

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UNB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

CARLA GIOVANNA SILVA BORGES

**SUSCETIBILIDADE DO MODELO MURINO SWISS À
OTOTOXICIDADE INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO
INTRAPERITONEAL DE AMICACINA DURANTE 14 DIAS**

**BRASÍLIA
2022**

CARLA GIOVANNA SILVA BORGES

**SUSCETIBILIDADE DO MODELO MURINO SWISS À
OTOTOXICIDADE INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO
INTRAPERITONEAL DE AMICACINA DURANTE 14 DIAS**

Dissertação apresentada ao Programa
Mestrado em Ciências Médicas da Universidade
de Brasília, como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Lopes
Sampaio

Co-orientador: Profa. Dra. Selma Aparecida
Kückelhaus

**BRASÍLIA
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

BC278sm
msos
Borges, Carla Giovanna
SUSCETIBILIDADE DO MODELO MURINO SWISS À OTOTOXICIDADE
INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE AMICACINA
DURANTE 14 DIASUSO / Carla Giovanna Borges; orientador Dr
André Luiz Lopes Sampaio; co-orientador Selma Kückelhaus.
- Brasília, 2022.
74 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2022.

1. SWISS. 2. OTOTOXICIDADE. 3. AMICACINA. 5. CÉLULAS
CILIADAS EXTERNAS. I. Sampaio, Dr André Luiz Lopes ,
orient. II. Kückelhaus, Selma , co-orient. III. Título.

CARLA GIOVANNA SILVA BORGES

**SUSCETIBILIDADE DO MODELO MURINO SWISS À
OTOTOXICIDADE INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO
INTRAPERITONEAL DE AMICACINA DURANTE 14 DIAS**

Trabalho de Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Médicas, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências Médicas.

Brasília-DF 26 de janeiro de 2022

Prof. Dr André Luiz Lopes Sampaio
Professor Adjunto de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina
Área de Cirurgia da Universidade de Brasília
Professor orientador

Profa. Dra Iruena Moraes Kessler
Professora Associada de Neurocirurgia da Faculdade de Medicina
Área de Cirurgia da Universidade de Brasília
Membro da banca examinadora

Profa Dra Monique Antunes de Souza Chelminski Barreto
Fonoaudióloga Preceptora da Residência Interdisciplinar em Saúde Infantil no Hospital
Materno Infantil de Brasília-SES-DF
Membro da banca examinadora

Profa Dra Juliana Gusmão Araújo
Médica Otorrinolaringologista do Programa de Implante Coclear Hospital Universitário
de Brasília-EBSERH
Membro da banca examinadora

AGRADECIMENTOS

À minha família, por possibilitar este momento de realização pessoal e profissional, em especial ao Fabiano e as minhas filhas Giovanna e Marina por estarem presente nos momentos especiais da minha vida e por entenderem as privações durante esses três anos. Minha mãe, pelos momentos de incentivo e orações. Ao meu pai (*in memoriam*) que nos dizia sempre, a herança que nos deixaria seriam os estudos. Minha irmã, Camilla, que já passou pelo mesmo processo, entendendo as dificuldades das ausências.

Ao meu Orientador, Professor Dr. André Luiz Lopes Sampaio, por tornar possível a realização deste objetivo. Agradeço por ter me aceito como aluna e pela excelente orientação, considero uma das pessoas mais empenhadas na difícil empreitada do labor educacional, que já convivi. Suas considerações dirigiram meu estudo.

A Professora Dra Selma Kuckelhaus, por ter aceitado o convite para me co-orientar, pela gentileza de contribuir com suas considerações e orientações técnicas.

A amiga e fonoaudióloga Dra. Lucieny Martins por participar ativamente em todos os momentos dessa pesquisa.

A todos os outros professores pela oportunidade de aquisição de novos conhecimentos, amadurecimento e crescimento.

As, Dra. Iruena Moraes Kessler, Dra Monique e Dra Juliana Gusmão pela presteza em participar da minha banca.

De forma particular, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, onde desenvolvi o estudo, por ter liberado a pesquisa, sem isso, não seria possível a realização do trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, Nilda, pela compreensão e por entender que o momento em realizar um mestrado era importante para mim. A Nátalia parceira em todos os momentos e vivenciando as mesmas angústias e ansiedades.

Ao Dr Rafael Andrade veterinário do CIEX (Laboratório de Cirurgia Experimental) e toda equipe dedicada com as pesquisas experimentais. Aos colegas do Nupmia, Wanessa Félix Cabral, a pesquisadora Dra Andreane Vasconcelos, aos alunos do PIBIC (programa de iniciação científica) Lucas Lauand e Marcela Gomes que contribuíram e se empenharam nas análises histológicas. E aos demais colegas, que trabalham juntos. Ao Mestre Ricardo Pessoa, muito obrigada por dedicar seus conhecimentos e por doar seu tempo nos cálculos matemáticos das dosagens e curvas de crescimento/ganho de peso dos animais, suas sugestões viabilizaram a pesquisa. Aos colaboradores da UNB, pela contribuição.

A todos os colegas do curso do Mestrado da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Brasília, muitas trocas, nunca me esquecerei.

A todos da coordenação da pós graduação, pelas orientações das burocracias, sempre atendendo com um sorriso e nesses novos tempos respondendo e-mails rapidamente.

O meu respeito e agradecimento aos animais que fizeram parte desta pesquisa e deram suas vidas em nome da evolução do conhecimento e da ciência.

A todos o meu muito obrigada!

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Amicacina causa ototoxicidade irreversível, e a detecção precoce desse agravo é considerada uma tarefa difícil. Estudos clínicos dos efeitos da Amicacina no homem têm revelado que a droga pode produzir alterações que provocam zumbido, perda auditiva nas frequências altas e manifestações comportamentais. A equivalência anátomo-fisiológica do sistema auditivo periférico de humanos com os camundongos faz com que esse modelo de animal seja rotineiramente empregado em ensaios clínicos, pois contribuem para a prevenção, diagnóstico e tratamento das alterações causadas pelo uso desse fármaco. **OBJETIVO:** Este estudo teve por objetivo verificar a suscetibilidade do modelo Murino SWISS às lesões de células ciliadas externas causadas em virtude do uso do aminoglicosídeo Amicacina. **MATERIAL E MÉTODO:** Pesquisa experimental, prospectiva e de intervenção, aprovada pelo CEUA/UnB nº (63/2018). Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle(G1) e Amicacina Ototóxica (G2). O G1 recebeu solução de Cloreto de Sódio(soro) 10mg/kg/dia e o G2 recebeu Amicacina 400mg/kg/dia. As soluções foram ofertadas diariamente via intraperitoneal por 14 dias consecutivos. Foram realizados exames de emissões otoacústicas por produto de distorção nas frequências de 6 à 12kHz no T0 e T14 e estudo histológico das bulas timpânicas. As análises foram realizadas empregando-se o programa *Prism5*[®]. Foram consideradas significativas, diferenças com $p < 0,05$. **RESULTADOS:** O uso de Amicacina em dose de 400mg/kg/dia por 14 dias consecutivos não ocasionou danos as células ciladas externas e estruturas cocleares no modelo SWISS. **CONCLUSÃO:** Camundongos SWISS apresentam resistência a ototoxicidade da Amicacina em tratamento na dosagem de 400mg/kg/dia durante 14 dias por via intraperitoneal.

