

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

## Ototoxicity and otoprotection in the inner ear of guinea pigs using gentamicin and amikacin: ultrastructural and functional aspects

Thomaz José Marra de Aquino<sup>1</sup>, José Antônio Aparecido de Oliveira<sup>2</sup>, Maria Rossato<sup>3</sup>

Palavras-chave: aminoglicosídeos/toxicidade, citoproteção, emissões otoacústicas espontâneas, microscopia eletrônica de varredura, orelha interna/lesões.

Keywords: aminoglycosides/toxicity, cytoprotection, otoacoustic emissions, spontaneous, inner ear/injuries.

### Resumo / Summary

A ototoxicidade ainda é um desafio para medicina. A descoberta dos mecanismos endógenos autoprotetores das células ciliadas externas associados a métodos de avaliação funcional e ultra-estrutural das mesmas abriu nova perspectiva no entendimento e controle destes mecanismos. **Objetivo:** O trabalho objetivou determinar se subdoses de gentamicina protegia contra ototoxicidade da amicacina baseado nestes mecanismos e determinar se a amplitude das emissões otoacústicas teria correlação com grau de integridade das células ciliadas. **Material e Método:** Estudo experimental. Utilizando 31 cobaias, administrou-se soro fisiológico, gentamicina e amicacina, isoladamente e associadas, via intramuscular, por 12, 30 e 42 dias. Pesquisa de emissões otoacústicas foi realizada no início e final do experimento, comparado com estudo da integridade coclear, por microscopia eletrônica. **Resultados:** Subdoses de gentamicina não protegeram a orelha interna contra toxicidade da amicacina; diminuições da amplitude das emissões otoacústicas apresentaram forte correlação com aumento de lesões das células ciliadas. **Conclusão:** Os achados contribuem para o entendimento dos mecanismos de ototoxicidade e otoproteção da orelha interna. A determinação da correlação entre amplitude de emissões e integridade celular tem grande importância no acompanhamento das lesões de células ciliadas, com possível aplicação no monitoramento de ototoxicidade por drogas em humanos.

Ototoxicity is still a challenge to medicine. The discovery of self-protecting endogenous mechanisms of the outer hair cells associated with their functional and ultra-structural assessment methods has opened new horizons in the understanding and controlling of these mechanisms. **Aim:** this paper aimed at establishing whether or not underdoses of gentamicin could protect the inner ear against the harmful effects of amikacin, based on these protection mechanisms and determine if the otoacoustic emission amplitudes could be associated with the level of hair cell integrity. **Materials and Methods:** Experimental study. We used 31 guinea pigs. They were injected with saline solution, gentamicin and amikacin, alone and in combinations -intramuscular injections - during 12, 30 and 42 days. The otoacoustic emissions were recorded in the beginning and at the end of the experiment, comparing it with the cochlear integrity study carried out by electron microscopy. **Results:** gentamicin underdoses did not protect the inner ear against amikacin toxicity; the reduction in otoacoustic emissions was strongly associated with an increase in hair cell lesions. **Conclusion:** these findings help understand inner ear otoprotection and ototoxicity. Establishing the correlation between the emissions amplitude an cell integrity plays an important role in the follow up of hair cell damage, with possible monitoring of ototoxicity caused by drugs in humans.

<sup>1</sup> Doutor Pela USP / FMRP, Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

<sup>2</sup> Livre-Docente Pela Universidade de São Paulo, Professor Titular do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

<sup>3</sup> Técnica Especializada Em Audiologia, Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Endereço para correspondência: Dr. Thomaz José Marra de Aquino - Rua Elias Alves Cunha 117 Bairro Cidade Jardim Patrocínio MG 38740-000.

E-mail: tjaquino@usp.br

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 26 de junho de 2007. cod. 4628  
Artigo aceito em 11 de agosto de 2007.

---

## INTRODUÇÃO

---

A ototoxicidade ainda é um grande desafio para medicina nos dias atuais. Não obstante o grande número de pesquisas que são realizadas sobre o tema pelos mais renomados pesquisadores e centros de pesquisa em todo o mundo e pelo gradual avanço no conhecimento da fisiopatologia da ototoxicose, ainda não se conseguiu o satisfatório controle sobre o processo lesivo da orelha interna provocado pelos ototóxicos, em seres humanos. A irreversibilidade da lesão em grande parte dos casos é o outro ponto crítico do processo de ototoxicidade, levando a um problema social importante em consequência do estabelecimento da surdez<sup>1,2</sup>.

Dentre as drogas ototóxicas, indubitavelmente os aminoglicosídeos são os mais largamente utilizados devido à sua alta eficácia antimicrobiana e baixo custo. Recentemente vários estudos vêm sendo desenvolvidos visando encontrar mecanismos de proteção da orelha interna contra estes agentes lesivos, mostrando resultados promissores e vislumbrando um caminho na direção da solução deste grave problema.

Uma nova linha de pesquisa que a cada dia ganha importância é a que estuda os mecanismos endógenos de proteção da orelha interna. Enzimas antioxidantes têm sido demonstradas, como: catalase, superóxido-dismutase, glutatona-peroxidase, glutatona-redutase, glutatona-S-transferase. Também a glutatona, um tripeptídeo presente em todas as células de mamíferos, tem mostrado ação protetora sobre as células ciliadas externas *in vitro* contra citotoxicidade<sup>3,4</sup>.

