

**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO
OTOPROTETOR DO EXTRATO DE GINKGO BILOBA, POR MEIO DAS
EMISSÕES OTOACÚSTICAS POR PRODUTO DE DISTORÇÃO, EM PACIENTES
SOB TRATAMENTO COM CISPLATINA**

Mirela Alves Dias

Brasília
2008

MIRELA ALVES DIAS

**ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO
OTOPROTETOR DO EXTRATO DE GINKGO BILOBA, POR MEIO DAS
EMISSÕES OTOACÚSTICAS POR PRODUTO DE DISTORÇÃO, EM PACIENTES
SOB TRATAMENTO COM CISPLATINA**

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (UnB).

Professor Dr. Carlos Augusto C. Pires Oliveira
Orientador da Dissertação

Brasília
2008

Dias, Mirela Alves

Ensaio Clínico Randomizado para Avaliação do Efeito Otoprotetor do Extrato de Ginkgo Biloba, por meio das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção, em Pacientes sob Tratamento com Cisplatina. / Mirela Alves Dias. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2008.

116 f.: il.

Orientador: Carlos Augusto Costa Pires de Oliveira. Dissertação (Mestrado) - UnB, FS, 2008.

1. Cisplatina. 2. Ototoxicidade. 3. EGB761. 4. Otoproteção. 5. EOAPD – I. Pires, Carlos Augusto Costa. II. UnB, FCS. III. Título

MIRELA ALVES DIAS

**ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO
OTOPROTETOR DO EXTRATO DE GINKGO BILOBA, POR MEIO DAS
EMISSÕES OTOACÚSTICAS POR PRODUTO DE DISTORÇÃO, EM PACIENTES
SOB TRATAMENTO COM CISPLATINA**

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (UnB).

Professor Dr. Carlos Augusto C. Pires Oliveira
Orientador da Dissertação

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Augusto C. Pires Oliveira
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Alessandra Ramos Venosa
Universidade de Brasília

Dra. Vanessa Furtado
Hospital Santa Luzia

Prof. Dr. Pedro Luiz Tauil
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Carlos Augusto Oliveira, pela confiança em mim depositada.

À coorientadora Profa. Dra. Alessandra Venosa, pela paciência que teve nas discussões sobre o tema.

Às chefias dos Setores de Oncologia do Hospital de Base (HBDF) e do Hospital Universitário (HUB), pela permissão e colaboração para realização da pesquisa.

À querida amiga Elienai Meneses, pela ajuda, incentivo e colaboração em todos os momentos.

À farmacêutica Margarete das Flores Guimarães, pela grande colaboração na preparação dos placebos, imprescindíveis para a realização do trabalho.

À Bibliotecária Patrícia Régis, pela inestimável colaboração na organização das referências.

A todos os funcionários do ambulatório de Oncologia do HBDF, sem citar nomes, pois são muitos, pelo auxílio sem o qual a meta não seria alcançada.

Especialmente às enfermeiras Ana Rita Flores e Maria das Dores Araújo (“Dorinha”), pela ajuda incondicional e pela forma com que se dedicam ao Setor de Oncologia do HBDF e o transformam em um ambiente melhor, apesar de todas as adversidades.

Aos colegas Luciano H. Santos, Márcio Paes e Marcos Trindade, que incondicionalmente nos ajudaram, de forma tão carinhosa e prestativa, na coleta dos dados, no encaminhamento dos pacientes, no esclarecimento de dúvidas.

Aos fonoaudiólogos Luciano Oliveira e Danielle Barboza, que se dispuseram a realizar os exames audiológicos.

À minha família, em especial à minha mãe, que, mesmo distante, está sempre ao meu lado.

À minha filha, por ter tido paciência nos momentos em que não pude lhe dar atenção.

Ao meu companheiro, que me ajudou a manter o foco e a determinação para a conclusão do trabalho.

A todas as pessoas que colaboraram como sujeitos da pesquisa.

RESUMO

A ototoxicidade é a alteração provocada por drogas que comprometem a função auditiva e/ou vestibular. Uma dessas drogas é a cisplatina (CDDP), um potente agente antineoplásico utilizado no tratamento do câncer, tanto de crianças quanto de adultos, mas que possui vários efeitos colaterais, entre os quais a ototoxicidade, que pode limitar seu uso. Atualmente considera-se que o mecanismo de ototoxicidade da cisplatina ocorre por alterações no sistema antioxidante das células ciliadas externas (CCE) da cóclea. Em razão disso, diferentes drogas antioxidantes têm sido testadas para avaliar o potencial otoprotetor quando utilizadas conjuntamente com cisplatina. O teste de emissão otoacústica por produto de distorção (EOAPD) tem se mostrado um exame sensível para o diagnóstico de alterações nas CCEs e tem sido utilizado na monitorização de pacientes submetidos a tratamento com drogas ototóxicas. O nosso objetivo foi avaliar, usando-se o teste de EOAPD, o efeito do extrato padronizado de ginkgo biloba (EGB761), de conhecida propriedade antioxidante, como otoprotetor contra a ação da cisplatina. O estudo foi conduzido em indivíduos que iriam iniciar tratamento com cisplatina. Eles foram randomicamente alocados em dois grupos: grupo estudo (GE) (n = 08), que recebeu EGB761(240mg/dia) e CDDP, e o grupo controle (GC) (n = 07), que recebeu placebo e CDDP. Ambos os grupos foram orientados a ingerir a medicação antes da primeira dose de cisplatina. Eles foram tratados e acompanhados por um período aproximado de 90 dias. As doses de cisplatina variaram, atingindo um total cumulativo de 300mg/m². Comparações foram feitas entre as medidas iniciais, ou seja, antes de iniciar-se o tratamento com CDDP, e aqueles registros obtidos após a última dose cumulativa de CDDP. Os indivíduos do GC apresentaram uma redução das amplitudes médias das EOAPDs e da relação sinal/ruído (S/R), na frequência de 8KHz, com p < 0,05, enquanto nos indivíduos do GE não foi observada essa redução. Nós concluímos que o EGB761, em virtude de suas propriedades antioxidantes, mostrou potencial efeito otoprotetor em indivíduos sob tratamento com cisplatina.

Palavras-chave: Cisplatina, Ototoxicidade, Ginkgo biloba, Otoproteção, Emissão Otoacústica por Produto de distorção.

ABSTRACT

ABSTRACT

The ototoxicity is an alteration caused by drugs that compromises the auditory and vestibular functions. The cisplatin (CDDP) is a potent antineoplastic agent used for the treatment of cancer in both adults and children although it has several side effects. The cisplatin ototoxicity is a dose-limiting condition. Current opinion is that cisplatin ototoxicity occurs due to alterations in the antioxidant system of the outer hair cells (OHC) of the cochlea. Because this, different antioxidant drugs have been tested to evaluate the potential otoprotector effect when combined with cisplatin. The distortion-product otoacoustic emission (DPOAE) has been showed to be a sensitive test for diagnosis of OHC injury and has been used for monitoring treatment with ototoxic drugs. Our proposal was to evaluate, using DPOAE test, the action of ginkgo biloba extract (EGB761), which has a known antioxidant property, as a possible otoprotector against cisplatin induced hearing loss. The study was conducted on individuals that would begin cisplatin treatment. They were randomized and allocated in two groups: Control group (CG) (n =07) receiving placebo plus CDDP and Study group (SG) receiving EGB761 (240mg/day) plus CDDP. Both groups were guided to ingest the drugs before first cisplatin dose. They were treated and followed up for approximately ninety days. The maximum cumulative cisplatin dosage was 300mg/m². Comparisons were made between baseline measurements and those records after maximum cumulative cisplatin dosage. The GC showed smaller DPOAE mean values amplitudes and smaller DPOAE/noise. The SG did not show changes. We conclude that these results demonstrate that EGB761, because of their antioxidant properties, showed potential otoprotector effect against cisplatin ototoxicity in patients receiving cisplatin therapy.

Keywords: Cisplatin, Ototoxicity, Otoprotection, Ginkgo biloba, Distortion-product Otoacoustic Emission

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de Fenton.....	34
Figura 2 - Mecanismo de ototoxicidade da cisplatina.....	35
Figura 3 - Mecanismo proposto para morte celular em células ciliadas externas expostas à cisplatina.....	36
Figura 4 - Mecanismo de ototoxicidade da cisplatina e pontos estratégicos de intervenções terapêuticas que poderiam impedir o dano ototóxico.....	37
Figura 5 - Constituintes químicos do EGB761® e quantidades aproximadas.....	43
Figura 6 - O espectro do som em um conduto auditivo humano saudável.....	58
Figura 7 - Seleção, acompanhamento e perdas dos sujeitos da pesquisa.....	70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Componentes do EGB761 [®] e atividades correspondentes, segundo os autores.....	46
Quadro 2 - Parâmetros considerados para avaliação da ototoxicidade, utilizando-se o teste de Emissões Otoacústicas, segundo os autores.....	64
Quadro 3 - Valores das amplitudes da EOAPD em função da freqüência e dos percentis 90 e 10.....	72
Tabela 1 - Amplitudes médias observadas nos pacientes do GC e do GE, por freqüências, antes da administração de cisplatina com o p-valor correspondente.....	78
Tabela 2 - Amplitudes médias observadas nos pacientes do GC e do GE, por freqüências, após dose total cumulativa de cisplatina (>225 a 300mg/m ²), com o respectivo p-valor.....	79
Tabela 3 - Amplitudes médias observadas nos pacientes do GC, por freqüências e por classes de doses de CDDP com o respectivo p-valor.....	81
Tabela 4 - Amplitudes médias observadas nos pacientes do GE, por freqüências e por classes de doses de CDDP, com o p-valor.....	82
Tabela 5 - Amplitudes médias das EOAPDs do GC antes da administração da cisplatina, em relação aos percentis 90 e 10, com o p-valor.....	84
Tabela 6 - Amplitudes médias das EOAPDs do GE antes da administração da cisplatina, em relação aos percentis 90 e 10, com o p-valor.....	85
Tabelas 5.1 - Médias das amplitudes das EOAPDs do GC após a administração de cisplatina (dose total cumulativa), em relação aos percentis 90 e 10.....	86
Tabelas 6.1 - Médias das amplitudes das EOAPDs do GE após a administração de cisplatina (dose cumulativa total), em relação aos percentis 90 e 10.....	87
Tabela 7 - Amplitudes médias da relação S/R do GC, por freqüência, segundo a dosagem cumulativa de cisplatina, com o p-valor.....	89
Tabela 8 - Amplitudes médias da relação S/R do GE, por freqüência, segundo a dosagem cumulativa de cisplatina, com o p-valor.....	90
Tabela 9 - Amplitudes médias da relação Sinal/ Ruído observada nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo por freqüências, antes da administração de Cisplatina.....	91
Tabela 10 - Amplitudes médias da relação Sinal /Ruído observada nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo por freqüências, após dosagem cumulativa de cisplatina (225 ; 300mg/m ²).....	92

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Amplitudes médias das EOAPDs observadas nos pacientes do GC e do GE, por freqüências, antes da administração de cisplatina.....	78
Gráfico 2 - Amplitudes médias das EOAPDs observadas nos pacientes do GC e GE, por freqüências, após dose cumulativa total de cisplatina (>225 a 300mg/m ²).....	79
Gráfico 3 - Amplitudes médias das EOAPDs observadas nos pacientes do GC, por freqüências e por classes de doses de cisplatina.....	81
Gráfico 4 - Amplitudes médias das EOAPDs observadas nos pacientes do GE, por freqüências e por classes de doses de cisplatina, com o p-valor.....	82
Gráfico 5 - Amplitudes médias das EOAPDs observadas nos pacientes do GC, por freqüências, antes da administração de cisplatina, em relação aos percentis 90 e 10.....	84
Gráfico 6 - Médias das amplitudes das EOAPDs observadas nos pacientes do GE antes da administração de cisplatina, em relação aos percentis 90 e 10.....	85
Gráfico 5.1 - Médias das amplitudes das EOAPDs observadas nos pacientes do GC após administração de cisplatina (dose total cumulativa), em relação aos percentis 90 e 10.....	86
Gráfico 6.1 - Médias das amplitudes das EOAPDs observadas nos pacientes do GE após administração de cisplatina (dose total cumulativa), em relação aos percentis 90 e 10.....	87
Gráfico 7 - Amplitudes médias da relação S/R do GC, por freqüências, segundo a dosagem cumulativa de cisplatina.....	89
Gráfico 8 - Amplitudes médias da relação S/R do GE, por freqüências, segundo a dosagem cumulativa de cisplatina.....	90
Gráfico 9: Amplitudes médias da relação Sinal /Ruído observada nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo por freqüências, antes da administração de Cisplatina.....	91
Gráfico 10: Amplitudes médias da relação Sinal/ Ruído observada nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo por freqüências, após dosagem cumulativa de Cisplatina (225; 300mg/m ²).....	92

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	113
ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	114
ANEXO C: Protocolo de Pesquisa.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAF	Audiometria de Altas Freqüências
AAS	Ácido Acetil Salicílico
ABR	Resposta Auditiva do Tronco Encefálico
AC	Audiometria Convencional
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
ASHA	American Speech-Language-Hearing Association
ATL	Audiometria Tonal Liminar
Ca^{2+}	Cálcio
CAT	Catalase
CCE	Células Ciliadas Externas
CCI	Células Ciliadas Internas
CDDP	Cis-diaminodicloroplatina; cisplatina
dBNA	Decibel Nível de Audição
dBNPS	Decibel Nível de Pressão Sonora
DDTC	Dietilcarbamato
D-Met	D- Metionina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ECochG	Eletrococleografia
EGB761	Extrato de Ginkgo Biloba
EOA	Emissão Otoacústica
EOAPD	Emissão Otoacústica por Produto de Distorção
EOATE	Emissão Otoacústica Transiente Evocada
EP	Potencial Endococlear
F	Freqüência
GB	Ginkgo Biloba
GC	Grupo Controle
GE	Grupo Estudo
GSH	Glutathione
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HO^{-1}	Hertz
Hz	Heme Oxigenase-1
I/O	Entrada/Saída
iNOS	Sintetase de Óxido Nítrico
KHz	Quilohertz
L	Intensidade
LD_{50}	Dose letal mediana
LPO	Peroxidação lipídica
MAO	Monoaminoxidase
ME	Microscopia eletrônica
mg/m^2	Miligrama por metro quadrado
MT	Metalotioneína
MTBA	Ácido metilbenzóico
N	Nitrogênio
NAC	N- acetilcisteína
NF	Ruído de Fundo
NO	Óxido Nítrico
NT	Nitrotirosina
$\text{O}_2^{\cdot -}$	Superóxido
$\cdot\text{OH}$	Hidroxila
ONOO	Peroxinitrito
PAF	Fator Ativador Plaquetário
PD	Produto de Distorção
PEATE	Potencial Evocado Auditivo do Tronco Cerebral
Perc	Percentil
QT	Quimioterapia
RE	Retículo Endosplamático

RNA	Ácido Ribonucleico
ROC	Característica de operação relativa
ROS	Espécie de Oxigênio reativo
S/R	Relação Sinal/Ruído
Seg	Seguimento
SES	Secretaria de Estado de Saúde
SH	Sulfidril
SOD	Superóxido dismutase
STS	Tiosulfato de sódio
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TTL	Terpeno-trilactonas
XIAP	Proteína inibidora de apoptose ligada ao X
4-HNE	4-Hidroxinonenal
%	Porcentagem
<	Menor
=	Igual
>	Maior
®	Marca registrada

SUMÁRIO

RESUMO	xviii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xvi
1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Objetivos.....	24
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 Cisplatina (CDDP).....	26
2.1.1 Mecanismo de ação antitumoral.....	27
2.1.2 Toxicidade	28
2.1.2.1 Incidência.....	28
2.1.3 Apresentação clínica da ototoxicidade	29
2.1.4 Fatores de Risco para ototoxicidade pela cisplatina.....	30
2.1.4.1 Dose única alta <i>versus</i> dose cumulativa	30
2.1.4.2 Perda auditiva pré-existente.....	32
2.1.4.3 Outros Fatores de Risco.....	32
2.1.5 Mecanismo de Ototoxicidade da Cisplatina.....	33
2.1.6 Proteção contra ototoxicidade pela cisplatina	37
2.1.6.1 Agentes Protetores Endógenos	38
2.1.6.2 Agentes Protetores Exógenos	38
2.1.6.2.1 Proteção Distal (<i>Downstream Protection</i>).....	38
2.1.6.2.2 Proteção Proximal (<i>Upstream Protection</i>).....	39
2.2 Extrato de Ginkgo Biloba (EGB 761)	42
2.2.1 Constituintes Químicos e Farmacocinética	42
2.2.2 Mecanismos Biológicos de Ação	45
2.2.3 Propriedade Antioxidante do EGB 761 [®]	47
2.2.4 Perfil de Segurança.....	50

2.3 Exames para Avaliação da Ototoxicidade	52
2.3.1 Considerações Gerais	52
2.3.2 Emissões Otoacústicas (EOA _s).....	54
2.3.3 Emissões Otoacústicas por Produtos de Distorção (EOAPD _s).....	56
2.3.3.1 Aplicações Clínicas	56
2.3.3.2 Características das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção	57
2.3.4 Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção e Avaliação da Ototoxicidade por Cisplatina.....	61
3 MÉTODOS	67
3.1 Aspectos Éticos	67
3.2 Tipo de Estudo.....	67
3.3 População Estudada.....	67
3.4 Delineamento Experimental	68
3.5 Procedimentos	71
3.6 Análise Estatística	73
4 RESULTADOS	76
5 DISCUSSÃO	94
6 CONCLUSÕES	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
8 ANEXOS.....	113

1 INTRODUÇÃO

A ototoxicidade é a alteração provocada por drogas que compromete a função auditiva e/ou vestibular. Segundo Hyppolito e Oliveira (2005), várias drogas têm potencial ototóxico por provocarem lesão coclear, como os antibióticos aminoglicosídeos, os antineoplásicos, os diuréticos, os antiinflamatórios não-esteróides e os anti-hipertensivos e, também, o quelante de ferro deferoxamina (Delehay et al., 2008). Entre esses grupos de drogas, os aminoglicosídeos e os antineoplásicos são os mais estudados, em razão de sua grande utilização na prática clínica (Hyppolito e Oliveira, 2005).

A Cisplatina (cis-diaminodicloroplatina; CDDP) é um agente quimioterápico amplamente usado no tratamento de um grande espectro de tumores, mas os vários efeitos colaterais que provoca podem limitar seu uso. Esses efeitos incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, toxicidade gastrointestinal e mielossupressão. As manifestações de ototoxicidade em animais experimentais e em humanos são de perda auditiva neurossensorial, começando em altas frequências e baseada na destruição de células sensoriais cocleares, células ciliadas externas e internas, na degeneração da estria vascular e numa significativa diminuição nas células do gânglio espiral. Ress et al. (1999) informam que a incidência de dano às células ciliadas e a perda auditiva em pacientes submetidos à quimioterapia com CDDP, relatada na literatura, pode variar de 3 a 100%. Schweitzer (1993 *apud* Li et al. 2002) ressaltam que essa incidência pode ser muito alta, chegando a 90%; em 2004, Ekborn et al. encontraram, em seu estudo, que 80% dos pacientes apresentaram sintomas auditivos após o primeiro curso de tratamento com cisplatina, e 92% após o segundo curso.

Os exames usados para diagnosticar e prevenir os efeitos ototóxicos dessa droga têm sido: audiometria tonal liminar (ATL); audiometria de altas frequências (AAF); potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE ou ABR, do inglês); potencial endococlear (EP) e as emissões otoacústicas (EOA_s).

O teste de EOA_s é um método de avaliação objetivo, não invasivo, de fácil aplicação e mede o estado funcional das células ciliadas externas (CCE). Entre outras aplicações, esse teste tem sido utilizado na monitorização de pacientes submetidos a tratamento com drogas consideradas ototóxicas e, nesses casos, apresenta maior especificidade e sensibilidade do que os outros métodos de análise da função auditiva. Em virtude de sua característica de avaliar o estado funcional das CCEs, é capaz de detectar lesões cocleares desencadeadas por drogas ototóxicas antes que sejam registradas

alterações no limiar auditivo; uma importante vantagem em relação às outras técnicas mencionadas e que faz dele a melhor escolha para monitoramento de pacientes submetidos a esse tipo de terapia.

Lonsbury-Martin, Whitehead e Martin (1991) sugerem que as EOAs podem ser úteis na identificação do estágio inicial de ototoxicidade durante o tratamento com certos antibióticos ou agentes antineoplásicos. Bonfils e Avan (1992), ao avaliarem valores para uso clínico em emissão otoacústica por produto de distorção (EOADP), utilizando dois grupos de sujeitos – sendo um grupo de controle, com limiares tonais normais, e outro composto de pacientes com perda auditiva neurossensorial pura –, mostraram que as emissões otoacústicas por produtos de distorção (EOADP_s), elicitadas por intensidades de estimulação primária de 52 e 62 dBNPS, permitem separar com alta sensibilidade (variando entre 93% e 100%) e boa especificidade (variando entre 63% e 95%, exceto para 2KHz) indivíduos com audição periférica normal daqueles com doença coclear, com lesões severas prováveis das células ciliadas externas, isto é, com limiar de audição acima de 30dBNA, e que as EOADPs devem ser consideradas um teste de triagem com uma seletividade de alta frequência.

Estudos têm demonstrado um possível mecanismo de alteração do sistema antioxidante celular para a ototoxicidade e a nefrotoxicidade geradas pela cisplatina. Os níveis de glutathione (GSH) e a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, GSH peroxidase e GSH redutase, estão reduzidos nesses tecidos, levando à peroxidação lipídica e instalando-se, assim, a toxicidade celular. Portanto, atualmente considera-se que o mecanismo de ototoxicidade da cisplatina ocorre por alterações no sistema antioxidante das células ciliadas externas da cóclea.

Em razão desse conhecimento, diferentes drogas antioxidantes têm sido testadas ao longo das duas últimas décadas, entre elas encontra-se o Ginkgo Biloba (EGB 761), que apresenta propriedades antioxidantes, atua na diminuição da peroxidação lipídica, aumentando os níveis de catalase, superóxido dismutase e glutathione. Fukaya e Kanno (1999) testaram os efeitos do EGB761 sobre a ototoxicidade pela cisplatina em ratos albinos e observaram que ele protege as células ciliadas externas.

Tendo em vista que a quimioterapia com CDDP está associada a um grande risco de alterações ototóxicas, justifica-se a avaliação da ação de drogas que tenham o potencial de minimizar o efeito ototóxico da cisplatina. Considerando-se ainda que os mecanismos de ototoxicidade pela cisplatina estão relacionados aos mecanismos de antioxidação celular e à formação de radicais livres

e que, por outro lado, o EGB761 leva à redução da peroxidação lipídica, com limpeza de superóxidos, impedindo a formação de radicais livres, além de ser um medicamento largamente utilizado em humanos, com efeitos colaterais considerados pouco significativos e evidências de otoproteção à cisplatina, propõe-se neste estudo avaliar o potencial otoprotetor do EGB761 aos efeitos ototóxicos da cisplatina em seres humanos, por meio das EOAPDs, para monitoramento da função coclear e detecção precoce da ototoxicidade.

1.1 Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o efeito otoprotetor do Extrato de Ginkgo Biloba (EGB761) por meio do teste de Emissão Otoacústica por Produto de Distorção (EOAPD), em pacientes sob tratamento com cisplatina (CDDP).

Objetivos Específicos

- a) Calcular as amplitudes médias das EOAPD_s por frequência (KHz), antes da primeira dose de cisplatina e após a última dose cumulativa de cisplatina;
- b) Calcular as amplitudes médias das EOAPD_s por frequência, por classes de doses de cisplatina separadamente;
- c) Analisar as amplitudes das EOAPD_s, em relação aos parâmetros de normalidade dos percentis 90 (P90) e 10 (P10) e por fim;
- d) Analisar as amplitudes médias das EOAPD_s, em relação à razão S/R.

Para todas as análises, fazer comparações entre o grupo controle e o grupo estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cisplatina (CDDP)

De acordo com relato de Williams e Whitehouse (1979), a cisplatina (CDDP) foi descoberta por Rosenberg et al. em 1965, quando investigavam o efeito de um campo elétrico no crescimento bacteriano e descobriram que a replicação da *Escherichia coli* era inibida por uma corrente elétrica que passava entre os eletrodos de platina. Posteriormente eles descobriram que a inibição não era causada pela corrente elétrica, mas por vários compostos de platina formados no meio. As investigações subseqüentes desses compostos levaram à identificação da cisplatina.

Segundo Reed (2001), a configuração espacial da platina depende de seu estado de oxidação, se +2 ou +4, geralmente designados Pt (II) e Pt (IV), e a atividade clínica ocorre principalmente com análogos da platina que estão no estado Pt(II), a saber: cisplatina e carboplatina. A cisplatina (ou cis-diaminodicloroplatina II; CDDP), por sua vez, é a principal molécula na família dos compostos citotóxicos que são baseados na platina natural, esses compostos estão entre as drogas antitumorais mais efetivas e amplamente usadas. São responsáveis pelo alto grau de cura de tumores de células germinativas, por altos graus de remissão em câncer ovariano e, quando usados em combinação com outras drogas ou irradiação, por um maior controle local de uma ampla variedade de tumores de vias aéreas superiores, esôfago, cérvix e ânus. São potentes citotoxinas tanto quanto sensibilizadores de irradiação. As ações biológicas dos complexos Pt (II) devem-se a reações de deslocamento, as quais fazem com que a platina se torne estável ligada a DNA, RNA, proteínas e outras biomoléculas. Todos os complexos antitumorais ativos são bifuncionais; eles podem formar, por sucessivas reações de deslocamento, ligações duplamente estáveis sob condições fisiológicas tais que produzem uma ligação cruzada covalente entre dois átomos nucleofílicos de uma macromolécula.

A cisplatina liga-se ao RNA mais extensamente do que ao DNA, e ao DNA mais do que à proteína. E, na maioria dos sistemas, a ligação ao DNA relaciona-se com a morte celular induzida pela cisplatina.

2.1.1 Mecanismo de ação antitumoral

Rabik e Dolan (2007) revisaram detalhes acerca do mecanismo de ação dos agentes da platina e descrevem que, ao entrarem em uma célula, eles se tornam hidratados, perdendo íons cloreto ou oxalato e ganhando duas moléculas de água. Essa molécula carregada positivamente é então capaz de interagir com moléculas nucleofílicas dentro da célula, incluindo DNA, RNA e proteínas. O DNA é o alvo citotóxico preferencial para a cisplatina, e os agentes de platina, quando ligados ao DNA, têm preferência pela posição N-7 dos anéis imidazólicos da adenosina e guanosina. Daí três diferentes tipos de lesão podem se formar nas bases de purina do DNA: mono junções, ligações cruzadas intracadeia e ligações cruzadas intercadeia. Evans e Halliwell (1999) já haviam descrito que as ligações cruzadas resultam em distorção do DNA, impedindo sua replicação e transcrição e, desse modo, causando morte celular, e que o DNA nas células tumorais está mais exposto e, portanto, mais susceptível a dano, por causa de sua velocidade de divisão e de seu metabolismo, embora muitos tipos diferentes de células sejam danificados por essas drogas citotóxicas.

Boulikas e Vougiouka (2003) informam que, além do DNA, aminoácidos, peptídeos, proteínas, por exemplo, metalotioneínas, e pequenas moléculas, como a glutationa, estão muito envolvidas no metabolismo da cisplatina, e que complexos de platina são muito reativos aos resíduos de cisteína da glutationa (GSH), a qual detoxifica esses compostos por um mecanismo de ligação. Essa ligação se dá pela interação com seus grupos SH, impedindo que drogas de platina se liguem ao DNA. Informam também que elevados níveis de glutationa conferem resistência a alguns tipos de células cancerosas contra a cisplatina e a carboplatina.

Ainda segundo Rabik e Dolan (2007), embora a cisplatina seja conhecida por induzir apoptose após dano no DNA, tem-se demonstrado também que ela causa ativação de caspases apoptóticas por meio da ativação da via de estresse do retículo endoplasmático (RE). A estimulação de vias pró-apoptóticas em células sem núcleo pelo estresse do RE induzido pela cisplatina seria um mecanismo secundário adicional da citotoxicidade da cisplatina. Segundo os mesmos autores, um conjunto de mecanismos pode resultar em uma resistência aos agentes de platina, entre eles a combinação com moléculas como GSH e metalotioneínas.

A glutatona age como um antioxidante celular; ajuda a manter o estado redox enquanto mantém os grupos sulfidril (SH) reduzidos. Já as metalotioneínas (MT) estão envolvidas no controle dos níveis de cobre e de zinco, tanto quanto na proteção das células do estresse oxidativo e das toxicidades associadas com metais pesados.

2.1.2 Toxicidade

2.1.2.1 Incidência

Vários autores, como Boulikas e Vougiouka (2003) e Rybak e Whitworth (2005), relatam os efeitos antineoplásicos da cisplatina em uma variedade de tumores e citam que, infelizmente, seu uso clínico continuado é impedido em virtude dos muitos efeitos adversos por ela provocados, entre os quais se incluem nefrotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, neuropatia periférica, mielossupressão, astenia e ototoxicidade.

Rademaker-Lakhai et al. (2006) descrevem que a diurese forçada, pré e pós-infusão, limitam a nefrotoxicidade e que a toxicidade gastrointestinal é administrável com a atual medicação de apoio, na maioria dos pacientes. Mas, ressaltam, todavia, que nenhuma intervenção terapêutica tem sido encontrada para impedir a neuro e a ototoxicidade, que tem se tornado o efeito dose limitante. Em seu trabalho eles encontraram uma incidência média de ototoxicidade de 33% com a administração de 50mg/m² de CDDP.

Incidências de ototoxicidade variam muito nos vários trabalhos; são relatadas incidências de 69% (Moroso e Blair, 1983 *apud* Ozturan et al., 1996); de 3 a 100% (Ress et al.,1999); de 52%, quando a avaliação é feita com audiometria convencional, aumentando para 71%, quando a avaliação da função auditiva é feita com EOAPD (Coradini et al.,2007); e ainda de 75 a 100%, segundo Rybak (2007). Segundo Rabik e Dolan (2007) a toxicidade associada à cisplatina pode variar de leve a severa. Eles relatam que a ototoxicidade ocorre em aproximadamente 23-54% dos pacientes recebendo tratamento com cisplatina, e em mais da metade dos pacientes pediátricos recebendo cisplatina.