Palavras-chave: Amicacina. Ototoxicidade. Camundongo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Amikacin causes irreversible ototoxicity, and early detection of this condition is considered a difficult task. Clinical studies of the effects of amikacin on humans have revealed that the drug can produce changes that cause tinnitus, high-frequency hearing loss and behavioral manifestations. The anatomical-physiological equivalence of the peripheral auditory system of humans with mice makes this animal model routinely used in clinical trials, as it contributes to the prevention, diagnosis and treatment of alterations caused by the use of this drug. **OBJECTIVE:** This study aimed to verify the susceptibility of the Murino SWISS model to outer hair cell injuries caused by the use of the aminoglycoside amikacin. **MATERIAL AND METHOD:** Experimental research, approved by CEUA/UnB nº (63/2018). The animals were divided into two groups: The control group (GC) and Ototoxic Amikacin (AO). The CG received a sodium chloride solution (serum) 10mg/kg/day and the OA received Amikacin, prospective and interventional, 400mg/kg/day. The solutions were offered daily via intraperitoneal for 14 consecutive days. Distortion product otoacoustic emissions tests in frequencies from 6 to 12kHz were performed on T0 and T14 and histological study of the tympanic bulla. Analyzes were performed using the Prism5® program. Differences with $p < 0.05$ were considered significant. **RESULTS:** The use of Amikacin at a dose of 400mg/kg/day for 14 consecutive days did not damage the outer stranded cells and cochlear structures in the SWISS model. **CONCLUSION:** SWISS mice are resistant to amikacin ototoxicity in treatment at a dosage of 400mg/kg/day for 14 days intraperitoneally.

Keywords: Amikacin. Ototoxicity. Mouse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de um Aminoglicosídeo	5
Figura 2 - Anatomia da orelha interna	7
Figura 3 - Órgão de Corti	8
Figura 4 - Histologia coclear	9
Figura 5A - Exame de EOADP no camundongo SWISS	17
Figura 5B - Representação com cores das frequências na tonotopia coclear	17
Figura 6 – Fluxograma	22
Figura 7 - Pesquisadora realizando exame de EOAPD no camundongo SWISS	25
Figura 8 - Pesquisadora administrando a medicação	26
Figura 9 - Quadrantes da Aplicação da Amicacina	26
Figura 10 - Curva de ganho de peso no camundongo	27
Figura 11A - Recipientes	28
Figura 11B – Recipientes	28
Figura 12 - Etapas do processamento histológico	29
Figura 13 - Bulas Emblocadas	29
Figura 14A - Boxplot da variação da amplitude do sinal na frequência de 6kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T1) e no décimo quarto dia (T2)	32
Figura 14B - Boxplot da variação da relação sinal/ruído na frequência de 6kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T1) e no décimo quarto dia (T2)	33
Figura 15A - Boxplot da variação da amplitude do sinal na frequência de 8kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T1) e no décimo quarto dia (T2)	34
Figura 15B - Boxplot da variação da relação sinal/ruído na frequência de 8kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T1) e no décimo quarto dia (T2)	34
Figura 16A - Boxplot da variação da amplitude do sinal na frequência de 10kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T1) e no décimo quarto dia (T2)	35
Figura 16B - Boxplot da variação da relação sinal/ruído na frequência de 10kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T1) e no décimo quarto dia (T2)	36
Figura 17A - Boxplot da variação da amplitude do sinal na frequência de 12kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T1) e no décimo quarto dia (T2)	36
Figura 17B - Boxplot da variação da relação sinal/ruído na frequência de 12kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T1) e no décimo quarto dia (T2)	37

Figura 18 - Células viáveis da cóclea dos camundongos SWISS	40
Figura 19 A e B - Fotomicrografia da orelha mostrando a topografia de parte da orelha externa, da orelha média e da cóclea de um camundongo do grupo controle	42
Figura 20 - Fotomicrografias do órgão vestibulococlear de camundongos do grupo controle	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mediana da variação de amplitude em camundongos SWISS, no exame de emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) em grupo controle e tratado com amicacina ototóxica 38

Tabela 2 - Mediana da variação de relação sinal ruído em camundongos SWISS, no exame de emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) em grupo controle e tratado com Amicacina ototóxica 38

Tabela 3 - Análise histológica em camundongos SWISS, no G1: grupo controle e tratado com Amicacina ototóxica 41

LISTA DE ABREVIATURAS

AO - Amicacina Ototóxica

CCE -Células ciliadas externas

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

CO2 - Gás Carbônico

dBNA - Decibel nível de audição

dBNPS - Decibel nível de pressão sonora

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

E1 - Exame um

E2 - Exame dois

EOA - Emissão Otoacústica Evocada

EOAE - Emissão Otoacústica Espontânea

EOAPD - Emissão Otoacústica por Produto de Distorção

EOAs - Emissões Otoacústicas

EOAT - Emissão Otoacústica Transiente

F1 - Frequência um

F2 - Frequência dois

FM - Faculdade de Medicina

G - Grupo

GC - Grupo Controle

H&E - Hematoxilina

Hz - Hertz

kHz - Quilo Hertz

L1 - Latência um

L2 - Latência dois

LEO - Laboratório de Ensino e Pesquisa em Otorrinolaringologia

mg/kg - Miligrama por quilograma

mg/ml - Miligrama por mililitro

ml - Mililitros

MW - Mann-Whitney

NaCl - Cloreto de sódio

NuPMIA - Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada

OMS - Organização Mundial da Saúde

RNA - Ácido ribonucleico

SNC - Sistema nervoso central

SNR – S/R - relação sinal ruído

T - Teste

T - Tempo

T0 - Tempo zero

T14 - Tempo quatorze

TEUTO - Laboratório de Medicamentos TEUTO Brasil

UFG - Universidade Federal de Goiás

UNB - Universidade de Brasília

USA - Estados Unidos da América

UTI - Unidade de Tratamento Intensivo

XIX - 19

μm^2 - micra ao quadrado

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 AMINOGLICOSÍDEOS	3
2.2 ANATOMIA DA ORELHA	7
2.3 OTOTOXICIDADE E APOPTOSE CELULAR	9
2.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL	13
2.4.1 Emissões Otoacústicas	13
2.5 EXPERIMENTO COM ANIMAIS	18
2.5.1 Modelo SWISS e Ototoxicidade	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODO	22
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	22
4.2 TIPO DE ESTUDO	22
4.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS	23
4.4 PROCEDIMENTOS PARA A SELEÇÃO DOS GRUPOS	23
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	24
4.6 EXAMES DE EOAPD	24
4.7 ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO	25
4.8 EUTANÁSIA	27
4.9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	27
4.10. OBTENÇÃO DOS DADOS HISTOLÓGICOS	29
4.10.1 Procedimentos analíticos	30
4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	30
5 RESULTADOS	32
5.1 FREQUÊNCIA DE 6kHz	32
5.2 FREQUÊNCIA DE 8khz	33
5.3 FREQUÊNCIA DE 10khz	35
5.4 FREQUÊNCIA DE 12khz	36
5.5 AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA CÓCLEA	39

6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
APÊNDICE A – GANHO DE PESO ESTIMADO DOS ANIMAIS	57
ANEXO 01 DECLARAÇÃO CEUA-UNB.....	58

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde cerca de 466 milhões de pessoas no mundo sofrem de perda auditiva incapacitante. Esse quadro tende a piorar até 2050, quando há previsão de 900 milhões de indivíduos com alterações auditivas. Dentre os fatores responsáveis por essa condição está o uso de drogas ototóxicas (1).

Algumas afecções iatrogênicas, chamadas de ototoxicoses, provocadas por drogas, alteram a orelha interna, afetando tanto o sistema coclear, quanto o sistema vestibular e, em alguns casos, ambos os sistemas, prejudicando a audição e dificultando o equilíbrio (2). A ototoxicidade no sistema auditivo é caracterizada por perda auditiva neurossensorial de mais de 25 dBNA e pode provocar surdez definitiva ou reversível. No sistema vestibular, a ototoxicidade provoca perda do equilíbrio, com manifestações vestibulares como vertigem (3).

Na literatura já foram identificadas mais de duzentas substâncias consideradas ototóxicas, porém nem todas são consideradas nocivas ao ser humano (4). A incidência de ototoxicidade induzida por drogas é dependente da dose e está diretamente relacionada à forma de oferta, podendo ser dose única ou cumulativa, tendo ainda relação com o tempo entre os ciclos de tratamento (5).