Recentemente descobriu-se que pequenas doses não-tóxicas de amicacina ou gentamicina, administradas durante um determinado período de tempo, como habituação, previamente a administração de doses ototóxicas do mesmo aminoglicosídeo utilizado na habituação, protege a cóclea do efeito lesivo dose-dependente desta droga, o que poderia ser explicado pelo desencadeamento destes mecanismos endógenos de autodefesa<sup>5,6</sup>. Nestes estudos, dentre os métodos de avaliação da orelha interna nas lesões induzidas por drogas, a microscopia eletrônica de varredura e as emissões otoacústicas têm se destacado por sua praticidade e fácil execução.

Contribuindo para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos de otoproteção na orelha interna contra ototoxicidade induzida por drogas, este trabalho foi desenvolvido com os objetivos específicos de determinar se subdoses de habituação de gentamicina também protege contra ototoxicidade por amicacina e determinar se a amplitude de resposta da emissão otoacústica produto de distorção é um método de correlação para avaliar o nível de integridade morfológica das células ciliadas externas, em cobaias.

---

## MATERIAL E MÉTODO

---

No estudo foram utilizadas 31 cobaias albinas macho. Das 62 cócleas, duas foram desprezadas por apresentarem problemas técnicos na preparação, sendo incluídas 60 cócleas no estudo. Escolhemos cobaias albinas como animal experimental pela facilidade de manejo, dissecação coclear e manipulação e ainda pela igual facilidade de infusão de drogas anestésicas e drogas em experimentação seja pela via intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea, quando comparados a outros animais experimentais.

Os cuidados seguiram as diretrizes do Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council<sup>7</sup>. O protocolo experimental seguiu ainda os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi submetido à análise e aprovação prévia da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob protocolo nº 086/2004.

### Critérios de Inclusão

Os animais foram selecionados no Biotério Central da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, através da presença do Reflexo de Preyer e peso variando entre 400 e 600 gramas. Após um repouso auditivo de 24 horas, os animais eram avaliados e submetidos à otoscopia externa. Os animais que apresentavam sinais de otite externa ou otite média aguda, cerume de difícil remoção, alterações inflamatórias do conduto auditivo externo ou mesmo conduto auditivo muito estreito para acomodar adequadamente a sonda do equipamento de emissões otoacústicas (EOA), eram descartados do experimento. Os que apresentavam rolha de cerume e tinham a mesma removida eram mantidos. Todos os animais incluídos eram então submetidos a uma triagem auditiva por emissão otoacústica produto de distorção (EOAPD) em cabine com isolamento acústico e sob anestesia com ketamina (65 mg/Kg). As cobaias que apresentavam EOAPD presentes nas duas orelhas eram selecionadas para o experimento e as demais excluídas.

### Grupos de Estudo

Para realização do estudo as cobaias foram divididas em quatro grupos:

**GRUPO 1 - CONTROLE - SORO FISIOLÓGICO:** Seis animais - doze cócleas, com administração de Soro Fisiológico 0,9% intramuscular em dose única diária, no mesmo volume correspondente à dose de amicacina para o peso da cobaia, durante 30 dias consecutivos.

**GRUPO 2 - CONTROLE - GENTAMICINA:** Cinco animais - dez cócleas, com administração intramuscular de Gentamicina na dose única diária de 10mg/kg/dia durante 30 dias consecutivos.

GRUPO 3 - ESTUDO - AMICACINA: Dez animais - dezoito cócleas, com administração intramuscular de Amicacina na dose única diária de 400mg/kg/dia, por doze dias consecutivos.

GRUPO 4 - ESTUDO - GENTAMICINA AMICACINA: Dez animais - vinte cócleas, com administração de intramuscular de Gentamicina na dose única diária de 10mg/kg/dia do 1º ao 30º dia, seguido pela de administração intramuscular de Amicacina na dose única diária de 400mg/kg/dia, por mais doze dias (31º ao 42º dia).

O uso de Gentamicina foi feito em dose considerada incapaz de provocar lesão significativa na orelha interna, baseado em estudo prévio de Maudonnet<sup>6</sup> e confirmado pelo nosso Grupo Controle 2. O objetivo do uso da mesma era promover apenas uma habituação das CCE previamente à exposição a uma droga potencialmente ototóxica - a amicacina.

O uso da amicacina foi feito em dose considerada potencialmente ototóxica, baseada em estudos prévios de Oliveira et al.<sup>5</sup> e Canedo<sup>8</sup> e confirmado pelos resultados do Grupo de Estudo 3. O objetivo do uso da mesma era testar um possível aumento da resistência das células ciliadas externas (CCE) à lesão provocada pela amicacina quando expostas a uma dose prévia de habituação realizado com subdoses de gentamicina, efeito este estudado no Grupo de Estudo 4.

#### Avaliação Funcional Auditiva

A avaliação funcional auditiva foi realizada através do Teste de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção, utilizando-se o Equipamento ILO 92 CAE System Otodynamics LTD. As cobaias eram sedadas com ketamina para serem submetidas aos testes. Antes da realização do registro das EOAPD eram submetidas à otoscopia para avaliação do conduto auditivo externo e membrana timpânica. Somente as cobaias com emissões otoacústicas (EOA) presentes foram incluídas no estudo.

No Grupo 1 (Controle com SF 0,9%), Grupo 2 (Controle com Gentamicina) e Grupo 3 (Amicacina), as EOAPD foram realizadas no 1º dia de administração e 1 dia após o término da administração das drogas ou solução salina. No Grupo 4 (Gentamicina Amicacina) as EOAPD foram realizadas no 1º dia de administração da Gentamicina, no 31º dia quando se interrompia o uso de gentamicina e iniciava-se o uso de Amicacina e no 43º dia, 24 horas após a última dose de amicacina, imediatamente antes do sacrifício. Neste estudo utilizamos intensidades iguais de 70 dB NPS. A intensidade do estímulo desencadeante pode variar numa faixa de 0 a 70 dB NPS e podem ser medidas na faixa de 500 a 8000Hz. A metodologia descrita é a mesma utilizado por Hyppolito et al.<sup>9,10</sup>.