Ress et al.(1999) informam que a grande variabilidade entre os estudos pode ser explicada por diferenças nos critérios de perda auditiva, nos procedimentos de avaliação audiométrica e no regime de dose de CDDP. Fato já constatado por Laurell et al. (1987), quando eles informaram que a incidência e a severidade da perda auditiva relatada em diferentes estudos clínicos variam, e que

muitos estudos não são diretamente comparáveis por causa de diferentes esquemas de doses, variações nas condições dos testes de audição, falta de uma interpretação padronizada de alterações significantes nos limiares auditivos e perda de pacientes, pois eles estão muito doentes para realizar audiogramas em série.

2.1.3 Apresentação clínica da ototoxicidade

Os efeitos ototóxicos da cisplatina levam à perda auditiva bilateral em altas frequências (4 – 8KHz), geralmente moderadamente severa, e permanente (Aguilar-Markulis et al., 1981; Vermorken et al., 1983), que se deve provavelmente a alterações nas CCEs e na estria vascular, como descrevem alguns autores.

Stadnicki et al. (1975) realizou trabalho com macacos *rhesus* onde foi administrada CDDP intravenosa, e foi observado que a perda de células ciliadas ocorreu e foi mais freqüente entre as CCEs do giro basal, menos freqüente nos outros giros e as CCI foram menos afetadas do que as CCEs. Tange e Vuzevski (1984) relataram em seu trabalho realizado com porcos da guiné aos quais foi administrada uma dose padrão de CDDP, que essa droga provocava também alterações tóxicas na estria vascular.

Laurell et al. (1987), e posteriormente Laurell e Bagger-Sjöbäck (1991), afirmam que esse padrão de degeneração das CCEs está correlacionado com a perda auditiva em altas frequências, que a primeira fileira de CCEs é afetada mais severamente e que as CCIs também podem ser destruídas, mas somente após doses mais altas de cisplatina. Esses últimos citam ainda dados da literatura em que sintomas vestibulotóxicos, tais como tontura, têm sido menos freqüentemente relatados e, em trabalho realizado com animais recebendo diferentes doses de cisplatina, eles observaram que as células sensoriais do órgão vestibular não foram afetadas por uma única dose alta de cisplatina. Laurell et al. (1987) avaliaram a ototoxicidade da cisplatina em mulheres tratadas com uma dose moderada da droga (50mg/m² a cada 4 semanas) para câncer ginecológico e, das pacientes que mostraram alteração auditiva, a maior incidência ocorreu em 6KHz e 8KHz, e não afetou significativamente a função coclear na faixa de frequências da fala. Eles informam que os dois principais sintomas relatados após a administração de cisplatina foram tinido e perda auditiva, ocorrendo juntos ou independentemente. Os mesmos autores citam que o primeiro sinal de dano auditivo geralmente aparece 3 a 4 dias após a administração da droga. Fato constatado também por

Laurell e Bagger-Sjöbäck (1991), os quais afirmaram que o início dos sintomas ototóxicos não aparecem no momento em que a cisplatina é administrada, mas é atrasado alguns dias após o início do tratamento.

Corroborando os achados da literatura, Blakley e Myers (1993) observaram que a perda auditiva se desenvolve cerca de dias ou semanas após a cisplatina ter sido administrada.

Rybak e Whitworth (2005) e Rybak e Ramkumar (2007), ao revisarem a literatura, informam que a ototoxicidade induzida pela cisplatina pode ser progressiva, envolvendo as baixas frequências e com o incremento da dose de cisplatina nos protocolos de tratamento, quase todo paciente pode desenvolver pelo menos alguma perda auditiva

Rademaker-Lakhai et al. (2006) determinaram em seu trabalho a toxicidade associada à dose e ao esquema intensivos de quimioterapia com cisplatina/gemcitabina em pacientes com carcinoma de pulmão. Observou-se que, quando foram administradas doses de cisplatina maiores que 60mg/m^2 , a maioria dos pacientes desenvolveu sinais clínicos de ototoxicidade, que ocorreram após a segunda administração e a perda auditiva ocorreu principalmente em frequências altas (4 e 8KHz).

Na literatura há poucos relatos de recuperação da ototoxicidade pela cisplatina, entretanto, segundo sugerem Truong, Winzelberg e Chang (2007), ela poderá ocorrer se for fornecido tempo suficiente para que o processo reparador aconteça. Esses autores relataram um caso de recuperação da perda auditiva que ocorreu um ano após a conclusão da terapia com CDDP.

2.1.4 Fatores de Risco para ototoxicidade pela cisplatina

2.1.4.1 Dose única alta *versus* dose cumulativa

Segundo Aguilar-Markulis et al. (1981), as alterações ototóxicas são predominantemente cumulativas, após várias injeções em doses baixas. Eles discutem que a ototoxicidade secundária à CDDP tem sido inconsistentemente estudada e que a incidência e a severidade da ototoxicidade são variadas, dificultando, assim, a interpretação e a comparação.

Em 1987, Laurell et al. afirmam que o achado de uma incidência maior de perda auditiva em pacientes recebendo injeções com dose única alta sugere uma correlação entre ototoxicidade e o pico de cisplatina no plasma. Entretanto, eles esclarecem que a cisplatina liga-se amplamente à albumina e a outras proteínas séricas, e o componente citotóxico ativo da cisplatina está na fração livre. Sendo assim, o nível total de platina sérica não reflete o nível da droga presente ativa, pois

ambas as espécies – livre e ligada a proteínas – estão incluídas. De acordo com esses autores, há uma ampla variabilidade individual na dose necessária para produzir um efeito ototóxico, e uma simples relação dose-efeito não parece existir para ototoxicidade pela cisplatina.

Laurell e Jungnelius (1990) reafirmam que, após a fase inicial rápida de eliminação, ocorre uma fase lenta de eliminação, e isto significa que uma quantidade considerável da droga é retida na massa corpórea total e que, em nível tecidual, certa quantidade de CDDP pode ainda estar presente como uma fração ligada à proteína no momento da próxima administração de CDDP, então a concentração de cisplatina retida é dependente do intervalo entre os cursos. Por isso, essa droga também pode causar dano à orelha interna quando dada em doses baixas e repetidas em curtos intervalos. Mas também relataram que o efeito colateral ototóxico está mais relacionado com a quantidade da dose única do que com a dose cumulativa. E concluem que a concentração da cisplatina no plasma e em um dado tecido, após a sua administração, é dependente de fatores como dose total, método e tempo de administração e, além disso, que os níveis relativos dessas frações provavelmente diferem de uma pessoa a outra.

Laurell e Bagger-Sjöbäck (1991) mostraram, em porcos da guiné, um padrão de dano às células ciliadas externas (CCEs) que foi dose-dependente, em que, à medida que a concentração de cisplatina aumentava, o grau de dano às CCEs aumentava, e que ocorria do giro basal para o segundo giro e da primeira para a terceira fileira de CCE. No mesmo estudo, observou-se que a aplicação de múltiplas injeções intraperitoneais (i.p.) até uma dose cumulativa de CDDP de 25mg/kg produziu uma perda auditiva moderada em alta frequência quase igual àquela observada um dia após a aplicação de uma só injeção intravenosa (i.v.) de 12,5mg/kg de peso corporal. E as alterações estruturais nas cócleas também não divergiram

Em estudo de Biro et al. (2006) o único fator de risco (estatisticamente significante) encontrado e detectado por meio das EOAPDs foi a dose cumulativa.

Segundo Rybak (2007), há uma considerável variação individual na susceptibilidade à ototoxicidade pela cisplatina, a qual, portanto, estaria relacionada a alguns fatores, tais como, magnitude da dose cumulativa, que, por sua vez, parece estar relacionada com a severidade da perda auditiva.

Rabik e Dolan (2007) relatam que doses altas de cisplatina em bolus, em adultos, são mais ototóxicas e nefrotóxicas do que infusões repetidas em doses mais baixas, e que, nas crianças,

contudo, infusões prolongadas são menos nefrotóxicas do que doses em bolus, mas ainda assim resultam em ototoxicidade.

2.1.4.2 Perda auditiva pré-existente

Wright e Schaefer (1982) mostraram em seu trabalho que pacientes que tinham perda auditiva antes do tratamento com CDDP apresentaram uma pronunciada diminuição na acuidade auditiva em ambas as frequências (alta e baixa) e também um declínio na resposta vestibular à estimulação calórica durante a quimioterapia. Eles observaram que, nos casos estudados, o número total de células ciliadas perdidas representava uma combinação de perda pré-existente de células sensoriais e de perda por dano ototóxico, uma vez que haviam lesões freqüentemente vistas na cóclea de pessoas mais velhas não expostas a drogas ototóxicas e células em processo recente de degeneração com alterações idênticas às já vistas por outros autores usando animais experimentais expostos a drogas ototóxicas.

Por outro lado, os resultados de Vermorken et al. (1983) não confirmam a maior susceptibilidade de ototoxicidade em pacientes com perda auditiva pré-existente.

E segundo Laurell et al. (1987), vários fatores de risco haviam sido sugeridos para ototoxicidade, mas não havia nenhum indicador conhecido que previsse o nível de susceptibilidade. Em estudo de Laurell e Jungnelius (1990) eles relataram não terem encontrado fator predisponente para perda auditiva tais como idade, sexo, ou perda auditiva pré-tratamento.

2.1.4.3 Outros Fatores de Risco

Segundo Bokemeyer et al. (1998 *apud* Rybak, 2007), exposição ao ruído, perda auditiva pré-existente e insuficiência renal são fatores que podem aumentar a probabilidade de ototoxicidade pela cisplatina. Também a idade parece ser um importante fator de risco: tanto crianças com menos de cinco anos como pacientes idosos são mais susceptíveis à perda auditiva induzida pela cisplatina do que adultos jovens. (Li et al., 2004 *apud* Rybak, 2007)

Low et al. (2006) realizaram um estudo randomizado controlado em indivíduos portadores de carcinoma nasofaríngeo (CNF) cujos campos de radiação incluem as estruturas do ouvido, comparando os efeitos da radioterapia e da radio e quimioterapia com CDDP na audição neurossensorial. Eles concluíram que os pacientes que receberam radioterapia e quimioterapia com

CDDP concomitante apresentaram maior perda auditiva quando comparados aos pacientes tratados somente com radioterapia.

Rybak e Ramkumar (2007) ainda citam anemia, hipoalbuminemia e também irradiação craniana prévia como fatores de risco.

2.1.5 Mecanismo de Ototoxicidade da Cisplatina

Sabia-se que os efeitos ototóxicos da cisplatina incluíam mudanças morfológicas e funcionais no órgão de Corti, contudo a base bioquímica para ototoxicidade pela cisplatina não era conhecida. Portanto, seria importante entender os mecanismos subjacentes desses efeitos tóxicos, a fim de se possibilitar aliviar os efeitos colaterais. Então, em 1995, Ravi, Somani e Rybak se propuseram a testar, em ratos, se a alteração no sistema antioxidante na cóclea provocada pela cisplatina poderia levar à ototoxicidade. Eles produziram ototoxicidade, determinada por ABR (resposta evocada auditiva do tronco cerebral), administrando doses de cisplatina, e analisaram a cóclea desses ratos quanto aos níveis das moléculas protetoras glutathione (GSH), glutathione oxidada (GSSG) e malondialdeído e quanto à atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), GSH peroxidase e GSH redutase, e os resultados foram comparados a dados de controles (ratos injetados com manitol). Os resultados mostraram que, nos ratos injetados com CDDP apresentaram elevação do limiar da ABR, latências prolongadas e diminuição das amplitudes, implicando destruição das células ciliadas cocleares e diminuição do EP, sugerindo dano da estria vascular. Mostraram ainda que a ototoxicidade da cisplatina em ratos estava associada à diminuição dos níveis de GSH na cóclea (47% do controle), diminuição da atividade da GSH peroxidase coclear (70% do controle) e da GSH redutase e que, três dias após a administração de cisplatina, houve aumento da peroxidação lipídica coclear e aumento na atividade da SOD (141%) e da CAT (138%), sugerindo haver aumento da geração de espécies de oxigênio reativo (ROS) na cóclea após injeções de cisplatina.

Com todos esses dados, eles sugeriram que o estado antioxidante da cóclea estaria prejudicado na ototoxicidade pela cisplatina e que a administração de antioxidantes poderia ajudar na prevenção dos efeitos ototóxicos da cisplatina.

Corroborando esses achados, mais tarde Rybak e Whitworth (2005), em seu artigo de revisão, relataram que a ototoxicidade da cisplatina envolve a produção de ROS, resultando em

depleção de moléculas protetoras antioxidantes dos tecidos cocleares, como, por exemplo, GSH e enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH peroxidase e GSH redutase), e permitindo a peroxidação lipídica, mostrada por aumentadas concentrações de malondialdeído e peróxidos lipídicos tóxicos e aldeídos, tais como, 4-hidroxinonenal (4-HNE) e peroxinitrito (ONOO⁻). Além disso, enzimas como a NADPH oxidase e NOX3 (somente expressa na orelha interna), quando ativadas pela cisplatina, catalisam a formação de radicais superóxidos (O₂^{·-}) (Rybak e Whitworth, 2005; Rybak, 2007; Rabik e Dolan, 2007).

Então, os radicais superóxidos (O₂^{·-}) gerados pela exposição à cisplatina, em uma série de eventos em cascata, podem ser transformados por enzimas celulares em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que pode ser catalisado pelo ferro (através da reação de Fenton – fig.1) para formar o radical livre hidroxila (·OH), que, por sua vez, pode reagir com ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) nas membranas e formar o 4-hidroxinonenal (4-HNE), um aldeído extremamente tóxico que tem um papel maior na ototoxicidade induzida pela cisplatina (fig. 2). O radical O₂^{·-} pode ativar a sintetase de óxido nítrico (iNOS), gerando NO, que, por sua vez, reagindo com O₂^{·-}, forma peroxinitrito (ONOO⁻), o qual reage com proteínas para formar nitrotirosina (NT). Esses mediadores podem desencadear a morte celular, por causarem a liberação do citocromo c da mitocôndria, resultando na ativação via abaixo de caspases 9 e 3, levando à apoptose. (fig. 3)

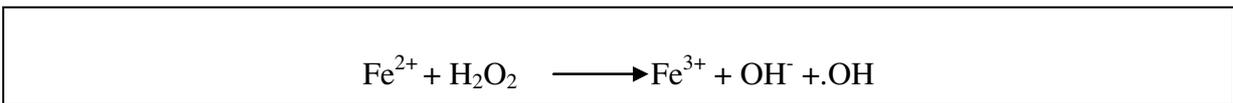


Figura 1: Reação de Fenton (extraído de Evans e Halliwell, 1999)

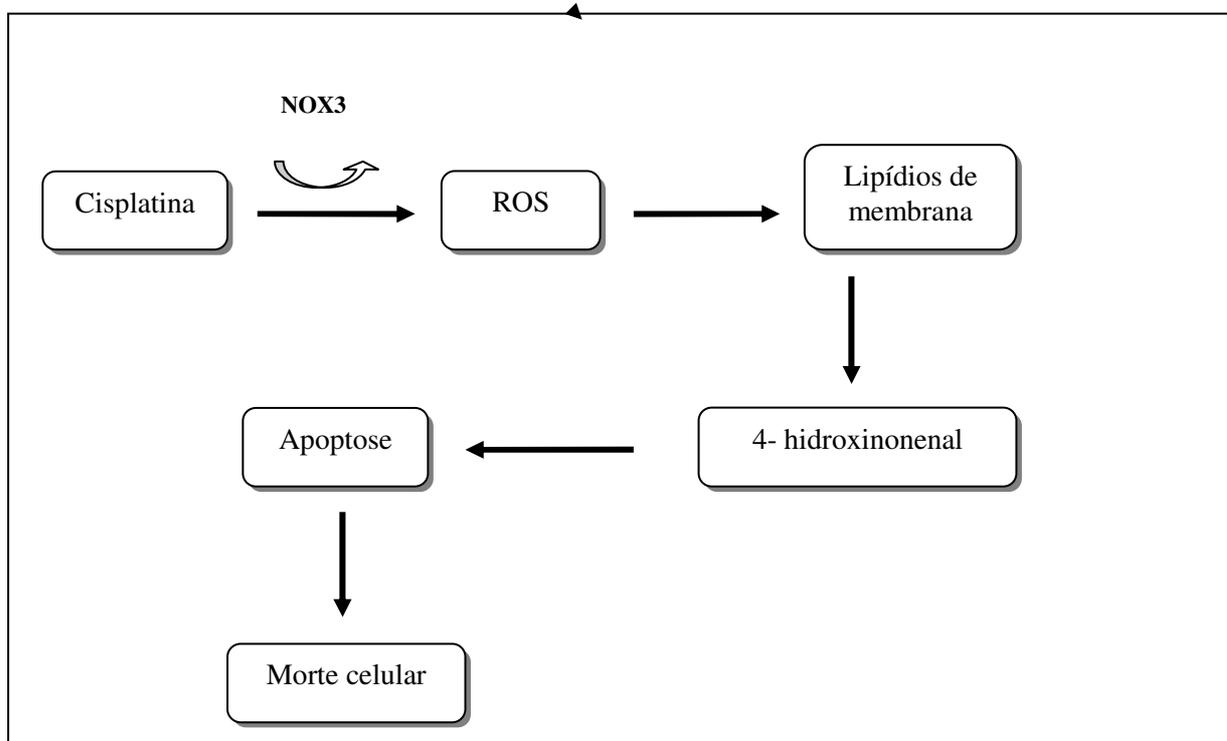


Figura 2: Mecanismo de ototoxicidade da cisplatina (adaptado de Rybak et al.,1999).

Rybak e Whitworth (2005) relatam ainda que se acredita ser um excesso de ROS o responsável por desencadear morte celular por apoptose (morte celular programada). A via de apoptose intrínseca pode resultar na ativação de uma família de proteína-quinases ativadas por estresse, tais como proteína-quinase ativada por mitogênio (MAPK) e c-Jun N-terminal quinase (JNK), e a atividade aumentada destas enzimas é acompanhada por altas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) intracelular e liberação de citocromo c da mitocôndria. A liberação do citocromo c da mitocôndria parece ser mediada por Bax, uma proteína que acentua a morte celular apoptótica, a qual causa dano da membrana mitocondrial e a formação de poro. A liberação de citocromo c e a subsequente ativação de caspases 8, 9 e 3 são passos chave na via de morte celular embora outros eventos também ocorram no núcleo (Fig. 3).

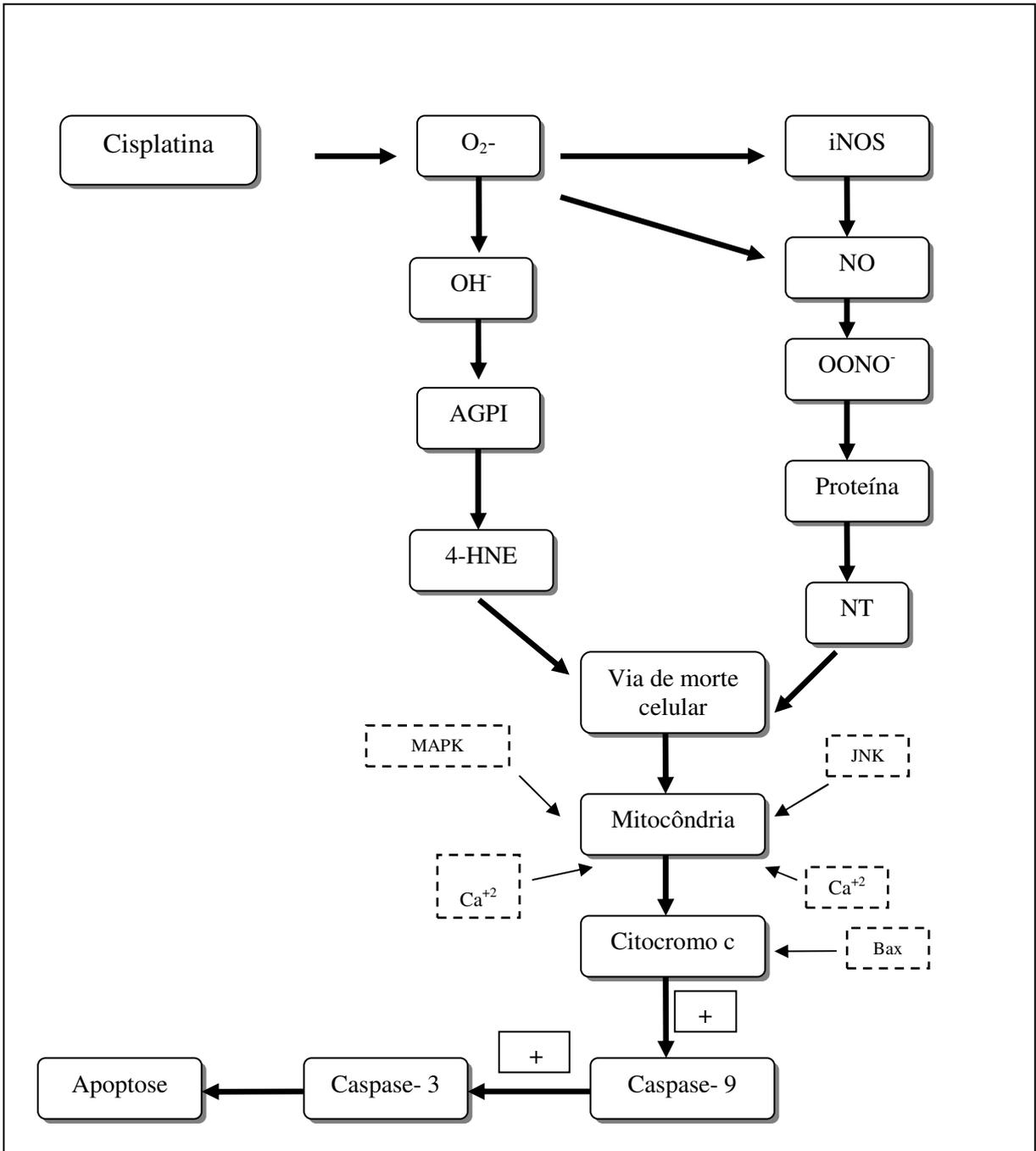


Figura 3: Mecanismo proposto para morte celular em CCEs expostas à cisplatina (adaptado de Rybak e Whitworth, 2005).

O influxo de cálcio (Ca^{2+}), a liberação de citocromo c da mitocôndria e ativação de caspases 9 e 3 promovem a apoptose nas células ciliadas externas da cóclea (Rybak, 2007, Rabik e Dolan, 2007).

2.1.6 Proteção contra ototoxicidade pela cisplatina

Vários trabalhos revisam e sugerem mecanismos pelos quais poderia se impedir a apoptose, induzida por estresse oxidativo, das células ciliadas externas expostas à cisplatina.

Segundo Rybak (2007), a proteção contra a cisplatina pode ser fornecida por moléculas endógenas ou por agentes exógenos ou por uma combinação de agentes exógenos que desencadeariam mecanismos protetores endógenos, os quais, contudo, não parecem ser capazes de superar o efeito tóxico da cisplatina quando a dose excede certo limiar.

Diversas estratégias têm sido sugeridas para impedir a apoptose induzida por estresse oxidativo das CCEs expostas à ação da cisplatina (Rybak et al., 1999, Rybak e Kelly, 2003) (fig. 4), quais sejam:

- 1) prevenção da formação de ROS, ou por ligação às toxinas ou por reverter a ligação das toxinas com proteínas celulares, lipídios ou DNA;
- 2) inibição da produção de subprodutos da peroxidação lipídica, tais como, 4-hidroxinonenal, que é extremamente tóxico;
- 3) adição de limpadores de radicais livres exógenos e enzimas antioxidantes e moléculas para impedir as reações de ROS com proteínas celulares, lipídios e DNA;
- 4) aumento da atividade do sistema antioxidante endógeno.

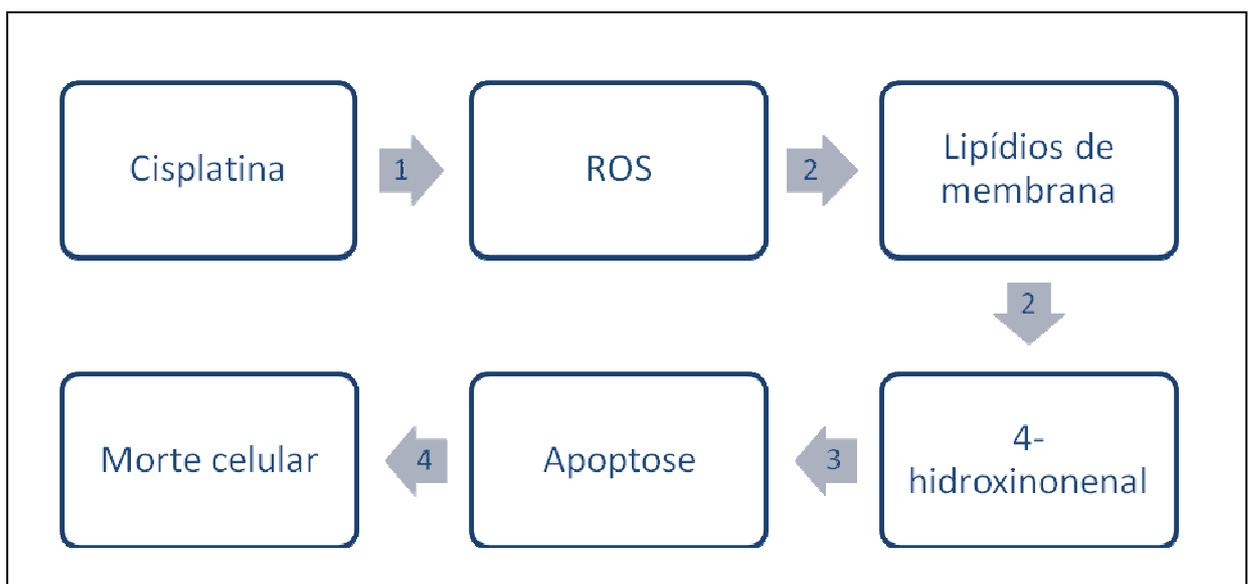


Figura 4: Mecanismo de ototoxicidade da cisplatina e pontos estratégicos de intervenções terapêuticas que poderiam impedir o dano ototóxico (adaptado de Rybak et al., 1999).

2.1.6.1 Agentes Protetores Endógenos

Em seu artigo de revisão, Rybak (2007) informa que, entre as moléculas protetoras endógenas, encontram-se: glutathione (GSH); enzimas antioxidantes (GSH peroxidase, GSH redutase, CAT, SOD); proteínas de choque térmico (HSP); receptores de adenosina; heme oxigenase-1(HO-1); o fator 2 relacionado ao fator eritróide nuclear (NRF2); e a molécula de dano renal (KIM-1). A CAT é uma hemoproteína com atividade específica sobre o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e a SOD é específica para o radical superóxido (O₂⁻) (Bridi et al., 2001).

O mesmo autor explica que o uso de um inibidor da síntese de GSH (butionina sulfoximina) aumentou a citotoxicidade da CDDP e que, por outro lado, GSH e GSH-ester forneceram significativa proteção contra o dano à célula ciliada externa provocado pela cisplatina em um modelo *in vitro*. Ressalta ainda que a ativação de receptores endógenos de adenosina na cóclea, pela aplicação na janela redonda de agonistas do receptor A1 de adenosina, pode ser um mecanismo protetor que aumenta a produção de enzimas antioxidantes, as quais ajudam a detoxificar ROS gerados pela cisplatina.

A heme oxigenase-1 (HO-1) tem ações antiinflamatória e antiapoptótica, e observou-se que a apoptose de células ciliadas induzida pela cisplatina *in vitro* é atenuada pela HO-1. Embora essas moléculas citoprotetoras sejam expressas na cóclea e reguladas após o estresse oxidativo, tal estresse imposto pela cisplatina pode oprimir esses supostos mecanismos de defesa (Rybak e Ramkumar, 2007).

2.1.6.2 Agentes Protetores Exógenos

2.1.6.2.1 Proteção Distal (*Downstream Protection*)

As intervenções com moléculas protetoras exógenas podem ser feitas nos eventos iniciais ou proximais, correspondentes à formação de ROS, e/ou na resultante via de morte celular. Entre os agentes que atuam na porção distal da via de morte celular (*downstream protection*), têm-se os inibidores da caspase-3 e 9, os quais, quando perfundidos na cóclea de porcos da guiné, reduziram a severidade da perda auditiva e a apoptose das células ciliadas, após a administração de cisplatina. Para obter-se proteção contra cisplatina, também foi usado a aplicação do inibidor p53, pifithrin- α e geneterapia com um vetor viral adeno-associado (AAV) decodificador de uma proteína humana

inibidora de apoptose ligada ao X (XIAP), que bloqueia vários efetores de apoptose, incluindo caspases 3, 7 e 9, tanto quanto outros mediadores da via de morte celular, por injeção através da janela redonda, antes da administração da cisplatina. Entretanto, o estudo desses agentes tem sido realizado *in vitro* ou tem necessitado de meios invasivos para liberar o agente dentro da orelha interna (Rybak e Ramkumar, 2007).

2.1.6.2.2 Proteção Proximal (*Upstream Protection*)

Por outro lado, e ainda segundo Rybak e Ramkumar (2007), os agentes que agem precocemente para impedir o início da via de morte celular fornecem uma proteção no início da via (*upstream protection*) e, entre eles, incluem-se vários antioxidantes contendo grupos tiol (compostos que contêm enxofre), na maioria eletrofílicos, que podem agir como limpadores de radicais livres e que têm sido testados para avaliar a eficácia contra a ototoxicidade pela cisplatina em estudos com animais, quais sejam: tiosulfato de sódio (STS), d- ou l-metionina (D-Met), dietilditiocarbamato (DDTC), ácido metilbenzóico (MTBA), ácido lipóico, N-acetilcisteína (NAC), tiopronina, glutathione ester e amifostina (WR-2721) (Rybak e Whitworth, 2005). Outros agentes que podem funcionar como limpadores de radicais livres e também proteger a cóclea do dano provocado pela cisplatina e da perda auditiva em animais experimentais incluem α -tocoferol (Vitamina E), aminoguanidina, salicilato de sódio, ebselen (isolado ou em combinação com alopurinol) e o extrato purificado de *Gingko biloba* (Rybak, 2007).

Esses autores, entretanto, informam que certos tióis, como o STS e o mesna (2-mercapto-etano-sulfonato), são incompatíveis com a CDDP, por neutralizá-la pela formação de um complexo que é excretado pelo rim, reduzindo assim tanto a atividade ototóxica como a potência antineoplásica. Dickey et al. (2005) relatam que a administração tardia de STS fornece proteção contra toxicidades induzidas pela CDDP *in vitro* e no modelo de ototoxicidade *in vivo*, sugerem que a via de quimioproteção e o tempo de administração podem ser manipulados para manter a eficácia antitumoral da CDDP enquanto protegem contra os efeitos colaterais tóxicos da quimioterapia.

