela avaliação funcional.

PALAVRAS-CHAVE: PEATE; corticoide; microscopia óptica.

ABSTRACT

Cisplatin (cisdiaminodichloroplatinum) (CDDP) is a chemotherapeutic agent often used in the treatment of several neoplastic lineages. However, ototoxicity continues to be one of the side effects that cause significant morbidity and is responsible for limiting its use. The main objective of this study was to evaluate the protection capacity of dexamethasone against the ototoxicity of cisplatin through the functional evaluations by brainstem evoked response audiometry (BERA) and morphological by optical microscopy. Male Wistar rats were divided into four groups: 1. Control: 06 animals received saline intraperitoneal (IP) 8ml / kg / day for four days; 2. DEXA15 + CDDP: 11 animals received dexamethasone 15mg / kg / day via IP and 90 minutes (min) after 8mg / kg / day of cisplatin via IP for four days; 3. DEXA20 + CDDP: 07 animals received 20 mg / kg / day of dexamethasone via IP and 90 min after 8 mg / kg / day of cisplatin via IP for four days; 4. C + CDDP: 11 animals receive 8ml / kg / day of saline via IP and 90 min after 8mg / kg / day of cisplatin via IP for four days. Based on the results of this study, it was found that dexamethasone did not protect against weight loss of animals exposed to cisplatin; The mortality rate was compatible with the literature; The animals in the DEXA20 + CDDP group had the statistically significant BERA threshold altered; The animals of the groups DEXA15 + CDDP and DEXA20 + CDDP had the vascular stria partially preserved after exposure to cisplatin. It was concluded that dexamethasone at a dose of 15mg / kg / day protected against ototoxicity by cisplatin in functional evaluation by BERA and morphological by optical microscopy, but did not protect against systemic toxicity and that dexamethasone at a dose of 20 mg / kg / day protected against ototoxicity by cisplatin through morphological evaluation, but not by functional evaluation.

Key-words: BERA; Corticoid; Optical microscopy.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Variação do peso no D0 e no D4 em todos os grupos.....	48
TABELA 2 - Variação do PEATE nos grupos 1,2,3 e 4 nos dias 0 (D0) e 5 (D4).	50
TABELA 3 - Variação do intervalo I-V nos grupos 1,2,3 e 4 nos dias 0 (D0) e 5 (D4)	52
TABELA 4 - Resultado de p para o teste de Fisher (2x2) na comparação intergrupos para estria vascular.....	54
TABELA 5 - Resultado de p para o teste de Fisher (2x2) na comparação intergrupos para célula ciliada externa.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fotomicrografia da cóclea de ratos mais esquema do órgão espiral de Corti.....	23
FIGURA 2. Principais estruturas que compõem o órgão espiral de Corti.....	24
FIGURA 3. Via auditiva central.....	25
FIGURA 4. Traçado normal do potencial evocado auditivo de tronco encefálico de rato Wistar.....	27
FIGURA 5. Estrutura molecular da cisplatina.....	28
FIGURA 6. Principais locais de acometimento da cóclea após exposição à cisplatina.....	29
FIGURA 7. Mecanismo de morte celular induzida pela cisplatina.....	31
FIGURA 8. Fotomicrografia representando os escores de lesão nas células ciliadas externas.....	37
FIGURA 9. Fotomicrografia representando os escores de lesão da estria vascular.....	38
FIGURA 10. Esquema do Experimento.....	43
FIGURA 11. Posicionamento dos eletrodos para realização do PEATE.....	44
FIGURA 12. Delineamento experimental.....	46
FIGURA 13. Gráfico representando a variação da média do peso dos animais nos grupos 1,2,3 e 4 nos dias 0 (D0) e 5 (D4) do experimento.....	49
FIGURA 14. Gráfico da média dos limiares do PEATE nos grupos 1,2,3 e 4.....	51
FIGURA 15. Gráfico do intervalo I-V médio dos animais nos dias D0 e D4.....	52
FIGURA 16- Gráfico representando presença ou ausência de lesão, em percentagem na estria vascular (EV)	53

FIGURA 17- Fotomicrografia da estria vascular de rato.....	54
FIGURA 18- Gráfico representando presença ou ausência de lesão, em percentagem, nas células ciliadas externas.....	55
FIGURA 19- Fotomicrografia do órgão espiral de Corti de rato.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - por cento

α - alfa

β - beta

κ - kappa

μm - micrômetros

4-HNE - 4-hidroxinonal

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius

C - grupo controle

C+CDDP - grupo controle + cisplatina

CAT - catalase

CCE - células ciliadas externas

CCI - células ciliadas internas

CDDP - cisdiaminodicloroplatinum ou cisplatina

CDDP+ D15 - cisplatina+ dexametasona 15mg/kg

CDDP+ D20 - cisplatina +dexametasona 20mg/kg

CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa em Animais

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

D0 - primeiro dia do experimento

D3 - terceiro dia após o início do experimento

D4 - quarto dia após o início do experimento

Dbna - decibél nível de audição

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM - erro padrão da média

ERK - quinase regulatória extracelular

EV - estria vascular

Fe - ferro

g - gramas

GSH-PX - glutathiona peroxidase

GSH-R - glutathiona redutase

H - horas

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HE - coloração hematoxilina-eosina

Hz - Hertz

IL - interleucina

IL-1 β - interleucina -1 β

IL-6 - interleucina- 6

iNOS - óxido nítrico sintase induzida

IP - intraperitoneal

JWH - 015- ligante do receptor canabinóide-2

Kg - kilograma

MED - média

mg - miligrama

min - minutos

ml- mililitro

mm - milímetro

mseg - milissegundo

n - número de animais

NAC - N acetilcisteína

NFκB - fator nuclear Kappa B

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NO - óxido nítrico

NOX-3 - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH)-oxidase

NT - nitrotirosina

O₂⁻ - superóxido

OH[·] - radical hidroxila

OONO[·] - peroxinitrito

PEATE - potencial evocado auditivo de tronco encefálico

Pt- platina

PUFA- ácidos graxos poli-insaturados

ROS - espécies reativas de oxigênio

S - segundos

-SH - grupamento tiol

SOD - superóxido dismutase

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

WR -1065 - metabólito ativo da amifostina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Aspectos Gerais.....	22
1.2 Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE)	24
1.3 Ototoxicidade por cisplatina.....	27
1.4 Otoproteção.....	32
1.4.1 Prevenção da ação de ROS.....	33
1.4.2 Prevenir a formação de ROS.....	34
1.4.3 Indução da produção de antioxidantes endógenos.....	35
1.5 Avaliação Morfológica da Ototoxicidade por Cisplatina.....	36
2 OBJETIVOS.....	39
2.1 Geral	39
2.2.Específicos.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Animais.....	40
3.2 Critérios de exclusão.....	40
3.3 Drogas.....	40
3.3.1 Cisplatina.....	40
3.3.2 Dexametasona.....	40
3.3.3 Solução salina fisiológica 0,9%.....	40
3.3.4 Ketamina.....	41
3.3.5 Xilazina.....	41
3.4 Grupos.....	41
3.4.1 Grupo 01 (C).....	41
3.4.2 Grupo 02 (C+ CDDP).....	41
3.4.3 Grupo 03 (D15+ CDDP).....	41

3.4.4 Grupo 04 (D20+CDDP).....	41
3.5 Procedimento.....	42
3.6 Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico.....	43
3.7 Técnica de Microscopia Óptica.....	44
3.8 Delineamento experimental.....	46
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4.1Análise de variância para dois fatores (2-way ANOVA) com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de Sidak.....	47
4.2 Teste exato de Fisher.....	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Toxicidade sistêmica da cisplatina.....	48
5.2 Avaliação auditiva funcional.....	49
5.3 Avaliação por microscopia óptica.....	53
5.3.1 Escore de microscopia óptica da estria vascular.....	53
5.3.2 Escore de microscopia óptica das células ciliadas externas.....	54
6 DISCUSSÃO.....	57
6.1 Aspectos gerais.....	57
6.2 Efeito sobre a toxicidade sistêmica.....	60
6.3 Efeito sobre a ototoxicidade.....	60
6.4 Considerações finais.....	64
7 CONCLUSÕES.....	65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICE A - Peso dos animais nos diversos grupos	84
APÊNDICE B - Limiares dos animais por PEATE no início e no fim do experimento nos grupos em dBNA.....	86
APÊNDICE C - Análise da microscopia óptica da estria vascular (EV) e das células ciliadas externas (CCE) quanto a presença (+) ou ausência (-) de lesões nos diversos grupos.....	88
APÊNDICE D - Intervalo I-V no início e no fim do experimento nos grupos em mseg.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A sistema auditivo consiste, de uma forma simplificada, na transformação da energia da onda sonora para energia elétrica, sendo, portanto, um sistema mecanorreceptor. Ele 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 se encontra 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).

A cóclea (FIGURA 1) é a estrutura neurossensorial 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). A cóclea 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, superiormente, a rampa média, onde se encontra o ducto coclear, e a rampa timpânica, inferiormente. 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 endósteo do canal, chamado de ligamento espiral e pela estria vascular (DANIELS et al,1996).

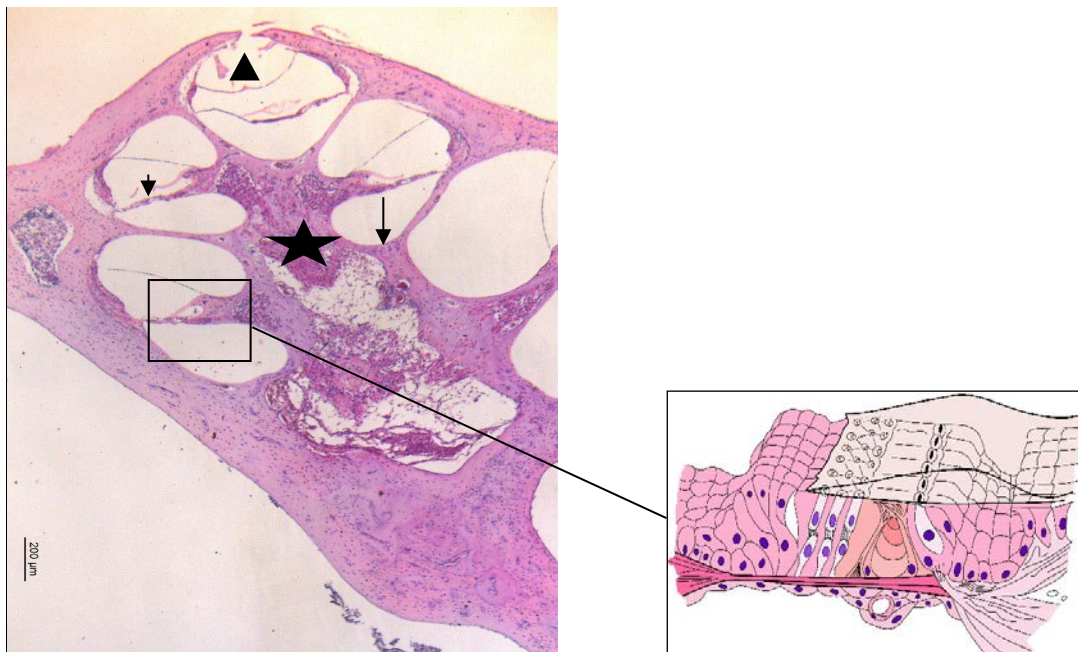


FIGURA 1 – Fotomicrografia da cóclea de rato mostrando os giros basal (seta), médio (cabeça de seta) e apical (triângulo), em torno do modíolo (estrela) (Coloração HE, 40X). Em destaque, desenho esquemático do órgão espiral de Corti.

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 a receber 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).

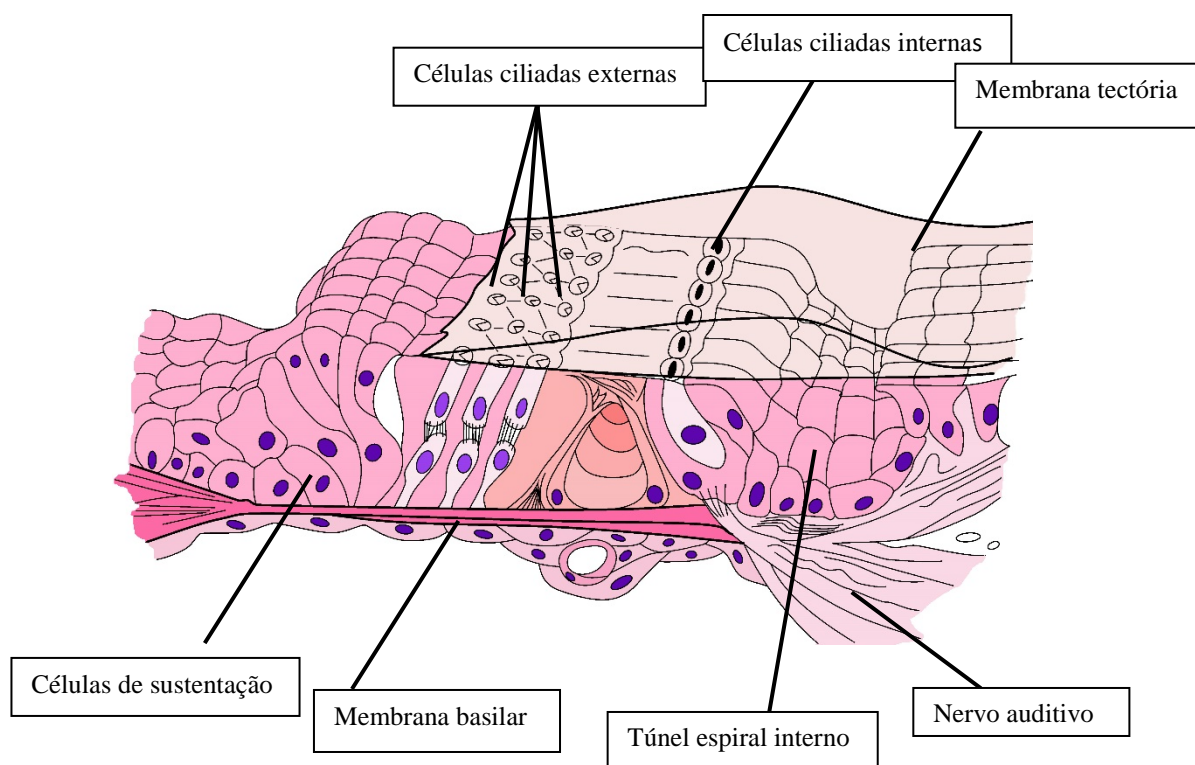


FIGURA 2 – Desenho esquemático representando as principais estruturas que compõem o órgão espiral de Corti, adaptado com autorização de FREITAS, M. R. (FREITAS, 2006).

1.2 Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE)

Alterações em células ciliadas e no gânglio espiral 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; ABUJAMRA et al, 2013). O potencial evocado auditivo de tronco encefálico, 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 evocados auditivos 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) (FIGURA 3). 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, através da avaliação do intervalo I-V (FREITAS, 2006). Quando este intervalo é maior que 04ms ou a diferença interaural é maior que 0,3 ms há a possibilidade de existir doença retrococlear (TANAKA; WHITWORTH; RYBAK, 2004).

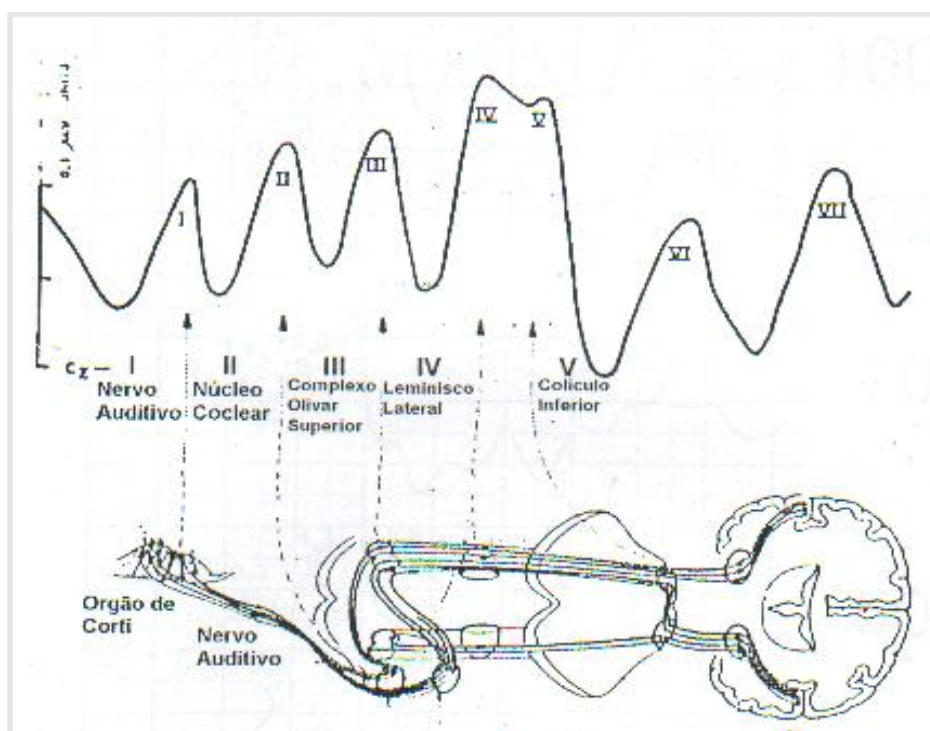


FIGURA 3- Figura demonstrando via auditiva central e as respectivas ondas geradas pelo PEATE. (Current 3 ed, 2013).