Consideramos mais importante as EOA nas frequências mais agudas, que avaliam qualitativamente o estado funcional das células ciliadas externas na espira basal da

cóclea, onde predominam as lesões por ototoxicidade induzida por aminoglicosídeos. Foram consideradas as EOAPD como presentes ou ausentes. Foi também analisado a variação da amplitude das EOA entre o início e o fim do experimento e comparado com o resultado da análise morfológica da orelha interna em cada cobaia.

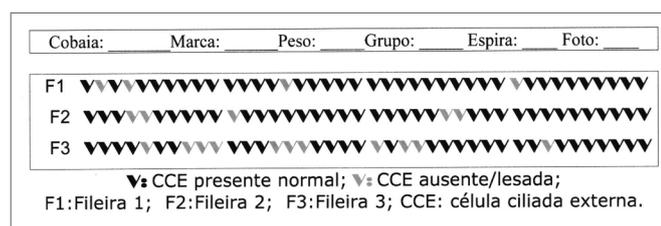
#### Avaliação Morfológica

No dia seguinte à última dose da droga ou solução salina administrada em cada um dos quatro grupos e, após realizada as EOAPD, os animais foram sacrificados com injeção letal de tiopental sódico (Thionembital®) intraperitoneal e as bulas imediatamente retiradas bilateralmente e abertas, expondo-se as cócleas. Em seguida, a abertura da bula timpânica, as cócleas eram preparadas para análise à microscopia eletrônica de varredura onde os principais passos foram: fixação através de banhos de glutaraldeído a 2,5%, solução tampão-fosfato 0,1M e tetróxido de ósmio; desidratação com etanol; secagem realizada no equipamento Bal-Tec CPD 030 através do método do ponto crítico, metalização das estruturas por vaporização de fina camada de ouro através do vaporizador Bal-Tec SCD 050 e fixação da cóclea em porta-espécime metálico (Figura 1).



Figura 1. Porta-espécime mostrando cóclea preparada para estudo em microscópio eletrônico.

Terminados os processos anteriores, as estruturas foram levadas para análise à microscopia eletrônica de varredura (MEV). O microscópio eletrônico utilizado foi o JEOL SCANNING MICROSCOPE - JSM 5200. A análise estrutural foi padronizada pelo estudo de um campo do terço médio das quatro espiras cocleares no aumento de 500 vezes. Uma vez que a varredura era feita na superfície do órgão de Corti, a imagem era congelada, fotografada e estudada através de um cocleograma (Figura 2). A condição de integridade ou não das células ciliadas foi definida pela análise dos estereocílios das mesmas. Células com estereocílios perfeitos eram consideradas íntegras. Células com estereocílios ausentes ou disformes eram consideradas lesadas<sup>5,9,10</sup>. As células ciliadas externas (CCE) normais e lesadas eram então contadas e tabuladas para análise estatística comparativa entre os grupos. O percentual de células normais e lesadas nas três primeiras espiras de cada cóclea era registrado para estudo nos diferentes grupos e posteriormente comparado com as emissões otoacústicas produto de distorção.



**Figura 2.** Cocleograma representando um campo de estudo das células ciliadas externas à microscopia eletrônica.

Quanto às EOAPD foi considerada a situação presente ou ausente. Foi também realizado um estudo estatístico para determinar possível correlação entre redução da amplitude das EOAPD e aumento da intensidade de lesão de CCE. A amplitude da resposta foi mensurada pela medida da intensidade média das EOAPD nas frequências de 2 kHz a 5 kHz estabelecidas nos exames inicial e final, comparadas e classificadas em 4 tipos, lembrando que todas as cobaias apresentavam EOA presentes no exame inicial. Os tipos de respostas determinados para estudo foram:

Resposta A: EOA presentes no exame final com amplitude (intensidade média de respostas) variando até 25% em relação ao exame inicial.

Resposta B: EOA presentes no exame final com redução de amplitude de respostas variando de mais de 25% até 50% em relação ao exame inicial.

Resposta C: EOA presentes no exame final com redução de amplitude de respostas variando mais que 50% em relação ao exame inicial.

Resposta D: Ausência de EOA no exame final.

Os quatro tipos de respostas foram comparados com os achados morfológicos (CCE normais e lesadas à

MEV) e a correlação entre estes dados analisada estatisticamente.

### Análise Estatística

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

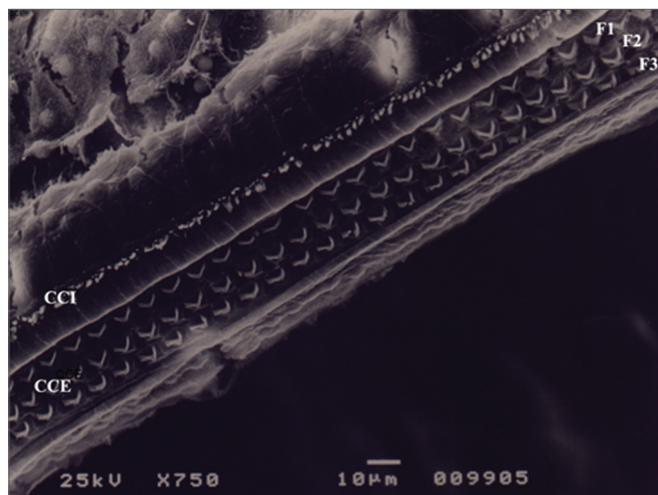
Para efeitos estatísticos foi considerada na comparação dos resultados e padronizada para análise a contagem das CCE normais e lesadas no terço médio das três primeiras espiras cocleares, em um campo com aumento de 500 vezes à microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## RESULTADOS