Dentre as substâncias que apresentam um alto risco de ototoxicidade estão os aminoglicosídeos (6). É frequentemente relatado que o uso irrestrito de aminoglicosídeos pode ter como consequência um grande número de indivíduos com perda auditiva. Antibióticos aminoglicosídeos são compostos antibacterianos de amplo espectro e são frequentemente usados no tratamento de infecções gram-negativas. Tobramicina, gentamicina e Amicacina são os aminoglicosídeos mais empregados, por exemplo, no tratamento de exacerbações pulmonares em pacientes com fibrose cística. Outro grupo que recebe antibióticos aminoglicosídeos com maior frequência são os recém-nascidos com infecções graves que necessitam de suporte de UTI neonatal (5).

É importante pontuar que alguns aminoglicosídeos são mais cocleotóxicos, outros são mais vestibulotóxicos (7). A Amicacina é um aminoglicosídeo semissintético derivado da canamicina, ativo contra a maioria das espécies microbianas resistentes à gentamicina e canamicina (8). Estudos clínicos dos efeitos

da Amicacina no homem têm revelado que a droga pode produzir alterações que provocam zumbido, perda auditiva nas frequências altas e, mais raramente, distúrbios vestibulares. Uma das limitações mais sérias na aplicação terapêutica dessa droga é a ototoxicidade que provoca lesões permanentes no sistema coclear e vestibular (8).

Nesse sentido, buscando entender a natureza da cocleotoxicidade induzida pelo aminoglicosídeo, modelos pré-clínicos são imprescindíveis, uma vez que, a partir deles é possível desenvolver soluções para prevenir a perda da função auditiva. Os modelos animais são de grande valor para estudos de fisiopatologia e para o desenvolvimento de medidas preventivas nas alterações na orelha interna. Na área de audiologia roedores são bastante utilizados, particularmente para a avaliação audiológica, inclusive em pesquisas com ototoxicidade (9).

O camundongo é o modelo experimental mais amplamente utilizado e compreendido pelos cientistas para testes laboratoriais com propósito de ensino e pesquisa biomédica. Diferentes linhagens de camundongos são utilizadas em pesquisas científicas, a exemplo da linhagem SWISS (10). Compreender como esses modelos se comportam diante de injúrias causadas por substâncias ototóxicas para os humanos agrega conhecimento e base científica para o futuro desenvolvimento de medidas protetivas para o uso dessas substâncias.

Os modelos experimentais, principalmente cobaias, ratos, camundongos, facilitam o manejo e similaridade com a orelha humana. Porém, é necessário observar que o resultado dessas pesquisas, a interpretação dos dados experimentais, são, muitas vezes, complexos, em função da distinção entre as dimensões cocleares dos humanos e da maioria dos animais experimentais (11).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a suscetibilidade do modelo murino SWISS às lesões de células ciliadas externas (CCE) causadas em pelo uso do aminoglicosídeo Amicacina. A hipótese que permeia esta pesquisa foi a de que a Amicacina afeta as células ciliadas externas, provocando perda auditiva nos camundongos da espécie SWISS, assim como já verificado em outras espécies como as cobaias albinas *Cavia porcellus* (12).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AMINOGLICOSÍDEOS

O aminoglicosídeo é uma categoria de antibióticos de amplo espectro. Desempenha um papel importante no arsenal terapêutico antibacteriano desde a década de 1940, especialmente em casos de infecções graves causadas por bactérias de Gram negativo (13).

As infecções bacterianas representam um enorme desafio para os profissionais de saúde, uma vez que as bactérias encontram no organismo humano várias condições essenciais ao seu crescimento. Sua constante evolução permite que desenvolvam cada vez mais características facilitadoras da invasão, permanência e multiplicação, no organismo humano, mesmo na presença de fármacos antibacterianos.

A presença de bactérias no ser humano não constitui necessariamente a ocorrência de infecção. Para que se desenvolvam, é necessário que haja sinergismo de vários fatores, entre os quais se destacam: suscetibilidade do doente à infecção; potencial de virulência da bactéria e oportunidade de interação entre o doente e a bactéria. (14).

O primeiro aminoglicosídeo – a estreptomicina – foi isolado em 1944 por Waksman e seus colaboradores a partir de culturas de *Streptomyces griseus* e foi o segundo antibiótico usado na terapêutica, logo após o aparecimento da penicilina, nomeadamente para o tratamento da tuberculose. Depois de serem descritas as primeiras estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à estreptomicina, novos antibióticos foram descobertos, com melhores características terapêuticas (15).

O nome aminoglicosídeo se deve ao fato de a molécula ser constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol, que habitualmente está em posição central. O nome da substância tem relação com sua origem (16).

Os aminoglicosídeos naturais e semissintéticos foram relatados, sendo que o número de antibióticos pertencentes a esta classe foi aumentando através do desenvolvimento de vários compostos, na sua maioria derivados semissintéticos de produtos naturais (15).

Eles apresentam propriedades químicas e farmacológicas semelhantes (16), tendo como vantagens terapêuticas o efeito pós-antibiótico, sua ação bactericida, o extenso espectro de ação antibacteriana, o sinergismo com outros antibióticos, principalmente β -lactâmicos, e os seus raros fenômenos de hipersensibilidade (17).

Devido a polaridade, os aminoglicosídeos devem ser administrados por via injetável, pois são incapazes de atravessar a barreira hematoencefálica eficientemente, não podendo, portanto, ser usados para tratamento de meningites, a menos que sejam injetados diretamente no SNC (18).

Os aminoglicosídeos são administrados em doses diárias repetidas. Estudos comparando a dose única diária e a dose múltipla de qualquer antibiótico aminoglicosídeo são escassos (19). Teoricamente, a dosagem diária única pode tornar a farmacocinética mais segura, com uma concentração mínima reduzida, ou mesmo um período sem drogas durante o curso do tratamento, resultando, portanto, menos acúmulo no ouvido interno (20).

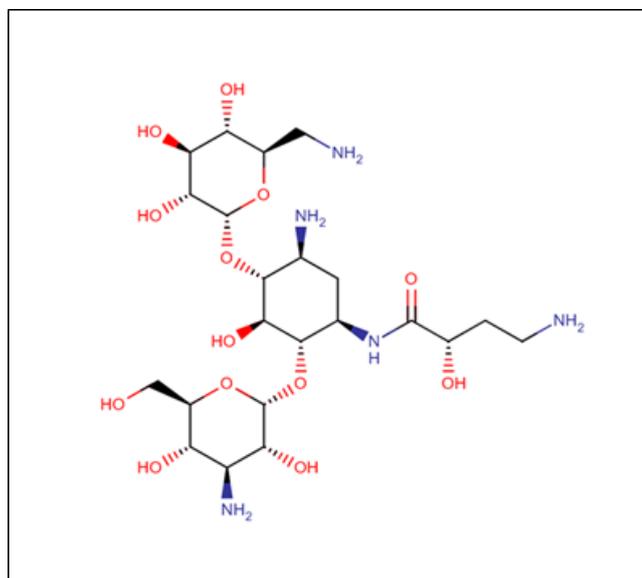
O transporte de medicamentos para o ouvido interno depende das características moleculares do medicamento. Os aminoglicosídeos têm baixa ligação às proteínas no plasma, são complexos solúveis em água e são conhecidos por penetrar mal no SNC, porém são capazes de ultrapassar as barreiras sangue-labirinto. Os mecanismos ototóxicos foram mapeados em diferentes contextos experimentais. Uma vez no ouvido interno, esses medicamentos exercem sua ação tóxica por meio de vários mecanismos. Em resumo, foi relatado que os antibióticos aminoglicosídeos geram espécies reativas de oxigênio na cóclea e, assim, induzem a disfunção mitocondrial e a indução de vias apoptóticas empregando caspase (21).

A Amicacina, substância escolhida para o presente estudo, foi descoberta em 1972, é um aminoglicosídeo semissintético amplamente utilizado no tratamento de infecções causadas por organismos gram-negativos resistentes à gentamicina e microbactérias não tuberculosas (22). O uso desse agente geralmente resulta em ototoxicidade devido à superprodução de espécies reativas de oxigênio (23).