Grande número de estudos utilizam os PAETE para avaliação em roedores da ototoxicidade por cisplatina (TANGE; VUZEVSKI, 1984; SCHWEITZER et al.,

1984; REBERT; PRYOR; FRICK, 1984; AMSALEM; ANDRIEU-GUITRANCOUT, 1985; CAMPBELL; RYBAC; MEECH, 1996; HATZOPOULOS et al., 1999; RYBAK; SATU, 1999; RYBAK et al., 1999; KAMIMURA et al., 1999; RYBACK; SOMANI, 1999; SOCKALINGAM et al., 2000; RYBAK et al., 2000; LAURELL et al., 2000; OH et al. 2000; LI et al., 2001; HATZOPOULOS et al., 2002; TANAKA; WHITWORTH; RYBAK, 2004; DICKEY et al., 2004; KALKANIS; WHITWORTH; RYBAK, 2004; MINAMI; SHA; SCHACHT, 2004; LYNCH et al., 2005). Entretanto, os parâmetros de execução do exame quanto ao posicionamento dos eletrodos, tipo de estímulo, taxa de apresentação do estímulo, número de aquisições têm uma variabilidade grande entre os autores. Quanto à espécie de roedores, apesar de cobaias serem animais mais sensíveis e apresentarem menor toxicidade sistêmica para modelos experimentais de ototoxicidade por cisplatina (SOCKALINGAM et al., 2000), ratos também são utilizados nesse tipo de experimento.

O PEATE 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 fácil execução e aplicabilidade (FREITAS et al, 2009a) (FIGURA 4).

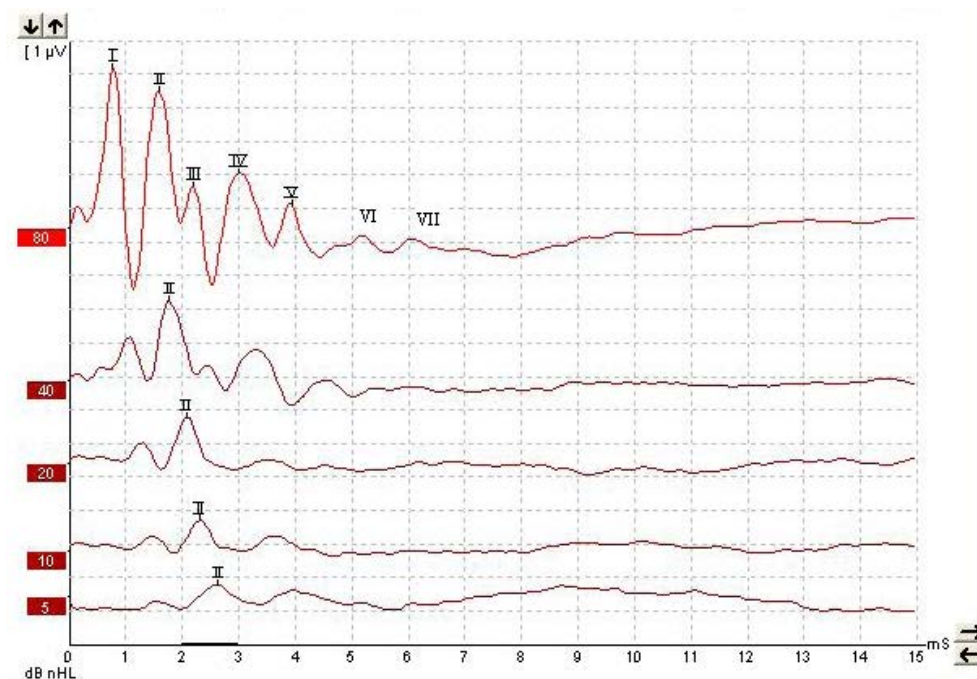


FIGURA 4 – Traçado normal de PEATE de rato mostrando as 7 ondas em 80 dB NA (traçado superior) e o aumento progressivo da latência, diminuição da amplitude e desaparecimento progressivo das ondas com a diminuição da intensidade de estímulo, permanecendo a onda II no nível do limiar eletrofisiológico (traçado inferior), adaptado com autorização de FREITAS, M. R. (FREITAS, 2006).

1.3 Ototoxicidade por Cisplatina

Ototoxicidade é o termo utilizado para definir o comprometimento funcional, anatômico e, às vezes, molecular dos tecidos da orelha interna causada por agentes terapêuticos (RYBAK;RAMKUMAR, 2007). O resultado da exposição a esses agentes é a perda auditiva e /ou comprometimento vestibular. As drogas ototóxicas mais comuns no uso clínico são: antibióticos aminoglicosídeos, agentes quimioterápicos (cisplatina e carboplatina), diuréticos de alça, antibióticos macrolídeos e antimaláricos (ARSLAN;ORZAN;SANTARELLI,1999).

A cisplatina (cisdiaminodicloroplatinum) (FIGURA 5) foi sintetizada originalmente por Peyrone em 1845 (RYBAK et al., 2005; KIM et al., 2015). Em 1965, Rosemberg e Cavalieri observaram as propriedades antiproliferativas dos compostos platinados (ROSEMBERG et al., 1965). Em 1971, a cisplatina foi introduzida em ensaios clínicos para a terapia do câncer (LEBWOHL et al., 1998). Desde então, vem sendo utilizada de maneira ampla e efetiva para o tratamento de tumores malignos em adultos, como: ovário, testículo, pulmão, tumores de cabeça e pescoço e bexiga. É utilizada, ainda, como tratamento padrão para vários tipos de câncer na infância, incluindo neuroblastoma, osteosarcoma e hepatoblastoma

(RYBAK et al., 2011; MCKEAGE, 1995). Entretanto, seu uso é limitado pela resistência celular e pelo aparecimento de efeitos colaterais intensos como nefrotoxicidade, ototoxicidade, toxicidade gastrointestinal, toxicidade em medula óssea e neuropatia periférica (BROCK et al., 2012; MCWHINNEY et al., 2009; SHEN et al., 2012; YAO et al., 2007). A nefrotoxicidade induzida por cisplatina ocorre primariamente nas células epiteliais dos túbulos proximais; a neurotoxicidade, nas extremidades superiores e inferiores; a ototoxicidade, apresenta pelo menos três principais alvos na cóclea: o órgão de Corti, a estria vascular e o gânglio espiral (FIGURA 6) (SCHWEITZER, 1993; CARDINAAL et al., 2000; HAMERS et al., 2003; VAN RUIJVENN et al., 2004).

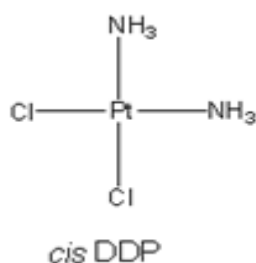


FIGURA 5 – Estrutura molecular da cisdiaminodicloroplatinum (cis-DDP)

(modificado de JORDAN; SCHWADE; TRUELSON, 1999).

As lesões causadas pela ototoxicidade da cisplatina usualmente aparecem em estágios iniciais (cerca de horas a dias após a exposição) (BUHRER et al., 1990), levando a uma perda auditiva, que pode ser acompanhada por zumbido. A perda é sensorineural, simétrica, progressiva, irreversível, dose-dependente e acomete, inicialmente, as altas frequências (SCHWEITZER, 1993; BOKEMEYER, et al., 1998). A ocorrência de hipoacusia é estimada em 20 a 90% dos adultos (KOPELMAN et al., 1988) e em 50 a 90% das crianças em tratamento com cisplatina (RYBAK et al., 2007; KOLINSKY et al., 2010). Existe uma variabilidade importante na suscetibilidade aos efeitos ototóxicos da droga. Alguns fatores, quando presentes, aumentam essa suscetibilidade, como: extremos etários, os pacientes pediátricos em especial (LI et al., 2004); perda auditiva preexistente (RYBAK et al., 2007); exposição a ruído (BOKEMEYER et al., 1998); exposição a outros agentes ototóxicos (KOPELMAN et al., 1988); altas doses cumulativas de cisplatina

(REDDEL et al., 1982); insuficiência renal (LI et al., 2004); depleção nutricional (KOPELMAN, et al., 1988); irradiação craniana prévia (HUAG et al., 2002; CHEN et al., 2006); fatores genéticos (ROSS et al., 2009).

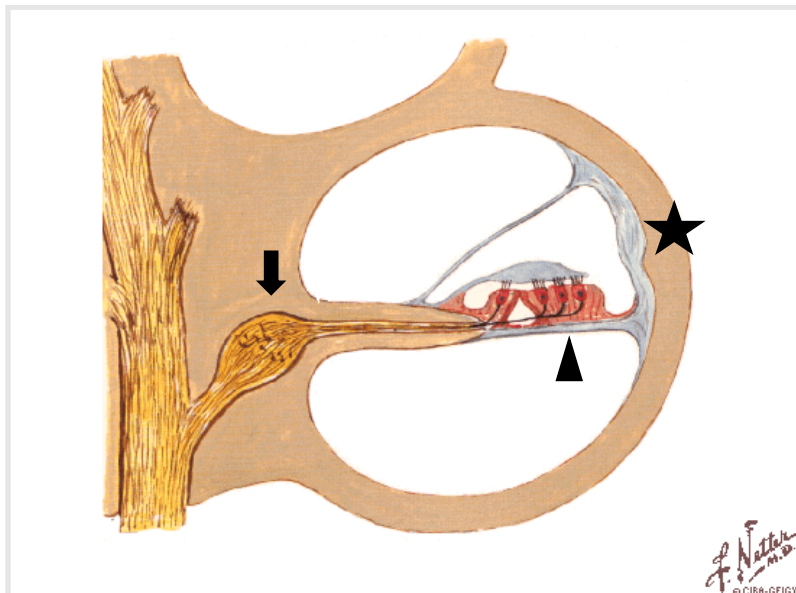


FIGURA 6- Desenho representando os principais locais de acometimento da cóclea após exposição à cisplatina: gânglio espiral (seta), células ciliadas externas (cabeça de seta) e estria vascular (estrela).

Os estudos animais têm demonstrado que as lesões histológicas na cóclea após a administração de cisplatina são mais proeminentes no órgão de Corti e consistem na degeneração e na perda de células sensoriais. Essa perda tipicamente se inicia na primeira fileira de células ciliadas externas (CCE) no giro basal da cóclea. Com o aumento da dose ou com uma administração prolongada da droga, a progressão da degeneração se estende para as outras fileiras de CCE do giro basal e, em seguida, para os giros mais apicais e, eventualmente, para as células ciliadas internas (KOMUNE et al., 1981; NAKAI et al., 1982; KONISHI et al., 1983; DE OLIVEIRA, 1989; SCHWEITZER, 1993; KALTENBACH et al., 1997; DE GROOT et al., 1997; KAMIMURA et al., 1999; CARDINAAL et al., 2000a; VAN RUIJVEN et al., 2004).

A cisplatina é quimicamente inerte até um ou ambos os grupamentos *cis* cloro serem substituídos por moléculas de água (EL-KHATEEB et al., 1999). Tal reação com a água ocorre em menores proporções no sangue, incidindo principalmente no citoplasma onde há uma concentração relativamente baixa de íons cloreto (EASTMAN et al., 1987; JONES et al., 1991; EKBORN et al., 2003). Uma vez dentro da célula, a cisplatina é capaz de causar morte por dois diferentes mecanismos: um

dependente de p-53 e caspases (HUANG et al., 2006; WATANABE et al., 2003; WANG et al., 2004), e outro mediado por proteínas quinases (PREVIATI et al., 2007).

Na apoptose caspase e p-53 dependente, exposição a altas doses de cisplatina inibe a atividade de algumas enzimas antioxidantes (superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT, glutathione peroxidase-GSH-PX e glutathione redutase-GSH-R) e estimula a atividade de outras, como a NOX-3 (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH- oxidase), isoforma altamente expressa na cóclea), com o consequente aumento na peroxidação lipídica, causando elevação nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CLERIC et al., 1995; GARCIA-BERROCAL et al., 2007). Os radicais superóxido gerados podem assim desenvolver quatro ações citotóxicas: (1)interagem com óxido nítrico (NO) e formam peroxinitrito que irá nitrosilar as proteínas, inativando-as (LEE et al., 2004); (2) formam radical livre hidroxila que, depois de interagir com o ferro (Fe), pode reagir com os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da membrana lipídica, gerando o aldeído reativo 4-hidroxinonal (4-HNE) (LEE et al., 2004) que desencadeia o influxo de cálcio para dentro das células, levando a apoptose (CLERIC et al., 1995; IKEDA et al., 1993); (3)inativa enzimas antioxidantes (PIGEOLET et al., 1990); (4) desencadeia a migração citosólica de Bax, com consequente ativação da cascata da apoptose mitocondrial, que envolve a liberação do citocromo c da mitocôndria e a ativação das caspases 9 e 3 (WATANABE et al., 2003; WANG et al., 2004) (FIGURA 7).

Além da apoptose caspase e p53 dependente, células expostas a cisplatina mostram aumento da expressão da quinase regulatória extracelular (ERK) e fator nuclear kB (NFκB), que estimulam citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina (IL) 1β e IL-6. Essas causam fragmentação nuclear, rearranjo do citoesqueleto e morte celular (PREVIATI et al., 2007; SO et al.,2007).

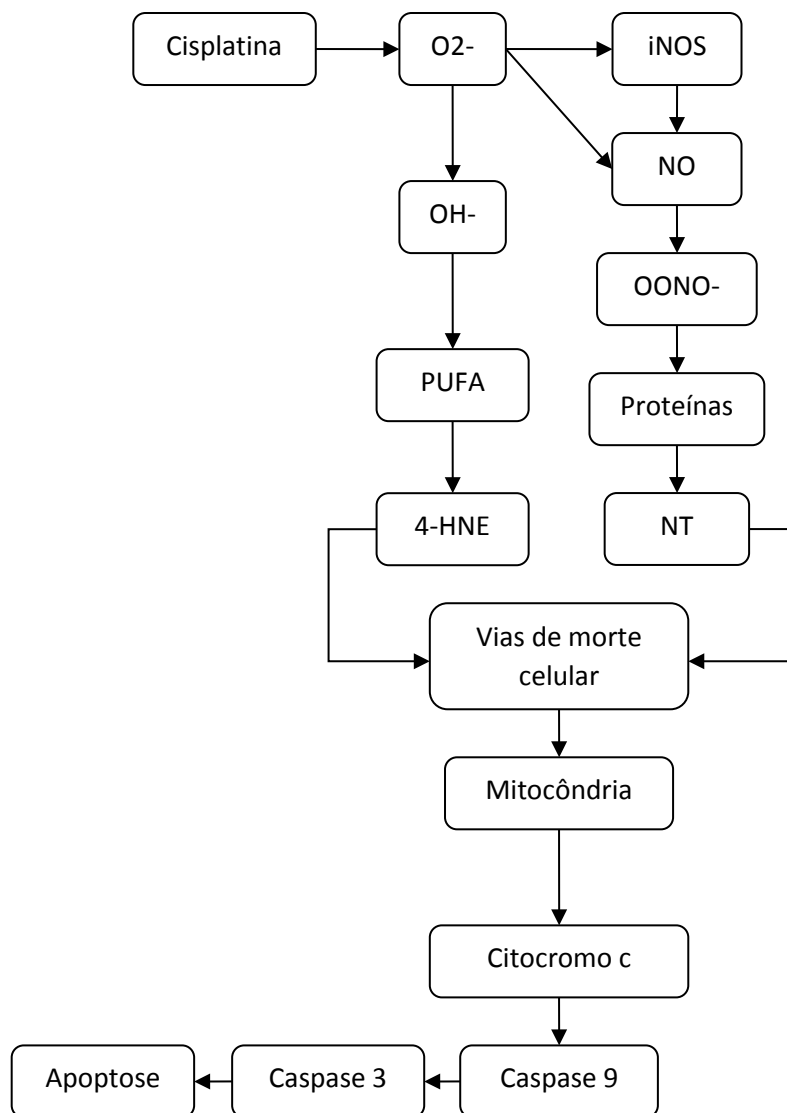


FIGURA 7 – Mecanismo de morte celular proposto para lesão de células ciliadas externas por cisplatina (modificado de RYBAK; WHITWORTH, 2005).

NF κ B é crucial na expressão das citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores de respostas inflamatórias agudas, assim como está associado a outras condições que causam aumento na produção de ROS (ABRAHAM, 2003). So et al.(2007) demonstraram que após a exposição a cisplatina intraperitoneal em ratos ocorre uma liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) pré-existent em células como mastócitos e neutrófilos e, posteriormente, ocorre a síntese de novas citocinas. O TNF – α e a IL-1 pré-formados são capazes de ativar o NF κ B através da sua translocação nuclear (BALDWIN, 1996; BARNES e KARIN, 1997). A ativação do fator nuclear κ B regula uma infinidade de genes incluindo as citocinas pró-inflamatórias.