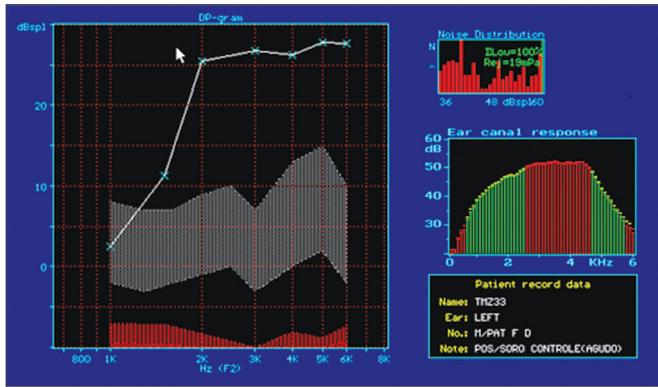
O Grupo 1 (Soro Fisiológico 0,9% - 30 dias) e o Grupo 2 (Gentamicina 10 mg/kg/dia - 30 dias) não apresentaram lesões significativas de células ciliadas externas à MEV em nenhuma cóclea. No Grupo 1, 100% das CCE mantiveram-se normais ao final do experimento, enquanto no Grupo 2, 94,2% das CCE também mantiveram-se normais. Na avaliação funcional, as EOAPD mantiveram-se presentes ao final dos 30 dias de experimento em ambas as orelhas em todas as cobaias incluídas nestes dois grupos (Figuras 3 e 4).

Nas cobaias do Grupo 3 (amicacina 12 dias) e do Grupo 4 (gentamicina 30 dias amicacina 12 dias) houve lesão de CCE em todas as cócleas examinadas nos dois grupos, em graus variados (Figura 5).

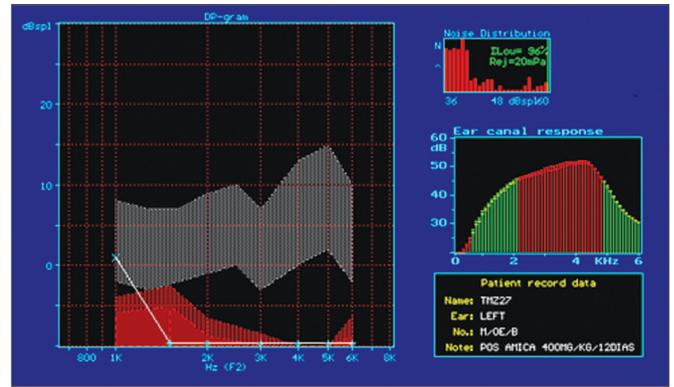
No Grupo 3 as lesões variaram de 4,3% a 96,9%, com média de 46,4% de lesão de CCE (53,5% de células normais) para as 18 cócleas do grupo. As lesões ocorreram predominantemente nas 2 primeiras espiras que, desta forma, apresentaram um menor número de CCE normais



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



**Figura 4.** Teste de EOAPD (emissões otoacústicas produto de distorção) normal de cobaia do Grupo 1.



**Figura 6.** Teste de EOAPD (emissões otoacústicas produto de distorção) de cobaia do grupo 3, mostrando ausência de respostas após aplicação da droga.

do que a espira 3. As lesões foram também mais intensas na 1ª fileira de CCE, seguida pela 2ª fileira.

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

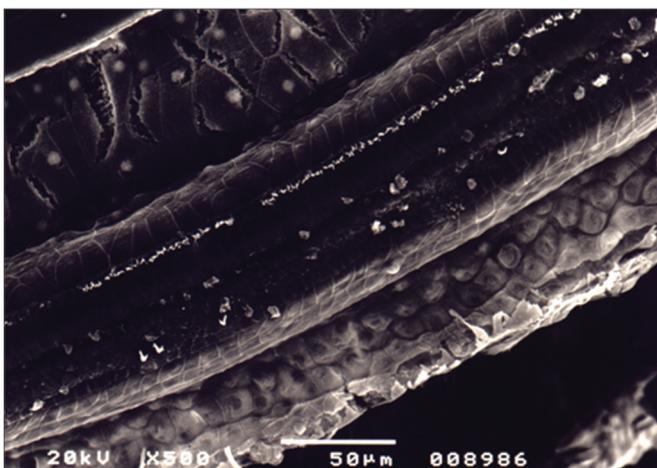
**Tabela 1.** Média de células ciliadas externas normais nos diferentes grupos.

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
100%	94,2%	53,5%	46,8%

Nos grupos 1 (soro fisiológico) e 2 (gentamicina), sem lesões morfológicas significativas, como já reportadas, as EOAPD estavam presentes e normais. No grupo 3 (n=18; lesão aguda por amicacina) elas estavam presentes em 11 orelhas, cuja média de CCE normais para estas 11 orelhas foi de 75,5%. Estavam ausentes ao fim do experimento em 7 orelhas, cuja média de CCE íntegras foi de 21,6% (Figura 6). Já no grupo 4 (n=20; uso de subdoses de gentamicina previamente a amicacina) as EOAPD estavam presentes em 12 orelhas, cuja média de CCE íntegras para estas orelhas foi de 68%. Estavam ausentes ao fim do experimento em 8 orelhas, cuja média de CCE íntegras foi de 18,9%. A relação entre CCE normal ou lesada e EOAPD presente ou ausente está demonstrada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Média de células ciliadas externas (CCE) normais nas orelhas com emissões otoacústicas (EOA) presentes e ausentes ao final do experimento, nos grupos 3 e 4.