Rybak et al. (2000) compararam a eficácia de DDTC, MTBA e ebselen como agentes protetores contra a elevação do limiar da resposta auditiva do tronco cerebral (ABR) e alterações do sistema de defesa antioxidante na cóclea de rato, induzidos pela cisplatina, e sugerem a possibilidade do uso clínico de agentes protetores em reduzir ou impedir o dano à orelha interna pela cisplatina

contanto que o efeito antitumoral não seja alterado. Mas Rybak et al. (1999) já informavam que o agente quelante DDTC possui um número de efeitos colaterais indesejáveis, como dormência no braço infundido, sudorese profusa, desconforto torácico, agitação e aumento da pressão sistólica.

Blakley et al. (2002) citam alguns trabalhos de Jones e Basinger e de Melvik e Peterson em que os primeiros demonstraram que D-Met não inibiu a atividade antitumoral da cisplatina, enquanto forneceu excelente nefroproteção em um modelo experimental, e os últimos demonstraram *in vitro* que a administração simultânea de D-Met e CDDP reduziu a atividade antitumoral, mas, quando D-Met foi administrada previamente, a atividade antitumoral da cisplatina aumentou. Campbell et al. (1996) informavam que a D-Met mostrava-se promissora para uso em humanos, entretanto existiam contra-indicações para pacientes com doença hepática e a alta dose de metionina pode inibir o crescimento em crianças, quando dada por um período longo de tempo.

Li et al. (2002) citam autores segundo os quais a intervenção farmacológica com D-Met, DDTC e STS, administrados sistemicamente, tem sido problemática por causa dos efeitos prejudiciais na eficácia da cisplatina contra certos tumores, e somente a liberação de D-Met na membrana da janela redonda tem mostrado uma ação otoprotetora contra o dano pela cisplatina sem afetar seu efeito quimioterapêutico nas células tumorais.

Rybak et al. (1999) investigaram as alterações que ocorrem na resposta auditiva evocada de tronco encefálico (ABR) concomitantemente a alterações nas concentrações cocleares de glutathione (GSH), peroxidação lipídica e na atividade de enzimas antioxidantes e otoproteção dose-dependente por um Lipoato antioxidante. Eles concluíram que a otoproteção conferida pelo ácido alfa-lipóico está relacionada com a preservação de um sistema antioxidante na cóclea.

A amifostina é uma pró-droga que é desfosforilada pela fosfatase alcalina para o metabólito ativo WR1065. Ekborn et al. (2004) iniciaram um estudo para testar a eficácia da proteção pela amifostina no tratamento com altas doses de CDDP, já que dados da literatura sugeriam um efeito otoprotetor. Foram avaliadas a eficácia antitumoral e a ototoxicidade em pacientes com câncer metastático tratados com alta dose de CDDP (125 – 150mg/m²) e amifostina. Os autores concluíram que a ototoxicidade era inaceitável, apesar do tratamento com amifostina.

Kalkanis, Whitworth e Rybak (2004) procuraram determinar a efetividade da vitamina E como um otoprotetor contra a ototoxicidade da cisplatina em ratos, considerando a vitamina E um limpador de radicais livres e importante componente da via antioxidante. Neste trabalho ficou demonstrada,

pelos testes de ABR pré e pós-tratamento, significante otoproteção nos ratos recebendo vitamina E, confirmada pela preservação de células ciliadas por microscopia eletrônica. Eles concluem que a vitamina E parece proteger contra a ototoxicidade da cisplatina em modelos animais e que futuros estudos são necessários para revelar a melhor dose e a utilidade clínica potencial da vitamina E como um agente otoprotetor.

Os salicilatos estão entre os medicamentos mais comumente usados por suas propriedades antiinflamatória, analgésica, antipirética e antitrombótica, principalmente na forma de aspirina (acetil salicilato). O salicilato pode intervir na via apoptótica, agir como limpador de radicais hidroxila e ter propriedades antineoplásicas. Com base nessas informações, Li et al (2002) testaram em ratos recebendo cisplatina o efeito otoprotetor do salicilato. Os autores sugerem que a administração de salicilato pode se tornar uma intervenção terapêutica efetiva contra os efeitos ototóxico e nefrotóxico associados com cisplatina, mas também informam que os efeitos colaterais da aspirina ou salicilato na função auditiva devem ser considerados, pois ambas as drogas têm um potencial ototóxico em doses altas, resultando em elevação temporária dos limiares e em tinido. Hyppolito, Oliveira e Rossato (2006) avaliaram a ação do salicilato de sódio, em porcos da guiné albinos, como um possível otoprotetor de células ciliadas externas contra a ação da cisplatina, usando emissões otoacústicas por produto de distorção (EOADP) e microscopia eletrônica de varredura e observaram apenas uma proteção anatômica parcial conferida pelo salicilato, sem sinais de proteção do estado funcional das células ciliadas externas.

Hyppolito et al. (2003) avaliaram, por meio das emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) e microscopia eletrônica de superfície (ME), a ação do EGB761 em cobaias albinas como possível otoprotetor e concluíram que o EGB761 atua como otoprotetor à ototoxicidade pela cisplatina. Além disso, eles sugerem que o EGB 761 deve ser testado na prática clínica, pois seu uso já é bastante difundido no tratamento de diferentes doenças.

Segundo Huang, Whitworth e Rybak (2007), o EGB761 protegeu ratos contra ototoxicidade induzida pela cisplatina.

Apesar dos vários estudos em busca da droga capaz de proteger a orelha interna dos efeitos deletérios da cisplatina, ainda não se chegou a uma droga, para uso em seres humanos, que possa proteger as células ciliadas e que, concomitantemente, não interfira no efeito antitumoral do quimioterápico e não produza efeitos colaterais indesejáveis.

2.2 Extrato de Ginkgo Biloba (EGB 761)

A árvore Ginkgo biloba existe na terra provavelmente há mais tempo do que qualquer outra árvore viva atualmente, sendo a única espécie sobrevivente de um grupo de plantas conhecido como Ginkgoales, cujos antepassados datam do período Paleozóico. É por isso considerada um “fóssil vivo”. Essas árvores só começam a reproduzir a partir dos 20 anos e podem viver por mais de 1000 anos. Tal longevidade do Ginkgo parece ser explicada, pelo menos em parte, pela sua resistência a doenças e adaptabilidade ao meio ambiente (Major, 1967; Sanchez et al., 2002). Segundo Blumenthal et al. (2003), o uso medicinal de folhas de Ginkgo foi primeiramente mencionado na medicina chinesa na dinastia Ming, em 1436.

Em 1964, um extrato de Ginkgo biloba (GB), chamado EGB761, foi desenvolvido por uma companhia farmacêutica alemã e, desde então, centenas de estudos têm examinado os efeitos do ginkgo em modelos animais e humanos. (Diamond et al., 2000).

Ginkgo biloba está entre as plantas medicinais mais vendidas no mundo. Uma grande variedade de metabólitos tem sido isolada da planta, tais como, terpenóides, polifenóis, alquilfenóis, ácidos orgânicos, carboidratos, ácidos graxos e lipídios, sais inorgânicos e aminoácidos. Contudo, os principais constituintes bioativos são terpenolactonas e os glicosídeos flavonóides, os quais são considerados responsáveis pelas atividades farmacológicas do seu extrato padronizado de folhas (Singh et al., 2008).

2.2.1 Constituintes Químicos e Farmacocinética

O extrato padronizado de folhas de Ginkgo (EGB761[®]) é um dos fitoterápicos mais testados clinicamente e prescritos na Europa, sendo, atualmente, o mais prescrito na Alemanha (Diamond et al., 2000, Blumenthal et al., 2003).

É um produto bem definido, que contém aproximadamente 24% (22-27%) de ginkgo glicosídeos flavonóides (quercetin, kaempferol e isorhamnetin) e 6% (5-7%) de terpeno-lactonas (ginkgolídeos - 3,1% e bilobalídeos - 2,9%) – (fig.5.). Os ginkgolídeos, terpeno-lactona somente presente na árvore do ginkgo, são diterpenos, cinco dos quais têm sido identificados (ginkgolídeos A, B, C, J e M), e o bilobalídeo é um sesquiterpeno (Christen e Maixent, 2002). Ginkgolídeos e bilobalídeos são conhecidos coletivamente como terpeno-trilactonas (TTL_s), compostos só presentes no ginkgo biloba e únicos produtos naturais que contêm o grupo *t*-butyl na sua estrutura (Singh et al.,

2008). Outros constituintes incluem proanthocyanadins, glicose, rhamnose, ácidos orgânicos, D-glucurac e ácidos ginkgólicos ¹. Os ácidos ginkgólicos são princípios potencialmente tóxicos que estão presentes nas folhas de ginkgo e que devem ser removidos para evitar reações alérgicas e gastrointestinais. Os flavonóides e os ginkgolídeos são os principais constituintes na folha do ginkgo (McKenna, Jones e Hughes, 2001). Na Alemanha, a Agência Federal de Saúde exige dos fabricantes de produtos de ginkgo que o conteúdo de ácido ginkgólico seja removido ou limitado a uma concentração de cinco partes por milhão (ppm) ou menos (McKenna, Jones e Hughes, 2001; Blumenthal, 2003).

Nos Estados Unidos (EUA), o EGB761[®] é uma das preparações fitoterápicas compradas sem prescrição (over-the-counter - OTC) mais comumente usadas, sendo vendido como suplemento dietético. E muitos dos produtos de ginkgo (OTC) podem não ser padronizados (Diamond et al., 2000).

As quantidades relativas dos vários flavonóides ou dos componentes ginkgolídeo e bilobalídeo podem variar em diferentes preparações comerciais¹ (Blumenthal et al., 2003).

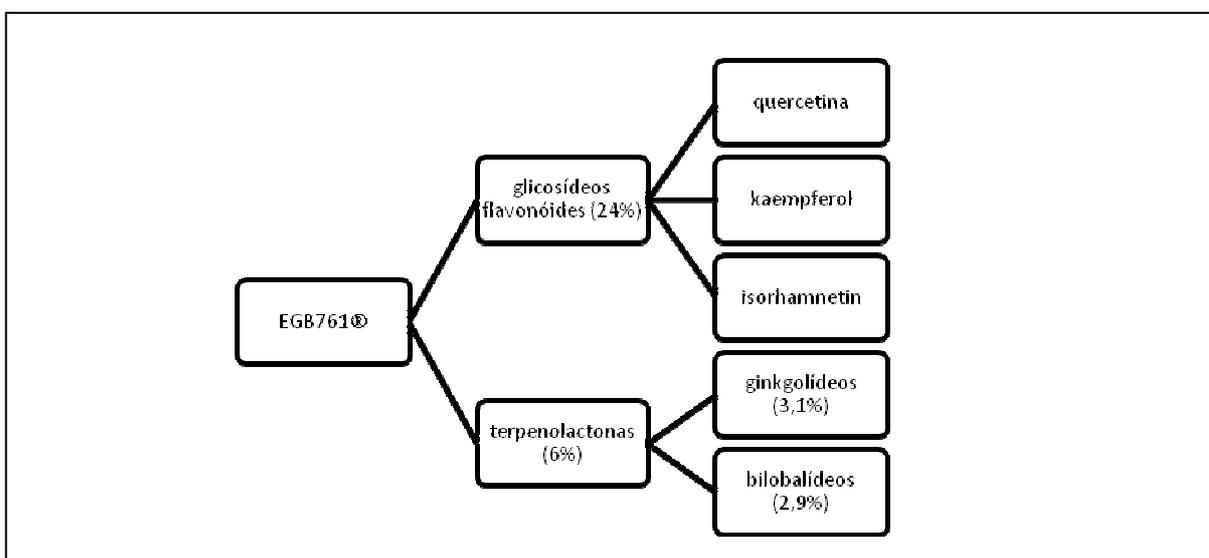


Figura 5: Constituintes químicos do EGB761[®] e quantidades aproximadas

O EGB761[®], que foi originado pelos produtos farmacêuticos Dr. Willmar Schwabe (Dr. Willmar Schwabe Group), tem estado disponível na Europa como um extrato de planta desde o início da década de 90¹.

¹ EGB 761: Ginkgo biloba extract, Ginkor. **Drugs in R&D**. v. 4, n.3, p. 188-193, 2003.

Na Alemanha, o órgão responsável pela regulamentação de medicamentos no país (E⁵), equivalente ao FDA americano (US Food and Drug Administration for botanicals), aprovou o EGB761[®] para tratamento sintomático de déficits de memória, concentração e depressão por doença cerebral orgânica. Dúzias de produtos de EGB761[®] estão atualmente disponíveis para os consumidores, e a maioria desses produtos usa uma proporção de 50:1 por peso (50 libras de folhas secas para cada libra do extrato final; cada libra equivale a cerca de 454g), que é a média na qual o produto alemão está baseado (Diamond et al., 2000, Blumenthal et al., 2003).

Blumenthal et al.(2000 *apud* Blumenthal et al., 2003) informam que a literatura dá pouco ou nenhum respaldo aos benefícios clínicos de outras formas de dosagens da folha de ginkgo natural ou a baixas concentrações do extrato feito da folha.

Segundo Le Bars e Kastelan (2000), os extratos padronizados de EGB761[®] podem ser administrados intravenosamente, na forma líquida, ou em comprimidos, mas, geralmente, são administrados na forma de cápsulas ou comprimidos e, com base na evidência de dose-resposta, uma dosagem de até 240mg seria a mais apropriada. Os mesmos autores informam que a padronização de fitoterápicos em geral e do ginkgo em particular é um fator essencial para reduzir a variabilidade nos programas de pesquisa. Eles revisaram a literatura quanto à eficácia e à segurança do EGB761 para tratar distúrbios de memória e demência e, inicialmente, observaram que a maioria dos estudos testou o extrato padronizado de ginkgo biloba, EGB761[®], cuja formulação e composição é idêntica ao produto registrado na Alemanha sob o nome de Tebonin[®] forte (Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals, Karlsruhe). Christen e Maixent (2002) também informam que, em humanos, uma dose de 120 ou 240mg/dia parece ser ativa no tratamento crônico.

Segundo Diamond et al. (2003), uma série de estudos têm tratado de questões acerca da absorção, da duração dos efeitos e da excreção do EGB761[®], e, com base em dados de atividades específicas no sangue, a farmacocinética do EGB761[®] foi característica de um modelo de dois compartimentos, consistindo de uma fase de primeira ordem e com uma meia-vida de aproximadamente 4,5 horas.

A distribuição, por sua vez, foi principalmente associada com o plasma, por meio de uma absorção gradual após 48 horas, Especulou-se que o trato gastrintestinal superior também foi um sítio de absorção, além do tecido neuronal, glandular e ocular – os níveis de atividade alcançaram o pico em 1,5 horas (concentração plasmática máxima) – e que, geralmente, o EGB761[®] completo ou

seus constituintes têm exibido meias-vidas variando de 2 a 4 horas e níveis de atividade que alcançam o pico em 1,5 a 3 horas em modelos animais e humanos. Um segundo pico plasmático aparece 12 horas após a administração, indicando metabolismo entero-hepático ².

2.2.2 Mecanismos Biológicos de Ação

Segundo Diamond et al. (2000), os componentes químicos do EGB761[®] têm sido implicados em ações biológicas que são responsáveis pelos seus efeitos clínicos. O EGB761[®] tem sido usado experimentalmente para tratar sintomas de demência associada à idade e a Alzheimer; dano cerebral traumático; derrame; derrame multiinfarto; aterosclerose cerebral; insuficiência cerebral; edema cerebral; inflamação; toxicidade por glutamato; necrose; apoptose; tinido; disfunção sexual; e degeneração macular. Os autores relatam que os efeitos clínicos do EGB761[®] podem ser periféricos e centrais, incluindo as propriedades vasomoduladoras, metabólica, antiplaquetária, moduladora de receptor/transmissor e antioxidante, de tal forma que, como efeito vasomodulador, o EGB761[®] potencializa a concentração de norepinefrina e causa a constrição C_a^{2+} dependente da aorta e da veia cava. E, em contraste aos mecanismos constritores, os efeitos dilatadores parecem ser endotélio-dependentes. Entre os efeitos metabólicos, o EGB761[®] causou aumentos na absorção de glicose e síntese de glicogênio, e estudos com células hipóxicas indicam que ele pode atrasar o início da glicólise hipóxica. Sua atividade parece inibir a agregação plaquetária, por aumentar as concentrações de trombolíticos derivados do endotélio (i.é, NO e PGI₂), e o ginkgolídeo B mostra antagonismo ao PAF.

De acordo com McKenna, Jones e Hughes (2001), de forma geral, são os flavonóides do ginkgo que agem como antioxidantes, por limparem do corpo os radicais livres, resultantes de processos oxidativos, enquanto os ginkgolídeos antagonizam atividades de inflamação e de coagulação sanguínea associada com o PAF.

O quadro 1, a seguir, apresenta informações sobre os componentes isolados do EGB761[®] e suas atividades, conforme Blumenthal et al. (2003) e Diamond et al. (2000).

² TEBONIN: comprimidos. Responsável técnico Wagner Moi. São Paulo: Altana Pharma, 2008. Bula de remédio.

Quadro 1: Componentes do EGB761[®] e atividades correspondentes segundo os autores

Autores	Componente isolado	Atividades
Gryglewski <i>et al</i> (1987)	Fração flavonóide	Inibe a agregação plaquetária
Barth <i>et al</i> (1991)		Inibe a peroxidação lipídica
Ramassamy <i>et al</i> (1992)		Media a absorção de 5-HT
Smith <i>et al</i> (1996)		Age com limpador de radical livre
Ahlemeyer e Krieglstein (1998)		Aumenta a liberação e absorção de 5-HT
De Feudis (1998); Blumenthal <i>et al</i> (1998)		Inibe a redução de colinoceptores muscarinérgicos relacionada a idade, e estimula a absorção de colina no hipocampo
Calapal <i>et al</i> (2000)		Inibe a formação de Óxido Nítrico
Logani <i>et al</i> (2000)		Antagonismo ao fator ativador plaquetário (PAF)
Coeffler (1998), WHO (1999), Bracquet (1988), Operpichler (1990); DeFeudis (1991)	Ginkgolídeo B	Inibe o PAF, inibe 3'5'-GMPcíclico fosfodiesterase
Janssens <i>et al</i> (1995)	Bilobalídeo	Atrasa o início da glicólise hipóxica
Amri <i>et al</i> (1996)	Bilobalídeo, Ginkgolídeo A, ginkgolídeo B	Induz a diminuição de PBR; aumenta a concentração de ACTH.

Abreviaturas: 5-HT - serotonina; PBR - receptor periférico tipo benzodiazepínico; ACTH - hormônio adrenocorticotrófico.

2.2.3 Propriedade Antioxidante do EGB 761[®]

Vários autores, em diferentes épocas, vêm estudando e investigando os efeitos anti-radicaais livres do EGB761[®] e de seus constituintes isolados, *in vitro* e *in vivo*, em modelos humanos e animais, com o propósito de justificar o uso do EGB761[®] como protetor por eliminar os radicais livres, e comprovar esse efeito com base em evidências científicas.

Pincemail et al. (1989), em seu trabalho, propuseram estudar, *in vitro*, a ação do EGB761 contra o ânion superóxido (O_2^-), o qual está direta ou indiretamente implicado no dano celular. Eles observaram um efeito anti-radical livre e uma atividade enzimática, pois descobriram que o EGB761 é eficiente contra o ânion superóxido ou por sua capacidade de diretamente limpar o radical ou pela presença no extrato de uma atividade superóxido dismutase ferro.

Marcocci et al. (1994) relatam em seu estudo propriedades do EGB761[®] como limpador de radicais, em sistemas *in vitro*. Primeiro eles avaliam a interação do EGB761[®] com superóxido e radicais hidroxila e, para avaliar o papel dos terpenos, eles comparam com uma mistura sem terpeno; a seguir eles avaliam a interação do EGB761[®] com o óxido nítrico (NO) e o efeito do EGB761[®] na atividade xantina oxidase. Seus resultados sugerem que o EGB761[®] limpa superóxidos; a fração terpeno teria um papel na limpeza de radicais superóxidos; o EGB761[®] pode ser um limpador de NO e inibe a atividade da xantina oxidase, uma fonte celular enzimática de superóxido e peróxido de hidrogênio. Além disso, eles informam que esses achados poderiam explicar os efeitos benéficos do extrato em desordens funcionais ligadas ao estresse oxidativo, como em alterações tipo isquemia-reperfusão no cérebro, cóclea, coração e retina.

Autores estudaram o efeito do EGB761[®] no estresse oxidativo e na peroxidação lipídica, em macrófagos e células endoteliais vasculares, e demonstraram que o EGB761[®] é um limpador de radicais peroxil, e indica um possível papel para o extrato no tratamento de doenças envolvendo radicais livres e dano oxidativo. E, além disso, sugerem um potencial uso terapêutico na patogênese da aterosclerose (Maitra et al., 1995; Rong, Geng e Lau, 1996). Kobuchi et al. (1997) avaliaram o efeito do EGB761[®] na síntese do NO em macrófago de rato, e seus achados mostram que o EGB761[®] não só age diretamente como um limpador de NO, mas também inibe a produção do NO nos macrófagos, sob condições inflamatórias de dano tecidual.

Hibatallah, Carduner e Poelman (1999) avaliaram, *in vitro* e *in vivo*, a atividade limpadora de radicais livres de um extrato original de ginkgo sem terpenos e com alta concentração (33%) de ginkgo glicosídeos flavonóides, principalmente quercetin e kaempferol. De acordo com os achados do estudo, o extrato de ginkgo reduz a inflamação, por agir como um limpador de radicais livres contra as ROS envolvidas na inflamação. Eles enfatizam que, de acordo com resultados anteriores, o extrato de ginkgo deve estar presente em uma ótima concentração, para maior eficiência.

Fukaya e Kanno (1999) testaram o efeito limpador de radicais livres do EGB761 contra a toxicidade da cisplatina, decorrente da geração de radicais livres, em ratos. Eles investigaram a ocorrência ou não de proteção do EGB 761[®] sobre os danos causados pela CDDP ao aparelho auditivo, aos rins, e também a influência do EGB761[®] no efeito antitumoral da CDDP. Foi observado, por fim, que o EGB 761[®] reduz o dano causado pela CDDP ao aparelho auditivo e ao rim e não exerce influência sobre o efeito antitumoral da CDDP quando utilizado em conjunto com essa droga.

Bridi et al. (2001) avaliaram o efeito antioxidante do EGB761[®] no hipocampo, substância negra (SN) e corpo estriado de ratos tratados com o extrato padronizado de ginkgo biloba, por meio da análise da peroxidação lipídica (LPO), e a atividade das enzimas antioxidantes, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e sugerem um possível papel para o extrato no tratamento de doenças que envolvem radicais livres e dano oxidativo.

Diamond et al. (2000) fazem uma revisão sobre efeito antioxidante do EGB761[®] e informam que ele tem se mostrado capaz de induzir a destruição de várias espécies de radicais – incluindo OH, O²⁻, difenilpicrilhidrazil, e adriamicil –, varrer NO_s e reduzir os níveis de nitrato de uma maneira dose-dependente, e que o componente flavonóide pode inibir a agregação plaquetária e a peroxidação lipídica e mediar a capacidade do ginkgo de proteger os sistemas fisiológicos de espécies de oxigênio reativo (ROS).

Em artigo de revisão, Christen e Maixent (2002) relatam que um dos mais intrigantes aspectos do EGB761 é que ele age mais para modular e regular do que para estimular ou inibir. De forma que, dependendo das circunstâncias, ele pode, simultaneamente, dilatar ou contrair um vaso sanguíneo ou fazer marcadores neuroendócrinos ou neuroquímicos variarem na direção apropriada do momento. Como, por exemplo, induzir a produção de NO por células endoteliais ou, ao contrário, limpar o radical livre NO e prevenir a ativação endotelial. Poderia ainda diminuir o consumo de glicose e aumentar o armazenamento de glicogênio. E ações celulares, como o efeito nos canais de íons das

membranas, seguem a mesma lógica. Se a célula é sensível à presença de um acúmulo de radicais livres ou a uma quantidade deste ou daquele íon, ele age para estabelecer a homeostase. E, por ser o EGB761 um complexo extrato de planta, ele possivelmente promove essas ações adaptativas em razão da presença de várias moléculas que tornam possível o envolvimento de diferentes mecanismos, e a atividade combinada de todos os seus componentes é necessária para a uma ótima ação terapêutica.

Dessa forma, Kim et al. (2005) demonstraram que o EGB761 também induz a apoptose de células cancerosas da cavidade oral pela ativação da via da caspase-3, e que o EGB 761 teria um potencial para uso como agente quimiopreventivo em câncer de cavidade oral. Os autores informam que, apesar do EGB761 ter uma ação apoptótica em células de câncer oral por ativação da via da caspase-3, no sistema nervoso central ele apresenta uma ação antiapoptótica ou neuroprotetora, por reduzir a atividade da caspase-3, diferentemente dos resultados deste trabalho. Portanto, a ação do EGB761[®] parece ser célula-específica em termos de envolvimento da caspase-3, e mostra seu efeito variando na direção apropriada do momento.

Huang, Whitworth e Rybak (2007) avaliaram a eficácia do EGB761 como um otoprotetor contra a ototoxicidade induzida pela cisplatina em ratos, por meio de medidas do potencial endococlear (EP), teste de respostas auditivas do tronco cerebral (ABR_s) e microscopia eletrônica de varredura das cócleas processadas. Os achados demonstraram significativa otoproteção nos ratos recebendo EGB761 e altas doses de CDDP, pelas medidas de ABR, EP e CCE na microscopia eletrônica, e oferecem evidências dos potenciais benefícios do antioxidante EGB761 na preservação da audição daqueles em uso de quimioterapia com cisplatina, o que confirma os achados anteriores do estudo de Fukaya e Kanno (1999).

Por fim, em uma revisão realizada por Mahadevan e Park (2008), os autores fazem uma explanação sobre a química, a eficácia, a segurança e os usos do EGB761 e informam que os dois mecanismos de ação propostos para sua atividade antioxidante seriam limpar radicais livres e, diretamente ou indiretamente, inibir a formação de radicais livres. Eles concluem que o EGB761 tem exibido efeitos terapêuticos complexos, que incluem efeitos em doenças neurodegenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, tinido, queixas geriátricas, desordens psíquicas, e que o principal mecanismo de ação em todos esses casos seria sua atividade antioxidante.

2.2.4 Perfil de Segurança

De forma geral, parece haver um consenso de que o consumo de produtos do extrato de ginkgo está associado a um baixo risco.

Duché et al. (1989) avaliaram o efeito do extrato de ginkgo biloba na indução enzimática microsomal e demonstraram que o EGB761 não teve efeito no sistema de oxidação microsomal hepático de drogas e, portanto, não alteraria o metabolismo de medicações usadas concomitantemente, as quais são metabolizadas por esse sistema.

De Feudis (1998) informa que a toxicidade aguda (LD_{50}), após administração oral de EGB761, em camundongo, é de 7,73g/kg, mas não foi possível determinar o valor no rato. Já na injeção intravenosa de EGB761 em ratos e camundongos, o LD_{50} é de cerca de 1,1g/kg, e o LD_{50} , após injeção intraperitoneal, é de 1,9g/kg em camundongos, e de 2,1g/kg em ratos. Estudos de toxicidade crônica conduzidos em ratos (27 semanas) e cachorros (26 semanas), com doses de EGB761 de 20 e 100mg/kg/dia inicialmente, e gradualmente aumentada para 300, 400 e 500mg/kg/dia, em ratos, e 300 e 400mg/kg/dia, em cachorros, não mostrou evidência de dano a órgão e nenhum prejuízo da função hepática ou renal. Também a administração oral de diferentes doses crescentes de EGB761 a ratos e coelhos não causou efeitos teratogênicos ou afetou a reprodução, e testes *in vitro* e *in vivo* mostraram que o EGB761 não possui atividade mutagênica. Além disso, ele informa que, em humanos, estudos de toxicidade revelaram um alto nível de segurança com respeito à superdosagem, com base num estudo conduzido em voluntários saudáveis recebendo dose oral única de 600mg, em que não houve mudanças no tempo de sangramento, coagulação ou contagem de células do sangue.

Em uma revisão de Le Bars e Kastelan (2000), os autores informam que, em todos os estudos revisados, o perfil de eventos adversos do EGB761 não foi diferente daqueles do placebo.

McKenna, Jones e Hughes (2001), em seu artigo de revisão, relatam, entre outras coisas, que não se sabe ao certo se o extrato de ginkgo pode potencializar ou ter efeitos aditivos quando combinado com medicações sedativas. Eles fazem uma exposição de vários relatos de casos encontrados na literatura, citando-os como exemplos da dificuldade inerente da avaliação da segurança do ginkgo na ausência de estudos do tipo caso-controle de larga-escala. Informam também que os produtos de ginkgo biloba são contra-indicados para indivíduos com

hipersensibilidade à planta ou seus produtos e que reações alérgicas têm sido atribuídas aos alquilfenóis, incluindo ácidos ginkgólicos, potentes alérgenos de contato que são encontrados em maior quantidade nas sementes. Colocam que a Comissão Reguladora Alemã proíbe a venda de extratos de ginkgo contendo mais do que 5ppm desses ácidos, pois níveis acima de 5ppm representam um perigo para aqueles que são alérgicos a outras plantas que contêm alquilfenóis, que mostram reação cruzada com os alquilfenóis do ginkgo.

Os mesmos autores informam ainda que, em raros casos, têm sido relatados como efeitos colaterais dores de cabeça, queixas gastrointestinais leves e reações alérgicas de pele.

Diamond et al. (2000) em sua revisão, que o EGB761 deveria ser usado com cuidado quando administrado com anticoagulantes, por ter uma ação antagonista ao PAF, e poderia exercer um efeito sinérgico, quando combinado com outras drogas inibidoras da MAO. Mas, Blumenthal et al. (2003), diversos trabalhos anteriores com relação às interações do EGB761 com outras drogas, como inibidores da MAO, drogas anticoagulantes e antiplaquetárias, diuréticos, anticonvulsivantes e antidepressivos, demonstram achados controversos e que não dão suporte às possíveis interações.

Bent et al. (2005) fazem uma revisão sistemática da literatura a fim de identificar todos os potenciais relatos de caso de sangramento em pessoas em uso de ginkgo, e também relatam um caso de sangramento espontâneo associado ao ginkgo biloba, para avaliar se o uso do ginkgo está relacionado à causa do sangramento. Os autores sugerem, após avaliação estruturada de relatos de caso publicados, uma possível associação causal entre o uso do ginkgo e os eventos de sangramento, e ainda que, em razão dos sérios eventos adversos relatados – como sangramento intracraniano –, mais estudos de segurança dessa planta deveriam ser avaliados e que os pacientes usando ginkgo deveriam ser avisados sobre o risco de sangramento. No mesmo ano, Gaus et al. (2005) tentam identificar reações adversas a drogas, demonstradas por risco de sangramento, utilizando uma base de dados de prescrição, e seus resultados mostraram que a taxa de complicações como sangramento é baixa, quando se toma qualquer droga usada para demência, entre elas, o ginkgo biloba.