A estrutura molecular da Amicacina (Figura 1), tal como dos fármacos pertencentes à subclasse dos aminoglicosídeos, é caracterizada por ligações glicosídicas que unem açúcares aminados a um anel aminociclitol. Como já referido anteriormente, é um fármaco obtido por semi-síntese da canamicina A, a partir de uma

acetilação do grupo 1-amina do núcleo desoxiestreptamina com o ácido 2-hidroxi-4-aminobutírico (Figura 1). Esta particularidade permite o aumento do espectro de ação da Amicacina em relação à molécula que lhe deu origem (24).

Figura 1: Estrutura química da Amicacina



Fonte: Marques (2017)

Sua composição e estrutura químicas, dotadas de vários grupos hidroxilo e amina, permitem a este fármaco apresentar características hidrossolúveis e básicas. Deste modo, a Amicacina tem uma ótima atividade em pH básicos, com valores compreendidos entre 7,5 e 8,5 (24).

Os aminoglicosídeos apresentam várias particularidades que os tornam úteis como agentes antimicrobianos, nomeadamente o fato de apresentarem atividade bactericida dependente da concentração, efeito pós-antibiótico, farmacocinética relativamente previsível e sinergismo com outros antibióticos (23).

A dosagem de Amicacina que pode ser considerada ototóxica é definida na literatura em torno de 400mg/kg/dia. Em pesquisa experimental com cobaias foi observado que a Amicacina na dose de 400mg/kg/dia intramuscular provoca completa eliminação das células ciliadas externas e lesão parcial das internas, na primeira e segunda espira da cóclea, com lesões menos intensas na terceira e quarta espira, ocorrendo lesões parciais nas células ciliadas internas (25).

Os antibióticos aminoglicosídeos são importantes e, às vezes, indispensáveis para o tratamento e profilaxia de várias infecções, ainda que seja conhecido o seu potencial de nefrotoxicidade e ototoxicidade e problemas associados à resistência das bactérias (18).

A nefrotoxicidade pode ocorrer em até 20% dos pacientes, embora usualmente reversível, a lesão renal causa maior tempo de internação e, conseqüentemente, maiores custos (18).

A resistência bacteriana pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (19). As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutações e são promíscuas, podendo trocar material genético entre linhagens de mesmas espécies ou de espécies diferentes.

Os aminoglicosídeos são substâncias que interagem fortemente com receptores fosfolipídeos da membrana das células ciliadas dos sistemas auditivo e vestibular, carregando negativamente os polifosfoinosídeos e formando um complexo aminoglicosídeo-polifosfoinosídeos que tem o poder de inibir os receptores das membranas celulares, bloqueando os canais de cálcio, causando assim, lesões nas células ciliadas (8).

Dentre os danos causados pelos aminoglicosídeos está o comprometimento das células ciliadas externas, lesando inicialmente as células da espira basal da cóclea (20). Numa fase aguda, a droga ototóxica se combinaria aos receptores de membranas de células ciliadas cocleares ou das máculas do sáculo, utrículo ou cristas ampulares dos canais semicirculares. Esses receptores compostos por polifosfonosídeos têm um papel importante nos mecanismos bioelétricos e na permeabilidade da membrana celular, por interação com íons cálcio (21).

O aminoglicosídeo leva a um bloqueio dos canais de cálcio e, conseqüentemente, os canais de potássio e perda de íons magnésio nas mitocôndrias das células ciliadas. Numa fase crônica ocorrerão alterações no RNA e DNA e na síntese proteica, desencadeados pelas alterações nos sistemas antioxidantes celulares (21).

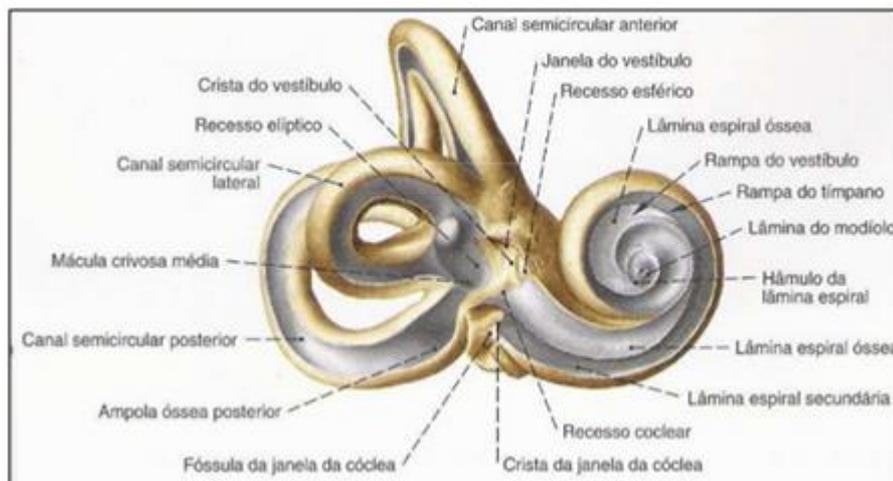
2.2 ANATOMIA DA ORELHA

A constituição do sistema auditivo é representada por conexões centrais e por estruturas sensoriais responsáveis pela audição. Esse sistema pode ser referido em duas porções distintas, inter-relacionadas, definidas como sistema auditivo periférico e sistema auditivo central. A porção periférica compreende estruturas da orelha externa, da orelha média, da orelha interna e do sistema nervoso periférico, ou seja, nervo vestibulococlear (25).

Na parte anterior da orelha interna, encontra-se a cóclea, principal responsável pela função auditiva (25).

A cóclea humana é uma estrutura helicoidal com aproximadamente dois giros completos e mais 2/3 de um giro, medindo cerca de 3,5 mm de altura e 7,5 mm de diâmetro na sua base, conforme mostrado na Figura 2. A região periférica é composta pela cápsula óssea e a região central é composta pelo modíolo, com canais para passagem de ramos nervosos e vasculares, provenientes do meato acústico interno. Ao redor do modíolo, forma-se uma espiral da base até o ápice da cóclea dividido em três compartimentos: escala vestibular; escala timpânica; e escala média ou ducto coclear (25).

Figura 2: Anatomia da orelha interna

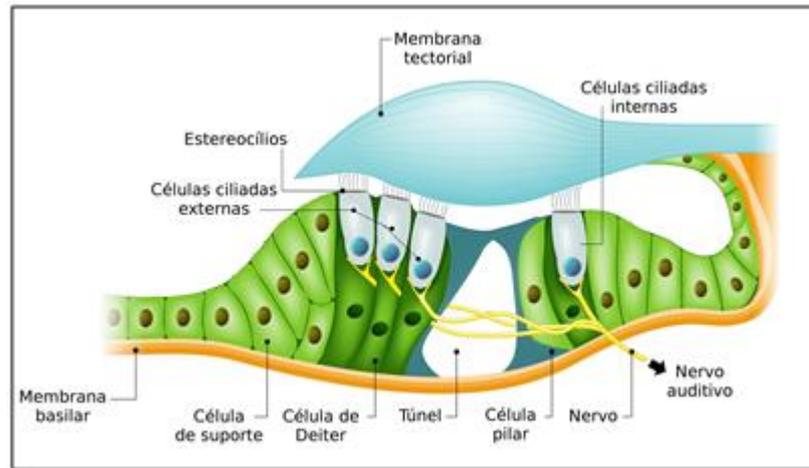


Fonte: Sobotta – Atlas de Anatomia Humana. Volume 1 Cabeça, Pescoço e Extremidade Superior. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

O ducto coclear é constituído por três paredes: ligamento espiral, membrana basilar e membrana vestibular ou de Reissner. No interior do ducto coclear, uma

região sobre a membrana basilar passa por um alto grau de diferenciação formando o órgão de Corti. Este é formado pelas células ciliadas internas em uma única fileira medialmente e próxima ao modíolo, por três fileiras de células ciliadas externas lateralmente às células ciliadas internas e por células de sustentação (Figura 3) (26).