	Média de CCE íntegras - Grupo 3.	Média de CCE íntegras - Grupo 4
Nas orelhas com EOA Presentes.	75,5%	68,0%
Nas Orelhas com EOA Ausentes	21,6%	18,9%

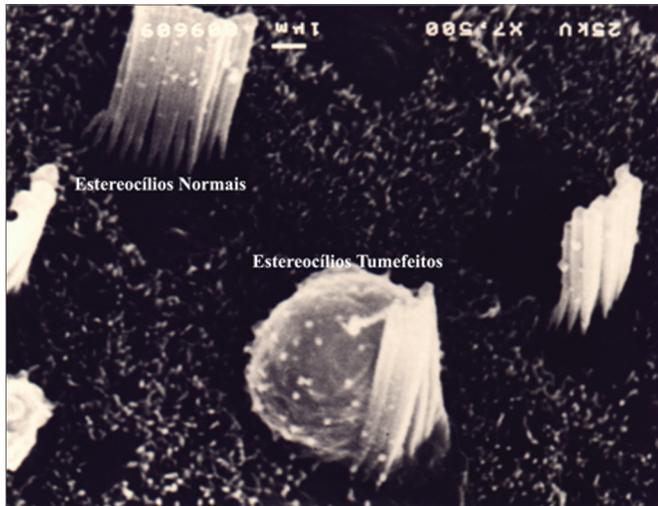


**Figura 5.** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do Grupo 3 mostrando lesão extensa, nas 3 fileiras, com ausência de quase todas as células ciliadas externas. Aumento de 500x.

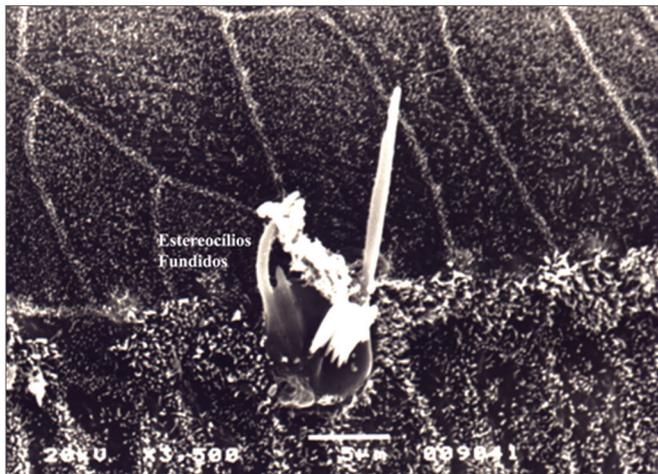
No total foram avaliadas 20.100 células ciliadas externas em 60 cócleas divididas nos 4 grupos, uma média de 335 CCE por cóclea.

Com relação à manutenção da arquitetura ciliar verificamos que nas células ciliadas externas lesadas os principais tipos de alterações encontradas foram: ausência de cílios (alteração mais comum), distorção do padrão em “v” para “w”, tumefação e fusão ciliar (Figuras 7 e 8).

As lesões ocorreram em padrão decrescente de gravidade da 1ª e 2ª espiras para o ápice e da 1ª fileira de CCE para a 3ª. Não houve diferença significativa entre o grau de lesão entre as duas primeiras espiras no nosso



**Figura 7.** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia mostrando estereocílios normais ao lado de célula com estereocílios alterados tumefeitos. Aumento de 7.500x.



**Figura 8.** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia mostrando estereocílios fundidos. Aumento de 3.500x.

trabalho. As células ciliadas internas (CCI), observadas, porém não consideradas para este estudo, apresentaram-se pouco lesadas nos grupos.

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

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

pela gentamicina contra a ototoxicidade da amicacina neste último grupo.

Para análise estatística, estes dois grupos (3 e 4) foram submetidos a um teste de distribuição de normalidade (Shapiro-Wilk Test). Neste teste o grupo 3 não apresentou distribuição normal. Por este motivo, no estudo estatístico, foi utilizado o teste não paramétrico U - Mann Whitney.

O teste comparativo entre CCE normais e lesadas nos grupos 3 e 4 encontrou  $p=0,501$  aceitando-se desta forma a hipótese da nulidade, ou seja, não havia diferença estatística entre os dois grupos (Tabela 3). Portanto a gentamicina não protegeu as CCE da cobaia contra a ação ototóxica da amicacina. Realizamos também uma análise estatística do resultado encontrado entre as espiras 1 nestes dois grupos e repetimos o teste para as espiras 2 e 3. Da mesma forma não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,65$  entre as espiras 1;  $p=0,83$  entre as espiras 2;  $p=0,36$  entre as espiras 3). Finalmente realizamos um teste estatístico comparativo entre presença ou ausência de EOAPD entre os Grupos 3 e 4. Para efeito de cálculo estatístico, todas as EOA presentes, ainda que com redução de amplitude em relação ao exame inicial, eram consideradas como presentes. Neste caso, como se tratava de variável categórica, utilizamos o teste do qui-quadrado. O resultamos foi:  $p= 0,793$  mostrando também não haver diferença entre os grupos 3 e 4 com relação a avaliação funcional das orelhas por EOAPD, coincidindo com a análise morfológica.

**Tabela 3.** Resultado da análise estatística referente ao número de CCE normais, ao final do experimento, entre os Grupos 3 e 4 \*.