A cóclea é um órgão altamente complexo composto por vários tipos de células cuja sensibilidade aos mecanismos citotóxicos da cisplatina varia. Nos fibrócitos tipo I da parede lateral do ligamento espiral, a cisplatina ativa os canais de grande condutância de potássio. O aumento do influxo de potássio causa uma perda intracelular da pressão osmótica e da força iônica. Isso perturba o gradiente eletroquímico da endolinfa, onde a concentração de potássio é maior e a de cálcio é menor comparada com a perilinfa ao redor (LIANG et al., 2005). Essas alterações no equilíbrio dos íons desencadeiam vias pró-apoptóticas, levando a morte celular (HUGHES et al., 1997; BORTNER et al., 1998).

Na estria vascular e no gânglio espiral da cóclea de ratos, indução de fator nuclear kappa B (NFκB) e óxido nítrico sintase indutível (iNOS) têm sido demonstradas após a exposição sistêmica a cisplatina, o que sugere que o óxido nítrico apresenta um importante papel na ototoxicidade (WATANABE et al., 2002). Estudos em ratos tratados com cisplatina mostram evidências da ativação do NFκB no órgão de Corti, ligamento espiral e estria vascular (SO et al., 2007).

1.4 Otoproteção

Na prática clínica, a ototoxicidade é o efeito colateral limitador da dose da cisplatina, exigindo a interrupção e substituição por um agente quimioterápico de segunda linha, normalmente a carboplatina (CALLEJO et al., 2015). A fim de reduzir a ototoxicidade causada pela cisplatina, o potencial otoprotetor de várias drogas vem sendo estudado. O otoprotetor ideal deve reunir as seguintes propriedades: deve oferecer otoproteção confiável; não interferir com o efeito antitumoral; poucos efeitos adversos e técnicas simples de administração. Um foco particular tem sido colocado nos antioxidantes que podem atenuar os efeitos das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (BERG et al., 2006).

Há três estratégias possíveis para evitar a ototoxicidade causada pelas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio: prevenir a interação de ROS com proteínas, lipídios e DNA celular através da formação de complexos com a cisplatina que são metabolicamente inativos; prevenir a formação de ROS; e induzir a produção de antioxidantes endógenos (RYBAK et al., 2003).

1.4.1 Prevenção da ação de ROS

Dois mecanismos moleculares têm sido descritos para inativar a ação da cisplatina: a formação de complexos com a cisplatina, que são inativos; ligação de composto catiônico ao DNA (TRESKES et al., 1992).

Compostos altamente nucleofílicos (agentes doadores de elétrons) reagem com átomos de platina (Pt), cujo núcleo é altamente eletrofílico, resultando em complexos moleculares inativos (RYBAK et al., 2003). Algumas moléculas com propriedades nucleofílicas são as que contêm enxofre, selênio, ácido carboxílico ou grupamento álcool (TRESKES et al., 1992). Estruturas que contêm enxofre são altamente nucleofílicas, devido à alta densidade de elétrons ao redor do núcleo. Portanto, todos os compostos químicos que contenham o grupamento tiol (-SH) têm alta afinidade com a cisplatina, neutralizando sua atividade. São moléculas que contêm o grupo tiol: amifostina, N-acetilcisteína, D-metionina e tiosulfato de sódio (TRESKES et al., 1992; DICKEY et al., 2005).

O segundo mecanismo consiste na ligação de uma molécula catiônica em pH fisiológico em torno da molécula de DNA, que apresenta uma carga elétrica negativa, de modo que a formação do composto pt-DNA não ocorre. Algumas moléculas que possuem essa capacidade são: metabólito ativo da amifostina (WR-1065), alopurinol e ebselen (TRESKES et al., 1992).

O grupo de drogas mais estudado é aquele que contém o grupamento tiol, incluindo o tiosulfato de sódio, D,L-metionina, ácido metilbenzóico, ácido lipóico, N-acetilcisteína e amifostina, que demonstraram sua capacidade otoprotetora em estudos experimentais (CARONIA et al., 2009; RYBAK et al., 2003; DICKEY et al., 2005; LYNCH et al., 2005; WANG et al., 2003; CHOE et al., 2004; FREITAS et al., 2006). Entretanto, o uso dessas drogas tem sido associado com a redução da atividade antineoplásica da cisplatina, logo sua utilidade clínica é limitada (DICKEY et al., 2005).

Amifostina é um composto tiofosfato orgânico. Seu metabólito ativo é o WR-1065, que resulta da defosforilação da amifostina pela fosfatase alcalina no sangue. WR-1065 é um removedor de radicais livres e previne a ligação do DNA com a platina (HOSPERS et al., 1999). Freitas et al. (2006) demonstrou tanto na avaliação

funcional quanto na morfológica otoproteção da amifostina após a administração sistêmica da cisplatina, sem haver interferência no efeito sistêmico da CPPD.

D-metionina é um aminoácido que pode prevenir a diminuição da concentração de antioxidantes endógenos (superóxido dismutase, catalase e glutatona) causada pela cisplatina na cóclea (CAMPBELL et al., 2003). Seu mecanismo de ação envolve a formação de complexos de D-metionina-cisplatina, assim reduzindo a concentração de cisplatina livre (EKBORN et al., 2002; CAMPBELL et al., 2003; EKBORN et al., 2004). Esses complexos são conhecidos por manter a atividade antitumoral da cisplatina (DEEGAN et al., 1994), dessa forma, a D-metionina possui um efeito otoprotetor sem comprometer a atividade antineoplásica após a administração sistêmica da droga.

1.4.2. Prevenir a formação de ROS

Glicocorticoides (prednisona, dexametasona e metilprednisolona) foram estudados para determinar seu potencial otoprotetor contra a cisplatina, com base na experiência clínica do seu uso sistêmico para o tratamento de várias causas de perda auditiva sensorineural: processos autoimunes em orelha interna, hidropsia endolinfática, doença de Meniere, zumbido, perda auditiva súbita e perda auditiva rapidamente progressiva (SUN et al., 2007; PARNES et al., 1999). Estudos experimentais têm demonstrado que os glicocorticoides limitam a formação de ROS na orelha interna (HAMID et al., 2008). A presença de receptores de corticoide na orelha interna de ratos tem sido demonstrada (PARNES et al., 1999), e algumas de suas ações identificadas. Estas incluem regulação eletrolítica (regulação dos canais de sódio e expressão da Na/K-ATPase); redução da produção de radicais livres na orelha interna; diminuição da formação de moléculas inflamatórias; controle imunológico; e manutenção do potencial do fluido endolinfático que banha as células ciliadas vestibulares e auditivas (PARNES et al., 1999). Além de limitar a produção de ROS, os corticóides também têm efeito otoprotetor por inibir a ativação da ERK e do NFκ-B, fundamentais na liberação e produção de citocinas que levam a morte celular (PARNES et al., 1999).

Alopurinol é uma xantina oxidase inibidora. Lynch et al. (2005) demonstraram o efeito sinérgico da administração combinada de alopurinol e ebselen em ratos que

receberam cisplatina (LYNCH et al., 2005). Melhor preservação de células ciliadas externa e limiars dos potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE) foram obtidos pela combinação da administração de baixas doses de ambos os compostos. Um estudo preliminar em ratos com câncer de mama e ovário mostrou que a combinação de alopurinol e ebselen não diminuía a atividade antitumoral da cisplatina no modelo do câncer de mama, e até melhorou a atividade no modelo do câncer de ovário (LYNCH et al., 2005).

Outra substância capaz de prevenir a formação de ROS é o JWH-015, um ligante do receptor canabinóide-2 que inibe a apoptose, dose-dependente, em uma linha de células auditivas. Isso é conseguido por meio da redução da produção de ROS associado a inibição da caspase, redução da liberação de citocromo c pela mitocôndria, e redução na produção de TNF-alfa (JEONG et al., 2006).

1.4.3 Indução da produção de antioxidantes endógenos

N-acetilcisteína (NAC) é um análogo da cisteína que possui atividade antioxidante e induz a síntese de glutathione, que é o principal captador de radicais livres. Dickey et al. (2005) demonstraram o efeito otoprotetor da NAC em ratos com a administração sistêmica prévia ao tratamento com cisplatina. Houve uma melhor preservação da audição em ratos pré-tratados com NAC quando comparados aos ratos expostos apenas a cisplatina através da avaliação por PEATE (DICKEY et al., 2005).

Salicilatos são os outros agentes antioxidantes que têm demonstrado atividade otoprotetora. Em um modelo experimental com ratos foi administrado salicilato subcutâneo previamente a administração sistêmica da cisplatina, resultando em limiars do PEATE reduzidos e elevação de antioxidantes endógenos na cóclea (MINAMI et al., 2004; HYPPOLITO et al., 2006).

Kalkanis et al.(2004) encontraram que a administração sistêmica de vitamina E previamente a cisplatina tinha uma atividade otoprotetora em modelo animal. Limiars normais de PEATE e preservação das células ciliadas externas foram reveladas pela avaliação por microscopia eletrônica.

D-metionina e L-metionina são capazes de prevenir a diminuição causada pela cisplatina de antioxidantes endógenos (superóxido dismutase, catalase e glutatona) na cóclea (CAMPBELL et al., 2003), o que pode explicar sua ação protetora contra ruído e perda auditiva induzida por aminoglicosídeos (CAMPBELL et al., 2007). Outro mecanismo de ação é a formação do complexo metionina-cisplatina, que diminui a concentração de cisplatina livre (EKBORN et al., 2004; LI et al., 2001), sem interferir com a atividade antitumoral da cisplatina (DEEGAN et al., 1994).

1.5 Avaliação Morfológica da Ototoxicidade por Cisplatina

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, através da microscopia óptica, 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) (FIGURAS 8 e 9). Entretanto, por ser uma classificação subjetiva e, por vezes, difícil de diferenciar cada um dos escores, neste estudo descrevemos, através da avaliação do giro basal da cóclea, a presença ou a ausência de lesão em células ciliadas externas (se os três núcleos estivessem visíveis, ausência de lesão e, se algum dos núcleos estivesse ausente, presença de lesão) e a presença ou a ausência de lesão em estria vascular (se havia algum grau de retração da camada média, foi descrito como presença de lesão).

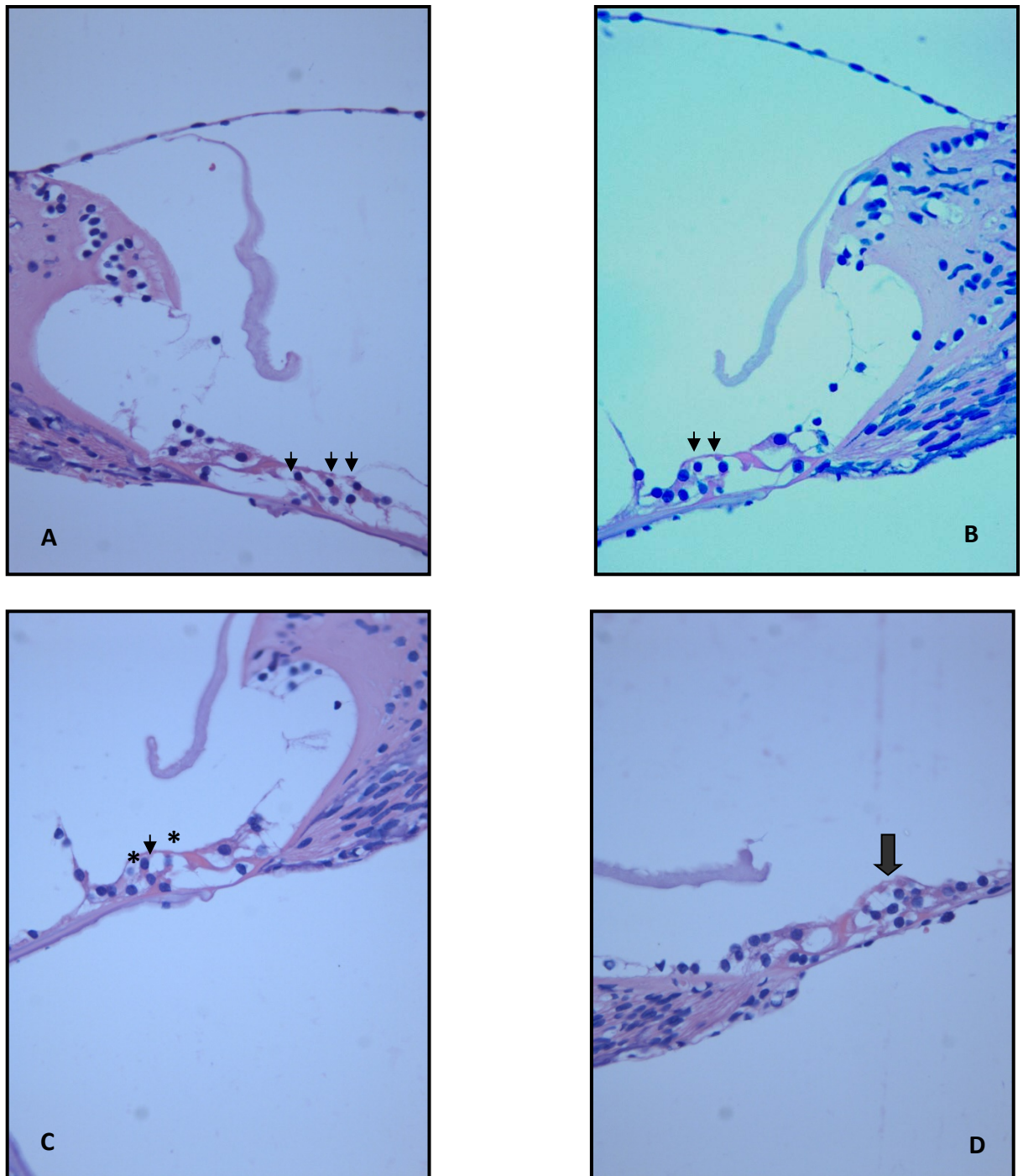


FIGURA 8 – Fotomicrografia do órgão espiral de Corti de rato representando os escores de lesão nas células ciliadas externas. A. Escore 0: presença de 3 células ciliadas externas, com núcleos bem delimitados (CCE) (cabeças de seta); B. Escore 1: presença de 2 CCE (cabeças de seta); C. Escore 2: presença 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 autorização de FREITAS, M. R. (FREITAS, 2006). (Coloração HE, 400x)

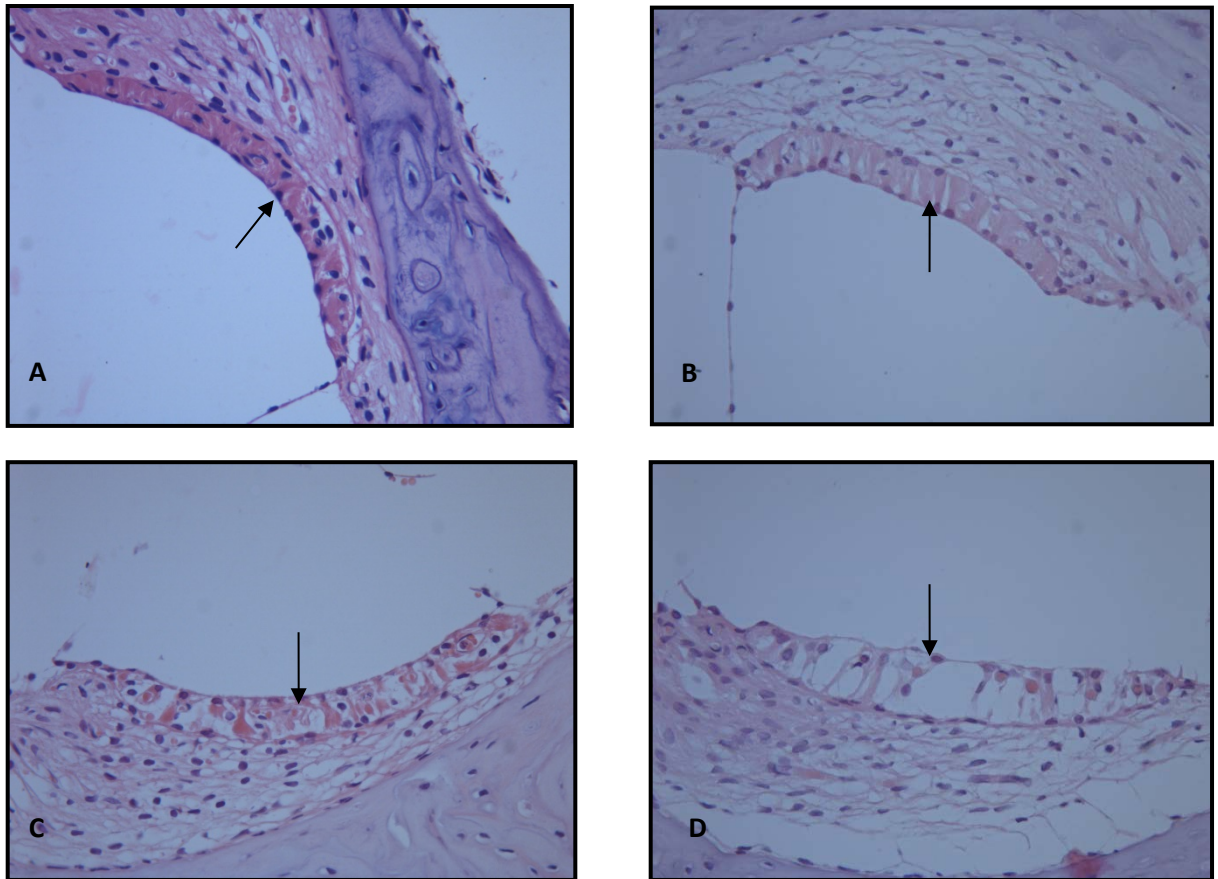


FIGURA 9 – Fotomicrografia da estria vascular (seta) de ratos representando os escores de lesão após tratamento com cisplatina. A. Escore 0: ausência de retração de camada média. B. Escore 1: retração leve de camada média. C. Escore 2: retração moderada de camada média. D. Escore 3: retração grave de camada média, adaptado com autorização de FREITAS, M. R. (FREITAS, 2006). (Coloração HE, 400x)

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 dexametasona intraperitoneal (IP), tendo em vista que existem poucos estudos utilizando essa via de administração do corticoide.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito protetor da dexametasona contra a ototoxicidade induzida por cisplatina.