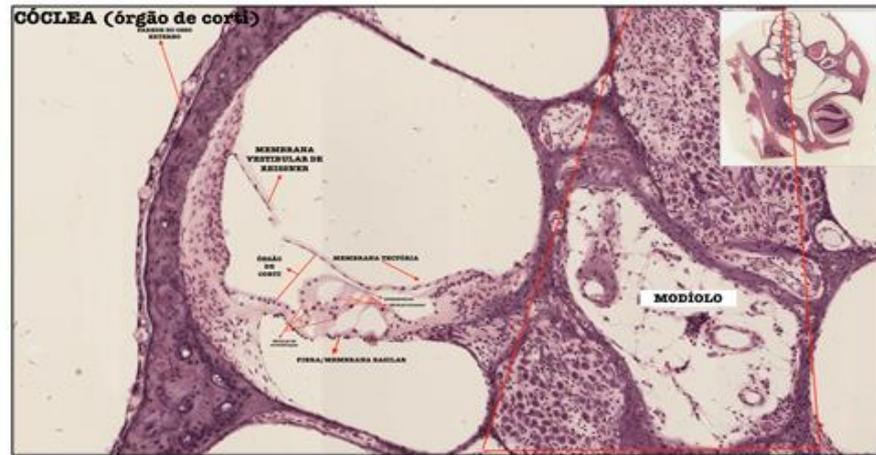
Figura 3: Órgão de Corti (órgão espiral).



Fonte: Shutterstock.com, 2013

A maior porção da parede lateral do labirinto membranáceo coclear é formada pela estria vascular, maior epitélio vascular, se estendendo do ligamento espiral até a membrana de Reissner, sendo responsável pela secreção e absorção do líquido endolinfático e manutenção do gradiente elétrico às custas de energia. A alta atividade metabólica se dá pela quantidade de mitocôndrias existentes. É formada por capilares e outros 3 tipos de células: Marginais (cromófilas, ou escuras), Intermediárias (cromófobas, ou claras) e basais (Figura 4) (25).

Figura 4: Histologia coclear



1-Órgão de Corti, Estria Vascular, Limbo,, Gânglio Espiral, Ligamento Espiral.
 Fonte: Kazimirski, 2020, Unifadra, Histologia 1

As células da estria vascular são ricas em ATPase, Na^+ K^+ , sendo capaz de secretar ativamente potássio na escala média, e assim contribuir para a gênese do potencial endococlear (26).

O ligamento espiral, situado adjacente à cápsula ótica, é formado por células de tecido conjuntivo, células epiteliais, vasos sanguíneos e uma matriz extracelular. Esse ligamento promove o suporte para a estria vascular e para a membrana basilar. Na região superior e inferior, os fibroblastos estão em contato direto com a perilinfa das escalas vestibular e timpânica (25).

O gânglio espiral (GE) é formado por células bipolares. As células ganglionares tipo I são as mais numerosas e compreendem cerca de 95% de todas as células do GE. Elas apresentam um prolongamento central e outro prolongamento periférico. O corpo celular é rico em mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomas, microtúbulo e neurofilamentos. (25).

2.3 OTOTOXICIDADE E APOPTOSE CELULAR

Os aminoglicosídeos podem causar ototoxicidade, de acordo com Leggett (27), uma vez que se acumulam nos fluidos (perilinf e endolinf) do ouvido interno (28). A exposição prolongada das células cocleares aos aminoglicosídeos está aparentemente ligada à morte de células ciliadas externas no órgão de Corti e células ciliadas sensoriais, tipo I, no órgão vestibular, levando à perda permanente de células

ciliadas e dano vestibular. O dano às células ciliadas progride da base da cóclea (uma área para detecção de sons de alta frequência) até o ápice (uma área para detecção de sons de baixa frequência) (16). Isso é seguido por dano retrógrado ao nervo auditivo. O grau de danos às células ciliadas e perda auditiva é diretamente proporcional à dose da droga à qual as células ciliadas estão expostas.

A exposição repetida a aminoglicosídeos leva a um dano auditivo às células ciliadas e às estruturas adjacentes e, subsequentemente, à surdez. Além disso, os danos podem ser potencializados pela administração concomitante de diuréticos, como ácido etacrínico e furosemida, que por si próprios produzem perda auditiva reversível. Indivíduos com insuficiência renal são mais suscetíveis à ototoxicidade de aminoglicosídeos, devido à redução da excreção renal, que pode resultar em níveis séricos mais elevados e meia-vida prolongada. Isso pode levar ao aumento da exposição do ouvido interno a concentrações tóxicas de aminoglicosídeos, resultando em perda auditiva mais severa (29).

A toxicidade coclear pode ser definida como um dano que afeta o sistema auditivo e resulta em zumbido e/ou deficiência auditiva neurossensorial, enquanto a toxicidade vestibular é caracterizada por uma lesão no sistema vestibular e manifesta-se sob a forma de tonturas, vertigens e perda de equilíbrio (30).

A ototoxicidade assume particular relevância e preocupação na medida em que é geralmente irreversível e pode aparecer após o fim do tratamento. No entanto, o risco cumulativo aumenta com a exposição repetida. É importante ressaltar que não é comum existirem casos de nefrotoxicidade e ototoxicidade no mesmo paciente (27).

O efeito colateral da ototoxicidade dos aminoglicosídeos depende de diferentes fatores, como dosagem e duração do tratamento, tipo de medicamento aminoglicosídeo, fatores genéticos e condições farmacotécnicas (30).

O mecanismo exato pelo qual os aminoglicosídeos danificam o ouvido interno ainda não está totalmente esclarecido, todavia, há evidências que sugerem que o estresse oxidativo tem como consequência a apoptose e necrose das células ciliadas da cóclea e das células marginais da estria vascular do ducto coclear (30).

Embora algumas pessoas tratadas com aminoglicosídeos se queixem de perda auditiva, cerca de dois terços apresentam evidência de comprometimento audiográfico de alta frequência, acima da percepção normal da fala. De um modo geral, a incidência

de toxicidade coclear varia de 3% a 14%, sendo que estudos controlados mostram um aumento de três vezes na toxicidade audiométrica, após 9 dias do início do tratamento em indivíduos que receberam aminoglicosídeos durante, pelo menos, 4 dias, em comparação com pacientes tratados com antibióticos β -lactâmicos (27).

A incidência real é complexa de determinar, na toxicidade vestibular, pois a lesão é bilateral e primeiramente simétrica, as pistas visuais e proprioceptivas são compensatórias, tendo como resultado o fato de os pacientes sofrerem danos consideráveis antes do início dos sintomas ou de evidências clínicas. As queixas: náuseas, vômitos e desequilíbrios devem ser consideradas suspeitas, porém, o nistagmo deve ser evidente (27).

A hipofunção vestibular, como por exemplo o desequilíbrio e oscilopsia, que se caracteriza por perda de reflexo ocular vestibular, também podem ser consequências de um tratamento com aminoglicosídeos. Entretanto, a hipofunção vestibular pode ser temporária, contrariamente à perda auditiva (31).

O risco de ototoxicidade varia entre os aminoglicosídeos frequentemente usados nos tratamentos clínicos. Apesar disso, quando comparados aos agentes quimioterápicos, apresenta menores efeitos ototóxicos (27). Ainda assim, sabe-se que no que diz respeito à estreptomicina e à gentamicina a lesão predominante é a vestibular, enquanto que para a netilmicina, netilmicina e Amicacina a lesão é majoritariamente coclear, sendo que a tobramicina não tem atuação preferencial sobre qualquer um deles (29), uma vez que afeta ambas as funções de igual forma (32).

No caso de tratamento prolongado, superior a 10 dias, insuficiência renal ou hepática e exposição prévia a aminoglicosídeos são considerados como fatores de risco (27). Além disso, a suscetibilidade dos pacientes à ototoxicidade resultante de tratamentos com aminoglicosídeos depende ainda de fatores como a via de administração, sendo que a administração diretamente através da membrana timpânica manifesta uma ototoxicidade menos grave do que a administração sistêmica (31).