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

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

Para determinarmos se havia correlação estatisticamente significativa entre a diminuição da amplitude/intensidade das respostas de EOAPD e o aumento do grau de lesão de CCE, aplicamos o cálculo do coeficiente não-paramétrico de Spearman, cujo resultado ( $r = 0,81$ ) mostrou haver correlação alta e significativa ( $p<0,001$ ) entre diminuição da amplitude/intensidade das EOA e diminuição do número de CCE normais na orelha interna da cobaia (Tabela 4).

A comparação dos valores morfológicos entre as categorias de respostas de EOA foi realizada através da aplicação do Teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrica) que mostrou  $X^2 = 39,75$  ( $p<0,001$ ), portanto, com diferença significativa entre os valores morfológicos dos diferentes tipos de respostas (Tabelas 5 e 6).

**Tabela 4.** Cálculo do Coeficiente de Correlação de Spearman entre Variação de Intensidade de EOA e Grau de Lesão de CCE.

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

**Tabela 5.** Teste de Kruskal-Wallis dos valores morfológicos entre as categorias de respostas de EOA.

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

Statistical Package for Social Sciences - Versão 10.0

**Tabela 6.** Teste de Kruskal-Wallis, b - análise estatística entre os tipos de respostas.

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

a. Teste Kruskal Wallis; b. Grupo Variável: Resposta EOA

Statistical Package for Social Sciences - Versão 10.0

**Tabela 7.** Teste Post Hoc de Dunn. Análise de significância entre as respostas de EOAPD e CCE normais.

VAR CCE normais

VAR RESP EOA	N	1	2	3
D	15	20,20		
C	18		45,86	
B	4			87,12
A	32			93,43

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

Para verificarmos quais diferenças eram significativas entre os diferentes tipos de respostas utilizamos o Teste Post Hoc de Dunn. Constatamos que a Resposta A possui valor equivalente a Resposta B e ambas são significativamente superiores às Respostas C e D, e que a Resposta C tem valores significativamente superiores aos de D:  $(A=B) > C > D$ , o que demonstra haver correlação entre a diminuição da amplitude das EOAPD e o aumento de lesão ou diminuição do número de CCE normais (Tabela 7).

## DISCUSSÃO

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

Dentre as drogas ototóxicas, os aminoglicosídeos são os mais estudados, seja por razões históricas ou por sua importância clínica<sup>11,12</sup>. Os inúmeros trabalhos de pesquisa sobre ototoxicidade utilizando estas drogas nos possibilitaram aprimorar o conhecimento sobre anatomofisiologia e bioquímica da orelha interna, sendo este o passo inicial para a descoberta de drogas menos tóxicas e meios de prevenção e proteção mais eficientes do Órgão de Corti.

Ainda segundo Oliveira e Bernal<sup>11</sup>, as lesões provocadas pelos aminoglicosídeos no órgão de Corti são predominantemente nas células ciliadas externas (CCE) e progridem da base para o ápice da cóclea. Nas espiras basais, a primeira fileira de CCE é também a primeira a ser lesada, seguindo-se para a segunda e terceira fileiras. Esta seqüência de lesões também coincide com a altura das CCE, sendo a espira basal a primeira a ser lesada, seguindo a segunda, terceira e por último as células apicais<sup>1</sup>. A estria vascular também pode estar envolvida, podendo haver mudança estrutural das células marginais<sup>11</sup>.

A identificação de mecanismos endógenos de autodefesa das células sensoriais do órgão de Corti, representado pelas enzimas de destoxificação e antioxidantes como a catalase, superóxido-dismutase e as glutatona-peroxidase, redutase e S-transferase e também a glutatona deu novo impulso às pesquisas sobre ototoxicidade e otoproteção, notadamente na proteção contra substâncias oxigênio-reativas<sup>13,14</sup>.

Recentemente foi demonstrado que pequenas doses de habituação (doses não-tóxicas) de um aminoglicosídeo administrado previamente à exposição a uma dose sabidamente ototóxica da mesma droga utilizada na habituação protege a cóclea contra o efeito lesivo desta. Este efeito foi comprovado para a amicacina<sup>5,8</sup> e para gentamicina<sup>6</sup>. A explicação inferida foi de que pequenas doses não-

tóxicas de um agente potencialmente ototóxico estimularia a cóclea a produzir substâncias endógenas de autodefesa de tal forma que quando ela recebesse a dose tóxica ela estaria melhor preparada para se defender, desta maneira conseguindo reduzir as lesões. Nestes estudos foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura para exame do Órgão de Corti após administração das drogas, associado ao estudo funcional por emissões otoacústicas (EOA).

O nosso estudo buscou pela primeira vez analisar, aos moldes destes últimos trabalhos, o efeito do uso de um aminoglicosídeo utilizado em doses não tóxicas de habituação, sobre a ação potencialmente lesiva de outro aminoglicosídeo que não o mesmo utilizado na habituação, sendo este o ponto divergente em relação às pesquisas realizadas pelos autores anteriormente citados. As drogas utilizadas em nossa pesquisa foram a gentamicina, um aminoglicosídeo predominantemente vestibulotóxico, como droga de habituação, e a amicacina, um droga predominantemente cocleotóxica, como agente lesivo agudo. A avaliação funcional foi realizada através do estudo por emissões otoacústicas produto de distorção, ao final do tratamento, seguindo a metodologia de trabalhos anteriores<sup>6,9</sup>. Na avaliação morfológica, as lesões nas células ciliadas externas eram identificadas pela ausência ou deformações de estereocílios, após análise à microscopia eletrônica de varredura, fotografadas, transferidas para um cocleograma, contadas e tabuladas.