Wolf (2006) avaliou em seu estudo se o EGB761[®] aumentava os conhecidos efeitos do ácido acetilsalicílico (AAS) na agregação plaquetária, no tempo de sangramento ou em outros parâmetros da coagulação em sujeitos saudáveis, e seus achados sugeriram que a administração concomitante

de AAS e EGB761[®] não constituem um risco para segurança, incluindo em uma população de pacientes mais idosa, submetida a tratamento com EGB761[®].

Da mesma forma que Wolf, Gardner et al. (2007) se propuseram a examinar, em um estudo clínico randomizado, duplo-cego e placebo controlado, o efeito do EGB761 e da aspirina na agregação e na função plaquetária de idosos com doença arterial periférica e fatores de risco para doença cardiovascular, e concluíram que idosos tomando doses relativamente altas de GB (300mg/dia), combinado com 325mg/dia de aspirina, não apresentaram impacto detectável clinicamente ou estatisticamente nos índices de coagulação, quando comparados com o efeito da aspirina isolada, e que, portanto, não houve evidência de aumento da disfunção plaquetária induzida pela aspirina promovida pelo EGB761.

Finalmente, para investigar se episódios de sangramento estão associados ao consumo de ginkgo biloba e se esses episódios têm uma base farmacodinâmica, idiossincrásica ou são coincidentes, uma revisão de estudos clínicos controlados e relatos de casos foi realizada por Bone (2008), o qual informa não haver evidências em estudos controlados de que doses normais de EGB761[®] ou de extratos quase semelhantes tenham qualquer impacto na hemostasia. Além disso, Mahadevan e Park (2008) informam que o EGB761[®] tem provados benefícios terapêuticos, ressaltando, todavia, que sua segurança em longo prazo ainda precisa ser apropriadamente comunicada.

2.3 Exames para Avaliação da Ototoxicidade

2.3.1 Considerações Gerais

Um conjunto de métodos audiológicos tem sido disponibilizado para monitorização da ototoxicidade.

Até o início da década de 90, segundo Campbell e Durrant (1993), nenhum padrão oficial existia para monitorar a ototoxicidade. Os autores revisaram alguns dos testes disponíveis na época e fizeram observações para tentar desenvolver protocolos de monitorização. Entre os testes avaliados por eles, incluem-se a Audiometria Convencional (AC), a Audiometria de Altas Freqüências (AAF) e Emissões Otoacústicas (EOA_s); ressaltavam que testes como EOA_s e o de Resposta Auditiva do Tronco Cerebral (ABR) ainda estavam em evolução e que sua utilidade clínica ainda não era determinada; e afirmavam também que, até aquela data, os dados que existiam sobre estudos em

humanos eram insuficientes para avaliar a eficácia clínica das EOAs em monitorar a ototoxicidade. Entretanto, relatavam que, se as EOAs provassem ser efetivas na monitorização da ototoxicidade, ofereceriam vantagens por não serem invasivas, não necessitarem da resposta do paciente e por serem medidas rapidamente.

Zorowka, Schimitt e Gutjahr (1993) avaliaram a audição de oito crianças e adultos jovens com câncer, em tratamento com cisplatina, usando AC e EOAs_s seriados, um dia antes e após várias doses da droga. Eles observaram que as mudanças nas EOAs parecem ser detectáveis antes das mudanças observadas na AC e que, portanto, o teste de EOAs_s pode ser uma ferramenta mais sensível do que a AC para detecção de disfunção do ouvido interno, por causa de agentes ototóxicos. Corroborando achados de outros autores, eles afirmam que o teste de EOAs_s oferece um modo não invasivo de avaliar diretamente a função do ouvido interno.

Por não existirem critérios de interpretação de resultados, a monitorização da ototoxicidade não era uma prática comum. Então, em 1994, a American Speech-Language-Hearing Association (ASHA) desenvolveu critérios para controle audiológico de indivíduos recebendo terapia com drogas cocleotóxicas. Ela informa que a avaliação prospectiva da função auditiva permanece como único método confiável para se detectar a presença de cócleotoxicidade antes da perda auditiva sintomática, e propõe os seguintes critérios audiométricos para cocleotoxicidade:

- a) diminuição de 20dB em qualquer freqüência testada;
- b) diminuição de 10dB em duas freqüências quaisquer adjacentes testadas;
- c) perda de resposta em três freqüências consecutivas onde as respostas foram previamente obtidas (especificamente para as freqüências mais altas).

Por fim, afirma que a alteração deve ser confirmada pela repetição do teste. Relata, também, que as evidências mostram que a AAF (testa faixa de freqüências acima de 8000Hz) seria o método de escolha para a detecção mais precoce da perda auditiva ototóxica. Entretanto, em 1993, Campbell e Durrant já haviam informado que, como na AC, seria importante a seleção de critérios de alteração na AAF, e que limiares normais ou inalterados na faixa de altas freqüências não garantem limiares normais ou inalterados na faixa convencional. Wilber (2001) informa que ainda não existem padrões oficiais para esse procedimento e que, na prática, ainda existem alguns problemas que podem impedir sua utilização na rotina clínica (calibração, informação de normatização).

Segundo a ASHA (1994), medidas objetivas devem ser usadas quando não for possível obter medidas comportamentais, como em pacientes não-responsivos ou com limitada responsividade por doença ou pela idade. Informam ainda que eletrococleografia (ECochG), EOA_s e ABR são as medidas objetivas com potencial para monitorar a ototoxicidade desses pacientes. Contudo, relatam que a ECochG é um teste que requer colocação de um eletrodo transtimpânico, para um teste mais sensível, o que faz o exame não ser disponível a todos os pacientes. Além disso, necessita de uma quantidade significativa de tempo para obter uma informação frequência-específica, o que o torna uma técnica inapropriada para monitorização auditiva objetiva de rotina, e ABR também está sujeito às mesmas limitações da ECochG, com relação ao tempo de teste e à especificidade de frequência.

Além do mais, eles ressaltam que, naquele momento, não podiam recomendar critérios específicos de aplicação dos testes objetivos para monitorização da ototoxicidade, mas afirmam que a avaliação com EOA_s é especificamente sensível ao estado das CCEs na cóclea, e é um teste objetivo eficiente, que tem sido usado para avaliar a função coclear em pacientes recebendo cisplatina com resultados promissores.

2.3.2 Emissões Otoacústicas (EOA_s)

Emissões Otoacústicas (EOA_s) são sons de origem coclear, que podem ser registrados por um microfone encaixado dentro do canal do ouvido. Esses sons aparecem no conduto auditivo externo quando o tímpano recebe vibrações provenientes da cóclea e que são transmitidas através da orelha média. Essas vibrações ocorrem como um subproduto de um mecanismo coclear vulnerável e único, conhecido como o “amplificador coclear”. Esse, portanto, é um processo mecânico ativo, em que o órgão de Corti faz uso da energia metabólica para criar microvibrações adicionais, que acentuam o movimento induzido por som das estruturas cocleares e aumentam a sensibilidade e a seletividade de frequência do ouvido. Considera-se que o “amplificador coclear” está situado nas CCEs, as quais, *in vitro*, têm se mostrado móveis, em resposta a altas frequências de estimulação elétrica, e vulneráveis ao trauma fisiológico e físico, tais como, anóxia e exposição a toxinas, ou ruídos altos (Kemp, Siobhan e Bray, 1990; Lonsbury-Martin, Whitehead e Martin, 1991).

O principal valor das EOAs é que sua presença indica que o mecanismo receptor coclear pré-neural é capaz de responder ao som de modo normal. As emissões são frequência específica e frequência seletiva, permitindo obter informações sobre diferentes partes da cóclea,

simultaneamente. É um teste que combina velocidade operacional, não invasibilidade, objetividade, sensibilidade e seletividade de frequência. E somente ouvidos normais ou quase normais produzem emissões otoacústicas. Quando presente, as EOAs exibem um alto grau de diferença entre os indivíduos, de tal forma que, em alguns pacientes, o resultado será expresso mais como uma probabilidade estatística de normalidade do que uma medida absoluta do limiar. Entretanto, as características da resposta acústica registrada de um ouvido dependerão da estimulação e do indivíduo, de modo que, sob condições de teste fixas, essas respostas são altamente estáveis e alterações que ocorram em minutos podem ser monitorizadas, por exemplo, como as que resultam do ruído, do uso de drogas, de doença, ou de estimulação eferente (Kemp, Siobhan e Bray, 1990). Franklin et al.(1992) também informam que as EOAs têm mínima variabilidade de teste-reteste, mostrando alta confiabilidade tanto para medidas seriadas quanto em dias consecutivos e em semanas, em indivíduos com audição normal, sem doença da orelha média. Além disso, eles informam que as EOAPDs produzem resultados confiáveis de 1 a 8 KHz. Corroborando esses dados, Musiek, Smurzynski e Bornstein (1994), explicam que a EOAPD de regiões de frequências baixas pode ser difícil de testar, uma vez que, tipicamente, o ruído de fundo é mais alto em frequências baixas (abaixo de 1Khz), e o teste de altas frequências (acima de 8KHz) é problemático em razão da complicada distribuição de pressão dentro do conduto auditivo externo.

Segundo Tlumak e Kileny (2001), muitas variáveis afetam a presença e a magnitude das EOAs, como as desordens do ouvido médio e ouvido externo, os níveis de ruído ambiental e interno/biológico, o número de medidas feitas e características dos tons primários, ou seja, o exame de EOAs é um teste de uma função coclear vulnerável e essencial, sendo um bom indicador de perda auditiva, mas pode ser afetado pela qualidade do acoplamento entre o sensor e o paciente (o encaixe da sonda) e por fatores não auditivos (Kemp, 2002).

A intensidade é um fator essencial na detectabilidade das EOAs, mas é a presença de uma resposta detectável a um estímulo particular que é clinicamente importante, e não sua potência (Kemp, 2002).

As emissões otoacústicas podem ser separadas em 2 categorias gerais: emissões espontâneas e evocadas. As emissões espontâneas (EOAS_s), como o próprio nome diz, ocorrem na ausência de qualquer estimulação do ouvido. São tons de aproximadamente 20dB_{NPS}, encontrados no conduto auditivo externo em 40 a 60% dos ouvidos saudáveis. E as condições particulares de

feedback interno coclear, necessárias para manter as EOASs, nem sempre estão presentes nem são importantes para uma audição normal. Portanto, as EOASs têm aplicação clínica limitada. Por outro lado, as emissões evocadas ocorrem em resposta à apresentação de estímulos acústicos ao ouvido. Com base no estímulo utilizado para elicitá-las, elas podem ser categorizadas em três subtipos, dos quais há dois tipos que são amplamente usados, a saber: EOA_s transientes evocadas (EOATEs), que são elicitadas por um transiente acústico, tais como um *click* ou *toneburst*; e as EOAs por produtos de distorção evocadas (EOAPD_s), que são geradas em resposta a dois tons puros contínuos, separados na frequência por uma diferença prescrita (em Hz). Esses tipos de emissões evocadas são encontrados essencialmente em todos os ouvidos com audição normal. Mas, apesar das EOATEs serem mais fortes (ouvidos infantis saudáveis tipicamente produzem fortes níveis de EOA_s de 15dBNPS até mais do que 30dBNPS) e mais fáceis de serem identificadas na faixa de frequências fundamentais da fala, de 1– 4KHz, e, em ouvidos jovens, se estenderem até 6–7KHz, muitos ouvidos adultos clinicamente normais produzem fracas EOATEs (menos de 3dBNPS), sem resposta substancial acima de 4KHz (Kemp, Siobhan e Bray,1990, Kemp, 2002).

2.3.3 Emissões Otoacústicas por Produtos de Distorção (EOAPD_s)

2.3.3.1 Aplicações Clínicas

O teste de EOA_s é um método de avaliação objetivo, não-invasivo, de fácil aplicação, pelo posicionamento de um pequeno microfone no conduto auditivo externo, e que mede o estado funcional das células ciliadas externas. Para que as EOAs sejam medidas, a orelha média deve estar normal, pois o teste depende da habilidade dessa orelha em transmitir a energia do som para dentro da orelha interna. Apresentam medidas de teste-reteste muito objetivas e conseqüentemente muito confiáveis. As EOAs estão presentes na orelha de essencialmente todos os indivíduos com audição normal, e reduzidas ou ausentes naqueles com distúrbios cocleares. Além disso, a utilidade clínica das EOAs evocadas é acentuada por sua habilidade de testar regiões discretas de frequência específica da cóclea, distinguindo, assim, regiões de frequência prejudicadas daquelas com função normal (Lonsbury-Martin, Whitehead e Martin, 1991), ou melhor, é da não-linearidade da orelha interna que as EOAPDs se valem para avaliar as CCEs com absoluta seletividade de frequências, dando uma idéia setorizada da vitalidade dessas células, ao longo de toda a membrana basilar (Munhoz et al., 2000, p.135).

Ohlms, Lonsbury-Martin e Martin (1990) avaliaram o potencial para uso clínico do teste de EOAPDs, em pacientes com doença coclear ou retrococlear conhecida e diagnosticada por testes audiológicos já padronizados, e demonstraram que as emissões por produto de distorção são um teste não invasivo, frequência-específico da função das células sensoriais e que descreve objetivamente o limite entre a audição normal e a anormal. Além disso, essas emissões foram capazes de detectar alterações dinâmicas em processos de doença progressiva, sugerindo seu uso importante no diagnóstico e no tratamento da disfunção coclear.

Entre outras aplicações, esse teste tem sido utilizado na monitorização de pacientes submetidos a tratamento com drogas consideradas ototóxicas, em virtude de sua característica de avaliar o estado funcional das células ciliadas externas, detectando lesões cocleares desencadeadas por drogas ototóxicas antes que sejam registradas alterações no limiar auditivo, uma importante vantagem em relação às outras técnicas mencionadas, que faz dele a melhor escolha para monitoramento de pacientes recebendo esse tipo de terapia (Lonsbury-Martin, Whitehead e Martin, 1991, Ress et al., 1999).

2.3.3.2 Características das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção

De acordo com Probst e Hauser (1990), as EOAPDs são evocadas por dois tons puros e consistem de energia acústica acima do ruído de fundo, detectável no espectro do canal do ouvido em frequências diferentes daquelas dos estímulos, os quais são chamados F_1 e F_2 e estão pouco distanciados em frequência, segundo Kimberley (1999).

Esses tons puros são chamados primários, com F_2 suavemente mais alto em frequência do que F_1 ($F_1 < F_2$). Em humanos com função auditiva normal, uma razão entre F_2 e F_1 de 1.22 tende a produzir os maiores produtos de distorção (Gorga et al., 1997); além disso, resultados prévios de Stover, Gorga e Neely (1996) recomendavam níveis primários de estímulo como sendo $L_1/L_2 = 65/55$ dBNPS, por representarem níveis médios produtores de máximo desempenho.

Em razão da intermodulação não-linear coclear subjacente, fundamental para a função coclear normal, entre os dois tons primários, a cóclea produz vários novos componentes de frequência acústica que podem viajar para o canal do ouvido, dos quais o mais proeminente dos produtos de distorção e, portanto, mais facilmente registrado é uma frequência particular localizada em $2F_1 - F_2$ e, por essa razão, é a usada na avaliação clínica. A maioria dos relatos clínicos usa o

termo EOAPD como sinônimo de $2F_1-F_2$, mesmo que haja muitas outras EOAPDs além dessa frequência particular. (fig. 6).

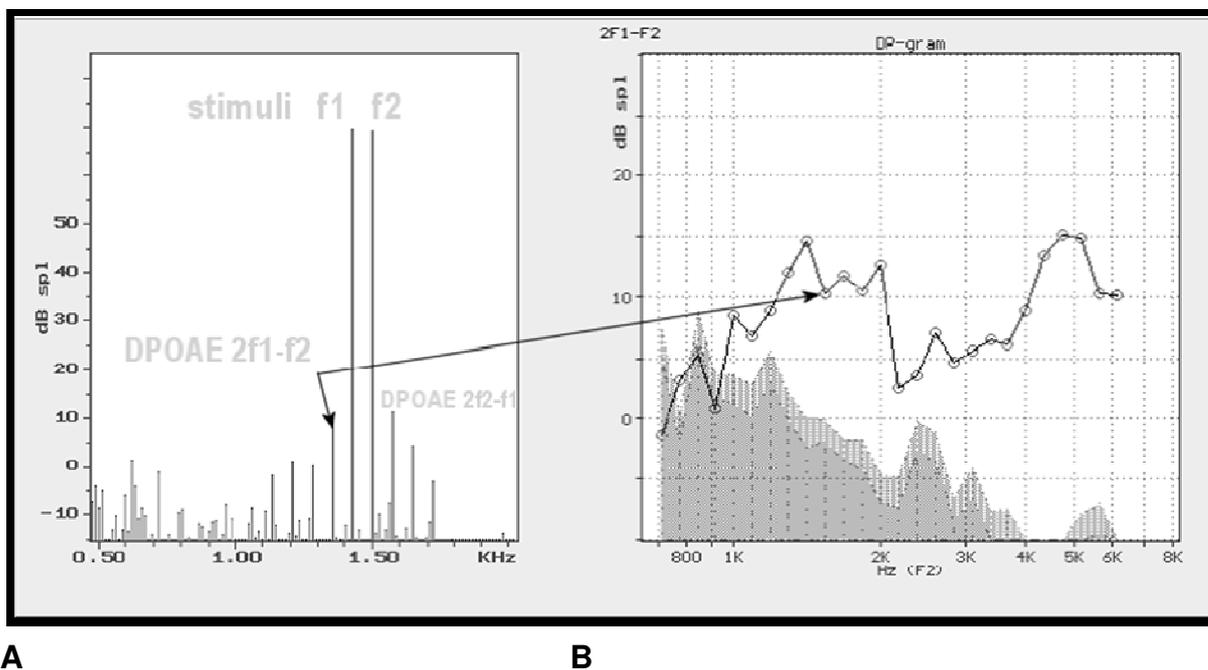


Figura 6: (A) O espectro do som em um conduto auditivo humano saudável durante a estimulação por dois tons puros, $f_1 = 1425$ Hz e $f_2 = 1500$ Hz, ambos em 70 dB NPS. As linhas espectrais entre 1100 – 1800 Hz, em qualquer lado das linhas de estímulo, são tons de intermodulação criados pela cóclea. Cada uma é separada de sua vizinha por um intervalo de $[f_2-f_1]$. A análise clínica da EOAPD tipicamente localiza o nível exatamente de um desses produtos de distorção ($f_{pd} = f_1 - [f_2 - f_1] = 2f_1 - f_2$). (B) Isso permite que um “DP gram” seja construído. Uma separação da frequência estímulo $f_2/f_1 \sim 1.2$ resulta na EOAPD mais forte. A porção inferior sombreada (direita) indica a contaminação pelo ruído (extraído de Kemp, 2002).

Os produtos de distorção são comumente medidos usando-se dois protocolos, um como uma função de resposta-crescimento ou entrada-saída (I/O) ou limiar da EOAPD, que, segundo Gorga et al. (1997), parece ter menos utilidade clínica, pois é mais difícil de medir e consome mais tempo, e outro como um audiograma, no qual sua intensidade é usada como indicador do estado coclear, delineada em gráfico como uma função da frequência no chamado “DP-gram”, ou audiograma do produto de distorção (PD). Dessa maneira, as EOAPDs são medidas para tons primários mantidos em nível constante (exemplo $L_1/L_2 = 65/55$), enquanto a frequência da emissão é aumentada em intervalos regulares de 10 intervalos por oitava (Lonsbury-Martin, Whitehead e Martin, 1991). De acordo com esses mesmos autores, as amplitudes da EOAPD, tanto no nível como na frequência, dependem dos estímulos primários. Portanto essas variáveis – diferenças dos níveis de F_1-F_2 , L_1-L_2 – e sua proporção de frequência (F_2/F_1) são cruciais na determinação da amplitude do PD. Segundo Munhoz et al. (2000, p.136), a relação $F_2/F_1 = 1,22$, que expressa a distância de um terço de oitava

entre uma e outra freqüência, é a melhor, pois reforça a amplitude da resposta, conforme citado anteriormente.

O nível do produto de distorção em um conduto auditivo externo saudável geralmente é pequeno (5 a 15 dBNPS), podendo estar acima de 20dBNPS, sendo, em humanos, geralmente 60 a 70 dB mais baixos do que os níveis primários elicítantes. A amplitude de uma EOAPD, como dito anteriormente, é dependente do estímulo primário e encontra-se muito reduzida e geralmente ausente no evento de condições patológicas comuns relacionadas à disfunção das CCEs, como na perda auditiva relacionada à idade ou ototoxicidade. Esse método de registro das EOAs tem seu uso clínico difundido (Probst e Hauser, 1990; Kimberley, 1999; Kemp, 2002).

Em 1990, Probst e Hauser avaliaram a possibilidade de testar as EOAPDs em um ambiente clínico típico, com parâmetros selecionados, em que eles configuraram arbitrariamente um valor de 6 dB acima do ruído de fundo como um nível mínimo necessário para a presença de EOAPD.

Stover, Gorga e Neely (1996) examinaram o efeito do nível do estímulo primário na capacidade das medidas de EOAPD em separar ouvidos com audição normal daqueles com audição prejudicada e informavam, a princípio, que não estava claro qual era o protocolo mais efetivo e se a amplitude da EOAPD ou o limiar da EOAPD era o melhor indicador do estado coclear. Eles relataram nesse estudo que, com exceção da freqüência mais baixa 500Hz, as EOAPDs foram capazes de separar ouvidos normais dos danificados em todas as freqüências, ou seja, que as EOAPDs podem diferenciar os ouvidos normais dos danificados mesmo para freqüências tão baixas quanto 707Hz, e concluíram que uma decisão diagnóstica pode ser feita com base nas amplitudes em resposta a níveis moderados de estimulação.

Entretanto, posteriormente Gorga et al. (1997) relatam que o desempenho do teste de EOAPD foi muito melhor em médias e altas freqüências, quando comparadas a freqüências abaixo de 1000Hz , e que os resultados da relação S/R apresentaram um desempenho ligeiramente melhor do que as medidas de amplitude da EOAPD.

Kemp (2002) relata que estas emissões oferecem uma maior faixa de freqüência de observação (acima de 10kHz) com menos sensibilidade a condições menores e subclínicas em adultos, sendo portanto melhor usadas para investigação clínica avançada em pacientes adultos.

Gorga et al.(1997) também relatam que são necessários valores padrão específicos para as medidas do teste, se deseja-se usar a medida clinicamente. E que no caso em que as medidas das

EOAPDs são usadas para determinar se a perda auditiva está presente; ou a amplitude das EOAPDs ou a relação EOAPD/ruído (S/R) tipicamente é medida, e uma decisão com respeito ao estado auditivo é baseada no valor medido, se ele está acima ou abaixo de algum valor padrão. Então, estes autores se propuseram a desenvolver um método que descrevesse a probabilidade de que qualquer resposta medida fosse proveniente ou de um ouvido normal ou de um ouvido danificado. E eles encontraram que em nenhuma condição a distribuição de respostas de EOAPD de ouvidos normais e ouvidos prejudicados estava completamente separada, significando que valores padrão ótimos resultaria em erros na identificação do estado auditivo. E concluíram que dentro de certos limites, parece que as medidas de EOAPD podem ser usadas para identificar corretamente o estado auditivo. Eles descrevem um método que permite atribuir a qualquer valor de EOAPD medido (amplitude de EOAPD, EOAPD/ruído) a probabilidade de que a resposta está vindo ou da distribuição de respostas normais ou de respostas prejudicadas, e envolve uma análise conhecida como “curvas características de operação relativa” (ROC_s). Eles forneceram valores de amplitude e da relação S/R das EOAPDs das distribuições de respostas nos percentis 95 e 90, e 10 e 5 em função da frequência onde, por exemplo, amplitudes de resposta acima do percentil 95 de distribuições prejudicadas foram interpretadas como normal porque poucos ouvidos com problema(10 ou 5 %) foram capazes de produzir respostas tão grandes ou maiores. E respostas abaixo do percentil 5 de distribuições normais foram classificadas como perda auditiva porque poucos ouvidos normais(10 ou 5%) produziram respostas tão pequenas ou menores. E as amplitudes que ficaram entre estes dois percentis foram consideradas originárias de um status auditivo duvidoso ou incerto. Eles encontraram, por exemplo, uma faixa de relação S/R nos percentis 5 e 95 de 9 e 8dBNS em 6000 e 8000Hz respectivamente, quando foram considerados os efeitos de fundo, com diminuição das áreas de sobreposição tanto para as amplitudes como para a relação S/R.

E informam ainda que sujeitos com audição normal tendem a produzir grandes respostas de EOAPD (ou baixos limiares de EOAPD) e sujeitos com algum grau de perda auditiva tendem a não produzir respostas.

Kimberley (1999) informa que, até este momento, nenhuma máquina em laboratório de pesquisa ou disponível comercialmente, permite obter uma estimativa do audiograma a partir de respostas das EOAs, e que os médicos são forçados a interpretar os dados das EOAPDs.

Segundo Azevedo (2003, p.35) considera-se alteração coclear quando a resposta das EOAPDs estiver ausente (abaixo do ruído) ou presente, porém fora dos níveis considerados normais. E como o desempenho do teste tem se mostrado melhor para frequências agudas e médias quando comparadas com as graves, as EOAPDs são mais recomendadas para monitorização da função coclear em indivíduos expostos a ruídos intensos e/ou medicados com drogas ototóxicas, incluindo a quimioterapia.

2.3.4 Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção e Avaliação da Ototoxicidade por Cisplatina

Desde décadas passadas já se sabe que a cisplatina provoca alterações na cóclea por destruição das células ciliadas externas (Stadnick et al., 1975). Tange e Vuzevski (1984) encontraram um efeito tóxico da cisplatina também sobre a estria vascular. E Laurell et al. (1987) relataram que a principal alteração morfológica do ouvido interno causada pela administração de cisplatina é a destruição das CCEs, a qual é mais pronunciada no giro basal da cóclea e, portanto, se correlacionando com a perda auditiva em alta frequência. As células ciliadas internas também podem ser destruídas, mas só após doses mais altas de CDDP. E segundo Rybak e Whitworth (2005) a ototoxicidade pela cisplatina envolve alterações no sistema antioxidante das células ciliadas externas.

Zorowka, Schmitt e Gutjahr (1993) informam que as EOAs estão ausentes em indivíduos que apresentem uma perda auditiva de mais de 30-35dBNA, e que uma redução das amplitudes das EOAs reflete um dano ao processo de transdução na cóclea.

Por estarem as CCEs entre as primeiras estruturas da orelha danificadas pela cisplatina, e por serem as medidas das EOAs um método não invasivo de investigação coclear que fornecem uma avaliação objetiva do funcionamento das CCEs da cóclea, alterações precoces nas EOAs podem refletir um dano coclear subclínico. Tais alterações podem ser vistas como diminuições na amplitude das EOAPDs; diminuições na relação S/R; e ou perda de EOAPD específicas de regiões onde ocorreu o dano das CCEs (Knight et al., 2007). Porém, este mesmo autor ressalta que critérios determinantes de alteração ototóxica, nas EOAPDs, ainda não existem.

Na literatura a metodologia empregada para avaliação da ototoxicidade por meio das EOAs varia muito nos diversos trabalhos encontrados.

Sockalingam et al. (2002) avaliaram os efeitos precoces da cisplatina nos limiares das EOAPDs (baseado na função I/O), em um modelo animal, e verificaram uma diferença (elevação)

significante nos limiões da EOAPD em 6KHZ, entre os limiões antes e 4 dias após a infusão de CDDP e entre o segundo e quarto dias após a infusão, demonstrando que os limiões das EOAPDs têm potencial para ser usado como indicador de ototoxicidade induzida pela cisplatina. Biro et al. (2006) estudaram as características e os fatores de risco da ototoxicidade da cisplatina, em pacientes com câncer testicular, por meio das EOAPDs medindo suas amplitudes, e encontraram que as alterações nas amplitudes das emissões estavam fortemente correlacionadas às doses cumulativas de cisplatina.

Os autores fazem comparações entre quais métodos que seriam mais eficazes em detectar alterações precoces na função auditiva, provocadas pela cisplatina.

Ozturan et al.(1996) mediram as amplitudes das EOAPDs e compararam com os resultados obtidos na audiometria de tons puros convencional (AC), e observaram reduções nas EOAPDs que ocorreram antes que a alteração na AC pudesse ser detectada. Toral-Martiñon et al. (2003) também compararam as EOAPDs com a AC, e encontraram uma especificidade no diagnóstico de 97% para as EOAPDs, para perdas auditivas menores de 45dBNA, e uma sensibilidade de 57% para pacientes com perda maior que 45dBNA.

Sie e Norton (1997) avaliaram animais expostos a altas doses de CDDP, e compararam as mudanças encontradas nos limiões das EOAPDs com as encontradas nos limiões das ABR, em resposta a estímulos nas frequências entre 2 e 12KHz, e observaram uma elevação dos limiões tanto das EOAPDs quanto da ABR, sendo que a magnitude das alterações foi maior para as EOAPDs. Os autores sugerem que tal fato pode refletir a maior sensibilidade das EOAPDs em relação a função das CCEs. Hatzopoulos et al. (1999) compararam, em ratos tratados com CDDP, as respostas das EOAs (EOATE e EOAPD) com os limiões da ABR, que foram usados somente como um confirmador da presença do possível efeito ototóxico, e observaram uma diminuição significativa da relação S/R das frequências dos produtos de distorção 2f1-f2, 6,34; 7,13 e 7,56KHz e aumento significativo das latências da ABR em 8KHz e relatam que as EOATEs não se mostraram uma técnica útil para descrever o estado ototóxico do órgão de Corti. Diferente disso, Sockalingam et al. (2000) fizeram a mesma comparação em seu estudo, usando três espécies diferentes de roedores, para avaliar o papel das EOAs e da ABR como indicadores precoces de ototoxicidade pela cisplatina, e encontraram que os registros das EOATEs e EOAPDs são técnicas válidas e sensíveis para a avaliação clínica da ototoxicidade por CDDP. Em 2001 Hatzopoulos et al. avaliaram a ototoxicidade

da cisplatina em animais, utilizando as EOAPDs com três protocolos de DP-gram, curvas de I/O (entrada/saída ou limiar do PD) e ABR sugerindo que, neste caso, o procedimento mais sensível para detecção precoce da ototoxicidade seria o protocolo I/O da EOAPD.