A recuperação funcional pode ocorrer em até metade dos pacientes após o fim da exposição aos aminoglicosídeos (27), tendo em conta que estes antibióticos são eliminados lentamente dos fluidos do ouvido interno. A semivida de eliminação aumentou até 30 dias, logo em seguida da aplicação de várias doses. Isso ocorreu

após se equacionar a utilização de outras drogas ototóxicas após a terapia com aminoglicosídeos (30).

A apoptose é um processo de morte celular programada, durante o qual o genoma é quebrado, a célula é fragmentada em pequenos pedaços, que são fagocitados por macrófagos e removidos sem que haja processo inflamatório (35). Nesse processo observa-se vários acontecimentos bioquímicos e a célula sofre alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que levam a uma morte individualizada sem afetar as células adjacentes, evitando uma resposta inflamatória. As células em apoptose são caracterizadas por uma agregação e marginalização da cromatina, diminuição do volume citoplasmático, condensação do núcleo e culmina com a fragmentação da célula em corpos apoptóticos que irão ser fagocitados por outras células (33, 34).

Existem duas vias principais que levam à apoptose nas células, a via extrínseca (ou via dos receptores de morte) e a via intrínseca (via mitocondrial) que vão ativar uma cascata de caspases, uma família de proteases de cisteína com especificidade para resíduos de ácido aspártico (33,34).

Na via extrínseca, a forma inativa da caspase iniciadora 8 encontra-se ligada aos receptores de morte presentes na membrana celular. Quando um estímulo apoptótico externo se liga aos receptores de morte, vai ocorrer a ativação da caspase 8 que por sua vez vai ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7 que vão levar à apoptose da célula (35, 36).

Na via intrínseca, estímulos apoptóticos internos vão influenciar a permeabilidade da mitocôndria celular levando à libertação de citocromo c. A presença de citocromo c no citoplasma vai ativar a caspase iniciadora 9 que por sua vez vai ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7 e levar a célula a entrar em apoptose. A ativação da caspase 8 na via extrínseca poderá ainda ativar a clivagem da Bid (uma proteína da família BCL2) que irá influenciar a permeabilidade da membrana mitocondrial recrutando, assim, também a ativação da via intrínseca (35, 36).

2.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

2.4.1 Emissões Otoacústicas

A detecção precoce dos sinais de ototoxicidade em animais é realizada por meio da pesquisa das emissões otoacústicas (37). As Emissões Otoacústicas Evocadas (EOA) são sons registrados no conduto auditivo externo, gerados pela atividade fisiológica dentro da cóclea (38), mais especificadamente pela atividade biomecânica não linear das células ciliadas externas do órgão de Corti (39).

Os primeiros conceitos teóricos que nos permitem entender as EOA datam de 1948 com os estudos de Thomas Gold, que publicou estudos sobre a função coclear, propondo o mecanismo ativo da cóclea, atribuindo-lhe um papel de amplificador mecânico. Kemp em 1978, demonstrou que a cóclea era capaz de produzir sons além de 130 dB (40). A captação da energia sonora produzida pela cóclea somente foi possível utilizando-se uma sonda inserida no meato acústico externo, com microfone e amplificador miniaturizados.

Kemp sugeriu que esses sons eram emitidos pelas células ciliadas externas (CCE) da cóclea, como um subproduto de processos de feedback mecânicos, ativos e não lineares, espontaneamente ou evocados por sons de baixa e média intensidades, podendo se manter estáveis, desde que não houvesse alterações cocleares, ou de orelha média. É um procedimento objetivo, não invasivo, rápido e aplicável em locais sem tratamento acústico (40).

As emissões otoacústicas tem origem pré-neural, ou seja, bloqueios do nervo, não afetam as emissões, também não são afetadas pela velocidade do estímulo. A latência é inversamente proporcional à frequência (frequências altas menor latência), a amplitude das EOAs decresce de maneira não linear. As emissões otoacústicas são vulneráveis a agentes que danificam provisória ou permanentemente a cóclea, tais como, drogas ototóxicas, ruídos intensos e hipóxia (41).

Para a realização do diagnóstico precoce da perda auditiva, as emissões otoacústicas (EOA) garantem maior especificidade e sensibilidade quando comparados a outras testagens que avaliam a função auditiva (41). Além disso, as EOA são consideradas um teste objetivo, de fácil aplicabilidade, e são úteis no diagnóstico diferencial da perda auditiva tipo neurosensorial. As respostas fornecidas

pelo teste com EOA podem apresentar alterações antes que sejam apontadas mudanças nos limiares auditivos (21).

Uma das formas de verificar os efeitos da ototoxicidade coclear pode ser através do exame das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção (EOAPD).

A importância da realização das EOAPD advém da possibilidade de verificar alterações de forma precoce. Na ocorrência de trauma acústico e em casos de ototoxicidade o desaparecimento das EOAPD é observado antes mesmo dos limiares auditivos ficarem comprometidos mostrando importante papel desse método diagnóstico na prática clínica (42).

A aplicabilidade das EOAs permite a realização do diagnóstico precoce da perda auditiva. As emissões otoacústicas (EOA) garantem maior especificidade e sensibilidade quando comparados a outras testagens que avaliam a função auditiva. São consideradas um teste objetivo, de fácil aplicabilidade, e são úteis no diagnóstico diferencial da perda auditiva do tipo neurosensorial (42).

O exame permite o monitoramento das células ciliadas externas (CCE). As respostas fornecidas pelo equipamento podem apresentar alterações antes que sejam apontadas mudanças nos limiares auditivos. Em virtude das EOAs serem uma medida fisiológica eletroacústica, as informações obtidas com esse exame são sobre parte do sistema auditivo devendo ser interpretadas como um teste de integridade da função coclear e não um teste de audição (42).

As Emissões Otoacústicas são classicamente divididas conforme ocorrem na ausência, ou não, de estimulação externa: respectivamente, as emissões otoacústicas espontâneas (EOAE) e as emissões otoacústicas estímulo frequência, as emissões otoacústicas transientes (EOAT) e produto de distorção (EOAPD) (37).

As EOAE foram descritas por Gold em suas observações sobre o funcionamento da cóclea onde observou que sons seriam gerados mesmo na ausência de estimulação. São sons de banda estreita, registrados no canal auditivo externo, registradas na ausência de estímulo acústico, podendo ser observadas em 50 a 70% da população auditivamente normal (43).

As EOAE podem ser afetadas por alterações de pressão da orelha média, onde ocorre um aumento da frequência e diminuição da amplitude, por estimulação por ruído contralateral ou a exposição a ruído intenso e /ou drogas ototóxicas (44).

As emissões otoacústicas transientes (EOAT) são respostas obtidas a partir de breve estimulação da cóclea, utilizando-se de cliques ou toneburst (37). As EOAT são registradas em 98% dos indivíduos com audição normal.

O registro da resposta é realizado colocando-se uma sonda no meato acústico externo que dispõe de um gerador de sinal-transdutor, microfone, amplificador, filtros e analisador da resposta no eixo do tempo (44).

A estimulação por cliques permite uma ampla estimulação da cóclea, cerca de 300 a 5000Hz. As respostas, às estimulações, são calculadas pelo tempo de latência em milissegundos. A estabilidade por um extenso período é uma das características da EOAT, também imprime uma assinatura única de cada indivíduo, proporcionando a monitoria da fisiologia coclear na exposição de elementos ototóxicos, químicos ou físicos (45).

Quando as EOATs se encontram presentes, as principais características ao se interpretar o exame são: reprodutibilidade e o nível da resposta ser maior que o ruído, na maioria das frequências (44).

Uma das formas de verificar os efeitos da ototoxicidade coclear pode ser através do exame das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção (EOAPD). A avaliação auditiva realizada por esse exame, analisa o funcionamento da orelha interna com grande especificidade, sendo apresentado dois tons puros (F1 e F2) com frequências sonoras próximas, que viajam pelo meato acústico externo, orelha média chegando até a cóclea, onde um terceiro tom puro é gerado nas células ciliadas externas.