Diferentemente das publicações anteriormente citadas, não encontramos no nosso trabalho diferença estatisticamente significativa entre o grupo que utilizou apenas amicacina (lesão aguda) e o grupo que utilizou gentamicina como habituação previamente a amicacina, tanto na análise geral da cóclea como na análise individualizadas das espiras 1, 2 e 3, comparativamente entre os dois grupos. A média de lesão de CCE foi de 46,5% (56,5% normais) para o Grupo 3 (tratado apenas com amicacina) e de 53,2% (46,8% normais) para o Grupo 4 (tratado com subdoses de gentamicina previamente à amicacina), o que estatisticamente não mostra diferença significativa ( $p=0,501$ ). Não houve, portanto, proteção pela gentamicina contra a ototoxicidade da amicacina. A análise individualizada de cada espira comparativamente entre os dois grupos também não mostrou diferença estatística significativa ( $p=0,656$  entre espiras 1;  $p=0,833$  entre espiras 2;  $p=0,364$  entre espiras 3). A explicação entendida pela divergência de resultados foi a combinação de drogas utilizadas. Ao utilizarmos a gentamicina como droga de habituação, sendo ela predominantemente vestibulotóxica, a mesma não teria conseguido estimular a orelha interna a produzir substâncias endógenas autoprotetoras em quantidade suficiente para se proteger contra as doses altamente lesivas da amicacina, predominantemente cocleotóxica, contra o órgão de Corti. Analisamos um total de 60 cócleas e 20.100 CCE (média de 335 CCE por cóclea).

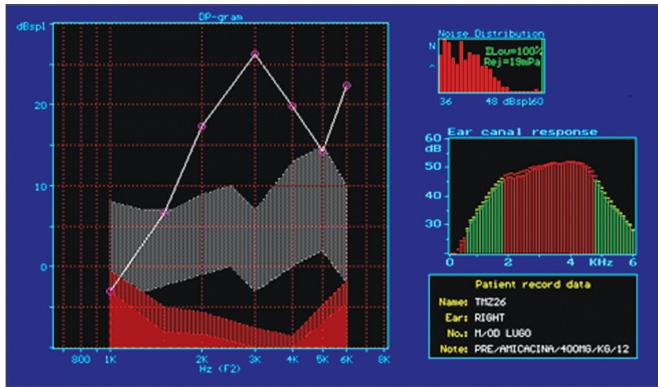
No nosso estudo, também diferentemente das publicações citadas, não houve predomínio de lesão na espira basal em relação à espira 2 nos Grupos 3 e 4. A explicação para tal achado deve-se ao alto grau de lesão apresentado nestes dois grupos já que à medida que progride a intensidade das lesões perde-se este padrão, havendo espiras com 100% de lesão das CCE nas 3 fileiras, chegando a acometer também, em alguns casos e em menor intensidade, as células ciliadas internas.

A análise morfológica mostrou que o tipo de lesão de CCE mais comum encontrado foi a ausência de estereocílios, seguido pela deformidade do mesmo (fusão e tumefação). Este achado coincide com aqueles descritos em outras publicações<sup>5,6,9</sup>.

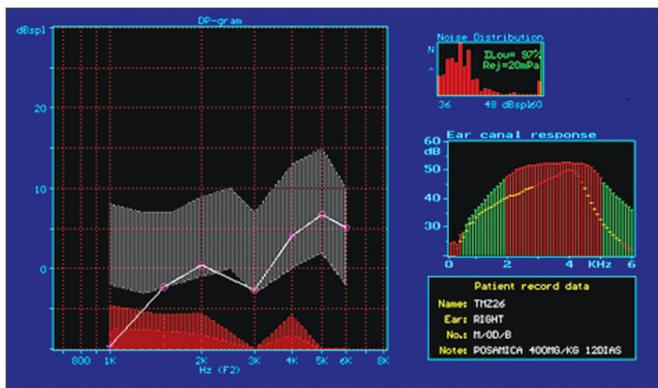
As EOAPD vêm sendo utilizadas como método de avaliação da função auditiva em cobaias há algum tempo<sup>9,15-18</sup>. Trata-se de método de fácil execução, baixo custo e alta reprodutibilidade. Adicionalmente, quando comparado com a análise morfológica do órgão de Corti, tem mostrando grande correlação.

O estudo funcional da orelha interna das cobaias pesquisadas por emissão otoacústica produto de distorção (EOAPD) de fato mostrou uma grande fidelidade com os achados morfológicos à microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nos grupos 1 (soro fisiológicos) e 2 (gentamicina), sem lesões morfológicas significativas, as EOAPD estavam presentes em todos os casos. No grupo 3 ( $n=18$ ; lesão aguda por amicacina) quando estavam presentes, a média de CCE normais foi de 75,5%. e quando ausentes a média de CCE íntegras reduziu para 21,6%. Já no grupo 4 ( $n=20$ ; uso de subdoses de gentamicina previamente a amicacina) quando as EOAPD estavam presentes a média de CCE íntegras foi de 68% para este subgrupo. Quando estavam ausentes a média de CCE íntegras reduziu para 18,9%.

Verificamos também que entre as cobaias que apresentavam EOAPD presentes ao término do experimento havia, em parte deste grupo, uma diminuição da amplitude das respostas de EOA no exame final, comparativamente com o inicial (Figura 9A, 9B). E que estas cobaias que apresentavam diminuição da amplitude das EOA também apresentavam um grau de lesão de CCE maior que aquelas sem esta variação. Classificados em 4 tipos de respostas, conforme esta variação da amplitude ou intensidade de EOA e comparados com a análise de integridade das CCE, verificamos haver uma correlação alta e significativa entre diminuição da amplitude/intensidade de EOA e diminuição do número de CCE normais. A existência desta forte correlação é de grande relevância por mostrar que não somente a presença, mas também a variação da amplitude deve ser observada. Acreditamos que tal fato reveste-se também de grande importância clínica se consideramos a possível aplicação no monitoramento de ototoxicidade por drogas em humanos.