Stavroulaki et al. (2001) e Coradini et al. (2007) compararam a eficácia das EOAs (EOAPDs e EOATEs) com a da AC. Os primeiros autores determinaram que as respostas das EOAPDs seriam válidas se tivessem amplitudes maiores que 2 desvios-padrão (DP) acima do ruído de fundo, e os últimos determinaram que uma relação S/R abaixo de 6dBNPS em cada frequência seria indicativo de dano coclear. Ambos observaram que as EOAPDs são superiores aos testes da AC e EOATE na monitorização audiológica destes pacientes. Estes autores concluíram que as EOAPDs são uma técnica mais sensível para detecção precoce da perda auditiva, quando comparada com a AC e EOATE, com a vantagem de não necessitar da cooperação do paciente. E além de sensíveis, as EOAPDs foram superiores à AC e/ou às EOATE como método de monitorização das perdas auditivas em pacientes sob tratamento com CDDP.

Também com o objetivo de verificar qual o método de investigação seria mais adequado para identificar precocemente as alterações auditivas induzidas por drogas ototóxicas ou mesmo desenvolver um protocolo de triagem para ototoxicidade pela cisplatina, os autores citados a seguir, compararam as AC, AAF e EOAs (EOAPD e EOATE). Ress et al. (1999) compararam as EOAPDs, AAF e AC, e consideraram como presente uma EOAPD ≥ 3 dBNPS acima do ruído de fundo. Enquanto Garcia, Lório e Petrilli (2003) avaliaram as EOATEs e EOAPDs pela comparação das médias das amplitudes da relação S/R por frequência. Dhooge et al. (2006) consideraram como um critério de resposta válido, um nível de amplitude da EOAPD > 3 dBNPS acima do ruído de fundo. Por fim, Knight et al. (2007) consideraram uma diminuição na EOAPD maior do que 8dBNPS, como uma alteração clínica significativa. Estes autores chegaram às seguintes conclusões:

- a) a AAF é um método sensível para detecção precoce do dano auditivo, indispensável para monitorização da ototoxicidade;
- b) a EOAPD pode ser utilizada como um instrumento adicional à monitorização auditiva;
- c) apesar da AAF ainda ser o “padrão ouro” para triagem da ototoxicidade, não é tão produtiva em monitorar populações de pacientes mais velhos e
- d) nos casos em que os pacientes não podem ser avaliados pela audiometria ou que não cooperarão completamente em um exame comportamental tradicional, por serem difíceis de avaliar

como crianças ou pacientes mais velhos ou muito doentes, a EOAPD por ser um método não invasivo; rápido; fácil de usar; e não ser influenciado por interpretações subjetivas; se torna uma forma mais precisa de monitoramento auditivo do que a AAF.

O quadro 2 a seguir mostra um resumo dos diferentes autores e os parâmetros analisados durante a aplicação clínica do teste de EOAs, para avaliação da ototoxicidade.

Quadro 2: Parâmetros considerados para a avaliação da ototoxicidade, utilizando-se o teste de Emissões Otoacústicas, segundo os autores.

Autores	População estudada	Tipo de EOAs utilizado	Critérios Considerados
Ozturan et al.(1996)	Sujeitos com CA de próstata	Medidas da amplitude das EOAPDs	Redução das amplitudes
Sie e Norton (1997)	Animais expostos a dose alta de CDDP	EOAPD na função I/O	Elevação do limiar da EOAPD
Ress et al.(1999)	Pacientes em tratamento com CDDP	EOAPD na função DP-gram	EOAPD \geq 3dB acima do ruído de fundo
Hatzopoulos et al.(1999)	Avaliação da ototoxicidade da CDDP em ratos	EOATE e EOAPD – relação sinal/ruído (S/R)	Alterações da relação S/R – Não quantifica
Sockalingam et al.(2000)	Animais de laboratório expostos a cisplatina	EOATE e EOAPD na função DP-gram	EOATE \geq 3dB e EOAPD \geq 3dB acima do ruído de fundo
Stavroulaki et al.(2001)	Avaliação de crianças em tratamento com CDDP	EOATE e EOAPD nas funções I/O e DP-gram	EOAPD $>$ 3dB acima do ruído
Hatzopoulos et al.(2001)	Avaliação da ototoxicidade da CDDP em ratos	Função DP-gram e I/O em 8KHz e ABR (8, 12 e 16KHz)	EOAPD presente se \geq 3dBNPS acima do ruído
Sockalingam et al.(2002)	Avaliação da ototoxicidade da CDDP em cachorros	Limiar da EOAPD (função I/O) em 2, 4 e 6KHz	EOAPD presente se \geq 3dBNPS e 2DP acima do ruído
Toral-Martiñón et al.(2003)	Avaliação das EOAPDs em crianças	EOAPD	S/I

Autores	População estudada	Tipo de EOA utilizada	Crítérios Considerados
Garcia, Lório e Petrilli (2003)	Monitoramento da audição de pacientes expostos a CDDP	EOATE e EOAPD	Fez comparação das médias das amplitudes da relação S/R por frequência
Biro et al.(2006)	Avaliação da ototoxicidade em pacientes com câncer em tratamento com CDDP	EOAPD, medida em 8 frequências de 750 a 8000Hz	Mediu as amplitudes e designou como diminuído ou ausente. Não quantifica
Dhooge et al.(2006)	Avaliação de crianças em tratamento com platina.	EOAPD, na função DP-gram	A resposta era válida se fosse 3 dBNPS > ruído
Knight et al.(2007)	Avaliação da audição com EOAPD e AAF, e AC em crianças em tratamento com CDDP e carboplatina	Amplitudes das EOAPDs	Diminuição maior que 8dBNPS na EOAPD foi considerada uma alteração clínica significativa.
Coradini et al.(2007)	Avaliou o efeito ototóxico da cisplatina em crianças com câncer	EOAPD, função DP-gram de 1 a 8KHz e EOATE	EOATE- critérios de passa: Amplitude > 3dBNPS, Estabilidade ≥ 80%, REPRO > 70%; e EOAPD, se S/R ≥ 6dNPS.

Abreviaturas: dBNPS, decibel nível de pressão sonora; EOAPD, emissão otoacústica por produto de distorção; EOATE, emissão otoacústica transiente evocada; REPRO, reprodutibilidade; S/R, relação sinal/ruído; AAF, audiometria de altas frequências; AC, audiometria convencional; S/I, sem informação.

Os autores diferiram tanto em que função utilizar; se a amplitude (na função Dp-gram); o limiar (função I/O), ou a relação S/R quanto nos valores a serem empregados. Em muitos trabalhos eles não determinam os valores utilizados, e em outros apenas citam os resultados como presentes ou ausentes.

3 MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES/DF) (Anexo A), sob o número 024/07, em conformidade com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS/MS), que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares. No momento da avaliação inicial, foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a todos os pacientes (Anexo B), os quais foram informados de que os resultados da pesquisa seriam divulgados para fins científicos, sem a identificação de seus participantes, ficando garantidos o sigilo e a privacidade.

3.2 Tipo de Estudo

Trata-se de um ensaio clínico controlado, randomizado e duplo-cego, em que os pacientes incluídos na pesquisa foram alocados em dois grupos aleatoriamente: um grupo de estudo (GE) e um grupo controle (GC). Os grupos foram tratados e acompanhados por um período de noventa dias.

3.3 População Estudada

Foram encaminhados do ambulatório de oncologia do Hospital de Base do Distrito Federal e do Hospital Universitário de Brasília, no período compreendido entre junho de 2007 e junho de 2008, 44 indivíduos em tratamento para câncer, que iniciariam quimioterapia com cisplatina (CDDP). A seleção dos pacientes a serem acompanhados no estudo foi feita pela própria pesquisadora, após os indivíduos serem informados sobre a realização dos testes e a inclusão dos dados no trabalho, concordância, assinatura do TCLE e realização de anamnese dirigida por meio de um questionário, visando conhecer a história otológica progressiva. Foram adotados os seguintes critérios de inclusão:

- a) idade acima de 18 anos;
- b) ausência de doença da orelha média, retrococlear ou coclear conhecida;
- c) nenhum tratamento com cisplatina anteriormente;

d) ausência de alteração no teste de emissão otoacústica por produto de distorção (EOAPD), na audiometria de tons puros (ATP) e imitanciometria, em exame antes do início do tratamento quimioterápico.

Desses pacientes encaminhados, aconteceram 29 perdas pelos motivos listados a seguir:

- * 14 foram excluídos por não se enquadrarem em pelo menos um dos critérios de inclusão pré-estabelecidos;
- * 09 dos previamente selecionados desistiram do acompanhamento por motivos pessoais;
- * 04 morreram durante o acompanhamento; e
- * 02 deixaram de ser acompanhados, porque a quimioterapia foi suspensa por causa do agravamento do estado geral. Foram então acompanhados 15 pacientes do início ao fim da pesquisa.

3.4 Delineamento Experimental

Os pacientes então selecionados foram randomizados, por sorteio, em dois grupos, que concluíram o acompanhamento da seguinte forma:

- a) Grupo de Estudo (GE): composto por 08 indivíduos que foram tratados com o extrato padronizado de ginkgo biloba (EGB761[®]), na dose de 120 mg, para ser ingerido duas vezes ao dia (240mg/dia);
- b) Grupo Controle (GC): grupo controle do estudo, composto por 07 indivíduos que receberam placebo (PBL), para ser ingerido duas vezes ao dia.

Tanto os EGB761[®] quanto os placebos foram doados pelo pesquisador a cada paciente, que foi orientado a ingerir o medicamento (EGB761[®]) ou o placebo no mesmo dia do início da quimioterapia, momentos antes de chegar ao hospital. Os placebos foram manipulados em farmácia hospitalar e eram semelhantes aos EGB761[®]. Todos os pacientes receberam as mesmas orientações do pesquisador independentemente do grupo a que pertenciam. Os exames iniciais (AC/Imitanciometria e EOAPD) e todos os demais foram realizados por um mesmo examinador, que não foi o pesquisador. Os EGB761[®] e os PBL contidos em frascos individualizados foram doados após um sorteio, realizado na primeira avaliação após a seleção e inclusão do primeiro indivíduo na pesquisa, e a seguir os PBL e os EGB761[®] foram distribuídos pelo pesquisador, um após outro (um a um) a cada paciente, à medida que os mesmos eram incluídos no estudo. Nem o examinador nem o

paciente sabiam qual droga estava sendo administrada, se PBL ou EGB761[®]. Além disso, para tentar garantir que cada paciente estava ingerindo a medicação, eles eram orientados a retornar para as reavaliações trazendo os frascos vazios ou quase vazios para serem trocados por novos frascos de medicamentos.

Droga

Foi utilizada a dose de 120mg, em duas tomadas ao dia (240mg/dia), do extrato de Ginkgo Biloba, fórmula original do Dr. Willmar Schwabe Group, para garantir as quantidades apropriadas dos seus princípios ativos (Le Bars e Kastelan, 2000).

O placebo foi empregado, pois não havia nenhum outro otoprotetor estabelecido no mercado que pudesse ser comparado com o EGB761[®].

Os pacientes pertencentes aos dois grupos, GE e GC, eram concomitantemente tratados com CDDP. Houve períodos em que alguns pacientes da pesquisa só estavam recebendo EGB761[®], pois seus ciclos de quimioterapia já haviam terminado, mas ainda não havia sido completado o período de 90 dias de acompanhamento.

Seguimento

As avaliações iniciais com ATP e imitanciometria, assim como o teste de EOAPD, foram realizadas imediatamente antes da primeira infusão de CDDP e, em todas as visitas subseqüentes foi realizado apenas o teste de EOADP com procedimentos idênticos àqueles usados durante a coleta dos dados iniciais, e sempre antecederiam as sessões de quimioterapia.

Os efeitos da terapia com CDDP e EGB761[®] nas várias medidas da função auditiva foram avaliados pela comparação dos resultados dos testes iniciais pré-tratamento (primeira avaliação - A1) com aqueles obtidos em períodos diferentes de tratamento, ou seja, aproximadamente 30, 60 e 90 dias de iniciado o tratamento com EGB761[®] ou placebo. Os períodos de acompanhamento são demonstrados na figura 7 a seguir.

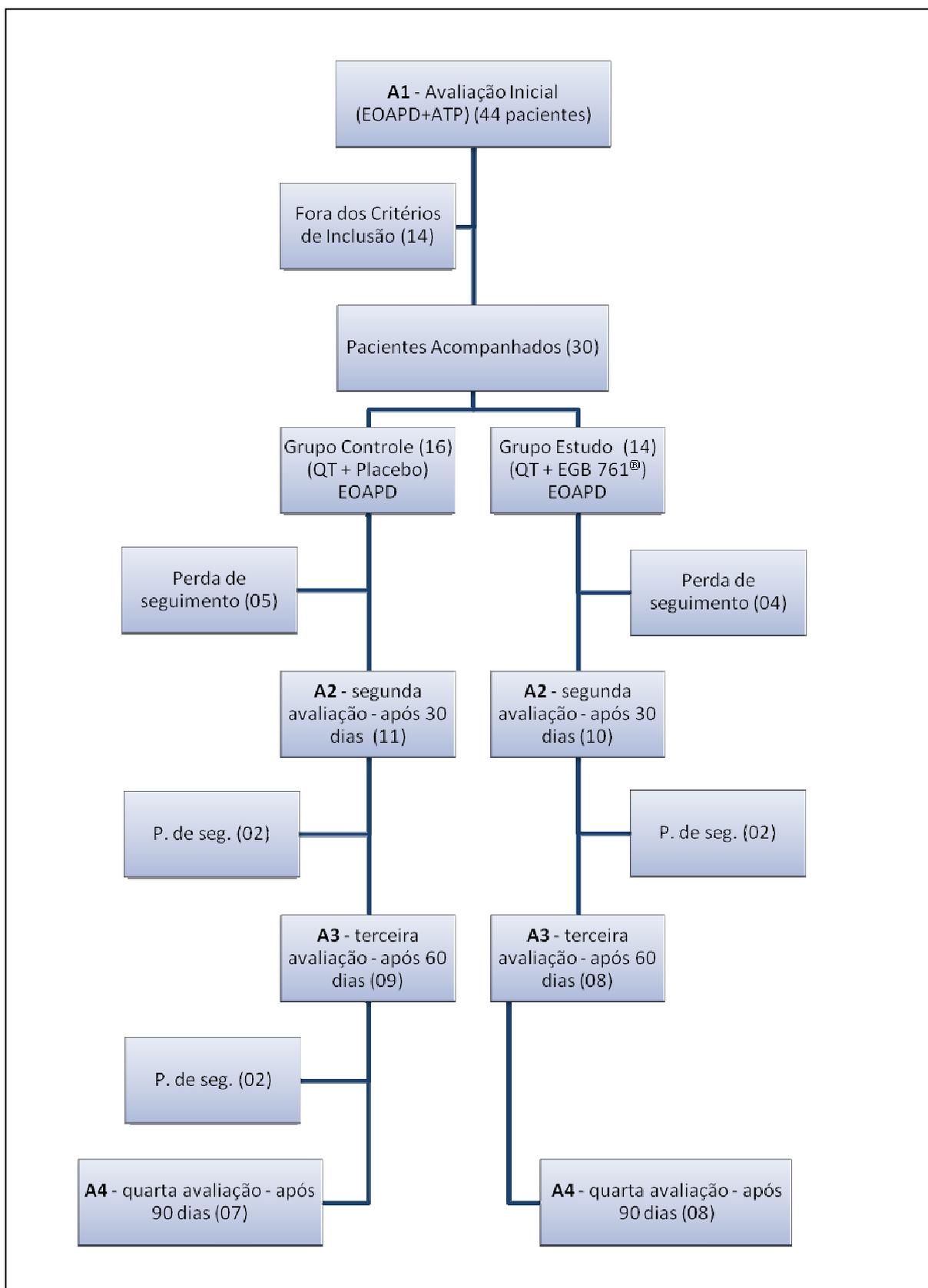


Figura 7: Seleção, acompanhamento e perdas dos sujeitos da pesquisa

3.5 Procedimentos

Testes de Função Auditiva

Na sessão de avaliação inicial, foi realizada uma Audiometria Convencional, em cabine acusticamente tratada, que mediu os níveis de limiar auditivo na faixa de freqüências de 0.25 a 8KHz (i.é, em 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 KHz). Limiares menores ou iguais a 25dBNA foram considerados normais (Silman e Silverman, 1991). O equipamento utilizado foi o audiômetro de dois canais AD-229E Clinical Audiometer – Interacoustics[®]. O fone padrão TDH 39P foi utilizado para aferição do limiar tonal. Além da audiometria de tons puros, o teste de imitanciometria também foi realizado para avaliar o estado funcional da orelha média por medir a sua pressão, e os limiares dos reflexos acústicos evocados por estimulação acústica aplicada ipsi (1, 2 KHz) e contralateralmente (1, 2, 3, 4 KHz), utilizando-se o imitanciômetro AZ 7 – Interacoustics[®].

O teste de EOAPD foi realizado em uma sala com mínimo nível de ruído, mas sem tratamento acústico, com o paciente sentado confortavelmente. Foi avaliado na função DP-gram em que as emissões foram evocadas pelo uso de dois tons puros simultâneos em 2 freqüências diferentes, F_1 e F_2 , de modo que $F_1/F_2 = 1.22$, e o parâmetro de respostas da relação $2F_1-F_2$ nas freqüências de 750 a 8KHz, em intervalos de 2 pontos por oitava. Os níveis tonais primários foram $L_1 = 65$ e $L_2 = 55$ dBNPS ($L_2 = L_1 - 10$). De acordo com padrões já estabelecidos, a EOAPD foi considerada representativa de dano coclear, quando demonstrou uma relação S/R < 8 dBNPS em cada freqüência. Além disso, as EOAPDs foram também consideradas alteradas, caso não se enquadrassem nos parâmetros limitantes de distribuições cumulativas de normalidade dos percentis 90 e 10.

As EOAPDs foram medidas independentemente em cada ouvido, e considerou-se que o paciente possui alteração coclear por alteração unilateral ou bilateral.

Parâmetros Utilizados

As alterações induzidas pela cisplatina nas EOAPDs foram definidas pela diminuição dos níveis de S/R (< 8dBNPS) ou pela ausência de respostas em cada uma das freqüências analisadas, com base nos parâmetros estabelecidos por Gorga et al.(1997) e contidos no equipamento Scout Bio-

logic³, no protocolo 750-8000Hz Diagnostic test, o qual foi empregado para coleta dos dados. O software Scout inclui protocolos pré-configurados que representam protocolos típicos usados para diagnóstico, sendo apresentado a seguir aquele utilizado para a pesquisa.

- * Frequências de 750 a 8.000Hz;
- * Intensidade de L₁ e L₂: 65 e 55dB NPS;
- * F₂/F₁: 1.2;
- * N.º Máximo de estímulos: 50;
- * Amplitude mínima do sinal (EOAPD): - 5dB NPS;
- * Amplitude mínima da relação sinal/ruído (S/R): 8dB NPS;
- * Amplitude mínima do ruído: - 17dB NPS.

Também foram utilizados valores de distribuição cumulativa de respostas provenientes provavelmente de orelhas normais e/ou orelhas danificadas, conforme os percentis 90 e 10, a partir da frequência de 1KHz, apresentados na tabela.3 a seguir.

Quadro 3: Valores das amplitudes da EOAPD em função da frequência e dos percentis 90 e 10 (adaptado de Gorga et al.,1997).

EOAPD							
Percentil	1000	1500	2000	3000	4000	6000	8000
95	7.65	3.83	-0.90	-2.30	0.18	-2.08	-9.97
90	4.40	0.43	-3.50	-5.55	-4.42	-6.88	-12.85
10	-8.10	-6.73	-9.85	-11.50	-5.93	-7.84	-22.20
5	-12.05	-9.80	-13.90	-16.25	-9.23	-11.00	-26.00

Protocolo de Quimioterapia

O protocolo de quimioterapia foi aquele instituído pela rotina do hospital de origem e consistiu-se de pré-hidratação com fluidos intravenosos, seguida pela administração de cisplatina concomitante com manitol, e pós-hidratação associada com medicação sintomática (volume aproximado total de 2.000 ml), durante uma sessão de infusão que variou para cada paciente, dependendo da dose de cisplatina (CDDP) administrada.

³ BIO-LOGIC SYSTEMS CORP. Scout Sport System. User's and Service Manual, Mundelein, 2001. 214p.

Os pacientes usavam diferentes esquemas de quimioterapia, listados a seguir.

- * 20 a 50mg/m² a cada semana, num total de cinco ou seis ciclos;
- * 50 a 75mg/m² a cada 21 ou 28 dias;
- * 20mg/m² em ciclos de cinco dias consecutivos, com intervalo de 14 dias até o próximo ciclo.

As doses cumulativas variaram de 50 a 300mg/m². Alguns pacientes também receberam outros agentes quimioterápicos, mas, por não serem considerados ototóxicos, foi observada apenas a relação entre administração de cisplatina e o desenvolvimento de ototoxicidade.

As indicações para quimioterapia foram:

- * Carcinoma epidermóide ou Adenocarcinoma de colo de útero;
- * Carcinoma de não-pequenas células de pulmão;
- * Timoma;
- * Carcinoma epidermóide de palato mole;
- * Adenocarcinoma de ampola de Váter;
- * Tumor de células germinativas de ovário.

3.6 Análise Estatística

Os dados demográficos (identificação, sexo, idade), clínicos (orelha, tipo e localização da neoplasia), relacionados ao tratamento (datas, agentes, dosagens) e relacionados aos resultados dos exames pré e pós-tratamento foram compilados em fichas individuais (Anexo C). Os achados foram correlacionados ao objetivo, qual seja: avaliar se houve efeito otoprotetor do extrato de ginkgo biloba, por meio do teste de emissão otoacústica por produto de distorção, durante o período de acompanhamento.

As características da população estudada serão apresentadas nos resultados com auxílio de métodos de estatística descritiva.

Os resultados das amplitudes do sinal das EOAPDs, das orelhas direita e esquerda, foram agrupados, visto que dados da literatura informam que a perda auditiva induzida pela cisplatina geralmente é bilateral e simétrica.

A partir desse agrupamento, foram realizadas as seguintes análises:

- a) Foi calculada a média aritmética das amplitudes das EOAPDs por frequência (KHz), antes da primeira dose de cisplatina e após a última dose cumulativa de cisplatina;
- b) Foi calculada a média aritmética das amplitudes das EOAPDs por frequência (KHz), por classes de doses de cisplatina separadamente;
- c) Também foi feita uma análise das amplitudes em relação aos parâmetros de normalidade dos percentis 90 (P_{90}) e 10(P_{10}) e por fim;
- d) Foi realizada uma análise comparativa da relação sinal/ruído (S/R) das EOAPDs.

Todas essas análises foram igualmente realizadas para o grupo controle (GC) e grupo estudo (GE) para fins de comparação entre os grupos.

Para a análise estatística, os grupos foram comparados pelos testes estatísticos de U-ManWhitney, Kruskal Wallis e T de Student, com níveis de confiança estatística de 95% para comparar e avaliar o comportamento das informações entre as avaliações. Para aplicação de tais testes, foram utilizados os *softwares* MINITAB 13 e SPSS 11.

O teste U-ManWhitney foi usado para comparação das médias entre amostras de duas populações independentes, ou seja, GE e GC. O de Kruskal Wallis, para verificar se existia perda de audição (por ototoxicidade) estatisticamente significativa em cada grupo, pois as doses cumulativas de cisplatina se dispõem de forma independente, já que o delineamento experimental não fornece comparações pareadas. E, para observar se houve perda de audição nos pacientes dos dois grupos (GE e GC), utilizando-se os parâmetros de normalidade auditiva do P_{90} e P_{10} (Gorga et al., 1997), foi aplicado o teste T-Student para comparação das amplitudes médias em relação ao percentil 90 por frequência. Nesse caso, testou-se se as amplitudes médias eram maiores que o P_{90} . Por fim, para analisar e comparar a amplitude da relação S/R, utilizou-se também o teste T-Student para verificar se a Hipótese Nula é verdadeira, ou seja, se a média das amplitudes da relação S/R por frequência seria maior ou igual a 8dBNPS. Para o teste apresentar significância estatística, rejeita-se tal hipótese e aceita-se que a amplitude média da relação S/R é menor que 8dBNPS, com 95% de confiança, admitindo-se, assim, que houve perda na audição dos indivíduos.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Foram selecionados inicialmente 44 pacientes que iriam iniciar quimioterapia (QT) com cisplatina. Desses, 14 não se enquadravam nos critérios de inclusão. Os 30 pacientes restantes, que apresentaram as condições necessárias para o estudo, foram randomicamente alocados em um dos grupos de estudo: aquele que recebeu EGB761 (GE) e o que recebeu placebo (GC).

Grupo de Estudo: composto por 14 pacientes. Desses, houve perda de seguimento de dois pacientes, por terem desistido de participar da pesquisa, e de outros dois pacientes por terem falecido entre a primeira e a segunda avaliação. Dos dez restantes, houve perda de seguimento de mais dois pacientes, um por desistência e outro por ter sua QT suspensa pelo agravamento do estado geral, entre a segunda e a terceira avaliação. Concluiu o seguimento, nesse grupo, um total de oito pacientes.

Grupo Controle: composto por 16 pacientes. Desses, houve perda de seguimento de cinco pacientes, três por desistência, um por falecimento e um por ter tido a QT suspensa, entre a primeira e a segunda avaliação. Dos onze restantes, houve perda de seguimento de mais dois pacientes, por desistência, entre a segunda e a terceira avaliação, e de outros dois, um por morte e um por desistência entre a terceira e a quarta avaliação. Concluiu o seguimento, neste grupo, um total de sete pacientes.

Os 15 pacientes que concluíram o acompanhamento apresentavam idades variando entre 24 e 69 anos, sendo que 7 (46,6%) possuíam mais de 50 anos; 12 deles (80%) eram do sexo feminino e 3 (20%) do sexo masculino. A doença mais comumente encontrada entre os pacientes foi o câncer de colo de útero (53,2%), seguida pelo câncer de pulmão (20%). Um menor número de indivíduo apresentava câncer de palato mole (6,7%), câncer de ampola de váter (6,7%), câncer de ovário (6,7%) e timoma (6,7%).

a) Primeira Análise: Avaliação das amplitudes médias das EOAPDs, por frequência, antes e após dose cumulativa total de cisplatina.

Na observação das amplitudes das EOAPDs obtidas nas frequências de 1.031 a 7.966KHz, antes e após a administração total de cisplatina, foram calculadas as amplitudes médias para os grupos estudo e controle. Em um primeiro estágio da análise descritiva dos dados, havia indícios de que o GC poderia ter audição melhor que o GE antes mesmo da administração da primeira dose de CDDP, o que não foi confirmado pelo teste U-ManWhitney (tabela 1, gráfico 1). E, após a análise das amplitudes médias das EOAPDs dos GE e GC, após dosagem cumulativa total de CDDP, observou-se uma diminuição das amplitudes das emissões do GC, na frequência aproximada de 8KHz (7.966KHz) (tabela 2, gráfico 2), em que o p-valor $< \alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Diferentemente disso, o GE manteve-se sem diferença estatisticamente significativa em relação à presença de alterações das emissões após dose cumulativa total de CDDP. Os dados são apresentados a seguir, em tabelas e gráficos correspondentes.

Tabela 1: Amplitudes médias observadas nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo, por freqüências, antes da administração de cisplatina, com o p-valor correspondente.

Grupos	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Grupo Controle	8,26	6,76	4,33	0,80	4,80	-0,34	-2,89
Grupo Estudo	6,03	3,40	2,11	-3,16	2,45	-2,74	-7,13

Teste U-ManWhitney bi lateral

Freqüência	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor	0,60	0,40	0,23	0,17	0,40	0,53	0,29

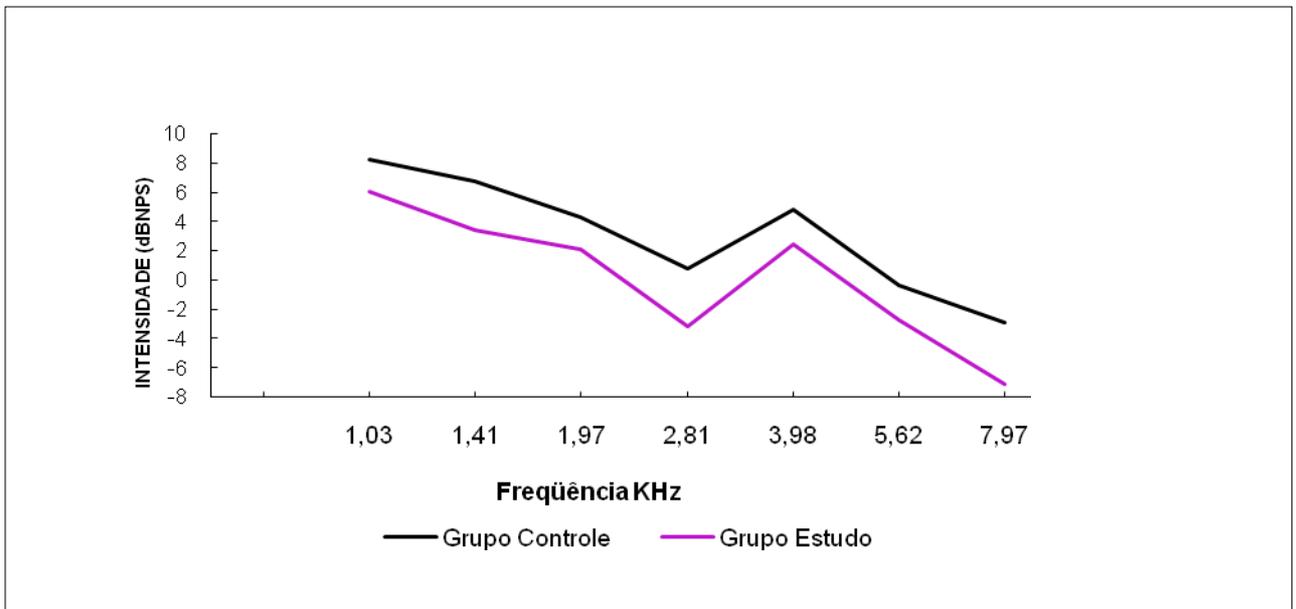


Gráfico 1: Amplitudes médias observadas nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo por freqüências, antes da administração de Cisplatina.

Tabela 2: Amplitudes médias observadas nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo, por freqüências, após dose total cumulativa de cisplatina (>225 a 300mg/m²), com o respectivo p-valor.