Esse terceiro tom puro referido é o produto de distorção (PD) ou produto de intermodulação dos dois tons puros apresentados. Em experimentos para a avaliação funcional do aparelho auditivo em cobaias as EOAPD são bastante utilizadas por se tratar de um método de fácil execução, baixo custo e alta reprodutibilidade, apresentando boa correlação com a análise morfológica das células ciliadas externas cocleares (45).

O produto de distorção mais robusto ocorre em $2f_1-f_2$, quando $f_1/f_2=1,22$. As intensidades dos estímulos f_1 e f_2 são denominadas L1 e L2. O protocolo L1=65dBNPS e L2=55dBNPS parece ser o mais sensível na identificação das perdas auditivas. As EOAPD são consideradas presentes quando há relação sinal/ruído (SNR) de pelo menos 6 dBNPS (45).

Uma das grandes vantagens do uso da EOAPD é a possibilidade de avaliar frequências mais agudas, podendo variar, de acordo com o equipamento a 8, 12, 16 ou até 32kHz, enquanto as EOAT avaliam somente até 4-5kHz. Nos modelos experimentais, observam-se melhores respostas de EOAPD em frequências mais altas, a partir de 6kHz (45).

Na ocorrência de trauma acústico e em casos de ototoxicidade o desaparecimento das EOAPD é observado antes mesmo dos limiares auditivos ficarem comprometidos mostrando importante papel desse método diagnóstico na prática clínica (45).

Nas EOA para a monitorização das CCE, as Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção (EOAPD) são mais precisas quando comparadas as Emissões Otoacústicas Transientes (EOAT), uma vez que pequenas regiões lesadas podem ser representadas como respostas alteradas (Figura 5A e 5B) (37).

2.5 EXPERIMENTO COM ANIMAIS

2.5.1 Modelo SWISS e Ototoxicidade

Desde o século XIX, os camundongos foram introduzidos em pesquisas de laboratórios e se transformaram em importantes animais experimentais. Isso se deu por serem prolíferos, fáceis de cuidar, menos onerosos, e são animais de ciclo de vida curto. Esses animais têm algumas semelhanças fisiológicas com o organismo humano, por isso também seu uso em pesquisas é bem representativo, cerca de 20% dos animais usados em pesquisas são da classe de roedores (46).

O camundongo é o modelo experimental mais amplamente utilizado e compreendido pelos cientistas para testes laboratoriais com propósito de ensino e pesquisa biomédica. O camundongo heterogênico (*outbred*) é utilizado há décadas em pesquisas biomédicas. Apresenta excelente desempenho reprodutivo, com alta fertilidade, prolificidade e produtividade (46).

Os camundongos SWISS originaram-se nos USA a partir de uma colônia de nove camundongos trazidos para Lausanne, Suíça, em 1926 por Clara Lynch. Consistem em um grupo de animais não consanguíneos, poligâmicos com duração do estro de 4-5 dias e gestação de 19 a 20 dias com prole variando entre 10 e 12 filhotes com aproximadamente 1,5g de peso cada animal. Apresentam pelagem branca e têm extensas variações alélicas estimados em *locus* genéticos, dentro das três principais colônias SWISS de linhagens consanguíneas ou derivativas. São modelos com propósitos para estudos variados, como doenças metabólicas, autoimunes, fixação de complemento, tumores de mama e pulmão, testes de drogas, estudo de comportamento, são úteis como receptores de embriões de linhagens não albinas e também em diversos modelos experimentais, para avaliação da atividade farmacológica de extratos vegetais e de formas farmacêuticas (47).

Nas pesquisas em que são necessárias investigações acerca dos mecanismos fisiopatológicos de danos auditivos, esses animais são bastante úteis, pois a partir dos conhecimentos adquiridos nos experimentos animais, é possível translacionar para a espécie humana (47).

Nos humanos, a cóclea possui dois giros completos e três quartos de um novo giro, no camundongo SWISS a cóclea apresenta 2,5 voltas ao redor do modíolo com cerca de 5-6mm de comprimento, apresenta ducto coclear contendo endolinfa e

órgãos de Corti, escalas vestibular e timpânica com presença de endolinfa. As estruturas morfológicas, são bastantes similares às encontradas nos humanos; presença de membrana tectória, membrana de Reissner, estria vascular e órgão de Corti (48).

O camundongo SWISS no primeiro mês de vida apresenta barreiras vasculares menos desenvolvidas o que torna as pesquisas usando ototóxicos mais fidedignas quando utilizado os aminoglicosídeos mais cedo. O modelo murino SWISS apresenta uma alta taxa metabólica e isso faz com que os camundongos devem receber doses sistêmicas muito maiores de qualquer medicamento ototóxico ou terapêutico do que os dados a animais maiores.

Há poucos estudos que tratam da ototoxicidade da Amicacina em modelos animais conforme verificado na revisão de literatura , assim como controvérsias na dosagem que levam à ototoxicidade e a via de administração do aminoglicosídeo utilizado neste experimento.

As divergências dos estudos reforçam a necessidade de mais pesquisas dessa natureza, pois o modelo animal é utilizado rotineiramente devido a grande semelhança fisiológica com os seres humanos. O Quadro 2, traz um compilado dos estudos recentes que versam sobre o tema. (Pub-Med, 2021).

Quadro 01: Estudos publicados com Amicacina em camundongos**Estudos publicados com Amicacina em camundongos**

TÍTULO	ANO DE PUB.	REVISTA	AUTOR	DOSE	EXAME UTILIZADO	VIA UTILIZADA	ANIMAL	OBJETIVO	RESULTADO
Intravenously delivered aminoglycoside antibiotics, tobramycin and amikacin, are not ototoxic in mice. Antibióticos aminoglicosídeos administrados por via intravenosa, tobramicina e amicacina, não são ototóxicos em camundongos.	2019	Science Direct	Ogier JM ¹ , Lockhart PJ ² , Burt RA ³ .	Controle salino (n=10) 40 mg/kg de amicacina (n=10) 80 mg/kg de amicacina (n=5) 120 mg/kg de amicacina (n=10) 145 mg/kg de amicacina (n=5) 40 mg/kg de tobramicina (n=5)	PEATE	Intravenosa	C57BL/6	Desenvolver um modelo murino de ototoxicidade de aminoglicosídeo que refletisse a prática clínica e os resultados.	Administração intravenosa de tobramicina ou amicacina não são uma técnica eficaz para induzir ototoxicidade em camundongos
ORC-13661 protects sensory hair cells from aminoglycoside and cisplatin ototoxicity. ORC-13661 Protege as células ciliadas sensoriais da ototoxicidade de aminoglicosídeo e cisplatina.	2019	JCI Insight	Kitcher SR ¹ , Kirkwood NK ¹ , Camci ED ² , Wu P ^{2,3} , Gibson RM ² , Redila VA ² , Simon JA ⁴ , Rubel EW ² , Raible DW ^{2,3} , Richardson GP ¹ , Kros CJ ¹ .		PEATE	Cultura Coclear	Larvas de Peixe-zebra e camundongos CD-1 do tipo selvagem	Demonstrar, em larvas de peixe-zebra e em culturas cocleares de camundongos, que o ORC13661 fornece proteção robusta de células ciliadas contra ototoxicinas, Ags e cisplatina.	O ORC-13661 é um protetor promissor e versátil que bloqueia reversivelmente o canal transdutor mecanoelétrico (MET) das células ciliadas e opera em várias espécies de toxinas.
Vitamin C alleviates ototoxic effect caused by coadministration of amikacin and furosemide. A vitamina C alivia o efeito ototóxico causado pela administração concomitante de amicacina e furosemida	2019	Pharmacol Rep.	Zadrozniak M1, Szymanski M2, Luszczycki JJ3.	Vitamina C 500mg/kg/Amicacina 0,797mgkg/Furosemida 56,25mg/kg	PEATE	intraperitoneal	camundongos albinos swiss	O objetivo deste estudo foi descobrir se o ácido ascórbico (vitamina C) é capaz de reverter ou aliviar a ototoxicidade provocada pela administração sistêmica (ip) da combinação de amicacina e furosemida em camundongos suíços machos albinos experimentais.	A vitamina C alivia o prejuízo no limiar auditivo evocado pela administração ip combinada de amicacina e furosemida em camundongos, reduzindo os valores de TDD50 de 49,82 para 21,56 (p < 0,01). Em contraste, a vitamina C (500 mg / kg, ip) não teve efeito significativo nos valores de TDD20 para a combinação de amicacina e furosemida.
A novel mouse of aminoglycoside - Induced Hyperacusis and Tinnitus. Um novo modelo de camundongo de hiperacusia induzida por aminoglicosídeo e zumbido	2020	Front Neuroscience	Longenecker RJ, Gu, R, Homan J, Kil J.	Ebselen(SPI-1005)-20mg/kg diluído em 0,5ml de solução salina	PEATE	Subcutânea	CBA / Ca	Objetivo desse estudo foi apresentar um trabalho pioneiro em camundongos que demonstre que a amicacina pode levar a evidências comportamentais flutuantes de hiperacusia e zumbido, conforme avaliado pelo reflexo de sobressalto acústico	Amicacina causa mudanças moderadas de limiar flutuante na ausência de danos cocleares óbvios. Amicacina induz a hiperatividade e evidências comportamentais de hiperacusia e zumbido, que se correlacionam com o aumento da atividade do tronco cerebral