2.2 Específicos

- Avaliar o papel protetor da dexametasona na toxicidade sistêmica da cisplatina.
- Analisar o efeito otoprotetor da dexametasona nos limiares auditivos de ratos submetidos a tratamento com cisplatina, através do potencial evocado auditivo de tronco encefálico.
- Avaliar a localização da lesão causada pela cisplatina.
- Avaliar o papel otoprotetor da dexametasona na lesão histopatológica da cisplatina na cóclea, através da análise das células ciliadas externas.
- Avaliar o papel otoprotetor da dexametasona na lesão histopatológica da cisplatina na cóclea, através da análise de estria vascular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados para o estudo ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, com peso variando entre 200-260 gramas, 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. O projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEPA) da Faculdade de Medicina da mesma universidade, tendo sido aprovado sob o número 127/16.

3.2 Critérios de Exclusão

- 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, ao exame otoscópico, 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 evocado auditivo de tronco encefálico maior que 20 dB NA, antes do início da administração das drogas.

3.3 Drogas

3.3.1 Cisplatina

- Fauldcispla – Laboratório Libbs 100mg/100ml.

3.3.2 Dexametasona

- Dexametasona-Laboratório Farmace 2mg/ml.

3.3.3 Solução salina fisiológica 0,9%

3.3.4 Ketamina

- Vetanarcol – Laboratório König 50mg/ml.

3.3.5 Xilazina

- Kensol – Laboratório König 20 mg/ml.

3.4 Animais (n=número de animais)

3.4.1 Grupo 1: Soro Fisiológico 0,9% - Controle- C (n= 06)

Ratos tratados com solução salina na dose de 8 ml/kg/dia em 4 dias consecutivos (total de 32ml/kg). Avaliados antes do tratamento (D0) e quatro dias (D4) após o seu início por potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE).

3.4.2 Grupo 2: Soro Fisiológico 0,9% + cisdiaminodicloroplatinum – C +CDDP (n=11).

Ratos tratados com solução salina na dose de 8ml/kg/dia (total de 32ml/kg) e, 90 minutos (min) após, com cisplatina na dose de 8mg/kg/dia (total de 32 mg/kg) em 4 dias consecutivos. Avaliados antes do tratamento (D0) e quatro dias (D4) após o seu início por potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE).

3.4.3 Grupo 3: Dexametasona 15mg/kg/dia + cisdiaminodicloroplatinum – DEXA15 + CDDP (n= 11).

Ratos tratados com dexametasona na dose de 15mg/kg/dia (total de 60mg/kg) e, 90 min após, com cisplatina na dose de 8 mg/kg/dia (total de 32 mg/kg) em 4 dias consecutivos. Avaliados antes do tratamento (D0) e quatro dias (D4) após o seu início por potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE).

3.4.4 Grupo 4: Dexametasona 20mg/kg/dia + cisdiaminodicloroplatinum – DEXA20 + CDDP (n= 07).

Ratos tratados com dexametasona na dose de 20mg/kg/dia (total de 80mg/kg) e, 90 min após, com cisplatina na dose de 8 mg/kg/dia (total de 32 mg/kg) em 4 dias consecutivos. Avaliados antes do tratamento (D0) e quatro dias (D4) após o seu início por potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE).

3.5 Procedimento

Os ratos Wistar foram submetidos à anestesia profunda com ketamina 80mg/kg associada a 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 PEATE, imediatamente antes do início da administração das drogas (D0). Em todos os grupos as medicações foram injetadas por via intraperitoneal. Nos grupos solução fisiológica (8ml/kg) e cisplatina (8mg/kg) (grupo 2), dexametasona 15mg/kg e cisplatina (8mg/kg) (grupo 3), dexametasona 20mg/kg e cisplatina (8mg/kg) (grupo 4) a injeção do quimioterápico foi realizada após 90 minutos da injeção inicial (dexametasona ou solução salina). Nos três dias subsequentes, depois de nova pesagem dos ratos, as drogas foram novamente administradas. Vinte e quatro horas (D4) depois da última injeção, os ratos foram anestesiados, foi realizada uma nova otoscopia para descartar aqueles que adquiriram doenças de orelha externa ou média durante o período de administração das drogas, e foram submetidos a nova avaliação auditiva por meio de PEATE.

Imediatamente após a última avaliação auditiva, realizou-se a remoção do osso temporal direito dos animais, após eutanásia por decapitação com guilhotina de fabricação própria. A cóclea foi dissecada para realização de preparo histológico. (FIGURA 10).

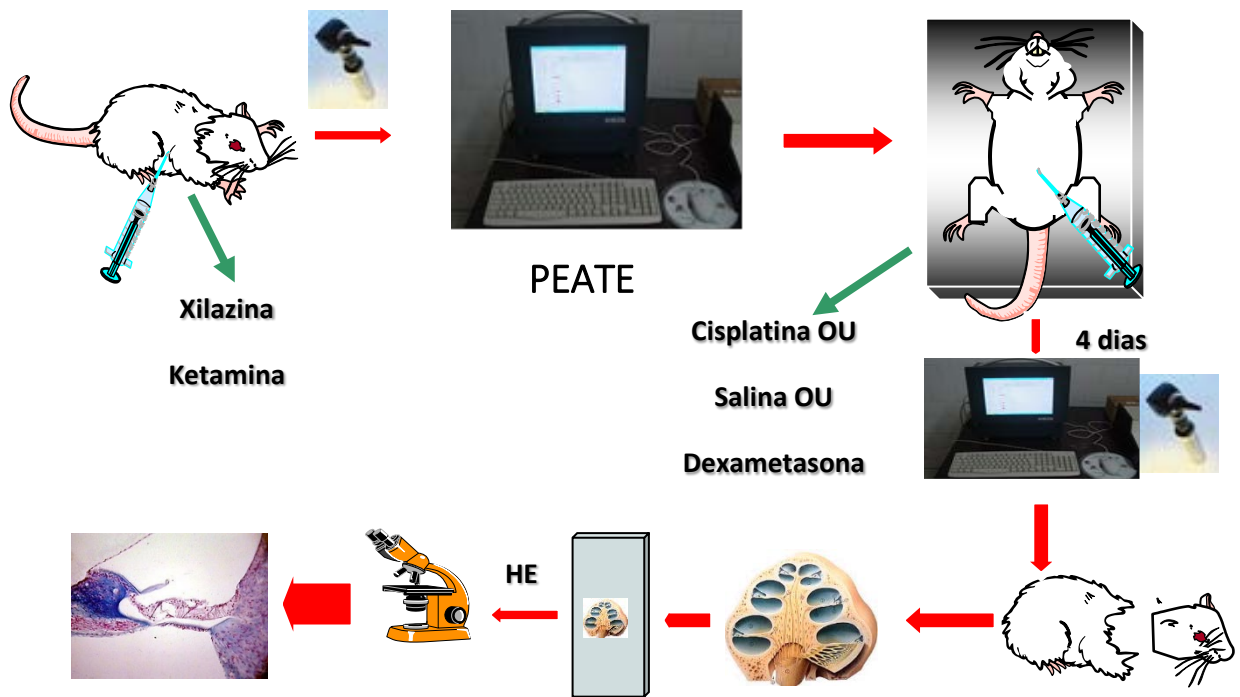


FIGURA 10 – Esquema do Experimento. Estudo por potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) e remoção da cóclea para realização das colorações por hematoxilinaeosina (HE), adaptado com autorização de FREITAS, M. R. (FREITAS, 2006).

3.6 Potencias Evocados Auditivos 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 evidenciou onda II.

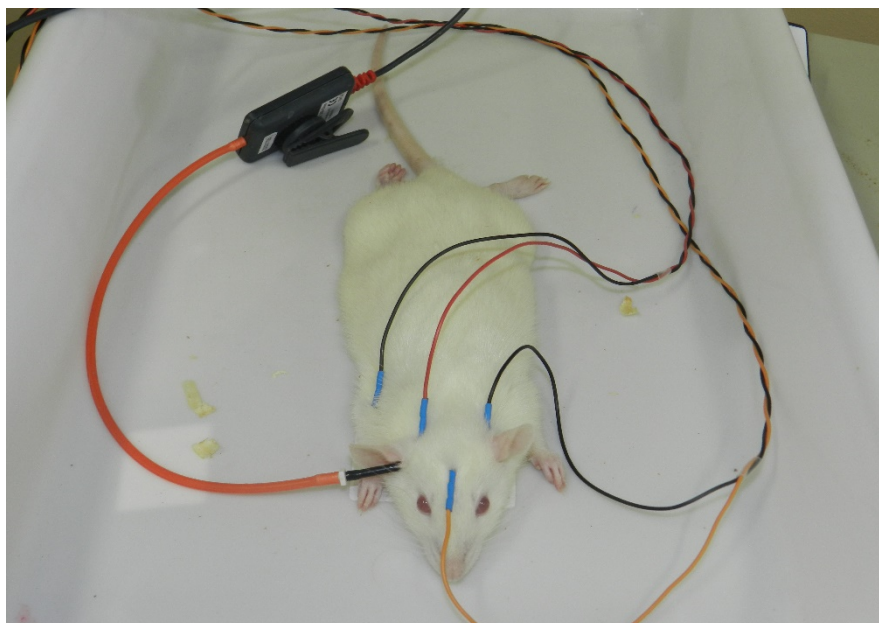


FIGURA 11- Fotografia demonstrando posicionamento dos eletrodos do PEATE em rato Wistar.

3.7 Técnica de Microscopia Óptica

A técnica de dissecação coclear e microscopia óptica foi realizado de acordo com o método descrito por Freitas et al.(2006). 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 21 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° C e em seguida incluído também em parafina. Foram feitos cortes de 20 µm (micrômetros), 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.

Após a preparação das lâminas, foi avaliado se havia ou não lesão na estria vascular e no 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.

3.8 Delineamento Experimental

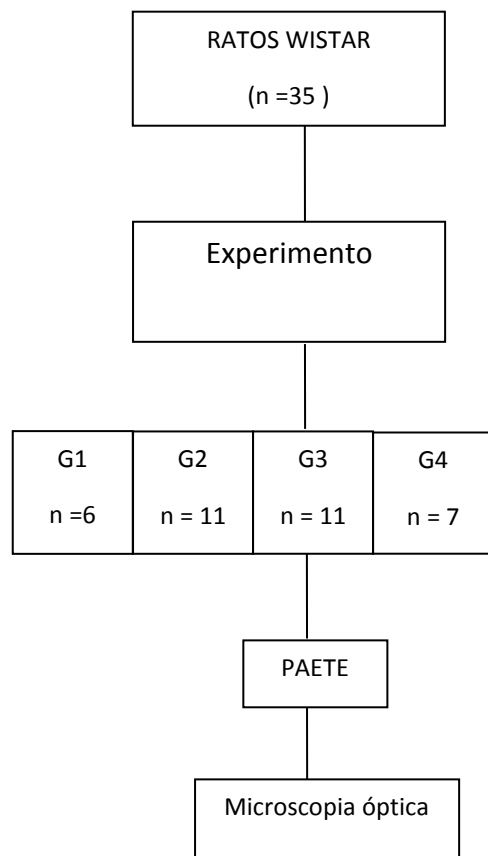


FIGURA 12. Delineamento experimental da execução do estudo. n=número de animais; G=grupos; PEATE= potencial evocado auditivo de tronco encefálico.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado, para confecção dos gráficos e análise estatística, o programa GraphPad Prism 7.02. 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. A significância mínima aceita foi ao nível de 5%. Os vários procedimentos experimentais foram comparados utilizando-se os seguintes testes:

4.1 Análise de variância para dois fatores (2-way ANOVA), medidas repetidas, com a significância entre os grupos estabelecida pelo teste de Sidak.

- Comparar a variação do peso dos animais nos grupos, até o quinto dia do experimento.
- 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.
- Comparar as médias dos valores do intervalo I-V obtidos através de potencial evocado auditivo de tronco encefálico entre o primeiro (D0) e o quinto (D4) dias da avaliação.

4.2 Teste exato de Fisher.

- Comparar as alterações morfológicas da estria vascular nos diversos grupos do estudo.
- Comparar as alterações morfológicas das células ciliadas externas nos diversos grupos do estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Toxicidade sistêmica da cisplatina

A distribuição dos dados referentes ao peso dos animais, a partir do teste de Koromonov-Smirnov, demonstrou que os dados seguiam distribuição normal ($p > 0,10$ em todos os grupos). Observou-se diferença estatisticamente significativa no peso dos animais de todos os grupos, quando comparados no D0 e no D4, com $p < 0,0001$ nos grupos C, C+CDDP e DEXA15+ CDDP e $p = 0,0004$ no grupo DEXA 20+CDDP pelo teste twoway- ANOVA medidas repetidas, pós-teste de comparação múltipla de Sidak (TABELA 1). O peso decresceu em todos os grupos, exceto no grupo C onde houve aumento de peso (FIGURA 13).

Tabela 1- Variação do peso (g) no D0 e no D4 em todos os grupos

GRUPOS	PESO				Valor de p
	D0		D4		
	MED	EPM	MED	EPM	
C	221,7	4,039	235	5,391	<0,0001****
C+CDDP	227,1	4,905	197,5	4,561	<0,0001****
DEXA15+CDDP	216,3	3,32	161,9	3,683	<0,0001****
DEXA20+CDDP	223	4,32	178	6,168	0,0004***

TABELA 1- Média \pm erro padrão da média (MED \pm EPM) do peso nos grupos 1,2,3 e 4 nos dias 0 (D0) e 5 (D4) do experimento. Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa do ganho ou da perda de peso dos animais pelo teste twoway-ANOVA medidas repetidas, pós-teste de comparação múltipla de Sidak. *** $p = 0,0004$; **** $p < 0,0001$. C: controle; C+CDDP: controle + cisplatina; DEXA15+CDDP: dexametasona 15mg + cisplatina; DEXA20+ CDDP: dexametasona 20mg + cisplatina.

Variação do peso

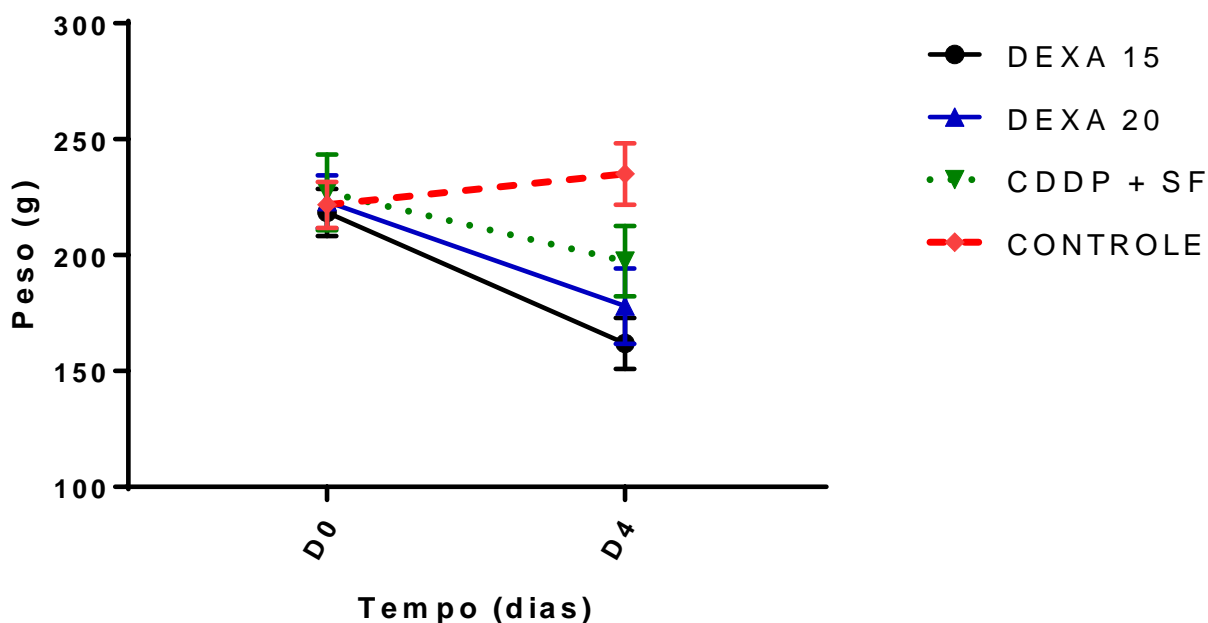


FIGURA 13 – Gráfico do peso. Gráfico representando a variação da média do peso dos animais nos grupos 1,2,3 e 4 nos dias 0 (D0) e 5 (D4) do experimento. Observa-se alteração do peso de forma significativa em todos os grupos. Ocorreu aumento de peso apenas no grupo controle e redução nos demais. Análise pelo teste twoway-ANOVA medidas repetidas (teste de comparação múltipla de Sidak). C = controle; CDDP =soro fisiológico+ cisplatina; DEXA15 = dexametasona 15 mg+ cisplatina; DEXA20= dexametasona 20 mg+ cisplatina.