Grupos	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Grupo Controle	5,66	1,52	0,73	-3,16	-3,12	-6,21	-17,98
Grupo Estudo	4,71	5,51	4,22	0,14	4,56	-3,08	-6,49

Teste U-ManWhitney bi lateral							
Freqüência	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor	1,00	1,00	0,72	0,72	0,29	1,00	0,03

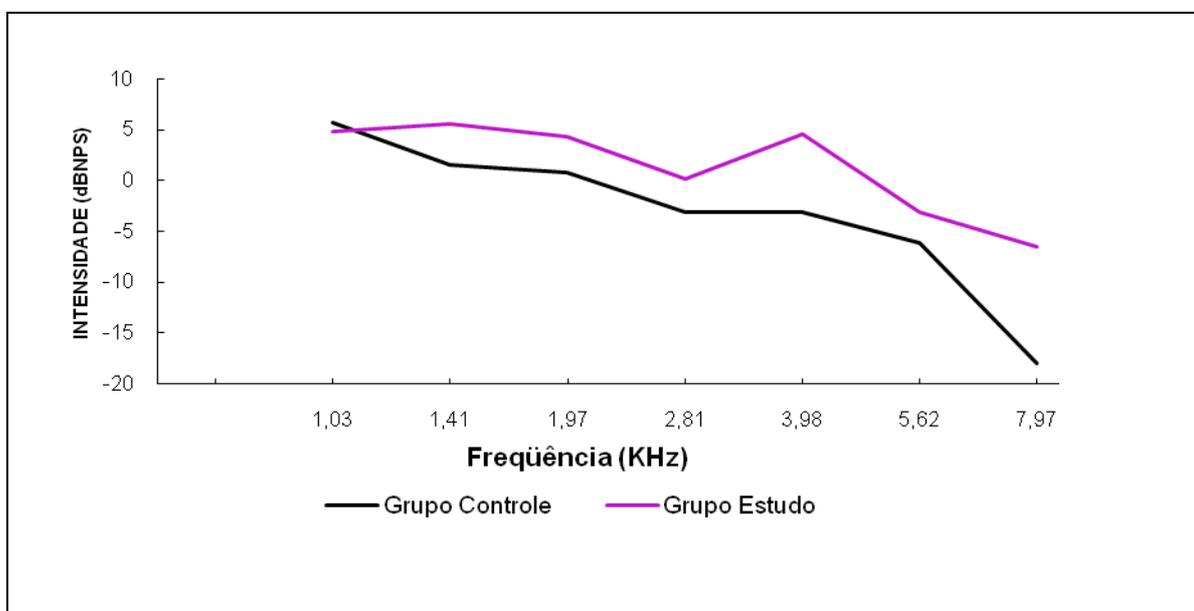


Gráfico 2: Amplitudes médias das EOAPDs observadas nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo, por freqüências, após dose cumulativa total de cisplatina (>225 a 300mg/m²).

b) Segunda Análise: Avaliação das amplitudes médias por frequências e por classes de doses de cisplatina

Visto que as amplitudes médias das EOAPDs para o GC mostraram uma queda em relação ao GE, comparando-se o 1.º exame com o último, correspondente à classe de dose cumulativa total maior que 225 a 300mg/m², procurou-se investigar se, dentro de classes de doses (40 —| 150mg/m²; 150 —| 225mg/m²; 225 —| 300mg/m²), houve diferença significativa à medida que as doses iam se acumulando, comparando-se o GC (tabela 3, gráfico 3) e o GE (tabela 4, gráfico 4). Apesar de a análise descritiva (gráfico 3) mostrar que as médias das amplitudes do GC parecem apresentar uma tendência à queda, com a maior dose de CDDP, para a frequência de 8KHz, o teste de Kruskal Wallis não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa. Para o GE, a mesma análise não mostrou diferença nem gráfica nem estatisticamente significante, ou seja, não houve qualquer alteração.

Tabela 3: Amplitudes médias observadas nos pacientes do grupo controle, por freqüência e por classes de doses de CDDP com o respectivo p-valor

Dosagens Cumulativas	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Inicial	8,26	6,76	4,33	0,80	4,80	-0,34	-2,89
40 — 150	8,11	5,82	2,72	-0,93	1,82	-3,16	-7,12
150 — 225	7,31	4,66	1,05	-0,67	2,74	1,97	-2,95
225 — 300	5,66	1,52	0,73	-3,16	-3,12	-6,21	-17,98

Teste Kruskal Wallis bi lateral

Freqüência	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor	0,74	0,60	0,60	0,94	0,64	0,71	0,23

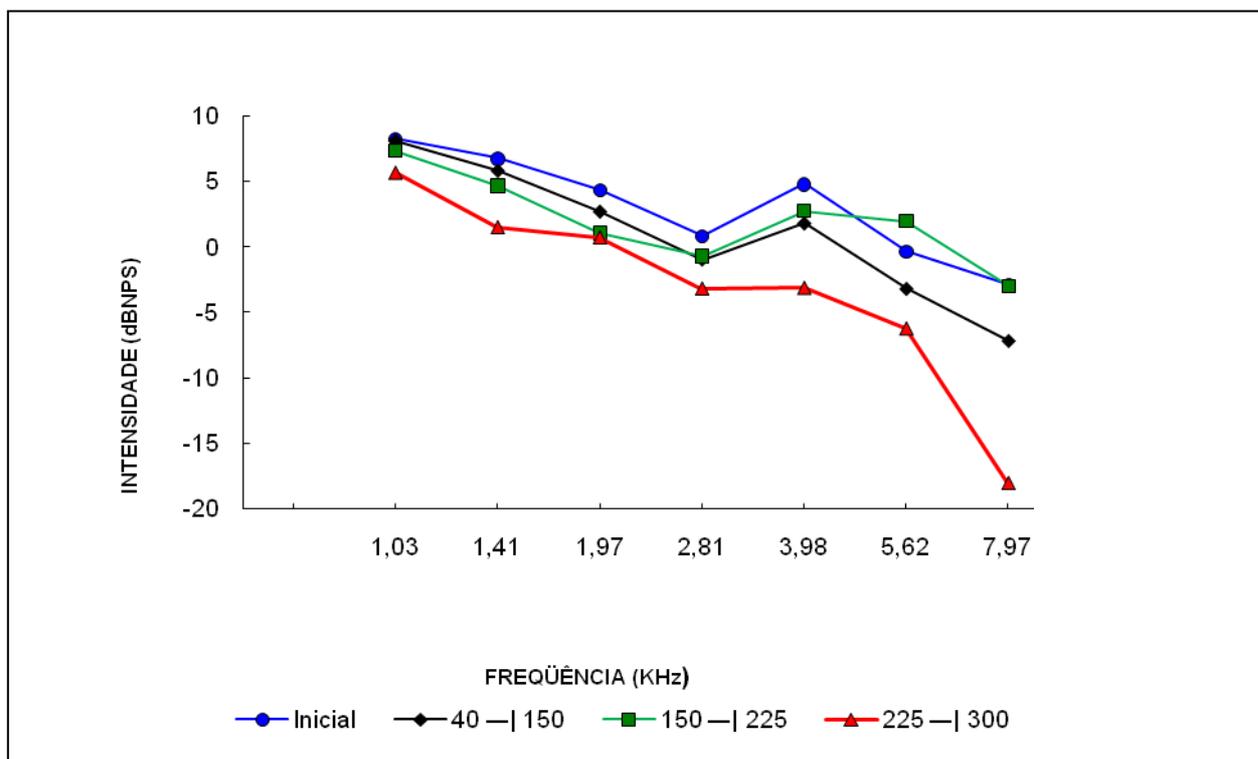


Gráfico 3: Amplitudes médias da EOAPDs observadas nos pacientes do grupo controle, por freqüência e por classes de doses de cisplatina

Tabela 4: Amplitude média observada nos pacientes do grupo estudo por freqüências e por classes de doses de CDDP, com o p-valor.

Dosagens Cumulativas	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Inicial	6,03	3,40	2,11	-3,16	2,45	-2,74	-7,13
40 — 150	6,96	4,91	2,39	-4,96	0,09	-3,56	-5,53
150 — 225	5,34	2,18	0,91	-4,90	-1,42	-4,60	-7,07
225 — 300	4,71	5,51	4,22	0,14	4,56	-3,08	-6,49

Teste Kruskal Wallis bi lateral

Freqüência	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor	0,90	0,83	0,89	0,37	0,30	0,91	0,86

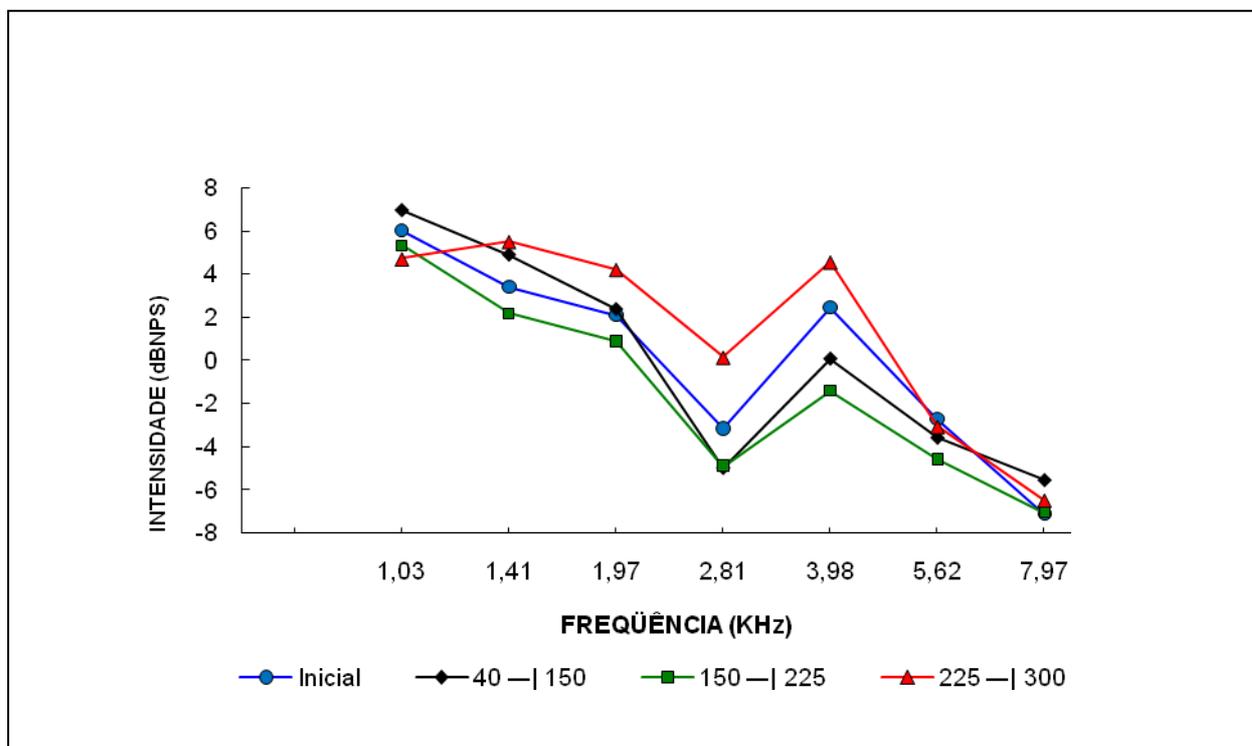


Gráfico 4: Amplitudes médias da EOAPDs observadas nos pacientes do grupo estudo, por freqüência e por classes de doses de cisplatina

c) Terceira Análise: Avaliação das amplitudes das EOAPDs em relação aos parâmetros de normalidades dos percentis 90(P_{90}) e 10(P_{10})

Na análise das amplitudes das EOAPDs do GC, em relação aos parâmetros P_{90} e P_{10} , antes e após a administração da dose cumulativa total de cisplatina ($225-300\text{mg/m}^2$) (tabela 5; gráfico 5; tabela 5.1; gráfico 5.1), observou-se graficamente (gráfico 5.1) uma queda nos valores das amplitudes na frequência aproximada de 8KHz (7,97 KHz), quando se compara com o exame inicial (tabela 5; gráfico 5), isto é, antes da administração da cisplatina e na mesma faixa de frequência. Existe também diferença estatisticamente significativa em relação ao P_{90} com um p-valor = 0,04($p < 0,05$) (tabela 5.1), embora o valor encontrado esteja situado na faixa considerada duvidosa ou de incerteza, pois se encontra entre P_{90} e P_{10} . Apesar disso, considera-se que, quanto mais próximo do P_{10} , maior a probabilidade de a resposta estar vindo de uma orelha com região de frequência danificada, ou seja, com alteração coclear. Ao comparar-se o GC com o GE (tabela 6.1; gráfico 6.1), observou-se que o GE manteve-se na faixa de normalidade em relação ao P_{90} , na mesma dosagem ($225-300\text{mg/m}^2$) e frequência (7,97KHz), ou seja, não sofreu alteração.

Tabela 5: Amplitudes médias das EOAPDs do grupo controle antes da administração da cisplatina, em relação aos percentis 90 e 10, com o p-valor.

Sem CDDP	Frequências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Amplitude Inicial	8,26	6,76	4,33	0,80	4,80	-0,34	-2,89
Perc 90	4,40	0,43	-3,50	-5,55	-4,42	-6,88	-12,85
Perc 10	-8,10	-6,73	-9,85	-11,50	-5,93	-7,84	-22,20
NF (dB)	-2,62	-6,82	-10,78	-15,22	-15,09	-19,54	-17,96
Teste T-Student bilateral							
Frequência	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor	0,97	0,99	1,00	0,99	0,99	0,92	0,98

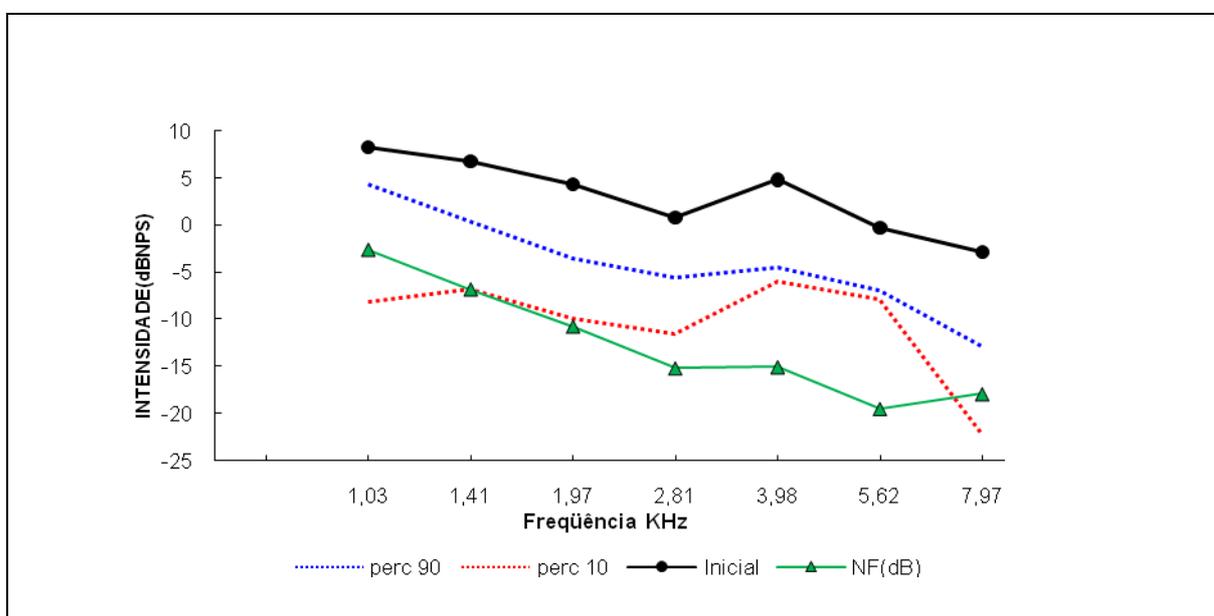


Gráfico 5: Amplitudes médias das EOAPDs observadas nos pacientes do grupo controle, por frequências, antes da administração da cisplatina, em relação aos percentis 90 e 10.

Tabela 6: Amplitudes médias das EOAPDs do grupo estudo antes da administração da cisplatina, em relação aos percentis 90 e 10, com o p-valor.

Sem CDDP	Frequências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Amplitude Inicial	6,03	3,40	2,11	-3,16	2,45	-2,74	-7,13
Perc 90	4,40	0,43	-3,50	-5,55	-4,42	-6,88	-12,85
Perc 10	-8,10	-6,73	-9,85	-11,50	-5,93	-7,84	-22,20
NF (dB)	-3,73	-9,63	-10,95	-16,93	-13,68	-19,70	-19,96

Teste T-Student bilateral							
Frequência	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor	0,72	0,86	0,98	0,87	1,00	0,91	1,00

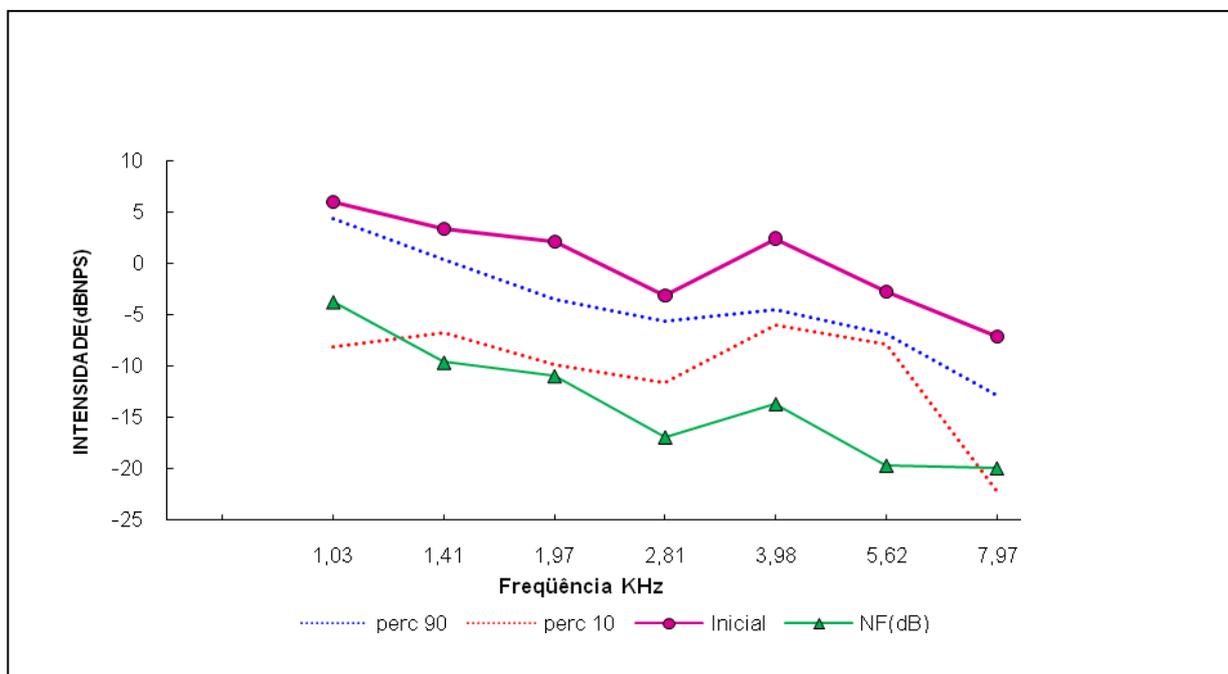


Gráfico 6: Médias das amplitudes das EOAPDs observadas nos pacientes do grupo estudo antes da administração de cisplatina, em relação aos percentis 90 e 10.

Tabela 5.1: Médias das amplitudes das EOAPDs do upo controle após a administração de cisplatina (dose total cumulativa), em relação aos percentis 90 e 10.

Dosagens Cumulativas	Frequências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
225 — 300	5,66	1,52	0,73	-3,16	-3,12	-6,21	-17,98
Perc 90	4,40	0,43	-3,50	-5,55	-4,42	-6,88	-12,85
Perc 10	-8,10	-6,73	-9,85	-11,50	-5,93	-7,84	-22,20
NF (dB)	-5,28	-10,19	-12,40	-19,51	-19,82	-19,70	-19,89

Teste T-Student bilateral		Frequências em KHz						
Frequência		1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor		0,86	0,56	0,83	0,65	0,57	0,54	0,04

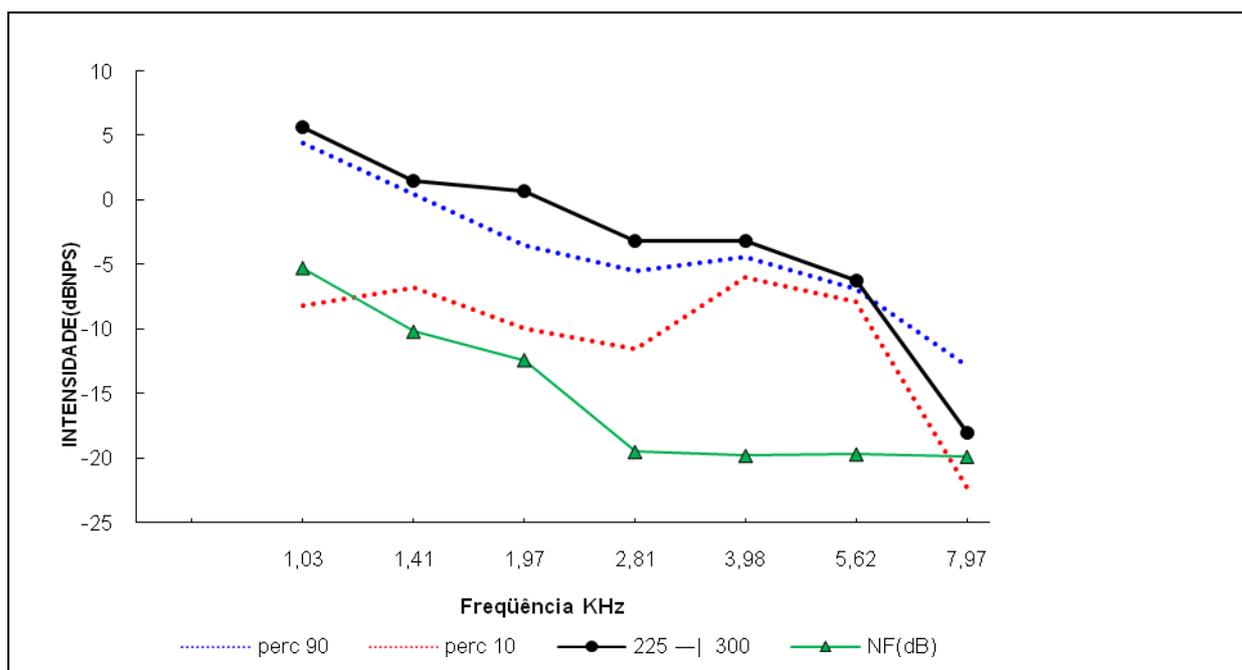


Gráfico 5.1: Médias das amplitudes das EOAPDs observadas nos pacientes do grupo controle após administração de cisplatina (dose total cumulativa), em relação aos percentis 90 e 10.

Tabela 6.1: Médias das amplitudes das EOAPDs do grupo estudo após administração de cisplatina (dose total cumulativa), em relação aos percentis 90 e 10.

Dosagens Cumulativas	Frequências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
225 — 300	4,71	5,51	4,22	0,14	4,56	-3,08	-6,49
Perc 90	4,40	0,43	-3,50	-5,55	-4,42	-6,88	-12,85
Perc 10	-8,10	-6,73	-9,85	-11,50	-5,93	-7,84	-22,20
NF (dB)	-4,98	-7,48	-12,70	-17,65	-17,04	-21,28	-20,82

Teste T-Student bilateral							
Frequência	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor	0,53	0,97	0,97	0,93	0,99	0,95	0,97

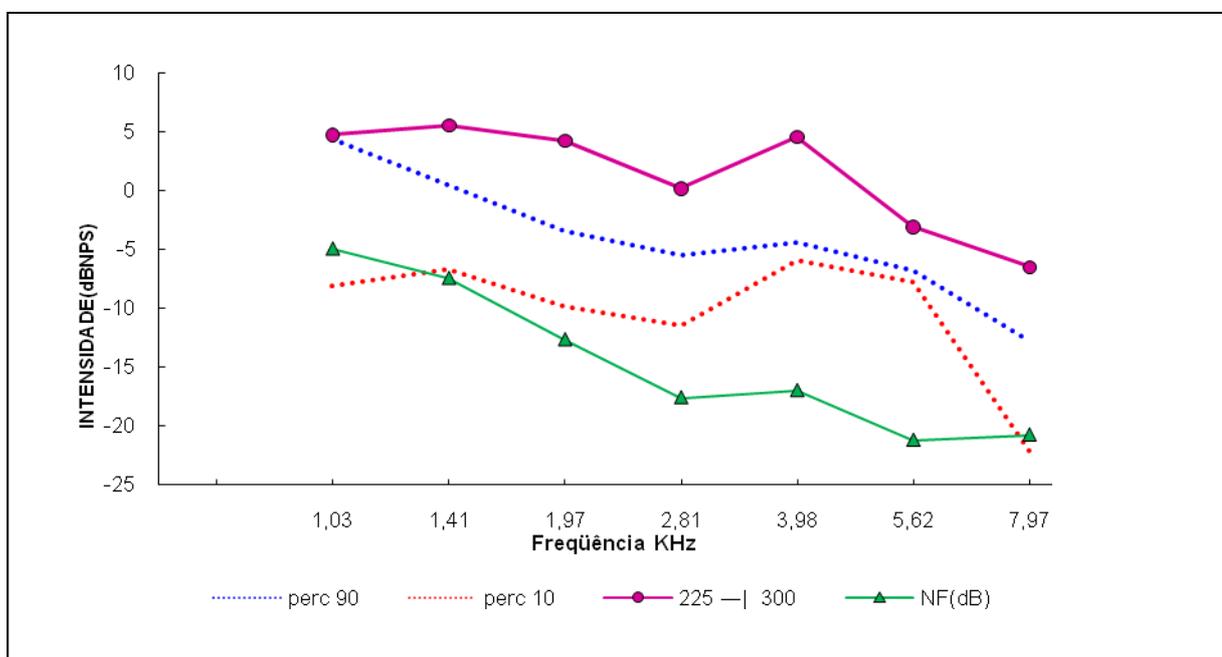


Gráfico 6.1: Médias das amplitudes das EOAPDs observadas nos pacientes do grupo estudo após administração de cisplatina (dose total cumulativa), em relação aos percentis 90 e 10.

d) Quarta Análise: Avaliação das amplitudes médias da relação sinal/ruído (S/R) por frequência, e por dose cumulativa de cisplatina.

Considerando como parâmetro de normalidade auditiva uma relação S/R maior ou igual a 8dBNPS, foi realizada a análise comparativa da relação S/R do grupo controle e do grupo estudo, e o achado foi o mesmo daquele encontrado para as médias das amplitudes, ou seja, ao aplicar-se o teste T de Student, verificou-se uma queda estatisticamente significativa da média da relação S/R em 8KHz, na dose cumulativa de 225–|300mg/m² no grupo controle, com um p-valor = 0,045 (tabela 7; gráfico 7), enquanto o grupo estudo manteve-se sem queda na mesma frequência e na mesma dose cumulativa (tabela 8; gráfico 8). Também foi feita a comparação entre os dois grupos, para verificar se havia diferença estatisticamente significativa no que diz respeito às amplitudes da relação S/R dos dois grupos (GC e GE), antes da administração de cisplatina (tabela 9; gráfico 9) e após acúmulo de cisplatina (tabela 10; gráfico 10). Nesta ocasião foi aplicado o teste U-ManWhitney e novamente somente notou-se significância estatística na dosagem de (225–|300mg/m²) para a frequência de 8KHz do grupo controle, em comparação com o grupo estudo (tabela 10; gráfico10).

Tabela 7: Amplitudes médias da relação S/R do grupo controle por freqüência, segundo a dosagem cumulativa de cisplatina, com o p-valor

Dosagens Cumulativas	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Final	10,875	13,581	15,100	16,019	19,894	19,194	15,075
40 — 150	10,989	14,493	15,777	16,602	18,661	17,664	12,036
150 — 225	9,181	10,994	14,250	11,838	20,844	21,575	16,156
225 — 300	10,933	11,708	13,133	16,350	16,700	13,492	1,908

Teste T-Student

Dosagens Cumulativas	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Inicial	0,982	0,996	1,000	0,999	0,998	0,984	0,952
40 — 150	0,996	1,000	1,000	0,999	0,997	0,986	0,912
150 — 225	0,825	0,836	0,949	0,813	0,963	0,935	0,881
225 — 300	0,919	0,665	0,896	0,897	0,839	0,782	0,045

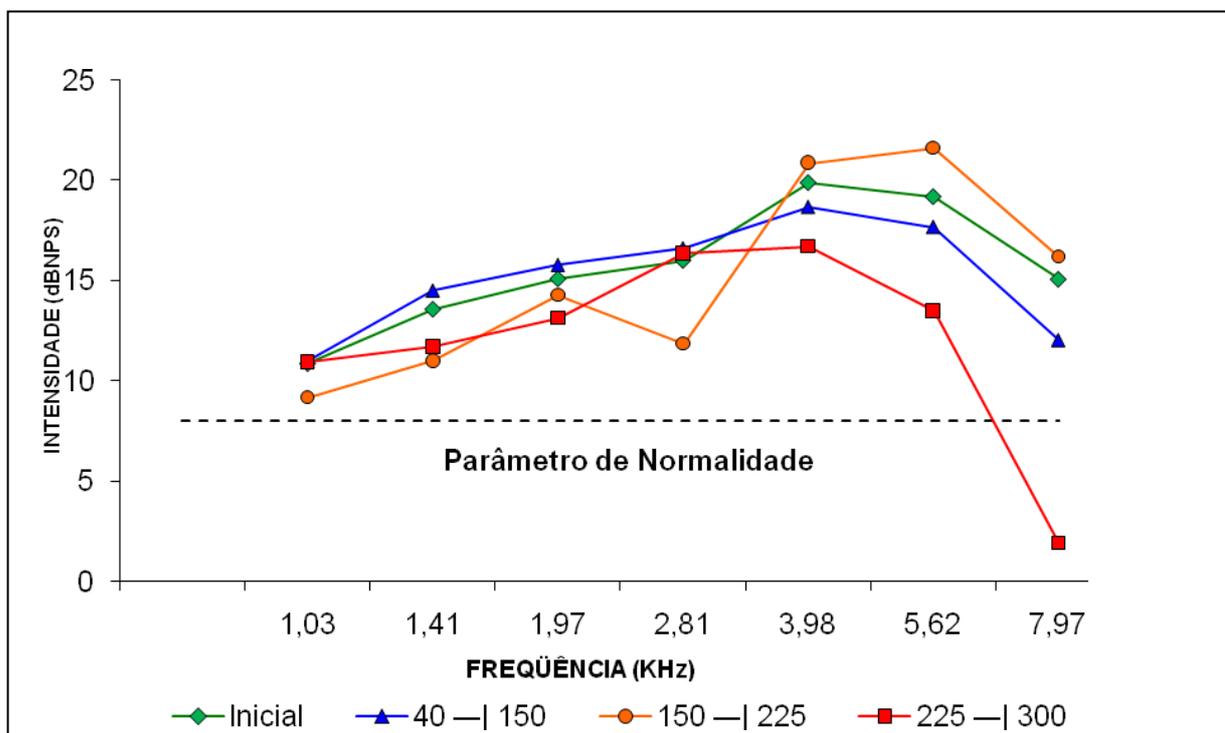


Gráfico 7: Amplitudes médias da relação S/R do grupo controle, por freqüências, segundo a dosagem cumulativa de cisplatina.