**Figura 9A.** Teste de EOAPD pré-tratamento de cobaia mostrando exame normal



**Figura 9B.** Teste de EOAPD pós-tratamento da mesma cobaia da figura 9 A mostrando redução da amplitude da resposta em relação ao exame anterior.

A coincidência observada entre normalidade das EOAPD com boa integridade morfológica e a redução da amplitude ou ausência das emissões com lesões celulares leves ou extensas fortalecem os resultados encontrados e vão de encontro também com a afirmação de Chambers<sup>19</sup> quando diz que “o grau de disfunção permanente correlaciona-se com o número de células ciliadas sensoriais destruídas ou alteradas”.

Acreditamos que a linha de pesquisa que estuda os mecanismos endógenos de autodefesa das células ciliadas do órgão de Corti, concomitantemente com as pesquisas genéticas<sup>20-22</sup> e avaliação funcional, é o caminho racional para chegarmos a resultados concretos que nos possibilitem ter um melhor controle sobre a lesão e a prevenção da toxicidade na orelha interna.

## CONCLUSÃO

Concluimos que a gentamicina, em doses não-tóxicas, na forma de habituação, não protege as células ciliadas externas da orelha interna da cobaia contra a ototoxicidade da amicacina e que a redução na amplitude das emissões otoacústicas produto de distorção correlaciona-se

fortemente com o aumento do número de células ciliadas externas lesadas, de forma estatisticamente significativa, em cobaias.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos às equipes do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos e Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Agradecemos também a Flávia Fiacadori Salata e Francisco Holanda, do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, pelo auxílio na fase experimental do estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Oliveira JAA. Audiovestibular toxicity of drugs vol. I e II. Flórida: Boca Raton: CRC Press; 1989.
- Oliveira JAA. Ototoxicité. Rev Laryngol Otol Rhinol (Bourd.) 1990; 111:491-6.
- El Barbary A. Altschuler RA. Schacht J. Glutathione S-transferases in the Organ of Corti of the rat: enzymatic activit subunit composition and immuno-histochemical localization. Hear Res 1993;71:80-90.
- Garetz SL. Latschuler RA. Schacht J. Attenuation of gentamicin ototoxicity by glutathione in the guinea pigs in vivo. Hear Res 1994;86:81-7.
- Oliveira JAA. Canedo DJM. Rossato M. Autodefesa contra a ototoxicidade de antibióticos aminoglicosídeos. Rev Bras Otorrinol 2002;68(1):7-13.
- Maudonnet EN. Autoproteção contra ototoxicidade da gentamicina [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo; 2005.
- Institute of Laboratory Animal Research. Commission on Life Sciences. National Research Council. The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. Ed. Washington DC: National Academy of Sciences; 1996.
- Canedo DJM. Resistência a ação ototóxica de antibióticos aminoglicosídeos [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo;1999.
- Hyppolito MA, Oliveira JAA. Lessa RM. Rossato M. Amifostine otoprotection to cisplatin ototoxicity: a guinea pig study using otoacoustic emission distortion products (DPOEA) and scanning electron microscopy. Rev Bras Otorrinol 2005;71:268-73.
- Hyppolito MA. Oliveira JA. Rossato M. Cisplatin ototoxicity and otoprotection with sodium salicylate. Eur Arch Otorhinolaryngol 2006;263(9):798-803.
- Oliveira JAA. Bernal TMO. Ototoxicidade de Aminoglicídeos e Otoproteção. In: Campos CAH. Costa HOO. São Paulo: Tratado de Otorrinolaringologia Vol. II; Editora Roca; 2003. p.148-167.
- Dauman R. Dulon D. Ototoxicidad medicamentosa. In: Vercken S.(edit.) Encyclopédie Médico-Chirurgicale-Otorrinolaringología v.II Paris: Editions Scientifiques et Médicales Elsevier; 2000. p. 20.184.B-10.
- Listowsky I Abramovitz M Homma H Niitsu Y. Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases. Drug Metab Rev 1988;19(3-4):305-18.
- Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal: application in reseach and therapy. Pharmacol Ther 1991;55:155-94.
- Withnell RH. Shaffer LA. Talmadge CL. Generation of DPOAEs in the guinea pig. Hear Res 2003;178:106-17.

- 
16. Goodman SS, Withnell RH, Shera CA. The origin of SFOAE microstructure in the guinea pig. *Hear Res* 2003;183:7-17.
  17. Lukashkin AN, Russell IJ. Dependence of the DPOAE amplitude pattern on acoustical biasing of the cochlear partition. *Hear Res* 2005;203:45-53.
  18. Nuttall AL, Grosh K, Zheng J, de Boer E, Zou Y, Ren T. Spontaneous basilar membrane oscillation and otoacoustic emission at 15 kHz in a guinea pig. *J Assoc Res Otolaryngol* 2004;5:337-48.
  19. Chambers HF. Antimicrobianos - os aminoglicosídeos. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. (edits). *Godman & Gilman-As Bases Farmacológicas da terapêutica 10ª edição*. Rio de Janeiro; Editora MacGraw-Hill; 2003. p.913-27.
  20. Fischel-Ghodsian N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Pharmacogenomics* 2005;6(1):27-36.
  21. Li Z et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Hum Genet* 2005;117(1):9-15.
  22. Rodriguez-Ballesteros M et al. Molecular and clinical characterisation of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C->T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Med Genet* 2006;43(11):e54.