5.2 Avaliação auditiva funcional

A distribuição dos dados de limiar auditivo obtidos pelo PEATE, a partir do teste de Koromonov-Smirnov, demonstrou que os dados não seguiam distribuição normal ($p < 0,0001$). Aplicou-se então o teste twoway-ANOVA medidas repetidas com pós-teste de comparação múltipla de Sidak e a avaliação por PAETE revelou diferença estatisticamente significativa entre o início (D0) e o fim do experimento (D4) nos grupos C+CDDP ($p = 0,0014$) e DEXA20+ CDDP ($p < 0,0001$) (FIGURA 14 e TABELA 2). Não se encontrou diferença estatisticamente significativa do intervalo I-V entre o primeiro (D0) e quinto (D4) dias do experimento em nenhum dos grupos avaliados (FIGURA 15 e TABELA 3).

Tabela 2– Variação do PEATE (dB NA) no D0 e no D4 em todos os grupos

LIMIAR PEATE					
GRUPOS	D0		D4		valor de p
	MED	EPM	MED	EPM	
C	5	0	5	0	>0,9999
C+CDDP	5	0	14,9	2,925	0,0014**
DEXA15+ CDDP	5	0	10	1,667	0,2928
DEXA20 + CDDP	5	0	21,43	3,221	<0,0001****

TABELA 2- Média \pm erro padrão da média (MED \pm EPM) do PEATE nos grupos 1,2,3 e 4 nos dias 0 (D0) e 5 (D4) do experimento. Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa dos limiares auditivos dos animais pelo teste twoway- ANOVA medidas repetidas, pós-teste de comparação múltipla de Sidak. ** p =0,0014; **** p <0,0001. C: controle; C+CDDP: controle + cisplatina; DEXA15+ CDDP: dexametasona 15mg+ cisplatina; DEXA20+ CDDP: dexametasona 20mg + cisplatina.

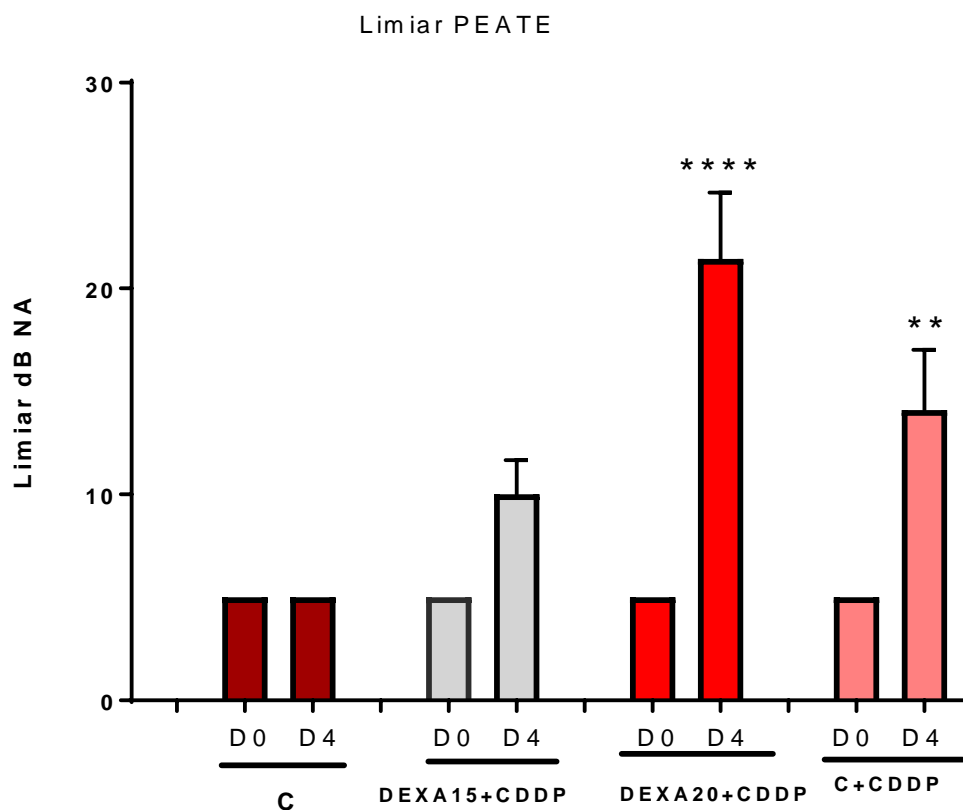


FIGURA 14- Gráfico da média dos limiares do PAETE nos grupos 1,2,3 e 4. Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa dos limiares auditivos dos animais entre D0 e D4 nos grupos C+CDDP e DEXA20+ CDDP pelo teste twoway- ANOVA medidas repetidas, pós-teste de comparação múltipla de Sidak. ** $p=0,0014$; **** $p < 0,0001$. C = controle; CDDP = cisplatina; DEXA15+CDDP = dexametasona 15mg + cisplatina; DEXA20+ CDDP = dexametasona 20mg + cisplatina; PEATE = potencial evocado auditivo de tronco encefálico.

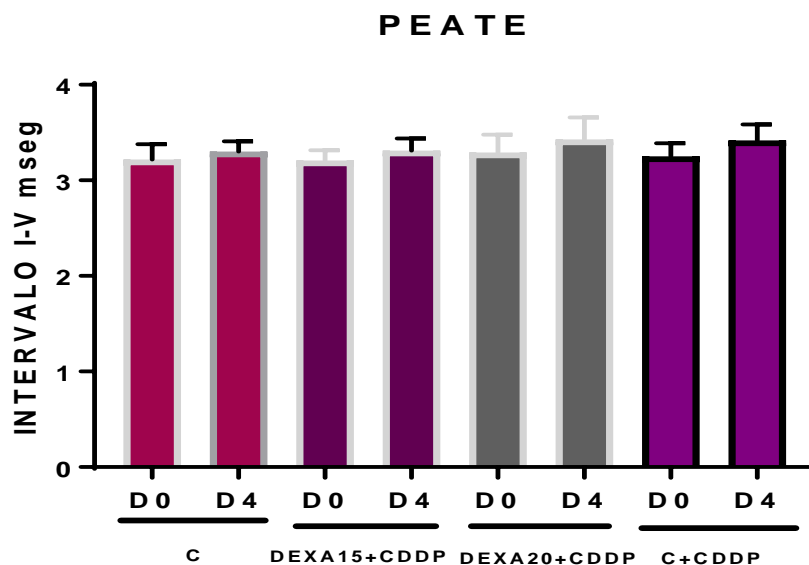


FIGURA 15. Gráfico do intervalo I-V médio dos animais nos dias D0 e D4 expressos como média \pm erro padrão da média (MED \pm EPM). Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os dias em nenhum dos grupos estudados através do teste twoway- ANOVA medidas repetidas, pós-teste de comparação múltipla de Sidak. C: controle; C+CDDP: controle + cisplatina; DEXA15 +CDDP: dexametasona 15 mg + cisplatina; DEXA20 +CDDP: dexametasona 20mg + cisplatina. PEATE = potencial evocado auditivo de tronco encefálico.

Tabela 3– Variação do intervalo I-V no D0 e no D4 em todos os grupos

GRUPOS	INTERVALO I-V msec			
	D0		D4	
	MED	EPM	MED	EPM
C	3,2	0,04463	3,267	0,05511
C+CDDP	3,209	0,07303	3,382	0,07149
DEXA15+CDDP	3,241	0,07638	3,369	0,05948
DEXA20+CDDP	3,25	0,0436	3,386	0,0553

TABELA 3. Média \pm erro padrão da média (MED \pm EPM) do intervalo I-V dos animais de todos os grupos nos dias D0 e D4. Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os dias em nenhum dos grupos através do teste twoway- ANOVA medidas repetidas, pós-teste de comparação múltipla de Sidak. C: controle; C+CDDP: controle + cisplatina; DEXA15 +CDDP: dexametasona 15 mg + cisplatina; DEXA20 +CDDP: dexametasona 20mg + cisplatina.

5.3 Avaliação por microscopia óptica

Neste estudo, foram perdidas as cócleas de 04 animais por erro de inclusão: uma do grupo C+CDDP, uma do grupo DEXA15 +CDDP e duas do DEXA20+CDDP. A análise, portanto, foi feita por 29 lâminas: seis do grupo C, dez do grupo C+CDDP, oito do grupo DEXA15 +CDDP e cinco do grupo DEXA20+CDDP.

5.3.1 Microscopia óptica da estria vascular

A estria vascular foi avaliada quanto a presença ou a ausência de retração em sua camada média. Através da análise microscópica da estria vascular foi observada diferença estatisticamente significativa apenas no grupo C X C+CDDP quanto a presença de alterações morfológicas (através do teste exato de Fisher 2x2, obteve-se valor $p < 0,05$) (FIGURAS 16 e 17). A tabela demonstra os valores de p obtidos no teste de Fisher entre os grupos (TABELA 4).

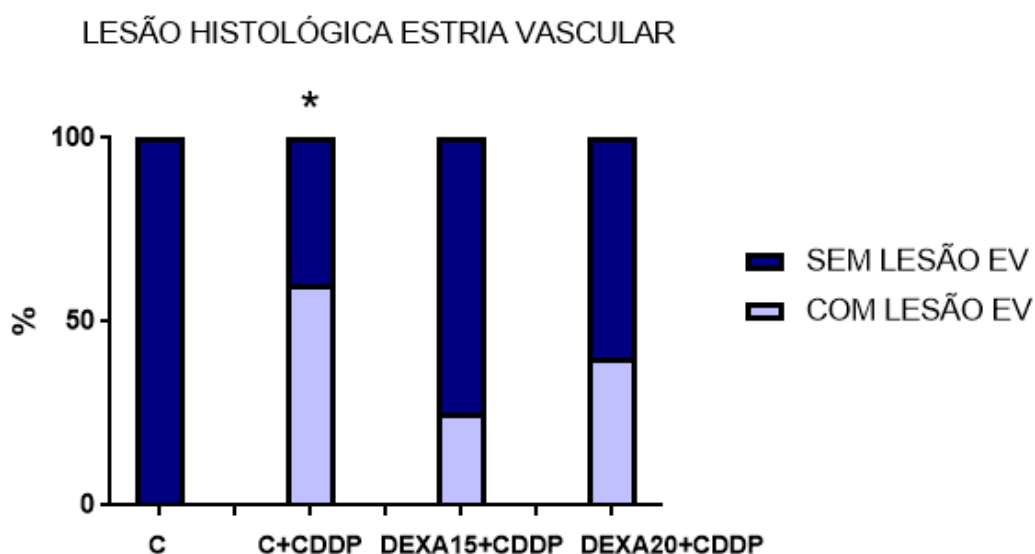


FIGURA 16- Gráfico representando presença ou ausência de lesão, em porcentagem, na estria vascular. Observa-se diferença estatisticamente significativa apenas no grupo C x C+CCDP através do teste exato de Fisher 2x2. * $p=0,0338$. C: controle; C+CDDP: controle + cisplatina; DEXA15 +CDDP: dexametasona 15 mg + cisplatina; DEXA20 +CDDP: dexametasona 20mg + cisplatina.

Tabela 4- Resultado de p para o teste de Fisher (2x2) na comparação intergrupos para estria vascular.

Grupos avaliados	Valor de p
C x C+CDDP	0,0338*
C x DEXA15+CDDP	0,4725
C x DEXA20+CDDP	0,0606
C+CDDP x DEXA15+CDDP	0,1880
C+CDDP x DEXA20+CDDP	0,9999
DEXA15+CDDP x DEXA20+CDDP	0,2929

Obteve-se o valor de p para a análise da presença de lesão estatisticamente significativa em estria vascular, observa-se o valor $p=0,0338(*)$ para os grupos C x C+CDDP pelo teste de Fisher. C: controle; C+CDDP: controle + cisplatina; DEXA15 +CDDP: dexametasona 15 mg + cisplatina; DEXA20 +CDDP: dexametasona 20mg + cisplatina.

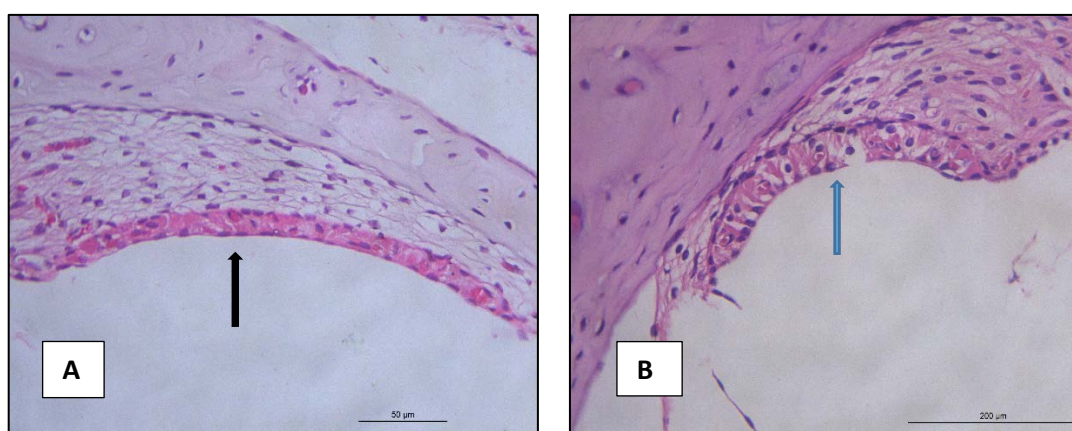


FIGURA 17- Fotomicrografia da estria vascular de rato. Em A (seta preta) ausência de lesão de estria vascular com manutenção da arquitetura da camada média. Em B (seta azul) a estria vascular encontra-se alterada, com uma retração importante da camada média. (Coloração HE, 400 x)

5.3.2 Microscopia óptica das células ciliadas externas

A análise dos dados de microscopia óptica revelou para as células ciliadas externas que houve diferença estatisticamente significante entre os grupos C x C+CDDP; C x DEXA15+CDDP; C x DEXA20+CDDP, através do teste exato de Fisher 2x2, com um $p=0,0114*$ e $p<0,01**$. A tabela demonstra os valores de p no teste de Fisher entre os grupos (TABELA 5) (FIGURAS 18 e 19).

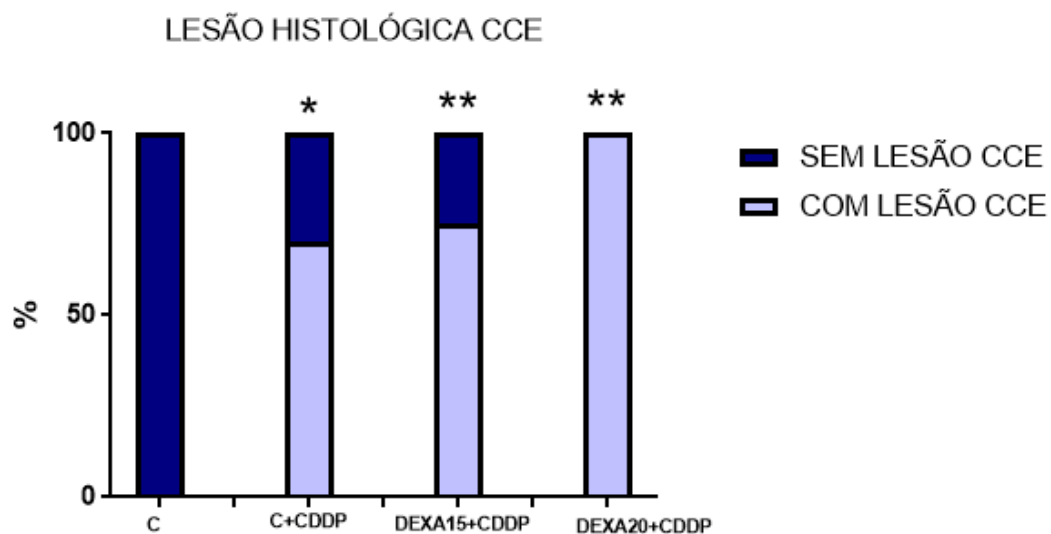


FIGURA 18. Gráfico representando presença ou ausência de lesão, em porcentagem, nas células ciliadas externas. Observa-se diferença estatisticamente significativa nos grupos C x C+CCDP; C x DEXA10+CDDP e C x DEXA20+CDDP através do teste exato de Fisher 2x2. * p=0,0114; ** p < 0,01. C: controle; C+CDDP: controle + cisplatina; DEXA15 +CDDP: dexametasona 15 mg + cisplatina; DEXA20 +CDDP: dexametasona 20mg + cisplatina.