Tabela 8: Amplitudes médias da relação sinal/ruído (S/R) do grupo estudo por freqüência, e segundo a dosagem cumulativa de cisplatina, com o p-valor

Dosagens Cumulativas	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Inicial	9,750	13,031	13,063	13,763	16,125	16,963	12,831
40 — 150	11,469	11,925	14,644	13,231	16,950	16,838	14,375
150 — 225	8,869	9,953	12,509	12,806	15,672	14,700	12,519
225 — 300	9,681	12,981	16,919	17,788	21,600	18,200	14,325

Teste T-Student

Dosagens Cumulativas	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Inicial	0,849	0,995	0,976	0,988	0,997	0,995	0,951
40 — 150	0,904	0,988	0,999	0,979	1,000	0,997	0,990
150 — 225	0,683	0,743	0,966	0,943	0,997	0,996	0,988
225 — 300	0,700	0,996	0,971	0,967	0,993	0,985	0,994

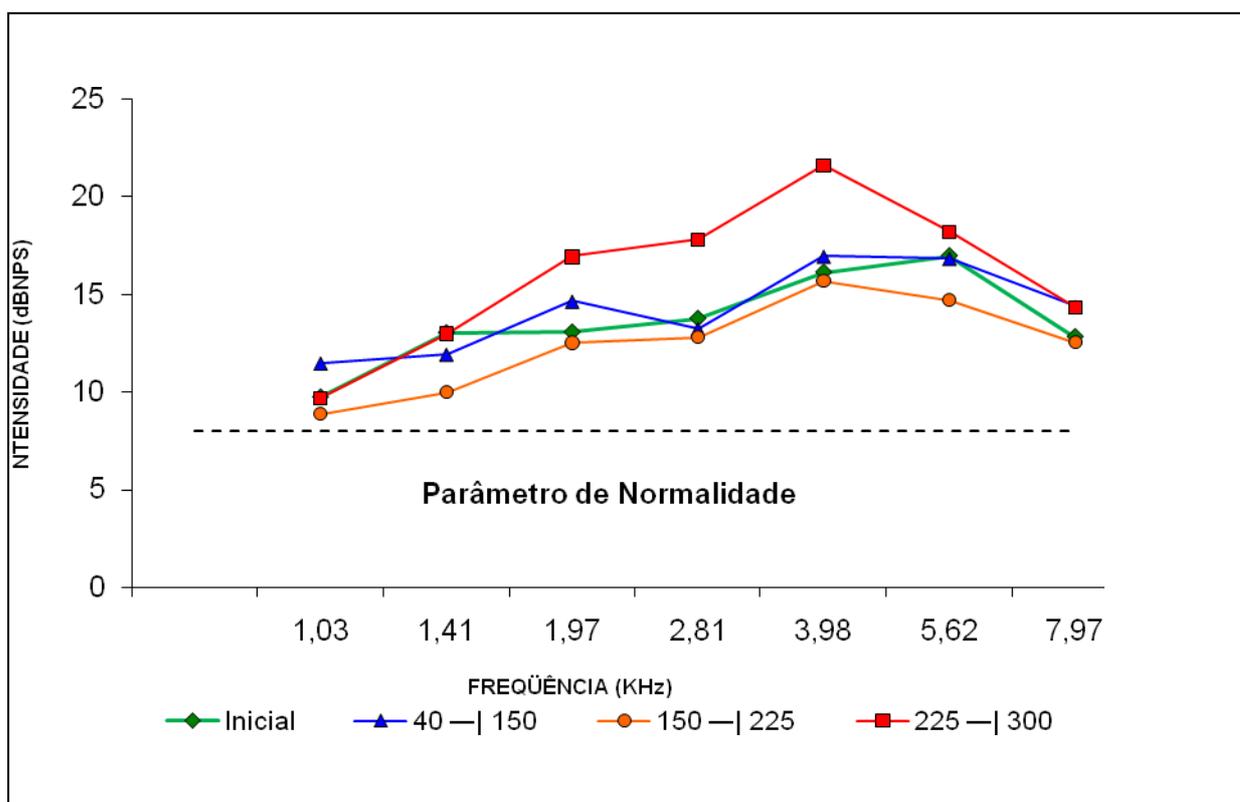


Gráfico 8: Amplitudes médias da relação S/R do grupo estudo, por freqüências, segundo a dosagem cumulativa de cisplatina.

Tabela 9: Amplitudes médias da relação Sinal/ Ruído observada nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo por freqüências, antes da administração de Cisplatina

Grupos	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Grupo Controle	10,88	13,58	15,10	16,02	19,89	19,19	15,08
Grupo Estudo	9,75	13,03	13,06	13,76	16,13	16,96	12,83

Teste U-ManWhitney bi lateral

Freqüência	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor	0,75	0,53	0,56	0,25	0,21	0,40	0,92

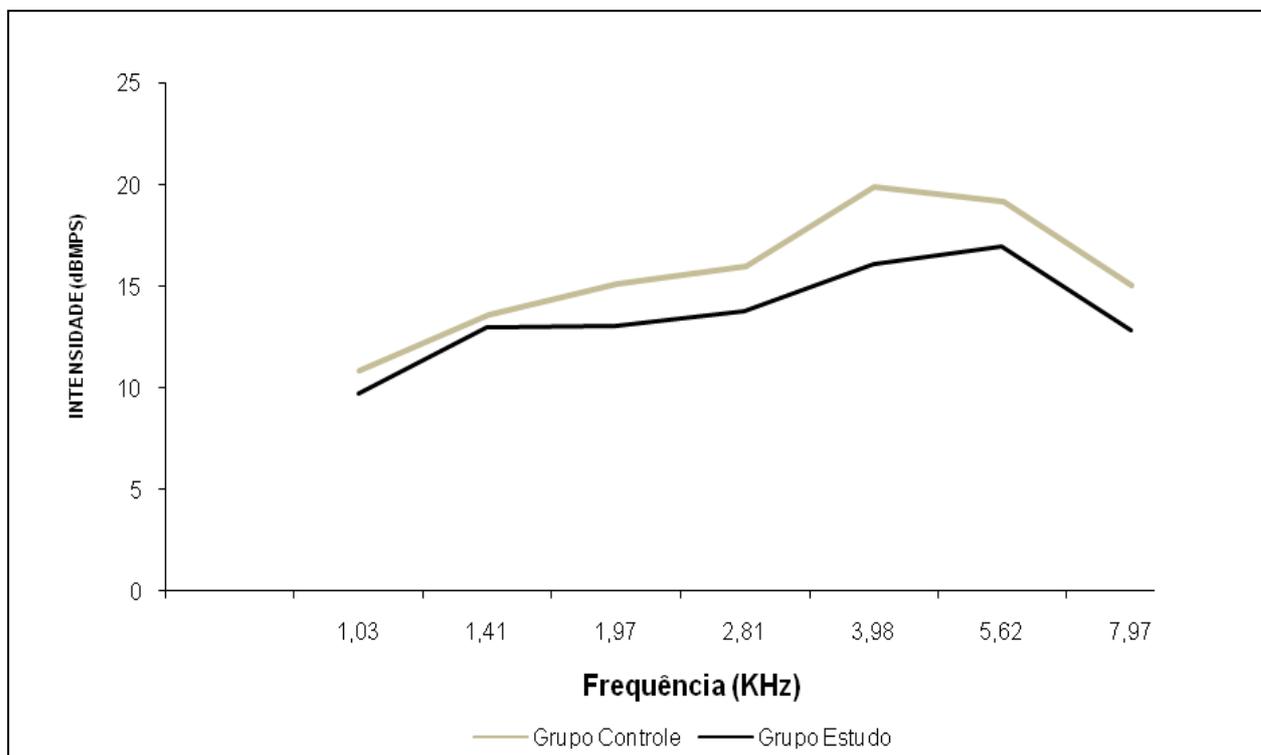


Gráfico 9: Amplitudes médias da relação Sinal/ Ruído observada nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo por freqüências, antes da administração de Cisplatina

Tabela 10: Amplitudes médias da relação Sinal /Ruído observada nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo por freqüências, após dosagem cumulativa de cisplatina (225 ; 300mg/m²)

Grupos	Freqüências em KHz						
	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
Grupo Controle	10,93	11,71	13,13	16,35	16,70	13,49	1,91
Grupo Estudo	9,68	12,98	16,92	17,79	21,60	18,20	14,33

Teste U-ManWhitney bi lateral

Freqüência	1,03	1,41	1,97	2,81	3,98	5,62	7,97
p-valor	0,48	0,48	0,48	1,00	1,00	0,29	0,03

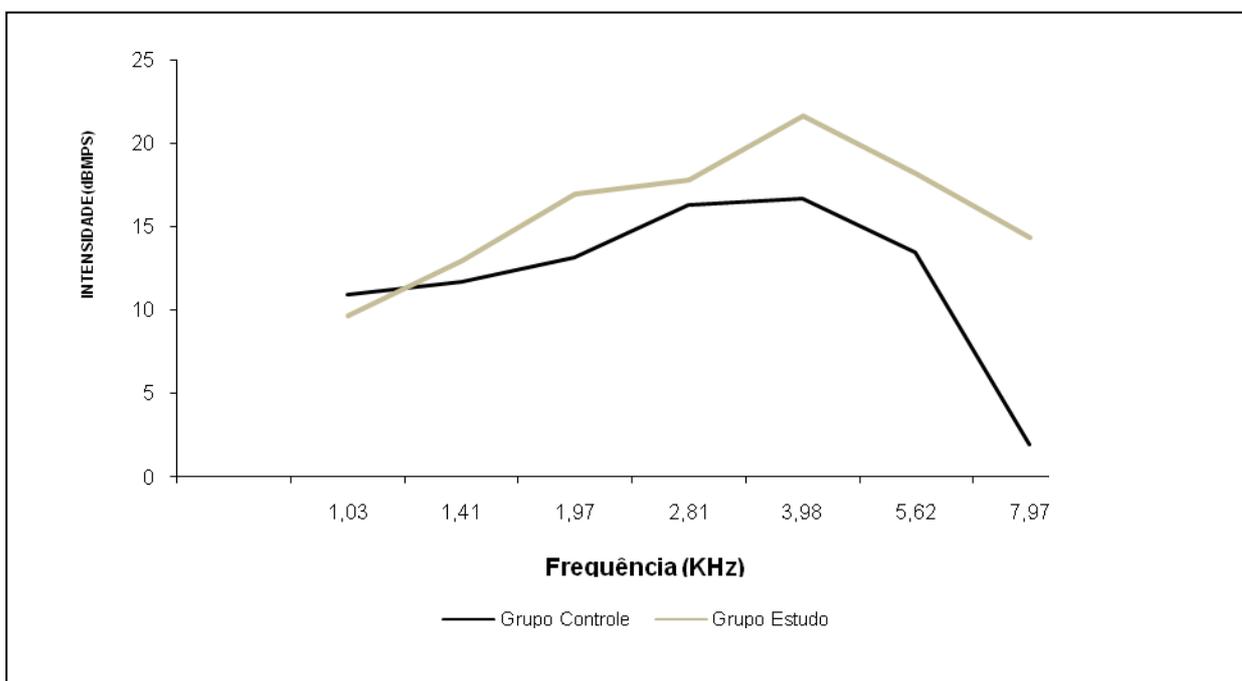


Gráfico 10: Amplitudes médias da relação Sinal/ Ruído observada nos pacientes do grupo controle e do grupo estudo por freqüências, após dosagem cumulativa de Cisplatina (225; 300mg/m²)

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

1 - Sobre os efeitos ototóxicos da cisplatina (CDDP)

A cisplatina é uma droga citotóxica que, além dos efeitos antineoplásicos, apresenta efeitos adversos que impedem seu uso clínico continuado. Sua toxicidade pode variar de leve a severa. Seus vários efeitos adversos incluem nefrotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, neuropatia periférica, mielossupressão, astenia e ototoxicidade. Enquanto as toxicidades gastrointestinal e renal podem ser contornadas com medicação de apoio e diurese forçada pré e pós-infusão de CDDP, respectivamente, nenhuma intervenção terapêutica foi encontrada, até o momento, para impedir a neuro e a ototoxicidade e, por isso, são efeitos dose-limitante (Rademaker-Lakhai et al., 2006, Rabik e Dolan, 2007). De fato, a cisplatina mostrou-se ototóxica e isso foi demonstrado, nesse trabalho, pela redução das amplitudes das EOAPD, dos indivíduos do grupo controle após a administração de uma dose cumulativa de 300mg/m^2 de CDDP. Além disso, o fato de que o efeito ototóxico apenas se deu na maior dose cumulativa e doses únicas tão baixas quanto 20 e 50mg/m^2 não mostraram ototoxicidade está de acordo com os dados da literatura onde autores como Rademaker-Lakhai et al. (2006) encontraram ototoxicidade apenas quando foram administradas doses de CDDP maiores que 60mg/m^2 .

A ototoxicidade relatada na literatura varia bastante e encontra-se na faixa – de 3 a 100%, segundo Ress et al. (1999). Tais achados discrepantes podem se dever a diferentes esquemas de doses, variações nas condições dos testes de audição, diferenças nos critérios de perda auditiva e à perda de pacientes (Laurell et al., 1987, Ress et al., 1999). Diante de diferentes incidências de ototoxicidade encontradas na literatura, tornou-se difícil, inicialmente, a quantificação ideal de uma população para estudo e, após a determinação da quantidade da amostra, foi difícil a manutenção do número, pois muitos pacientes desistiram de comparecer aos testes de avaliação e também de ingerir mais uma medicação entre tantas que necessita usar para fazer seu tratamento. Em outros casos, a quimioterapia foi suspensa pelo comprometimento do estado geral do paciente, impedindo-o de dar seguimento ao tratamento, ou o paciente veio a falecer no decurso do seu tratamento. Em razão disso, o número de pacientes seguidos apresentou um declínio importante, que prejudicou em parte a avaliação dos dados, pois, por exemplo, quando tentou-se analisar os resultados separando os

indivíduos por classes de doses de cisplatina administradas, apesar de graficamente visualizar-se uma queda das amplitudes das emissões em 8KHz na dose cumulativa de 225-300mg/m² do GC, o que denotaria o efeito ototóxico do quimioterápico, o teste de Kruskal Wallis não mostrou significância estatística, e deduziu-se que isso se deveu ao pequeno número de indivíduos incluídos nessa classe de dose.

Sabe-se que a incidência de alterações audiográficas pode ampliar-se com o aumento cumulativo da dose de CDDP e que as mudanças podem ser mais graves após doses únicas altas. As alterações são geralmente bilaterais, permanentes e em alta frequência, nas faixas de 4 a 8 KHz (Aguilar-Markulis et al., 1981, Vermorken et al., 1983).

Sabendo disso, procurou-se analisar os resultados baseando-se no efeito tóxico cumulativo da droga, já que os pacientes acompanhados foram tratados com diferentes esquemas de QT, desde doses baixas e repetidas, a doses maiores e com maior intervalo entre as doses até atingir uma dose cumulativa tão alta quanto 300mg/m², suficiente para causar ototoxicidade. Os grupos (GC e GE) foram comparados antes da primeira administração e após doses cumulativas de cisplatina, e observou-se que, diferentemente do grupo estudo (GE), o grupo controle (GC) apresentou uma queda das amplitudes médias e da relação S/R das EOAPDs na frequência de 8KHz e cuja incidência encontrada, nesses casos, variou de 66,6% a 100%, dependendo se a análise se baseou na amplitude da relação S/R ou na amplitude da EOAPD com relação aos parâmetros P₉₀ e P₁₀ respectivamente. Dado que confirma a grande variabilidade na incidência, já descrita na literatura e explicado, entre outros, por diferentes critérios de perda (Laurell et al., 1987; Ress et al., 1999).

É importante lembrar que a alteração encontrada só ocorreu na maior dose cumulativa de CDDP e em alta frequência, o que está de acordo com os dados encontrados na literatura. Diante dos resultados encontrados, o fator de risco mais importante, nesse caso, foi o da dose cumulativa, pois, nas medidas iniciais, com doses únicas tão baixas quanto 20 ou 50mg/m² de CDDP, não foram encontradas modificações nas amplitudes do sinal ou da relação S/R em ambos os grupos (GE e GC).

A literatura informa que o primeiro sinal de dano auditivo causado pela cisplatina aparece 3 a 4 dias após a administração da droga, ou seja, não acontece no momento em que a cisplatina é administrada, mas é atrasado em alguns dias após o início da quimioterapia (Laurell et al., 1987, Laurell e Bagger-Sjöbäck, 1991). Daí a importância do período de acompanhamento empregado

nesse trabalho, que serviu para mostrar tanto o efeito ototóxico por si só, como o efeito dose-cumulativo.

Evidências demonstram que, no mecanismo de ototoxicidade induzida pela cisplatina, ocorre a formação de radicais livres, principalmente ânion superóxido, e, com isso, ocorre depleção de antioxidantes intracelulares, como a glutathione (GSH), e um aumento no nível dos produtos de oxidação lipídica celular, que podem mediar a apoptose celular (Huang, Whitworth e Rybak, 2007).

2 – Sobre o efeito antioxidante do extrato padronizado de Ginkgo biloba (EGB761)

O EGB761 age como um limpador de radicais livres por impedir a peroxidação lipídica, aumentar os níveis de GSH e a atividade de enzimas antioxidantes, assim como possui uma atividade superóxido-dismutase (SOD) (Huang, Whitworth e Rybak, 2007). Dessa forma, o EGB761 contribuiria para impedir o efeito ototóxico da cisplatina. Seus princípios ativos, em especial, ginkgolídeos e flavonóides seriam os responsáveis pelos efeitos antioxidantes, e acredita-se que eles migrem para a orelha interna, exercendo, dessa forma, efeito sobre a toxicidade induzida pela cisplatina (Fukaya e Kanno, 1999).

O presente estudo procurou avaliar o potencial do EGB761 como um otoprotetor contra a ototoxicidade pela cisplatina. E utilizou o extrato padronizado de Ginkgo biloba[®], fórmula original do Dr. Willmar Schwabe Group, para garantir as quantidades apropriadas dos seus princípios ativos (Le Bars e Kastelan, 2000). Além disso, a dose empregada de 240mg/dia foi a escolhida por ser largamente utilizada na prática clínica, sendo considerada a dose mais apropriada e ativa no tratamento crônico, por exibir efeitos terapêuticos em doenças neurodegenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, tinido, queixas geriátricas e desordens psíquicas, cujo principal mecanismo de ação em todos esses casos seria a sua atividade antioxidante (Mahadevan e Park, 2008).

O achado neste estudo, de que o GE não sofreu alteração auditiva, avaliado por meio da EOAPD, sugere que o EGB761 apresentou, portanto, seu efeito antioxidante e, assim, foi otoprotetor nos indivíduos em tratamento com CDDP, o que foi consistente com os achados de Fukaya e Kanno, 1999 e Huang, Whitworth e Rybak, 2007. Neste trabalho, o efeito otoprotetor foi demonstrado pelo exame audiológico empregado.

Levando em consideração que o EGB761 tem um pico de atividade de 1,5 horas e exibe uma meia-vida que varia de 2 a 4 horas, que o efeito tóxico da cisplatina somente surge 3 a 4 dias após a

administração da droga (Laurell et al., 1987, Laurell e Bagger-Sjöbäck, 1991) e, por fim, que um estudo apresentado por Fukaya e Kanno em 1999 mostrou que o EGB761 administrado 90 minutos antes da administração de CDDP pôde reduzir o dano às células ciliadas externas e proteger a função renal sem atenuação do efeito antitumoral da cisplatina, em ratos, infere-se que o intervalo entre a ingestão do EGB761 e o início da QT foi suficiente para permitir o efeito otoprotetor procurado e além disso, com a continuação do uso do EGB761, foi mantida uma concentração plasmática suficiente para manter tal efeito otoprotetor. Entretanto, é importante salientar que são necessários mais estudos para saber se com doses cumulativas mais altas ou se com uma dose única alta de cisplatina, a dose empregada de EGB761 seria capaz de manter o efeito otoprotetor desejado.

A dose empregada de EGB761 de 120mg, oralmente, duas vezes ao dia (240mg/dia); foi utilizada por ser a mais apropriada como dito anteriormente, com base na evidência de dose-resposta e por ser ativa no tratamento crônico (Le Bars e Kastelan, 2000, Christen e Maixent, 2002). Estudos realizados com animais mostraram que regimes de doses de 400 e 500mg/Kg/dia não mostraram evidências de dano a órgãos e, especialmente, nenhum prejuízo da função hepática ou renal. E, em humanos, um estudo conduzido em voluntários saudáveis recebendo dose oral única de 600mg não mostrou alteração no tempo de sangramento, coagulação ou contagem de células do sangue (DeFeudis, 1998). Bone (2008) informa não haver evidências, em estudos controlados, de que doses normais de EGB761 têm qualquer impacto na hemostasia. E a dose aqui utilizada, mostrou-se segura uma vez que nenhum paciente do GE relatou ou apresentou efeitos adversos que pudessem estar, de fato, relacionados à ingestão de EGB761.

3 – Sobre o teste de EOAPD como um método de avaliar a ototoxicidade pela cisplatina

Vários métodos audiológicos têm sido utilizados para a monitorização da ototoxicidade, tais como, audiometria convencional (AC), audiometria de altas freqüências (AAF), potencial endococlear (EP), resposta auditiva do tronco cerebral (ABR) e eletrococleografia (ECohG). Sabendo-se que as EOAs avaliam o estado funcional das CCEs e que a cisplatina leva à ototoxicidade por lesão dessas células, o teste de EOAPD_s foi o utilizado nesse estudo.

Dentre os tipos de EOAs_s existentes, as EOAPD_s foram escolhidas por possuírem algumas vantagens sobre os outros tipos de EOAs_s que as tornaram mais indicadas para utilização nesse grupo de indivíduos estudado, como, por exemplo, serem encontradas essencialmente em todas as orelhas com audição normal, e produzirem resultados confiáveis de 1 a 8KHz.

Além de constituírem uma medida objetiva, as EOAPDs são um teste não-invasivo, que pode ser medido rapidamente (Campbell e Durrant, 1993). O teste de EOAPD_s combina velocidade operacional, não-invasibilidade, objetividade e seletividade de freqüência, e, sob condições de teste fixas, as respostas são altamente estáveis. Dessa forma, mostra alta confiabilidade tanto para medidas seriadas quanto para dias consecutivos e semanas (Kemp, Siobhan e Bray, 1990, Franklin et al., 1992). Por todos esses motivos, foi empregado o teste de EOAPD_s para avaliação auditiva dos sujeitos desse estudo. E, nesse caso, pôde-se detectar, por meio do teste, uma variação (redução) das amplitudes médias e da relação S/R da EOAPD, na faixa de freqüências de 8KHz, nos indivíduos do GC, na maior dose cumulativa de CDDP, que foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), enquanto o GE não apresentou alterações. Esses achados estão de acordo com os da literatura, os quais informam que a CDDP leva à perda auditiva em alta freqüência (4 – 8KHz) (Vermorken et al., 1983). Quando foram analisadas as respostas das amplitudes médias das EOAPDs para os indivíduos, por freqüência e por classes de doses de CDDP, graficamente foi visualizada uma queda na classe de dose mais alta (225 – 300mg/m²), na freqüência de 8KHz, embora esse achado não tenha sido estatisticamente significativo. Mas o teste de EOAPD se mostrou sensível em detectar o dano à orelha interna, como ficou demonstrado pelos resultados.

Na análise das EOAPD_s não foram incluídos os dados das freqüências baixo de 1KHz para permitir uma melhor identificação do dano coclear, pois, nestas freqüências, o ruído proveniente da

própria respiração do paciente pode afetar o registro das EOAPD_s (Musiek, Smurzynski e Bornstein, 1994).

Segundo Riss et al. (1999), o teste de EOAPD foi um método melhor de triagem da ototoxicidade induzida pela cisplatina do que a AAF. Mas as EOAPDs também têm limitações em avaliar a audição em frequências mais altas e assim identificar ototoxicidade em pacientes idosos, que podem apresentar esse tipo de alteração pela presbiacusia. Isso contribuiu para diminuir a quantidade de indivíduos para seguimento, pois a faixa etária dos pacientes com câncer é a de indivíduos mais velhos e nos quais, conseqüentemente, já se espera encontrar algum grau de perda auditiva.

As medidas foram realizadas na primeira avaliação (A1), por meio da audiometria convencional e imitanciometria, que, por sua vez, avaliou a função da orelha média, garantindo assim que nenhum paciente incluído no estudo apresentasse disfunção na orelha média que pudesse alterar o resultado do teste de EOAPD, antes da administração de cisplatina.

Gorga et al. (1997), utilizando um método que descrevia a probabilidade de que qualquer resposta medida era proveniente de uma orelha normal ou danificada, encontraram que, em nenhuma condição, a distribuição de respostas de EOAPD de orelhas normais e prejudicadas estava completamente separada. Eles atribuem, dessa forma, a qualquer valor de EOAPD medido a probabilidade de que a resposta está vindo ou da distribuição de orelhas normais ou de orelhas prejudicadas, e que são desenhadas em gráfico como curvas de resposta em termos percentuais 95, 90, 10 e 5, já explicado anteriormente nesse trabalho. Em vista disso, utilizou-se os valores percentuais informados por Gorga et al. (1997) e, ao analisar os resultados dos GC e GE, foi observada também uma redução, estatisticamente significativa, das amplitudes médias das EOAPDs do GC, em relação ao percentil 90, o que não ocorreu com o GE.

4- Discussão Final

Pelo que sabemos, este é o primeiro estudo que avalia o efeito otoprotetor do EGB761, por meio das EOAPDs, em seres humanos sob tratamento com CDDP. Outros trabalhos foram realizados, com o mesmo objetivo, ou seja, avaliar se o EGB761 protege a orelha interna contra o dano provocado pela cisplatina, mas possuem algumas diferenças, como o método de avaliação empregado (ABR, EOAPD, EOATE, Microscopia eletrônica, Potencial endococlear), e por terem sido

realizados em animais (Fukaya e Kanno, 1999, Hyppolito et al., 2003, Huang, Whitworth e Rybak, 2007). Os resultados deste trabalho foram extremamente favoráveis em relação ao potencial efeito otoprotetor do EGB761 em seres humanos, mas são necessários mais estudos com um número maior de indivíduos, que usem uma dose maior de cisplatina, para que se possa confirmar os achados deste trabalho. Além disso, é importante ressaltar que a proteção testada foi dose-cumulativa de cisplatina e não para doses únicas elevadas.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Diante do exposto, os resultados sugerem que o extrato padronizado de Ginkgo biloba exibe um potencial efeito otoprotetor para a orelha interna de indivíduos sob tratamento com cisplatina. A conclusão baseia-se nos seguintes achados:

- a) O grupo controle, que recebeu placebo concomitante com cisplatina, apresentou diminuição das amplitudes médias das EOAPDs após dose cumulativa total de CDDP (225 – 300mg/m²), na frequência aproximada de 8KHz, com uma diferença estatisticamente significativa em relação ao primeiro exame, e o grupo estudo, que recebeu o EGB761[®], não mostrou tal alteração.
- b) O grupo controle apresentou uma diminuição estatisticamente significativa das médias das amplitudes das EOAPDs, em relação ao percentil 90, na dose cumulativa total de CDDP, na frequência aproximada de 8KHz, em comparação com o exame inicial, enquanto o grupo estudo manteve-se na faixa de normalidade, acima do P90.
- c) O grupo controle mostrou uma diminuição, estatisticamente significativa, da amplitude média da relação S/R, na frequência aproximada de 8 KHz e na maior dose cumulativa de CDDP, e o grupo estudo manteve-se sem diminuição significativa, na mesma frequência e na mesma dose cumulativa. E além disso, o grupo controle apresentou uma redução da amplitude média da relação S/R, estatisticamente significativa, na frequência de 8KHz, em comparação com o grupo estudo.
- d) Na análise das amplitudes médias das EOAPDs, por classes de doses de cisplatina, houve, graficamente, uma tendência à queda, na dose cumulativa total, em 8KHz, para o grupo controle, e o grupo estudo exibiu, graficamente, uma manutenção das médias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-MARKULIS, N. V. et al. Auditory Toxicity effects of long-term cis-dichlorodiammineplatinum II therapy in genitourinary cancer patients. **Journal of surgical oncology**, New York, v.16, n. 2, p.111-123, 1981.

ALMEIDA, E. O. C. de. et al. Audiometria Tonal e Emissões Otoacústicas-Produtos de Distorção em pacientes tratados com cisplatina. **Arq Int Otorrinolaringol**. São Paulo, v. 10, n.3, p. 203-208, 2006.

AMERICAN SPEECH-LANGUAGE-HEARING ASSOCIATION. Audiologic Management of Individuals Receiving Cochleotoxic Drug Therapy (Guidelines). **ASHA**, v. 36, n. s12, p. 1-17, 1994.

AVAN, P.; BONFILS, P. Distortion-product otoacoustic emission spectra and high-resolution audiometry in noise-induced hearing loss. **Hearing Research**, Amsterdam, v. 209, n. 1-2, p. 68-75, 2005.

AZEVEDO, M. F. de. Emissões Otoacústicas. In: FIGUEIREDO, M. S.(org.) **Emissões Otoacústicas e BERA**. Pulso, 2003. cap. II, p.35-83.

BALATSOURAS, D. G. et al. The effect of impulse noise on distortion product otoacoustic emissions. **International Journal of Audiology**, Piraeus, Greece, v. 44, n.9, p. 540-549. Sep, 2005.

BALKANY, T. et al. Otoacoustic emissions in otologic practice. **Am J Otol**, Miami, v.15, n. 1, p. 29-38, May, 1994.

BENT, S. et al. Spontaneous bleeding associated with ginkgo biloba: a case report and systematic review of the literature. **J Gen Intern Med**, San Francisco, v. 20, n. 7, p. 657-61, Jul. 2005.

BIO-LOGIC SYSTEMS CORP. Scout Sport System. **User's and Service Manual**, Mundelein, 2001. 214 p.

BIRO, K. et al. Characteristics and risk factors of cisplatin-induced ototoxicity in testicular cancer patients detected by distortion product otoacoustic emission. **Oncology**, Houston, v. 70, n.3, p.177-84, 2 Jun 2006.