Tabela 5- Resultado de p para o teste de Fisher (2x2) na comparação intergrupos para célula ciliada externa.

Grupos avaliados	Valor de p
C x C+CDDP	0,0114*
C x DEXA15+CDDP	0,0097**
C x DEXA20+CDDP	0,0022**
C+CDDP x DEXA15+CDDP	0,9999
C+CDDP x DEXA20+CDDP	0,5055
DEXA15+CDDP x DEXA20+CDDP	0,4872

Obteve-se o valor de p para a análise da presença de lesão estatisticamente significativa em células ciliadas externas, observa-se o valor p=0,0114 (*) para o grupo C x C+CDDP e p<0,01 (**) para os grupos C x DEXA15+CDDP; C x DEXA20+CDDP, pelo teste de Fisher. C: controle; C+CDDP: controle + cisplatina; DEXA15 +CDDP: dexametasona 15 mg + cisplatina; DEXA20 +CDDP: dexametasona 20mg + cisplatina.

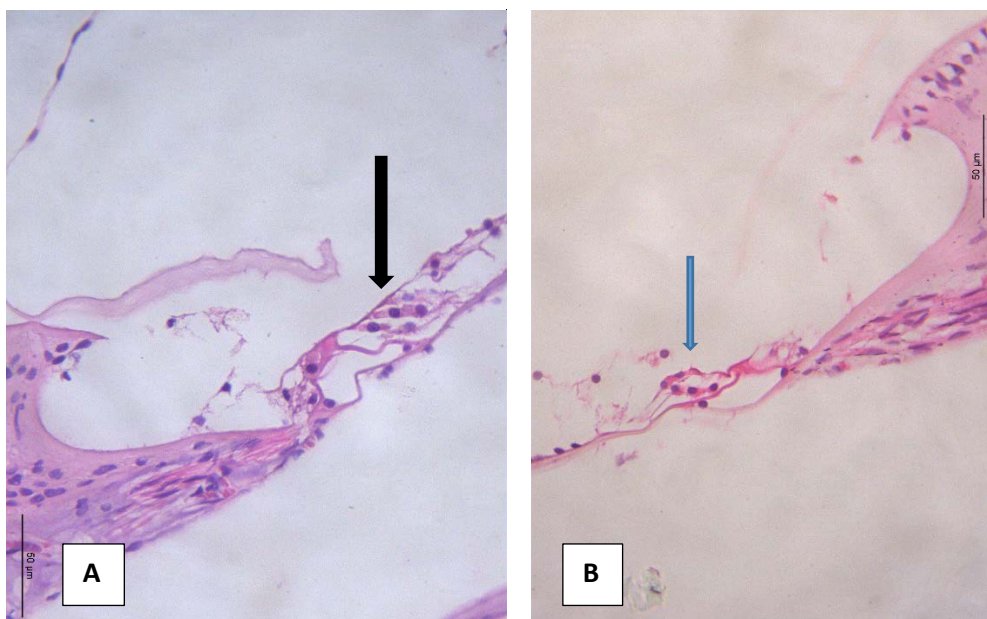


FIGURA 19- Fotomicrografia do órgão espiral de Corti de rato. Em A ausência de lesão em CCE (seta preta). Em B (seta azul) presença de lesão em CCE.(Coloração HE, 400 x)

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos gerais

A cisplatina é um agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos (KELLAND, 2000), notadamente cânceres de cabeça e pescoço, cânceres do sistema urogenital, tumores do sistema nervoso central, osteossarcoma e cânceres de esôfago (FRAM, 1992; RYBAK et al., 2007). Seu uso tem sido limitado por uma variedade de efeitos adversos como a ototoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, supressão medular e efeitos gastrintestinais (FEGHALI et al., 2001). Alguns de seus efeitos colaterais conseguem ser combatidos com o uso de medicamentos e hidratação como a nefrotoxicidade e os efeitos gastrintestinais (MINAMI; SHA; SCHACHT, 2004). Contudo, a ototoxicidade permanece sendo um dos efeitos colaterais causadores de significativa morbidade e que freqüentemente limita sua utilização (KALKANIS; WHITWORTH; RYBAK, 2004). Diante disso, há a necessidade de se desenvolver modelos experimentais com drogas que possam amenizar tais efeitos e permitir a utilização irrestrita da cisplatina.

O objetivo principal desse estudo foi desenvolver um modelo experimental de otoproteção pela dexametasona que pudesse ser realizado nas condições de infraestrutura aqui existentes. Assim, apesar da maioria dos trabalhos levantados na literatura terem como animal de experimentação a cobaia albina, resolveu-se desenvolver o modelo em ratos Wistar pela maior disponibilidade dessa espécie nos biotérios aos quais se tinha acesso.

O rato é um animal menos sensível à ototoxicidade e mais sensível à toxicidade sistêmica por cisplatina quando comparado à cobaia albina. O estudo de Sockalingam et al. (2000) mostrou que ratos albinos injetados com 12 mg/kg via intraperitoneal de cisplatina apresentaram maior percentagem de perda de peso, diarreia e anorexia que cobaias albinas submetidas à mesma dose. Por outro lado, cobaias albinas tiveram maior susceptibilidade à perda de audição que ratos albinos, como comprovado por emissões otoacústicas evocadas transitórias e produtos de distorção e por potencial auditivo evocado de tronco encefálico. A anatomia da cobaia albina também favorece os estudos morfológicos de ototoxicidade por apresentarem uma cóclea com três e meio giros, portanto maior que a do rato com dois e meio giros, possibilitam um acréscimo na facilidade de dissecação e remoção desse órgão para estudos morfológicos (JUDKINS; LI, 1997). Por outro lado, os ratos têm uma quantidade de giros similar à cóclea humana.

Estabeleceu-se, neste experimento, que apenas o osso temporal direito seria utilizado para os diversos procedimentos, a fim de tornar mais homogêneo o tempo entre a remoção da cóclea e sua fixação, evitando-se ao máximo as lesões do órgão relacionadas ao método de retirada.

Não se encontraram relatos de desenvolvimento de infecção de orelha média ou externa durante os experimentos animais com cisplatina na literatura pesquisada. Neste estudo, muitos dos animais cedidos para pesquisa apresentavam alterações à otoscopia de orelha externa e média (presença de osteoma de conduto auditivo externo, abaulamento de membrana timpânica, opacidade de membrana timpânica) o que dificultou a realização dos experimentos. Assim, apesar da grande dificuldade de seleção da amostra pela prevalência elevada de doenças de orelha externa e média entre os ratos disponibilizados para os experimentos, não foi comum o aparecimento dessas afecções após o seu início. Essa dificuldade de seleção também foi o motivo pelo qual não houve uma maior homogeneidade no número de animais entre os grupos.

Diversos agentes foram avaliados em estudos clínicos e/ou experimentais afim de reduzir a toxicidade induzida pela cisplatina (RYBAK et al., 2003; RYBAK et al., 2005) tais como: sódio tiosulfato (GANDARA et al., 1991; LEITAO et al., 2003), amifostina (GANDARA et al., 1991; HUSSAIN et al., 2003; FREITAS et al., 2006), D-metionina (CAMPBELL et al., 1996; CAMPBELL et al., 2003), glutathione (HAMERS et al., 1993), tocoferol (FETONI et al., 2004; KALKANIS et al., 2004), vitamina C (GREGGI et al., 2000), N-acetilcisteína (FEGHALI et al., 2001; CHOE et al., 2004), sódio salicilato (LI et al., 2003), glicocorticoides (SALIN et al., 2011; WAISSBLUTH et al., 2013; HUGHES et al., 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).

Os glicocorticóides têm sido avaliados como potenciais fármacos otoprotetores, baseado em seu efeito anti-inflamatório, homeostase iônica e efeito imunossupressor (HORIE et al., 2010; MELTSER et al., 2011). Administração sistêmica de glicocorticoide é comum e rotineira no manejo de doenças da orelha interna (HILL et al., 2008). Os corticóides inibem as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), reguladores importantes de fatores de transcrição de agentes pró-

inflamatórios (BARNES, 2005). MAPKs regulam vários eventos celulares, incluindo diferenciação, proliferação e apoptose (LEWIS et al., 1998). ERK, p38 e JNK pertencem a família dessas proteínas quinases ativadas por mitógenos e são importantes componentes na via de transdução de sinais envolvendo a produção de citocinas pró-inflamatórias (GUHA et al., 2001; SHEN et al., 2005) e apoptose (WANDA e PENNINGER, 2004). Todas as três MAPK também foram implicadas na via de ativação do NF-B através da fosforilação do seu inibidor, I κ B (GHOSH et al., 1998; WIDMANN et al., 1999). Os glicocorticóides também podem induzir a expressão de I κ B- α que suprime o NF- κ B inibindo a cascata inflamatória (AUPHAN et al., 1995). So et al.(2007) demonstraram que a inibição farmacológica de ERK é mais efetiva na supressão da secreção das citocinas pró-inflamatórias e na prevenção da morte celular por cisplatina quando comparada com a inibição de p38 e JNK. Demonstraram ainda que a ativação de ERK tem um papel fundamental na liberação dos estoques pré-existentes de citocinas, tendo em vista que houve um bloqueio considerável da liberação dessas citocinas com a inibição de ERK.

A injeção transtimpânica de glicocorticóide tem sido avaliada como uma estratégia de tratamento para a ototoxicidade induzida pela cisplatina com graus variados de proteção (SALIN et al., 2011; HUGHES et al., 2014). Paksoy et al.(2011) mostraram efeito otoprotetor da injeção transtimpânica de dexametasona em cobais, enquanto Murphy et al.(2011), Daldal et al.(2007) e Hill et al.(2008) encontraram um efeito modesto na proteção do corticoide transtimpânico. As vantagens dessa via de administração são: alcançar níveis de concentração mais elevados quando comparado com a oral ou parenteral (PARNES et al., 1999; BIRD et al., 2007); administração local previne absorção sistêmica, evitando efeitos colaterais como hiperglicemia, úlceras pépticas, hipertensão, osteoporose (PARNES et al., 1999; DOYLE et al., 2004) e não redução da eficácia dos agentes quimioterápicos (HERR et al., 2003; ZHANG et al., 2006).

Realizada extensa revisão na literatura foram encontradas poucas referências relacionadas a administração sistêmica de glicocorticóide com o objetivo de proteger contra a ototoxicidade da cisplatina. Waissbluth et al.(2013) e Salehi et al.(2014) não conseguiram demonstrar otoproteção com a dexametasona sistêmica isolada.

6.2 Efeito sobre a toxicidade sistêmica

Apesar de existirem formas pouco quantificáveis de avaliação da toxicidade sistêmica pela cisplatina como anorexia e diarreia (SOCKALINGAM et al., 2000), deu-se preferência a parâmetros objetivos e mensuráveis como perda de peso e taxa de sobrevivência final.

O peso dos animais diminuiu de forma significativa em todos os grupos, exceto no grupo controle onde houve aumento de peso. No grupo C+CDDP houve uma perda média de peso de 13% no D4. No grupo DEXA15+CDDP a perda foi de 25% e no grupo DEXA20+CDDP, de 20%. Kamimura et al., utilizando a dose de 16mg/kg de cisplatina, evidenciaram em ratos Wistar uma perda de peso média, após 3 dias, de 24,5%, semelhante ao encontrado no grupo DEXA15+CDDP deste estudo. Tanaka, Whitworth e Rybak (2004) encontraram resultado semelhante ao descrito com uma perda de peso de 23% nos animais tratados com uma dose de 13mg/kg. Entretanto, outros autores como Freitas et al.(2006) encontraram perda de peso média, na avaliação de 3 dias, de 14% para a dose de 16mg/kg de cisplatina. Laurell et al.(2000) apresentaram resultado semelhante com perda de peso de 13% em ratos Long-Evans com a dose de 16mg/kg de CDDP. No grupo C houve um aumento de peso dos animais em torno de 6%, apesar de os animais também serem submetidos ao estresse da injeção intraperitoneal eles não apresentam diarreia nem redução do apetite como os animais expostos a cisplatina.

A taxa de sobrevivência encontrada no presente estudo foi de 100% no D3 e 94% no D4 (dois animais do grupo DEXA15+CDDP morreram: um deles foi encontrado morto no último dia do experimento e o outro morreu durante a indução anestésica para a realização do PEATE). Kamimura et al.(1999) relataram uma sobrevivência de 43% em 72h com a dose de 16mg/kg. Já Campbell et al.(1996,1999), com os mesmos parâmetros encontraram sobrevivência de 50%, Laurell et al.(2000) 92% e Hatzopoulos et al.(2002) 100%. Os dados deste estudo, mostraram uma taxa de mortalidade em 72h menor que aquela da maioria dos modelos animais com cisplatina que varia entre 33 e 50% (MINAMI; SHA;SCHACHT, 2004).

6.3 Efeito sobre a ototoxicidade

A avaliação funcional da audição foi realizada através do potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE), assim como na maior parte dos estudos encontrados (PAKSOY et al., 2011; WAISSUBLUTH et al., 2013; HUGHES et al., 2014; SUN et al., 2016), por ser de fácil execução e apresentar menor variabilidade

e maior reprodutibilidade quando comparado às emissões otoacústicas produtos de distorção (FREITAS et al, 2009a).

A maioria dos estudos de ototoxicidade por cisplatina em roedores se dá por meio de microscopia eletrônica de varredura, pois a lesão das células ciliadas é, por esse método, facilmente identificada (CAMPBELL; RYBAC; MEECH, 1996; KAMIMURA et al., 1999; LI et al., 2001; TANAKA; WHITWORTH; RYBAK, 2004; KALKANIS; WHITWORTH; RYBAK, 2004; FETONI et al., 2004). Observa-se alterações cocleares como: desarranjo do padrão das células ciliadas externas e/ou internas com distorção ou ausência ciliar (HYPPOLITO et al, 2005). Entretanto, a microscopia eletrônica, mais sensível e mais utilizada, é um método caro e ainda não disponível amplamente em nosso meio. A avaliação morfológica neste estudo foi feita através de microscopia óptica, que é de fácil realização. Entretanto, a inclusão das peças em parafina em sentido longitudinal ao plano de corte do micrótomo pode ser, por vezes, difícil, gerando perdas em algumas peças dos grupos do estudo.

No presente estudo, a dose de cisplatina utilizada para desencadear ototoxicidade foi de 32mg/kg, que já havia sido testada em outro experimento por um membro do nosso grupo de pesquisa (MARTINS et al., 2015). Essa dose foi capaz de desencadear ototoxicidade mensurável pelo PEATE sem aumentar de forma importante a mortalidade. A ototoxicidade foi alcançada, em outros estudos, com doses que variaram de 12 mg/kg (MURPHY et al., 2011; WAISSBLUTH et al., 2013; SUN et al., 2016) a 24 mg/kg (FREITAS et al., 2006; SALIN et al., 2011; PAKSOY et al., 2011; TOKGOZ et al., 2012).

A injeção intraperitoneal da dexametasona foi realizada 90 min antes da administração da cisplatina, tendo em vista que Liu et al.(2006) mostraram que a concentração máxima do glicocorticoide, por essa via de administração, na perilinfa ocorre em até 02 horas. A dose utilizada de dexametasona sistêmica no presente estudo foi semelhante a utilizada por outros autores a qual variou de 10 mg/kg/dia a 20 mg/kg/dia (WAISSBLUTH et al., 2013; SUN et al., 2016).

O efeito da dexametasona na dose de 15 mg/kg sobre a ototoxicidade revelou papel protetor na avaliação funcional por PEATE. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os potenciais auditivos no D0 e no D4 neste grupo, demonstrando que a utilização do corticoide teve um efeito protetor sobre ação da cisplatina, não havendo aumento importante nos limiares auditivos. Já nos grupos

C+CDDP e DEXA20+CDDP foi encontrada diferença estatística entre os potenciais auditivos no D0 e no D4, mostrando o potencial ototóxico da cisplatina no grupo C+CDDP e demonstrando que não houve proteção com a dexametasona na dose de 20 mg/kg. Sun et al.(2016) também demonstraram que a administração de multidoses de dexametasona pode proteger a função auditiva de forma significativa. Entretanto, a maior parte dos estudos que utilizaram a dexametasona isolada por via intraperitoneal como agente otoprotetor não encontraram proteção significativa contra a ototoxicidade da cisplatina (WAISSBLUTH et al., 2013; SALEHI et al., 2014).

O aumento médio do limiar eletrofisiológico foi de 9,9 dB NA para o grupo C+CDDP; 16,43 dB NA para o grupo DEXA20+CDDP e de 05 dB NA para o grupo DEXA15+CDDP. Esse aumento foi inferior ao encontrado na literatura como demonstrado por Freitas et al.(2006) com um aumento médio do limiar eletrofisiológico para a dose de 24 mg/kg de cisplatina de 12 dB NA no D3 e 21 dB NA no D4. Este mesmo autor encontrou aumento médio de limiar de 14,17 dB NA tanto no D3 como no D4 com a dose de 16 mg/kg do quimioterápico. Outros estudos mostraram aumento médio de limiar eletrofisiológico ainda maiores após a injeção de 16mg/kg de cisplatina e avaliação 72 h após, variando de 15,2 dB (HATZOPOULOS et al., 2002) a 36 dB (RYBAK et al., 1999).

A dose de 15 mg/kg de dexametasona além da proteção funcional, vista através do PEATE, também revelou proteção histológica. O presente estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa quando se comparou o grupo C com o grupo DEXA15+CDDP em relação a preservação da estria vascular, demonstrando que houve proteção com essa dose do corticoide, já que não houve desarranjo estrutural significativo. A dose de 20mg/kg também se mostrou protetora em relação á morfologia da estria vascular, não havendo diferença significativa quando comparada ao controle. Sun et al.(2016) também mostraram proteção sobre a morfologia coclear. No grupo da cisplatina + multidoses de dexametasona foi vista uma estria vascular praticamente normal quando comparado com o grupo controle (soro), além disso, a quantificação das células ciliadas residuais nesse grupo foi significativamente mais alta que no grupo da cisplatina isolada. Waissbluth et al.(2013) demonstraram preservação da morfologia da estria vascular com o uso de corticoide sistêmico, mas não encontraram o mesmo achado para as células ciliadas externa que foram parcialmente destruídas.

Em relação às células ciliadas externas, o resultado encontrado foi semelhante ao de Waissbluth et al.(2013), houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos C x DEXA15+CDDP e C x DEXA20+CDDP. Não mostrando proteção histológica das células ciliadas externas.

A maioria dos autores descreve lesões das células ciliadas externas e estria vascular com uso da cisplatina (SMOORENBURG et al., 1999; CARDINAAL et al., 2000a, 2000b, 2000c; O'LEARY et al., 2001; LYNCH et al., 2005). As lesões descritas na estria vascular são retração celular na camada intermediária (SMOORENBURG et al., 1999; CARDINAAL et al., 2000a, 2000b, 2000c; O'LEARY et al., 2001), formação de bolhas nas células marginais (CARDINAAL et al., 2000a, 2000b, 2000c), protusão dessas células para o interior do espaço endolinfático (CAMPBELL et al., 1999; SMOORENBURG et al., 1999), edema (LYNCH et al., 2005) e atrofia (SLUYTER et al., 2003). De Groot et al.(1987), O'Leary et al.(2001) e Van Ruijven, De Groot e Smoorenburg (2004) com dose de cisplatina de 2mg/kg em 8 dias consecutivos não evidenciaram alterações na estria vascular.

Os trabalhos com microscopia óptica em cobaias são unânimes em afirmar que a CDDP promove lesão de células ciliadas externas, predominantemente na espira basal da cóclea, com progressiva menor perda quando se dirige ao ápice (DE GROOT et al., 1997; HEIJMEN et al., 1999; SMOORENBURG et al., 1999; CARDINAAL et al., 2000a, 2000b, 2000c; O'LEARY et al., 2001; SERGI et al., 2003 WANG et al., 2003; WOLTERS et al., 2004; VAN RUIJVEN; DE GROOT; SMOORENBURG, 2004; VAN RUIJVEN et al., 2005b). Em ratos, o trabalho de Campbell et al.(1999) avaliou apenas as alterações da estria vascular. Lynch et al.(2005) mostraram o mesmo padrão de lesão de células ciliadas externas como descrito em cobaias, embora em preparações de superfície.

Em todos os estudos avaliados as doses mais altas da dexametasona empregadas eram responsáveis pela proteção funcional ou morfológica, diferente do encontrado neste estudo onde a dose mais baixa (15 mg/kg) protegeu contra a ototoxicidade e a mais alta (20mg /kg), não. São necessários dados complementares, como a realização de imunohistoquímica, para justificar tal achado.

Neste estudo pode-se verificar que a lesão auditiva desencadeada pela cisplatina provém de estruturas cocleares, já que não houve um aumento significativo no intervalo I-V nos animais tratados. Resultado semelhante foi observado por Rebert,

Pryor e Frick (1984), bem como por Freitas et al.(2006). Entretanto, em hamsters, Church et al.(1995) acusaram prolongamento do intervalo I–IV com a dose de 15 mg/kg de CDDP, sugerindo lesão retrococlear por essa droga.

6.4 Considerações finais

Experimentos de ototoxicidade por cisplatina e otoproteção são amplamente encontrados na literatura pela necessidade de se estudar os mecanismos envolvidos e pela possibilidade de poder utilizar essa droga como opção terapêutica com menos efeitos adversos.

Este estudo teve o objetivo de contribuir com as discussões relacionadas ao tema, envolvendo parâmetros de análise funcionais e morfológicos.

Observou-se que a dose de 32 mg/kg de CDDP em ratos foi capaz de desencadear lesão pelos os parâmetros estudados, como também se mostrou passível de utilização nos estudos de otoproteção. Cinco dias de estudo foram suficientes para as análises de ototoxicidade e otoproteção, uma vez que houve lesão coclear significativa com mortalidade baixa dos animais. A dexametasona se mostrou parcialmente protetora na dose de 15 mg/kg/dia, sendo uma medicação de fácil acesso e que pode contribuir para a redução dos efeitos colaterais da cisplatina.

Por fim, espera-se que o modelo do presente estudo contribua para experimentos posteriores e uma possível utilização da dexametasona sistêmica como droga otoprotetora nos pacientes que necessitam utilizar a cisplatina como quimioterápico, já que é uma droga amplamente disponível e com efeitos colaterais bem estabelecidos.

7 CONCLUSÕES

- A dexametasona não protegeu contra a toxicidade sistêmica da cisplatina através da avaliação do peso.
- A utilização da dexametasona na dose de 15mg/kg/dia protegeu parcialmente contra a ototoxicidade induzida por cisplatina em ratos, através da avaliação pelo PEATE.
- A cisplatina demonstrou causar lesão auditiva proveniente de estruturas cocleares, através da manutenção do intervalo I-V.
- A análise histológica demonstrou que a utilização da dexametasona na dose de 15mg/kg/ dia protegeu de forma significativa a estria vascular, mas não as células ciliadas externas.
- A análise histológica demonstrou que a utilização da dexametasona na dose de 20mg/kg/ dia protegeu de forma significativa a estria vascular, mas não as células ciliadas externas.

REFERENCIAS

ABRAHAM, E. Nuclear factor-kappa B and its role in sepsis-associated organ failure. **J. Infect. Dis.**, v.187, p.364–369, 2003.

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.

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

AUPHAN, N. et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through inducing of I kappa B synthesis. **Science**, v.270, p.286-290, 1995.

BALDWIN, A.S.J.R. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annu. Rev. Immuno l.**, v.14, p.649–683, 1996.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, v.336, p.1066–1071, 1997.

BIRD, P.A. et al. Intratympanic versus intravenous delivery of methylprednisolone to cochlear perilymph. **Otol Neurotol.**, v.28,p. 1124-1130, 2007.

BOKEMEYER, C.; BERGER, C.C.; HARTMANN, J.T. et al. Analysis of risk factors for cisplatin-induced ototoxicity in patients with testicular cancer. **Br. J. Cancer**, v.77, p.1355–1362, 1998.

BORTNER, C.D.; CIDLOWSKI, J.A. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. **Biochem. Pharmacol.**, v.56, p.1549–1559, 1998.

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. Oncol.**, v.30, p. 2408–2417, 2012.

BUHRER, C.; WEINEL, P.; SAUTER, S. Acute onset deafness in a 4-year-old girl after a single infusion of cis-platinum. **Pediatr. Hematol. Oncol.** v. 7, p.145–148, 1990.

CALLEJO, A. et al. Cisplatin-induced ototoxicity: effects, mechanisms and protection strategies. **Toxics**, v.3, p.268-293, 2015.

CAMPBELL, K.C.M. et al. D- Methionine provides excellent protection from cisplatin ototoxicity in the rat. **Hear. Res.**, v.102, p. 90-98, 1996.

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

CAMPBELL, K.C.; MEECH, R.P.; RYBAK, L.P.; HUGHES, L.F. The effect of D-methionine on cochlear oxidative state with and without cisplatin administration: mechanisms of otoprotection. **J. Am. Acad. Audiol.**, v.14, p.144–156, 2003.

CAMPBELL, K.C. et al. Prevention of noise- and drug-induced hearing loss with D-methionine. **Hear. Res.**, v.226, p.92–103, 2007.

CARDINAAL, R.M. et al. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino pig cochlea. **Hear. Res.**, v.144, p. 135–146, 2000a.

_____. Cisplatin-induced ototoxicity: morphological evidence of spontaneous outer hair cell recovery in albino guinea pig? **Hear. Res.**, v. 144, p. 147-156, 2000b.

_____. Histological Effects of co-administration of an ACTH₄₋₉ analogue, ORG 2766, on cisplatin ototoxicity in the albino guinea pig. **Hear. Res.**, v. 144, p. 157-167, 2000c.

CARONIA, D. et al. Common variations in ERCC2 are associated with response to cisplatin chemotherapy and clinical outcome in osteosarcoma patients. **Pharmacogenomics J.**, v. 9, p.347–353, 2009.

CHEN, W. C.; JACKSON, A.; BUDNICK, A.S. et al. Sensorineural hearing loss in combined modality treatment of nasopharyngeal carcinoma. **Cancer**, v.106, p.820–829, 2006.

CHOE, W.T.; CHINOSORN VATANA, N.; CHANG, K.W. Prevention of cisplatin ototoxicity using transtympanic N-acetylcysteine and lactate. **Otol. Neurotol.**, v.25, p.910–915, 2004.

CHURCH, M. W.; KALTENBACH, J. A.; BLAKLEY, B. W.; BURGIO, D. L. The comparative effects of thiosulfate of sodium, diethyldithiocarbamate, fosfomycin and WR-2721 on ameliorating cisplatin-induced ototoxicity. **Hear. Res.**, v. 86, n. 1-2, p. 195-203, 1995.

CLERIC, W.J.; DIMARTINO, D.L.; PRASAD, M.R. Direct effects of reactive oxygen species on cochlear outer hair cell shape *in vitro*. **Hear Res.**, v.84, p.30–40, 1995.

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

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.

DEEGAN, P.M.; PRATT, I.S.; RYAN, M.P. The nephrotoxicity, cytotoxicity and renal handling of cisplatin-methionine complex in male Wistar rats. **Toxicology** , v.98, p.1–14, 1994.

DE GROOT, J.C.M.J.; HAMERS, F.P.T.; GISPEN, W.H.; SMOORENBURG, G.F. Co-administration of the neurotropic ACTH₍₄₋₉₎ analogue, ORG 2766, may reduce the cochleotoxic effects of cisplatin. **Hear. Res.**, v.106, p. 9–19, 1997.

DICKEY, D.T.; WU, Y.J.; MULDOON, L.L.; NEUWELT, E.A. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and *in vivo* levels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.314, p.1052–1058, 2005.

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.

DOYLE, K.J. et al. Intratympanic steroid treatment: a review. **Otol Neurotol.**, v.25, p.1034-1039, 2004.

EASTMAN, A. Cross-Linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. **Chem. Biol. Interact.** ,v.61, p.241–248,1987.

EKBORN, A.; LAURELL, G.; JOHNSTROM, P. D-Methionine and cisplatin ototoxicity in the guinea pig: D-methionine influences cisplatin pharmacokinetics. **Hear. Res.**, v.165, p.53–61,2002.

EKBORN, A.; LINDBERG, A.; LAURELL, G. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.51, p.36–42, 2003.

EKBORN, A. et al. High-Dose cisplatin with amifostine: Ototoxicity and pharmacokinetics. **Laryngoscope**, v.114, p.1660–1667,2004.

EL-KHATEEB, M. et al. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. **J. Inorg. Biochem.** v.77, p.13–21, 1999.

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

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.

FETONI, A.R. et al. Protective effects of alpha-tocopherol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity. **Acta Otolaryngol**, v. 124, p. 421-442, 2004.

FRAM, R.J. Cisplatin and platinum analogues: recent advances. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 4, p.1073-1079, 1992.

FREITAS, M.R. **Caracterização morfofuncional da ototoxicidade por cisplatina em ratos: avaliação do papel da apoptose e da otoproteção por amifostina**. 2006. 169f. 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. Light microscopy study of cisplatin-induced ototoxicity in rats. **The Journal of Laryngology & Otology**, v. 123, p.590-597, 2009c.

GANDARA, D.R. et al. Cisplatin chemoprotection and rescue: pharmacologic modulation of toxicity. **Semin Oncol**, v. 18, p. 49-55, 1991.

GARCÍA-BERROCAL, J. et al. The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. **Br. J. Pharmacol.**, v.152, p.1012–1020, 2007.

GHOSH, S. et al. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Rev. Immunol.**, v. 16, p.225-260, 1998.

GREGGI, A.L.M. et al. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose -dependent study. **Pharmacol Res**, v.41, p. 405-411, 2000.

GUHA, M. et al. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. **Blood**, v. 98, p.1429-1439, 2001.

HAMERS, F.P.T. et al. Cisplatin ototoxicity involves organ of Corti, stria vascularis and spiral ganglion: Modulation by alpha-MSH and ORG 2766. **Audiol. Neurootol.**, v.8, p. 305–315, 2003.

HAMID, M.; TRUNE, D. Issues, indications, and controversies regarding intratympanic steroid perfusion. **Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.16, p.434–440, 2008.

HATZOPOULOS, S. et al. Ototoxic effects of cisplatin in a Sprague-Dawley rat animal model as revealed by ABR and transiently evoked otoacoustic emission measurements. **Hear. Res.**, v.170, p.70-82, 2002.

HENRY, K. R. Auditory Brainstem volume-conducted responses: origins in laboratory mouse. **J. Am. Audit. Soc.**, v. 4, p. 173-178, 1979.

HERR, I. et al. Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. **Cancer Res.**, v.63, p. 3112-3120, 2003.

HILL, G. W. et al. Cisplatin-induced ototoxicity: effect of intratympanic dexamethasone injections. **Otol Neurotol.**, v.29, p. 1005-1011, 2008.

HYPPOLITO, M.A. et al. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina em cobaias albinas por emissões otoacústicas produzidas por distorção e microscopia eletrônica de varredura. **Rev Bras de Otorrinol.**, v. 71, n. 3, p. 268-273, 2005.

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

HORIE, R.T. et al. Stealth-nanoparticle strategy for enhancing the efficacy of steroids in mice with noise-induced hearing loss. **Nanomed**, v.5, p. 1331-1340, 2010.

HOSPERS, G.A.; EISENHAUER, E.A.; DE VRIES, E.G. The sulthydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio- and chemoprotective agents. A review, indications for use and prospects. **Br. J. Cancer**, v.80, p.629–638, 1999.

HUANG, E.;THE, B.S.; STROTHER, D.R. et al. Intensity-modulated radiation therapy for pediatric medulloblastoma: early report on the reduction of ototoxicity. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.52, p.599–605, 2002.

HUANG, Z.; TIMERBAEV, A.R.; KEPPLER, B.K.; HIROKAWA, T. Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis techniques. **J. Chromatogr.**, v.1106, p.75–79, 2006.

HUGHES, F.M., JR.; BORTNER, C.D.; PURDY, G.D.; CIDLOWSKI, J.A. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.30567–30576, 1997.

HUGHES, A.L. et al. Dexamethasone otoprotection in a multidose cisplatin ototoxicity mouse model. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 150, p. 115-120, 2014.

HUSSAIN, A.E. et al. Assesment of protective effects of amifostine against cisplatin-induced toxicity. **J Otolaryngol**, v.32, p. 294-297, 2003.

IKEDA, K.; SUNOSE, H.; TAKASAKA, T. Effects of free radicals on the intracellular calcium concentration in the isolated outer hair cell of the guinea pig cochlea. **Acta. Otolaryngol.**, v.113, p.137–141, 1993.

JEONG, H.J.; KIM, S.J.; MOON, P.D. Antiapoptotic mechanism of cannabinoid receptor 2 agonist on cisplatin-induced apoptosis in the Hel-OC1 auditory cell line. **J. Neurosci. Res.**, v.85, p.896–905, 2006.