BLAKLEY B. W. et al. Strategies for prevention of toxicity caused by platinum-based chemotherapy: review and summary of the annual meeting of the Blood-Brain Barrier Disruption Program, Gleneden Beach, Oregon, March 10, 2001. **Laryngoscope**. Gleneden Beach, v. 112, n. 11, p. 1997-2001, Nov. 2002.

BLAKLEY, B.W.; MYERS, S. F. Patterns of hearing loss resulting from CP therapy. **Otolaryngol Head Neck Surgery**. Detroit, v. 109, n. 3.1, p. 385 -391, 1993.

BLUMENTHAL, M. et al. Ginkgo Biloba L.: Clinical Overview. In: **The ABC Clinical Guide to Herbs**. Austin, American Botanical Council, p. 188-200, 2003. Disponível em: <http://abc.herbalgram.org/site/PageServer?pagename=The_Guide#Sampler> Acesso em: 10 out. 2008.

BONE, K. M. Potential Interaction of Ginkgo biloba leaf with antiplatelet or anticoagulant drugs: What is the evidence ? **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. 7, p. 764-771, 2008.

BONFILS, P.; AVAN, P. Distortion-Product Otoacoustic Emissions. Values for Clinical Use. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, Paris, v. 118, p. 1069-1076, 1992.

BOULIKAS T, VOUGIOUKA M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). **Oncol Rep**, Mountain View, v. 10, n. 6, p. 1663-1682, Nov-Dec, 2003.

- BRIDI, R. et al. The antioxidant activity of standardized extract of Ginkgo Biloba(EGB 761) in rats. **Phytother Res**, Porto Alegre, v : 15, n. 5, p. 449-451, 2001.
- CAMPBELL, K. C. M. Ototoxicity: Understanding Oxidative Mechanisms. **American Academy of Audiology**, Springfield. v. 12, n.3, p. 121-123, Jan. 2003;
- CAMPBELL K. C. M. et al. D-methionine provides excellent protection from cisplatin ototoxicity in the rat. **Hear Res**, Springfield, v. 102, n. 1-2, p. 90-8, 1 Dec, 1996.
- CAMPBELL, K. C. M.; DURRANT, J. Audiologic Monitoring for Ototoxicity. **Otolaryngol Clin North Am**, Springfield, v. 26, n. 5, p. 903-914, 1993.
- CORADINI, P. P. et al. Ototoxicity From Cisplatin Therapy in Childhood Cancer. **J Pediatr Hematol Oncol**, Porto Alegre, v. 29, n. 6, p. 355–360, June 2007.
- CHRISTEN , Y.; MAIXENT, J-M. What is ginkgo biloba extract EGB 761? An overview. **Cellular and molecular biology**, Paris, v. 48, n. 6, p. 601 -611, 2002.
- CRUL M. et al. Randomized phase I linical and Pharmacologic study of Weekly versus Twice-Weekly dose-intensive cisplatin and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, Amsterdam, v. 9, n. 10, p. 3526–3533, September 1, 2003.
- DADAL, A.; ODABASI, O.; SERBETCIOGLU, B. The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, Denizli, Turkey. v. 137, n. 5, p.747-752. 2007.
- DEKOSKY, S T. et al. The Ginkgo Evaluation of Memory (GEM) study: Design and baseline data of a randomized trial of Ginkgo biloba extract in prevention of dementia. **Contemporary Clinical Trials**, Pittsburgh .v. 27, n. 3, p. 238-53, Jun 2006
- DeFEUDIS, F.V. Toxicology of EGB761 in Experimental Animals and Humans: Safety of EGB761-Containing Products. In: **Ginkgo Biloba Extract (EGB761): From chemistry to the clinic**. Ullstein Medical, 1998. cap.XVII, p. 197-201.
- DeFEUDIS, F. V. Clinical Studies and Clinical Pharmacology with EGB 761. In: **Ginkgo Biloba Extract (EGB761): Pharmacological activities and clinical application**, Paris: Elsevier. 1991. cap. V, p. 97-138.
- DELEHAYE, E. et al. Distortion-product otoacoustic emission: Early detection in deferoxamine induced ototoxicity. **Auris Nasus Larynx**, Sassari, v. 35, n. 2, p. 198–202, 2008.
- DHOOGHE, I. et al. Distortion product otoacoustic emissions: an objective technique for the screening of hearing loss in children treated with platin derivatives. **International journal of audiology**, Ghent, v. 45, n. 6, p. 337-343, 2006.
- DIAMOND, B.J. et al. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. **Arch Phys Med Rehabil**. Newark, v. 81, n. 5, p. 668-678, 2000.
- DIAS, M. C. et. al. Protective effects of *Ginkgo biloba* against rat liver carcinogenesis. **Chemico-Biological Interactions**, Botucatu, v. 173, n. 1, p. 32-42, 2008.
- DICKEY D.T. et al. 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**, Portland, v. 314, n. 3, p. 1052-8, Sep. 2005.
- DUCHÉ, J. C. et al. Effect of Ginkgo Biloba Extract on Microsomal Enzyme Induction. **Int J Clin Pharm Res**, Paris, v. IX, n.3, p.165-168, 1989.

- EGB 761: Ginkgo biloba extract, Ginkor. **Drugs in R & D**. v. 4, n. 3, p. 188-193, 2003.
- EKBORN, A. et al. High-dose Cisplatin with amifostine: ototoxicity and pharmacokinetics. **Laryngoscope**, Stockholm. v. 114, n. 9, p. 1660-1667, 2004.
- EVANS, P; HALLIWELL, B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. **Ann N Y Acad Sci**, London, v. 884, p. 19- 40. 1999.
- FEGHALI, J. G.; LIU, W.; VAN DE WATER. T. R. L-N-Acetyl-Cysteine Protection Against Cisplatin-Induced Auditory Neuronal and Hair Cell Toxicity. **Laryngoscope**, New York, v. 111 n. 7, p. 1147-1155, 2001.
- FRANKLIN, D. J. et al. Test/Retest Reliability of Distortion-Product and Transiently Evoked Otoacoustic Emissions. **Ear and Hearing**, Houston, v. 13, n. 6, p. 417- 429, 1992.
- FUKAYA, H.; KANNO, H. Experimental studies of the protective effect of ginkgo biloba extract (GBE) on cisplatin-induced toxicity in rats. **Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho**, Fukushima, v. 102, n. 7, p. 907-17, Jul 1999.
- GARCIA, A. P.; LÓRIO, M. C. M.; PETRILLI, A. S. Monitoramento da audição de pacientes expostos à cisplatina. **Rev Bras Otorrinolaringol**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 215-21, mar/abr 2003.
- GARDNER, C. D. et al. Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) and aspirin on platelet aggregation and platelet function analysis among older adults at risk of cardiovascular disease: a randomized clinical trial. **Blood coagulation & fibrinolysis**, Stanford, v. 18, n. 8, p. 787-93, Dec. 2007.
- GAUS, W. et al. Identification of Adverse Drug Reactions by Evaluation of a Prescription Database, Demonstrated for "Risk of Bleeding". **Methods Inf Med**, Hamburg. v. 44, p. 697-703, 2005.
- GORGA, MP. et al. The use of cumulative distributions to determine critical values and levels of confidence for clinical distortion product otoacoustic emission measurements. **J Acoust Soc Am**, Omaha, v. 100, n. 2 Pt 1, p. 968-77, Aug 1996.
- GORGA, M. P. et al. From Laboratory to Clinic: A Large Scale Study of Distortion Product Otoacoustic Emissions in ears with normal hearing and ears with hearing loss. **Ear & Hearing**, Omaha, v. 18, n. 6, p. 440-455, December 1997.
- HATZOPOULOS, S. et al. Evaluation of cisplatin ototoxicity in a rat animal model. In: **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 884, p. 211-225, 1999.
- HATZOPOULOS, S. et al. Cisplatin ototoxicity in the sprague Dawley rat evaluated by distortion product otoacoustic emissions. **Audiology**, Ferrara, v. 40,n. 5, p. 253-264, 2001.
- HIBATALLAH, J. ; CARDUNER, C. ; POELMAN, M. C. In-vivo and In-vitro assessment of the Free-radical-scavenger activity of Ginkgo Flavone Glycosides at High Concentration. **J.Pharm.Pharmacol**, Paris, v. 51, n. 12, p. 1435-1440, 1999.
- HUANG, T. et al. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. **Int J Dev Neurosci**, New York, v. 18, n. 2-3, p. 259-270, 2000.
- HUANG, X.; WHITWORTH, C.A.; RYBAK, L.P. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats. **Otol Neurotol**, Springfield, v. 28, n. 6, p. 828-33, 2007.
- HYPOLITO M. A, OLIVEIRA J. A de. Ototoxicidade, otoproteção e autodefesa das células ciliadas da cóclea. **Med. Rib. Preto**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 3 /4, p. 279-289, 2005.
- HYPOLITO, M. A. et al. Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. **Rev Bras Otorrinolaringol**, Ribeirão

Preto, v. 69, n.4, p. 504-11, jul./ago. 2003.

HYPPOLITO, M. A.; OLIVEIRA J. A de, ROSSATO, M. Cisplatin ototoxicity and otoprotection with sodium salicylate. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, Ribeirão Preto, v. 263, n. 9, p. 898-903, Sep. 2006.

HYPPOLITO M. A, et al. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de varredura. **Rev Bras Otorrinolaringol**, Ribeirão Preto, v. 71, n. 3, p. 268-73, Mai./Jun. 2005.

JORDAN J. A. ; SCHWADE N. D.; TRUELSON J. M. Fosfomycin does not inhibit the tumoricidal efficacy of cisplatin. **Meeting of the Southern Section of the American Laryngological, Rhinological and Otological Society Inc**, New Orleans, v. 109, n.8, p. 1259-1262. 15, Jan. 1999.

KALKANIS, J. G.; WHITWORTH, C.; RYBAK, L. P. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. **Laryngoscope**, Springfield, v. 114, n.3, p. 538-42. Mar. 2004.

KALTENBACH, J. A. et al. Comparison of five agents in protecting the cochlea against the ototoxic effects of cisplatin in the hamster. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Michigan, v. 1, n. 7, p. 493-500, 1997.

KEMP, D. T. Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function, and use. **British Medical Bulletin**, London, v. 63, n. 1, p. 223-241, 2002.

KEMP, D.T.; SIOBHAN, R.; BRAY, P. A guide to effective use of otoacoustic emissions. **Ear Hear**, London, v. 11, n. 2, p. 93-105, 1990.

KIM, K-S. et al. Ginkgo biloba extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. **Oral Oncology**, Seoul, v. 41, n. 4, p. 383-389, 2005.

KIMBERLEY, B. P. Applications of Distortion-Product Emissions to an Otological Practice. **Laryngoscope**, Minneapolis, v.109, p.1908-1918, 1999.

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**, Portland, v. 25, n. 10, p. 1190-1195, 1 April, 2007.

KOBUCHI, H. et al. Ginkgo biloba extract (EGb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 **Biochemical Pharmacology**, Berkeley, vol. 53, n. 6, p. 897-903, 1997.

KOMUNE S.; AKASIMA S. Pathophysiology of the ototoxicity of cis-diamine-dichloroplatinum. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Philadelphia, v. 89, p. 275-282, 1981.

KUSHNER, B. H. et al. Ototoxicity From High-Dose Use of Platinum Compounds in Patients With Neuroblastoma. **Cancer**, New York, v. 107, n. 02, p.417-22. 2006.

LAURELL, G; BAGGER-SJÖBÄCK, D. Dose-dependent inner ear changes after i.v. administration of cisplatin. **J Otolaryngol**, Stockholm, v. 20, n. 3, p. 158-67. Jun. 1991.

LAURELL, G. et al. Ototoxicity of cisplatin. **Int J Androl**, Stockholm, v. 10, n.1, p. 359-62, Feb. 1987.

LAURELL, G.; JUNGNELIUS, U. High-Dose Cisplatin Treatment: Hearing Loss and Plasma Concentrations. **Laryngoscope**, Stockholm, v. 100, p. 724-734, July. 1990.

LE BARS, P. L; KASTELAN, J. Efficacy and safety of a Ginkgo biloba extract. **Public Health Nutr**, New York, v.3, n. 4A, p.495-9, Dec. 2000.

LI, G. et al. Salicylate Protects Hearing and Kidney Function from Cisplatin Toxicity without

- Compromising its Oncolytic Action. **Lab Invest**, New York, v. 82, n. 5, p. 585-596, 2002.
- LONSBURY-MARTIN, B. L.; WHITEHEAD, M. L.; MARTIN, G. K. Clinical Applications of Otoacoustic Emissions. **Journal of Speech and Hearing Research**, Miami, v. 34, p. 964-981, Oct. 1991.
- LONSBURY-MARTIN, B. L.; MARTIN, G. K.; TELISCHI, F. F. Emissões Otoacústicas na Prática Clínica. In: MUSIEK, F. E.; RINTELMAN, W. F. (Ed.). **Perspectivas Atuais em Avaliação Auditiva**, Barueri: Manole, 2001. cap. 6, p. 163-192.
- LOW, W. K. et al. Sensorineural hearing loss after radiotherapy and chemoradiotherapy: a single, blinded, randomized study. **J Clin Oncol**, Singapore, v. 24, n.12, p. 1904-9, 20 Apr. 2006.
- MAHADEVAN, S.; PARK, Y. Multifaceted Therapeutic Benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, Efficacy, Safety and Uses. **J. Food Sci**, Amherst, v. 73, n. 1, p. 14-19, 2008.
- MAITRA, I. et al. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract egb 761. **Biochemical Pharmacology**, Roma. v. 49, n. 11, pp. 1649-1655, 1995.
- MAJOR, R. T. The Ginkgo, the most ancient living tree. The resistance of Ginkgo biloba L. to pests accounts in part for the longevity of this species. **Science**, Charlottesville, v. 157, n. 3794, p. 1279-1273, 15 sept. 1967.
- MARCOCCI , L. et al. Antioxidant Action of Ginkgo biloba extract EGB761 in vitro. **Methods in Enzymology**, Berkeley, v. 234, p. 462-474, 1994.
- McKENNA, D. J.; JONES, K.; HUGHES, K. Efficacy, Safety, and use of Ginkgo Biloba in Clinical and Preclinical Applications. **Alternative Therapies**, v. 7, n. 5, p. 70-90, sept./oct 2001.
- MEYERHOFF W. L. et al. Audiologic threshold monitoring of patients receiving ototoxic drugs. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, Dallas, v. 98, n. 12.1, p. 950-954, 1989.
- MULDOON, L. L. et al. Delayed administration of sodium thiosulfate in animal models reduces platinum ototoxicity without reduction of antitumor activity. **Clin Cancer Res**, Portland, v. 6, n. 1, p. 309-15, 2000.
- MUNHOZ, M. S. L. et al. Otoemissões Acústicas. In: MUNHOZ, M. S. L. et al. (Ed.). **Audiologia Clínica**, São Paulo: Atheneu, 2000. v. 2, cap. 9, p.121-148.
- MUSIEK, F. E.; SMURZYNSKI, J.; BORNSTEIN, S. T. Otoacoustic emissions testing in adults: an overview. **The Am Journal of Otology**, Lebanon, v. 15, n. s1, p. 21-28, May. 1994.
- OHLMS, L. A.; LONSBURY-MARTIN, B. L.; MARTIN, G. K. The clinical application of acoustic distortion products. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Houston, v. 102, p. 315-322, 1990.
- OZTURAN, O. et al. Monitoring of cisplatin ototoxicity by distortion-product otoacoustic emissions. **Auris Nasus Larynx**, Tokio, v. 23, p. 147-151, 1996.
- PALOMAR GARCIA V. et al. Drug-induced ototoxicity: current status. **Acta Otolaryngol**, Lleida, v. 121, n. 5, p. 569-72, Jul. 2001.
- PINCEMAIL, J. et. al. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Liège, v. 45, n. 8, p. 708-712, Aug. 1989.
- PROBST, R.; HAUSER, R. Distortion Product Otoacoustic Emissions in Normal and Hearing Impaired Ears. **Am J Otolaryngol**, Basel, v. 11, p. 236-243, 1990.
- RABIK , C. A.; DOLAN, M. E. Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with

- Platinating Agents. **Cancer Treat Rev**, Chicago. v. 33, n. 1, p. 9-23, Feb. 2007.
- RADEMAKER-LAKHAI, J. et al. Relationship Between Cisplatin Administration and the Development of Ototoxicity. **J Clin Oncol**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p. 918-924. Feb. 20. 2006.
- RAVI, R.; SOMANI, S. M.; RYBAK, L. P. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. **Pharmacol Toxicol**, Springfield, v. 76, n. 6, p. 386-94, Jun. 1995.
- REED, E. Cisplatin and Analogs. In: CHABNER, B.; LONGO, D. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice**, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 15, p. 447-462.
- RESS, B. D. et al. Effects of *cis*-platinum chemotherapy on otoacoustic emissions: The development of an objective screening protocol. **Otolaryngol Head Neck Surg**. Miami, v. 121, n. 6, p. 693-701, 1999.
- RONG, Y.; GENG, Z.; LAU, B. H. Ginkgo biloba attenuates oxidative **stress in** macrophages and endothelial cells. **Free Rad. Biol. Med**, Loma Linda. v. 20, n. 1, p. 121-127, 1996.
- ROSENBERG, B. et al . Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. **Nature**, East Lansing, v. 222, p. 385-386, Apr. 26. 1969.
- RYBAK, L. P. et al. Dose Dependent Protection by Lipoic Acid Against Cisplatin-Induced Ototoxicity in Rats: Antioxidant Defense System. **Toxicol Sci**, Springfield, v. 47, n. 2, p. 195-202, Feb. 1999.
- RYBAK, L. P.; RAMKUMAR, V. Ototoxicity. **Kidney Int.**, Springfield, v. 72, n. 8, p. 931-5, Oct. 2007.
- RYBAK, L. P.; WHITWORTH, C. A. Ototoxicity: therapeutic opportunities. **Drug Discov Today**, Springfield, v. 10, n.19, p. 1313-21, Oct. 1. 2005.
- RYBAK, L. P.; KELLY, T. Ototoxicity: bioprotective mechanisms. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, Springfield, v. 11, n.5, p. 328-33, Oct. 2003.
- RYBAK, L. P. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, Springfield, v. 15, n.5, p. 364-9. Oct. 2007.
- RYBAK, L. P. et al. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. **Hear Res**, Springfield, v. 226, n. 1-2, p.157-67, Apr. 2007.
- RYBAK, L. P.; WHITWORTH, C.; SOMANI, S. Application of Antioxidants and Other agents to Prevent Cisplatin Ototoxicity. **Laryngoscope**, Springfield, v. 109, n. 11, p. 1740-4, Nov. 1999.
- RYBAK, L. P. et al. Effect of Protective Agents Against Cisplatin Ototoxicity. **Am J Otol**, Springfield, v. 21, n. 4, p.513-20, Jul. 2000.
- SANCHEZ, T. G. et al. Experiência Clínica com EGb 761 no tratamento do Zumbido. **Arq Int otorrinolaringol**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 198-206, Jul./Set. 2002.
- SHA, S-H.; SCHACHT, J. Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation in vitro and ototoxicity in vivo: D-methionine is a potential protectant. **Hearing Research**, Ann Arbor. v.142, n. 1-2, p. 34-40, 2000.
- SIE, K. C.Y.; NORTON, S. J. Changes in otoacoustic emissions and auditory brain stem response after *cis-platinum* exposure in gerbils. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Seattle, v. 116, p. 585-92, 1997.
- SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica (Para as Ciências do Comportamento)**. Tradução Alfredo Alves de Farias. São Paulo: Mcgraw-Hill do Brasil LTDA, 1977. 370 p.

SILMAN, S.; SILVERMAN C.A. Basic Audiologic testing. In: _____. **Auditory Diagnosis. Principles and Applications**. San Diego: Singular Publishing Group Inc. 1997. cap. 2. p. 51.

SINGH, B. et al. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. **Fitoterapia**, Palampur, v. 79, n. 6, p. 401-418, June. 27. 2008.

SOCKALINGAM, R. et al. Cisplatin-Induced Ototoxicity and Pharmacokinetics: Preliminary Findings In a Dog Model. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, Brisbane, v. 111, n. 8, p. 745-750, 2002.

SOCKALINGAM, R. et al. Effect of High-Dose Cisplatin on Auditory Brainstem Responses and Otoacoustic Emissions in Laboratory Animals. **Am J Otol**, Brisbane, v. 21, n. 4, p. 521–527, 2000.

SOLIMANDO, D. A. et al. Cisplatin. In: **Drug Information Handbook for Oncology**. 2nd ed. Horsham: Apha, 2000-2001. p. 134-138.

SOUZA, C. A. et al. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. **Rev. bras. hematol. Hemoter**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 123-128, 2000.

STADINICKI, S.W. et al. *Cis*-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119875): Hearing Loss and Other Toxic Effects in Rhesus Monkeys. **Cancer chemother**. v. 59, n. 3, p. 467-480, May/Jun. 1975.

STAVROULAKI, P. et al. Evoked otoacoustic emissions - an approach for monitoring cisplatin induced ototoxicity in children . **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, Bristol, v. 59, n. 1, p. 47-57, May. 31. 2001.

STAVROULAKI, P. et al. Otoacoustic Emissions for Monitoring Aminoglycoside-Induced Ototoxicity in Children With Cystic Fibrosis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, Bristol, v. 128, p. 150-155, Feb. 2002.

STOVER, L.; GORGA, M. P.; NEELY, S. T. Toward optimizing the clinical utility of distortion product otoacoustic emission measurements. **J. Acoust. Soc. Am**, Omaha, v. 100, n. 2, p. 956-967, Aug. 1996.

TANGE, R. A.; VUZEVSKI, V. D. Changes in the Stria Vascularis of the Guinea Pig Due to Cis-Platinum. **Arch Otorhinolaryngol**, Rotterdam, v. 239, p. 41-47, 1984.

TEBONIN: comprimidos. Responsável técnico Wagner Moi. São Paulo: Altana Pharma, 2008. Bula de remédio.

TLUMAK, A. I.; KILENY, P. R. Parameters that affect the measurement of otoacoustic emissions. **Otology and neuro-otology**, Ann Arbor, v. 9, n. 5, p. 279-283, Oct. 2001.

TORAL-MARTIÑÓN, R. et al. Distortion Product Otoacoustic Emissions Test Is Useful in Children Undergoing Cisplatin Treatment. **Archives of Medical Research**, Mexico City, v. 34, n. 3, p. 205–208, 2003.

TORRE III, P. et al. Distortion Product Otoacoustic Emission Response Characteristics in Older Adults. **Ear & Hearing**, Madison, v. 24, n. 1, p. 20-29, 2003.

TRIOLA, M. F. **Introdução à Estatística**. Tradução Alfredo Alves de Farias. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. 410 p.

TRUONG, M. T.; WINZELBERG, J.; CHANG, K.W. Recovery from cisplatin-induced ototoxicity: a case report and review. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 71, n. 10, p. 1631-8, Aug. 2007.

VAN DEN BERG, J. H. et al. Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. **Cancer Treat Rev**, Amsterdam, v. 32, n. 5, p. 390-7, Aug. 2006.

VERMORKEN, J. B. et al. Ototoxicity of *cis*-Diamminedichloroplatinum(II): Influence of Dose,

Schedule and Mode of Administration. **Eur J Cancer Clin Oncol**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 53-58, 1983.

WILBER, L. A. Audiometria Tonal Liminar: Via Aérea e Via Óssea. In: MUSIEK, F.; RINTELMAN, W. F. (Ed.). **Perspectivas Atuais em Avaliação Auditiva**, Barueri: Manole, 2001. cap. 1, p. 16.

WILLIAMS, C. J.; WHITEHOUSE. J. M. A. Cis-platinum: a new anticancer agent. **British Medical Journal**, Southampton, v. 1,n. 6179, p. 1689-1691, 1979.

WOLF, H. R. D. Does Ginkgo Biloba Special Extract EGB761 Provide Additional Effects on Coagulation and Bleeding When Added to Acetylsalicylic Acid 500mg Daily? **Drugs R D**, BadKreuznach, v. 7, n. 3, p. 163-172, 2006.

WRIGHT, C.G.; SCHAEFER, S.D. Inner ear histopathology in patients treated with cis-platinum. **Laryngoscope**, Dallas, v. 92, p. 1408-1413, 1982

ZHANG, Y. et al. Ginkgo biloba Extract Kaempferol Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. **Journal of Surgical Research**, Houston, Texas, v. 148, n. 1, p. 17-23. July. 2008.

ZOCOLI, R.; REICHOW, S. L.; ZOCOLI, A. M. F. Emissões otoacústicas x Cisplatina: detecção precoce da ototoxicidade em pacientes oncológicos. **Rev Bras Otorrinolaringol**, São Paulo, v..69, n.2, p. 222-5, mar./abr. 2003.

ZOROWKA, P.G.; SCHIMITT, H. J.; GUTJAHR, P. Evoked otoacoustic emissions and pure tone threshold audiometry in patients receiving cisplatinum therapy. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** , Mainz, v. 25 p. 73-80, 1993.

ANEXO A: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 054/2007

Processo Nº: 024/07

Projeto de Pesquisa: Estudo clínico prospectivo, randomizado efeito otoprotetor do Extrato de Ginkgo Biloba por meio das Emissões Otoacústicas em pacientes sob tratamento com cisplana.

Instituição Pesquisada: HBDF

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial),
Ciências da Saúde;

Validade do Parecer: 23/04/2009

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 23 de abril de 2007.

Atenciosamente.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A presente pesquisa visa estudar o efeito de proteção ao ouvido, do Extrato de Ginkgo Biloba (EGB761); analisando o efeito tóxico ao ouvido interno da cisplatina, por meio do teste de emissões otoacústicas evocadas (teste da orelhinha), que será objeto de pesquisa na área de Eletrofisiologia da Audição do curso de Mestrado da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UNB).

O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão em participar deve ser sua. Para tanto, leia atentamente as informações abaixo. Se você concordar em participar basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se você tiver alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável pela pesquisa.

A pesquisa será iniciada com a realização de testes que avaliam a audição (Audiometria Tonal/Imitanciometria e Emissões Otoacústicas), os quais são de rápida realização e não causam qualquer tipo de desconforto. Será também realizado um exame clínico otorrinolaringológico, com o objetivo de recolher dados acerca de doenças otológicas e hábitos que possam influenciar a qualidade de audição, através de um questionário. Após o exame será dado a cada paciente da pesquisa o Extrato seco de Ginkgo Biloba, durante um período de 90 dias, medicação que será usada na tentativa de proteger o ouvido da ação tóxica do quimioterápico. O Extrato de Ginkgo Biloba pode raramente ocasionar incômodo gastrointestinal, dor de cabeça, reações alérgicas cutâneas e risco de sangramento, que devem ser informadas ao pesquisador. Ainda serão analisados os exames sanguíneos laboratoriais: hemograma, glicemia, uréia e creatinina para verificar o estado de saúde do paciente, exames estes já realizados no ambulatório de Oncologia para avaliação clínica antes do início da quimioterapia. Os testes auditivos serão realizados em clínica de Otorrinolaringologia e os dados serão fornecidos gratuitamente, após o término da pesquisa. Os resultados assim como as orientações necessárias ao caso serão repassados para os participantes através do prontuário médico.

Eu _____ portador da carteira de identidade, RG (_____), autorizo de livre e espontânea vontade a participação na pesquisa intitulada, **Ensaio clínico randomizado, para avaliação do efeito otoprotetor do Extrato de Ginkgo Biloba, por meio das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção, em pacientes sob tratamento com cisplatina**, a ser executado pela Otorrinolaringologista Mirela Alves Dias, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre, na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Augusto C. Pires de Oliveira.

Os resultados da pesquisa serão divulgados para fins científicos, sem a identificação de seus participantes, ficando garantido o sigilo e a privacidade. Os participantes terão acesso, em qualquer etapa do estudo, ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, que poderá ser encontrado no ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital Regional da Asa Norte, e através dos telefones 81196635/33468567. Informações também poderão ser obtidas junto ao Comitê de Ética e Pesquisa da SES/DF, cujo número do telefone é 61-3325.4955.

É permitido ao paciente em qualquer momento, deixar de participar da pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Estando de acordo com os procedimentos acima informados, o paciente ou responsável e o pesquisador abaixo assinam. Telefone do CEP/SES/DF: 61-325. 4955

Brasília, ___ de _____ de 200_.

Paciente ou Responsável _____
Assinatura

Pesquisador _____
Assinatura

ANEXO C: Protocolo de Pesquisa

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

“Ensaio clínico, prospectivo, randomizado, do efeito otoprotetor do Extrato de Ginkgo Biloba, por meio das Emissões Otoacústicas em pacientes sob tratamento com cisplatina”.

Área de Pesquisa – Eletrofisiologia da Audição

Protocolo

Nome: _____ Reg: _____

Data de Nascimento ___ / ___ / ___ Sexo: Mas. Fem.

Idade: _____

Endereço: _____ Tel: _____

História Clínica

Data da avaliação _____

Diagnóstico(tipo e localização): _____

Tratamento-QT(datas,agentes,dosagens)/RxT _____

() Sem queixas clinicas

Respiratório

() NDN

() Disfunção Tubária

Exame Físico

Otoscopia: _____

Resultados Exames :

Emissões Otoacústicas DP

EOA-DP – Data: / /2007

EOA PD Ouvido Direito

L1(dB)	L2 (dB)	F1 (Hz)	F2 (Hz)	GM(Hz)	DP(dB)	NF(dB)	DP-NF(dB)
65	55	6654	7966	7280			
65	55	4686	5623	5133			
65	55	3327	3983	3640			
65	55	2343	2811	2566			
65	55	1640	1968	1797			
65	55	1171	1406	1283			
65	55	843	1031	932			
65	55	609	750	676			

Fonte – Dados da pesquisa

EOAPD Ouvido Esquerdo

L1(dB)	L2 (dB)	F1 (Hz)	F2 (Hz)	GM(Hz)	DP(dB)	NF(dB)	DP-NF(dB)
65	55	6654	7966	7280			
65	55	4686	5623	5133			
65	55	3327	3983	3640			
65	55	2343	2811	2566			
65	55	1640	1968	1797			
65	55	1171	1406	1283			
65	55	843	1031	932			
65	55	609	750	676			

Fonte – Dados da pesquisa

1- Audiometria Tonal e Immitanciometria:

1)

OD-Hz	0,25K	0,5K	1K	2K	3K	4K	6K	8K
VA								
VO								

OE-Hz	0,25K	0,5K	1K	2K	3K	4K	6K	8K
VA								
VO								

Timpanometria:

Tipo de Curva:

- A
- B
- C
- Ad
- Ar