JONES, M.M.; BASINGER, M.A.; BEATY, J.A.; JOLSCHER, M.A. The relative nephrotoxicity of cisplatin, cis-Pt (NH₃)₂(guanosine)₂²⁺, and the hydrolysis product of cisplatin in the rat. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.29, p.29–32, 1991.

JUDKINS R. F.; LI, H. Surgical anatomy of the rat middle ear. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 117, p. 438-447, 1997.

KALKANIS, J.G.; WITHWORTH, C.; RYBAK, L.P. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. **Laryngoscope**, v.114, p.538–542, 2004.

KALTENBACH, J. et al. Comparison of five agents in protecting the cochlea against the ototoxic effects of cisplatin in the hamster. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.117, p. 493–500, 1997.

KAMIMURA, T.; WHITWORTH, C.A.; RYBAK, L.P. Effect of 4-methylthiobenzoic acid on cisplatin-induced ototoxicity in the rat. **Hear. Res.**, v.131, p. 117–127, 1999.

KARASAWA, T. et al. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. **Toxicol Let**, v.237, p. 219-227, 2015.

KELLAND, L.R. et al. Platinum – based drugs in cancer therapy. **Totowa, NJ:** Humana Press, 2000.

KIM, H. et al. Nicotinamide adenine dinucleotide: an essential factor in preserving hearing in cisplatin-induced ototoxicity. **Hea Reser**, v.326, p. 30-39, 2015.

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.

KOLINSKY, D.C. et al. late onset hearing loss: a significant complication of cancer survivors treated with Cisplatin containing chemotherapy regimens. **J Pediatr Hematol Oncol**, v.32, p. 119-123, 2010.

KOMUNE,S.; ASAKUMA,S.; SNOW,J.B.J. Pathophysiology of the ototoxicity of *cis*-diamminedichloroplatinum. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.89, p. 275–282, 1981.

KONISHI,T.;GUPTA,B.N.; PRAZMA,J. Ototoxicity of *cis*-dichlorodiammine platinum (II) in guinea pigs. **Am. J. Otolaryngol.**, v.4, p. 18–26, 1983.

KOPELMAN, J. et al. Ototoxicity of high-dose cisplatin by bolus administration in patients with advanced cancer and normal hearing. **Laryngoscope**, v. 98, p.858–864, 1988.

LAURELL, G. et al. Blood-perilymph barrier and ototoxicity: an in vivo study in rat. **Acta Otolaryngol.**, v.120, p. 796-803, 2000.

LEBWOHL, D.; CANETTA, R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. **Eur. J. Cancer**, v. 34, n. 10, p. 1522-1534, 1998.

LEE, J.E. et al. Role of reactive radicals in degeneration of the auditory system of mice following cisplatin treatment. **Acta. Otolaryngol.**, v.124, p.1131–1135, 2004.

LEITAO, D.J. et al. Quantification of sodium thiosulphate protection on cisplatin-induced toxicities. **J Otolaryngol**, v. 32, p.146-150, 2003.

LEWIS, T.S. et al. Signal transduction through MAP kinase cascade. **Adv. Cancer Res.**, v.74, p. 49-139, 1998.

LI, G.; FRENZ, D.A.; BRAHMBLATT, S. Round window membrane delivery of L-methionine provides protection from cisplatin ototoxicity without compromising chemotherapeutic efficacy. **Neurotoxicology** , v.22, p.163–176, 2001.

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

LIANG, F.; SCHULTE, B.A.; QU, C.; HU, W.; SHEN, Z. Inhibition of the calcium- and voltage-dependent big conductance potassium channel ameliorates cisplatin-induced apoptosis in spiral ligament fibrocytes of the cochlea. **Neuroscience**, v.135, p.263–271, 2005.

LUI, H.J.; DONG, M.M.; CHI, F.L. Dexamethasone pharmacokinetics in Guinea pig inner ear perilymph. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**, v.68, p.93-98, 2006.

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.

MARTINS, M.J.B. **Efeito do pré-condicionamento isquêmico à distância na ototoxicidade em ratos induzida por cisplatina.** 2015. 83f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

McKEAGE, M.J. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. **Drug Saf.**, v.13, p.228-244, 1995.

McWHINNEY, S.R.; GOLDBERG, R.M.; MCLEOD, H.L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Mol. Cancer Ther.**, v.8, p. 10–16, 2009.

MELTSER, I. et al. Protecting the auditory system with glucocorticoids. **Hear. Res.**, v.281, p.47-55, 2011.

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

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.

MUKHERJEA, D. et al. Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity. **Pharmacogenomics**, v.12, p. 1039-1053, 2011.

MURPHY, D. et al. Intratympanic dexamethasone to prevent cisplatin ototoxicity: a guinea pig model. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 145, p. 452-457, 2011.

NAKAI, Y.; KONISHI, K.; CHANG, K. C.; OHASHI, K.; MORISAKI, N.; MINOWA, Y.; MORIMOTO, A. Ototoxicity of the anticancer drug cisplatin. An experimental study. **Acta Otolaryngol. (Stockh.)**, v.93, p. 227–232, 1982.

O'LEARY, S. J.; KLIS, S. F. L.; DE GROOT, J. C. M. J.; HAMERS, F. P. T.; SMOORENBURG, G. F. Perilymphatic application of cisplatin over several days in albino guinea pigs: dose dependency of electrophysiological and morphological effects. **Hear. Res.**, v. 154, p. 135-145, 2001.

PAKSOY, M. et al. The protective effects of intratympanic dexamethasone and vitamin E on cisplatin-induced ototoxicity are demonstrated in rats. **Med Oncol**, v. 28, p. 615-621, 2011.

PARNES, L.S.; SUN, A.; FREEMAN, D.J. Corticosteroid Pharmacokinetics in the inner ear fluids: An animal study followed by clinical application. **Laryngoscope**, v.109S, p.1–17, 1999.

PREVIATI, M.; LANZONI, I.; ASTOLFI, L. Cisplatin cytotoxicity in organ of Corti derived immortalized cells. **J. Cell. Biochem.**, v.101, p.1185–1197, 2007.

PIGEOLET, E. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. **Mech. Ageing Dev.**, v.51, p.283–297, 1990.

REBERT, C.S. et al. Effects of vincristine, maytansine and cisplatin on behavioral and electrophysiological indices of neurotoxicity in the rat. **J. Appl. Toxicol**, v.4, n.6,p.333-338, 1984.

REDDEL, R.R.; KEFFORD, R.F.; GRANT, J.M.; COATES, A.S.; FOX, R.M. Ototoxicity in patients receiving cisplatin: importance of dose and method of drug administration. **Cancer Treat. Rep.**, v.66, p. 19–23, 1982.

ROSENBERG, B.H.; CAVALIERI, L.F. Template deoxyribonucleic acid and the control of replication. **Nature**, v. 206, p 999- 1001, 1965.

ROSS, C.J.D.; KATZOV-ECKERT, H.; DUBE, M.P. et al. Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin therapy. **Nat. Genet.**, v.41, p.1345–1349, 2009.

RYBAK, L.P. et al. Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. **Laryngoscope**, v.109, p. 1740-1744, 1999.

RYBAK, L.P.; KELLY, T. Ototoxicity: Bioprotective mechanisms. **Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.** , v.11, p.328–333, 2003.

RYBAK, L.P.; WHITWORTH, C.A. Ototoxicity: therapeutic opportunities. **Drug Discovery Today**, v.10, p. 1313-1321, 2005.

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

RYBAK, L.P.;MUKHERJEA, D. Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity. **Pharmacogenomics**, v. 12, p.1039-1050, 2011.

SALEHI, P. et al. Attenuation of cisplatin ototoxicity by otoprotective effects of nanoencapsulated curcumin and dexamethasone in a guinea pig model. **Otology neurotology**, v.35, p.1131-1139, 2014.

SALIN, A. et al. The protective effect of dexamethasone and lactate against cisplatin-induced ototoxicity. **Turk J Med Sci**, v. 41, p. 467-474, 2011.

SCHWEITZER, V.G. Cisplatin-induced ototoxicity: The effect of pigmentation and inhibitory agents. **Laryngoscope**, v.103, p. 59, 1993.

SERGI, B.; FERRARESI, A.; TROIANI, D.; PALUDETTI, G.; FETONI, A. R. Cisplatin ototoxicity in the guinea pig: vestibular and cochlear damage. **Hear. Res.**, v. 182, p. 56-64, 2003.

SHEN, D.W.; POULIOT, L.M.; HALL, M.D.; GOTTESMAN, M.M. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic change. **Pharmacol. Rev.**, v.64, p. 706–721, 2012.

SHEN, J. et al. Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. **Life Sci.**, v.77, p. 1502-1515, 2005.

SLUYTER, S. et al. Alterations in the stria vascularis in relation to cisplatin ototoxicity and recovery. **Hearing Research**, v. 185, p.49-56, 2003.

SO, H.; KIM, H.; LEE, J.H. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.** v.8, p.338–355, 2007.

SMOORENBURG, G. F.; DE GROOT, J. C. M. J.; HAMERS, F. P. T.; KLIS, S. F. L. Protection and spontaneous recovery from cisplatin-induced hearing loss. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 28, p. 192-210, 1999.

SOCKALINGAM, R. et al. Effect of high-dose cisplatin on auditory brainstem responses and otoacoustic emissions in the laboratory animals. **Am. J. Otol.**, v.21, p.521-527, 2000.

SUN, J.; LIU, Y.; KONG, W.; JIANG, P.; JIANG, W. *In vitro* permeability of round window membrane to transforming dexamethasone with delivery vehicles- a dosage estimation. **Chin. Med. J.**, v.120, P.2284–2289, 2007.

SUN, C. et al. Dexamethasone loaded nanoparticles exert protective effects against cisplatin-induced hearing loss by systemic administration. **Neuroscience Letters**, v.619, p. 142-148, 2016.

TANAKA, F. Round window Ph manipulation alters the ototoxicity of systemic cisplatin. **Hear. Res.**, v. 187, p. 44-50, 2004.

TOKGOZ S.A. et al. Protective effects of vitamin E, B and C and L-carnitine in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity in rats. **The Journal of Laryngology and otology**, v. 126, p. 464-469, 2012.

TRESKES, M.; NIJTMANS, L.G.; FICHTINGER-SCHEPMAN, A.M.; VAN DER VIJGH, W.J. Effects of the modulating agent WR2721 and its main metabolites on the formation and stability of cisplatin-DNA adducts *in vitro* in comparison to the effects of thiosulphate and diethyldithiocarbamate. **Biochem. Pharmacol.** , v.43, p.1013–1019, 1992.

VAN DEN BERG, J.H.; BEIJNEN, J.H.; BALM, A.J.M.; SCHELLENS, J.H.M. Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. **Cancer Treat. Rev.**, v. 32, p.390–397, 2006.

VAN RUIJVEN, M. W. M. et al. Time sequence of degeneration pattern in the guinea pig cochlea during cisplatin administration. A quantitative histological study. **Hear. Res.**, v.197, p. 44–54, 2004.

VAN RUIJVEN, M. W. M.; DE GROOT, J. C. M. J.; HENDRIKSEN, F.; SMOORENBURG, G. F. Immunohistochemical detection of platinated DNA in the cochlea of cisplatin-treated guinea pigs. **Hear. Res.**, v. 203, p. 112-121, 2005a.

VAN RUIJVEN, M. W. M.; DE GROOT, J. C. M. J.; KLIS, S. F. L.; SMOORENBURG, G. F. The cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. **Hear. Res.**, v. 205, p. 241-248, 2005b.

WADA, T.; PENNINGER, J.M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. **Oncogene**, v.23, p.2838-2849, 2004.

WAISSBLUTH, S. et al. Systemic dexamethasone for the prevention of cisplatin-induced ototoxicity. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v.270, p.1597-1605, 2013.

WANG, J.; LADRECH, S.; PUJOL, R. Caspase inhibitors, but not c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss. **Cancer Res.**, v.69, p.217–224, 2004.

WATANABE, K.; INAI, S.; JINNOUCHI, K. Expression of caspase-activated deoxyribonuclease (CAD) and caspase-3 (CPP32) in the cochlea of cisplatin (CPPD)-treated guinea pigs. **Auris. Nasis. Larynx**, v.30, p.219–225, 2003.

WIDMANN, C. et al. Mitogen-activates protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol. Rev.**, v.79, p.143-180, 1999.

WOLTERS, F. L. C. et al. Perilymphatic application of α -melanocyte stimulating hormone ameliorates hearing loss caused by systemic administration of cisplatin. **Hear. Res.**, v. 189, p. 31-40, 2004.

YAO,X.; PANICHPISAL,K.; KURTZMAN,N.; NUGENT, K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. **Am. J. Med. Sci.**, v. 334 , p. 115–124, 2007.

ZHANG, C. et al. Glucocorticoid-mediated inhibition of chemotherapy in ovarian carcinomas. **Int J Oncol.**, v.28, p.551-558, 2006.

APÊNDICE A - Peso dos animais nos diversos grupos.

GRUPO 01		DIA DO EXPERIMENTO				
C		D0	D1	D2	D3	D4
RATO						
01		222	225	232	238	244
02		214	215	220	220	226
03		216	225	227	231	237
04		235	237	242	250	251
05		232	235	235	237	238
06		211	210	215	215	214
GRUPO 02		DIA DO EXPERIMENTO				
C+ CDDP		D0	D1	D2	D3	D4
RATO						
01		228	220	218	200	197
02		219	210	207	197	189
03		244	240	215	200	211
04		235	227	215	208	197
05		243	237	224	210	205
06		238	230	225	218	217
07		252	247	238	222	220
08		214	206	197	190	184
09		208	202	196	180	173
10		206	202	193	187	180
11		211	203	203	199	199

GRUPO 03
CDDP+D15

DIA DO EXPERIMENTO

	D0	D1	D2	D3	D4
RATO					
01	200	180	169	157	142
02	210	195	187	171	153
03	226	205	184	170	167
04	214	201	185	172	162
05	215	199	187	178	X
06	212	201	182	169	158
07	219	200	185	180	171
08	227	202	184	169	157
09	231	208	197	189	180
10	227	210	199	175	167
11	198	175	160	153	X

GRUPO 04
CDDP+D20

DIA DO EXPERIMENTO

	D0	D1	D2	D3	D4
RATO					
01	230	208	195	189	184
02	235	215	200	194	190
03	232	222	215	208	202
04	215	199	180	174	170
05	229	215	201	192	181
06	216	201	189	170	166
07	204	192	180	165	153

GRUPO 03
CDDP+D15

DIA DO EXPERIMENTO

	D0	D4
RATO		
01	5	5
02	5	20
03	5	5
04	5	15
05	5	X
06	5	5
07	5	10
08	5	10
09	5	10
10	5	10
11	5	X

GRUPO 04
CDDP+D20

DIA DO EXPERIMENTO

	D0	D4
RATO		
01	5	25
02	5	5
03	5	30
04	5	30
05	5	20
06	5	20
07	5	20

APÊNDICE C - Análise da microscopia óptica da estria vascular (EV) e das células ciliadas externas (CCE) quanto a presença (+) ou ausência (-) de lesões nos diversos grupos.

GRUPO 01

C

	EV	CCE
RATO		
01	-	-
02	-	-
03	-	-
04	-	-
05	-	-
06	-	-

GRUPO 02

C+CDDP

	EV	CCE
RATO		
01	+	-
02	-	+
03	+	-
04	+	-
05	MÁ INCLUSÃO	
06	+	+
07	+	+
08	-	+
09	+	+
10	-	+
11	-	+

GRUPO 03

CDDP+D15

	EV	CCE
RATO		
01	+	+
02	-	+
03	-	+
04	-	+
05	X	
06	MÁ INCLUSÃO	
07	-	-
08	-	-
09	+	+
10	-	+
11	X	

GRUPO 04

CDDP+D20

	EV	CCE
RATO		
01	MÁ INCLUSÃO	
02	-	+
03	+	+
04	MÁ ICLUSÃO	
05	+	+
06	-	+
07	+	+

APÊNDICE D - Intervalo I-V no início e no fim do experimento nos grupos em mseg.

GRUPO 01	D0	D4
C		
01	3,2	3,3
02	3,3	3,3
03	3,2	3,5
04	3,1	3,3
05	3,2	3,2
06	3,5	3,6

GRUPO 02	D0	D4
C+CDDP		
01	3,0	3,2
02	3,3	3,5
03	3,1	3,3
04	3,5	3,5
05	3,1	3,4
06	3,0	3,3
07	3,2	3,3
08	3,5	3,7
09	3,3	3,5
10	3,2	3,5
11	3,0	3,2

GRUPO 03	D0	D4
CDDP+D15		
01	3,5	3,5
02	3,3	3,5
03	3,0	3,1
04	3,1	3,2
05	3,0	X

06	3,1	3,3
07	3,0	3,1
08	3,3	3,3
09	3,1	3,5
10	3,2	3,3
11	3,2	X

GRUPO 04

CDDP+D20

	D0	D4
01	3,0	3,1
02	3,3	3,4
03	3,2	3,3
04	3,1	3,3
05	3,2	3,3
06	3,4	3,5
07	3,1	3,2