Fonte: Própria da autora, 2021

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a suscetibilidade do modelo Murino SWISS às lesões de CCE causadas em virtude do uso do aminoglicosídeo Amicacina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

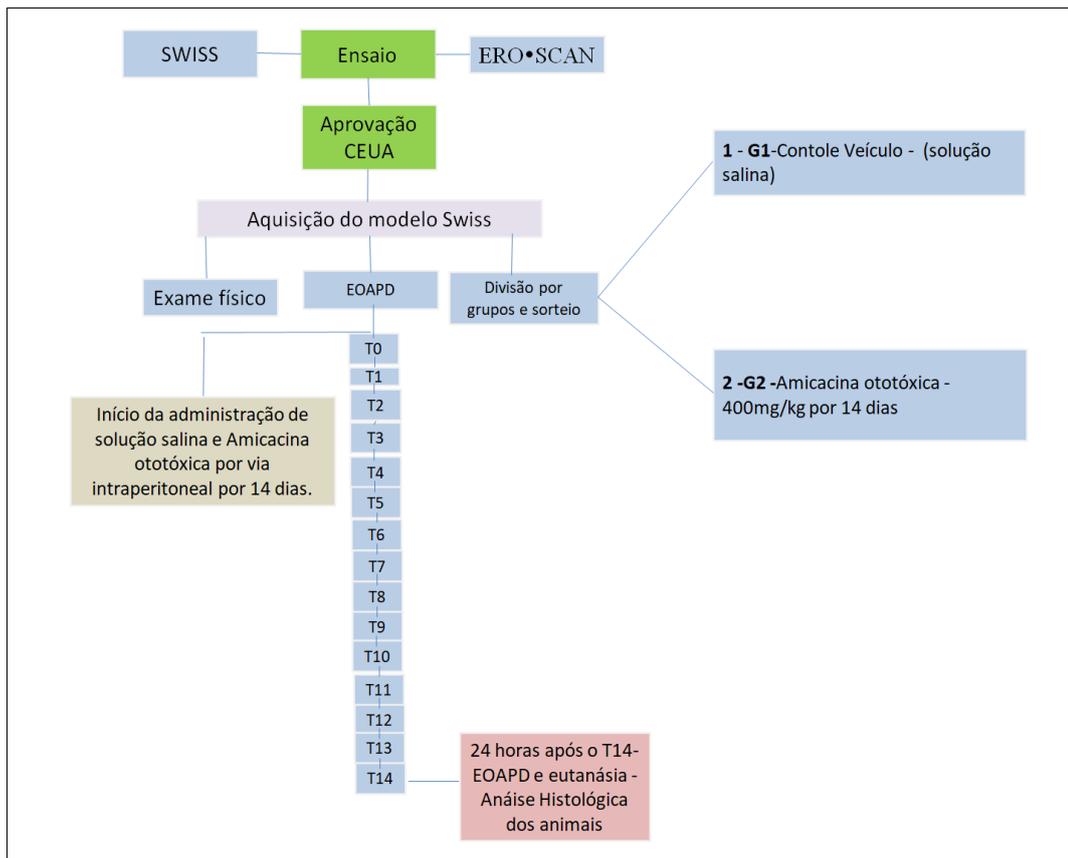
- Determinar os valores médios das amplitudes das EOAPD nas frequências de 6 a 12kHz.
- Estabelecer os valores médios da relação S/R das EOAPD nas frequências de 6 a 12kHz.
- Realizar estudo histopatológico do tecido coclear dos camundongos SWISS, submetidos ao uso de Amicacina na dose 400mg/kg/dia por 14 dias consecutivos.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

A figura 6 apresenta o fluxograma de realização do estudo experimental. Após aprovação do Comissão de Ética no uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UNB), deu-se o início à aquisição e aclimatação dos animais para posterior coleta de dados.

Figura 6: Fluxograma da Pesquisa:



Fonte: Própria da autora, 2021

4.2 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental, prospectivo e de intervenção, realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Otorrinolaringologia (LEO) em parceria com o Laboratório de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (NuPMIA-UNB).

4.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados neste estudo 20 roedores machos da linhagem SWISS, com a exclusão de 03 animais, por não apresentarem EOADP, foram utilizados 17 animais (34 cócleas). A opção por animais machos se deu pela apresentação de menores variações hormonais. Os roedores, com peso médio entre 20,89 gramas a 31,65 gramas, foram adquiridos no Biotério da Universidade Federal de Goiás (UFG) e enviados ao completarem 20 dias de vida, seguindo todos os protocolos de segurança de transporte animal.

4.4 PROCEDIMENTOS PARA A SELEÇÃO DOS GRUPOS

Os animais foram inicialmente submetidos a inspeção geral de saúde, além de otoscopia com objetivo de verificar a integridade da orelha média. O critério de inclusão de animais na amostra foi a presença de reflexo de Preyer (contração do pavilhão auricular frente ao estímulo acústico, utilizado instrumento agogô percutido em alta intensidade).

Em seguida foram submetidos à avaliação por Emissões Otoacústicas Evocadas por Produto de Distorção (EOAPD) no equipamento Ero-Scan. Para viabilizar a realização do exame de EOA, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Cloridrato de cetamina, fabricado pelo laboratório Syntec (65 mg/kg [50 mg/ml]) e Xilasina, fabricado também pelo laboratório Syntec, (6,5 mg/kg [20mg/ml]).

Após a realização do primeiro exame os animais foram sorteados e divididos em 2 grupos:

Grupo 1: Grupo Controle – composto de 4 animais (8 cócleas), ao qual foi administrado solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl), via intraperitoneal, 1 vez ao dia, por 14 dias consecutivos.

Grupo 2: Amicacina Ototóxica – composto por 13 animais (26 cócleas), ao qual foi administrado Amicacina na dose ototóxica de 400mg/kg, via intraperitoneal, 1 vez ao dia, por 14 dias consecutivos.

Os animais foram avaliados com exame de EOAPD nos seguintes tempos (T): T0 - realizado primeiro exame, T1 – início da administração da Amicacina (G2) e NaCl

(G1) e após 24 horas do T14 - tempo final de administração da Amicacina (G2) e NaCl (G1).

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos da pesquisa os animais que apresentaram alterações na otoscopia e parâmetros de ausência das EOAPD em alguma frequência estudada no primeiro exame, ausência do Reflexo de Preyer antes da administração da droga Amicacina. Do total de 20 animais foram excluídos no T0 3 animais, por apresentarem ausência nas EOPD em alguma frequência testada.

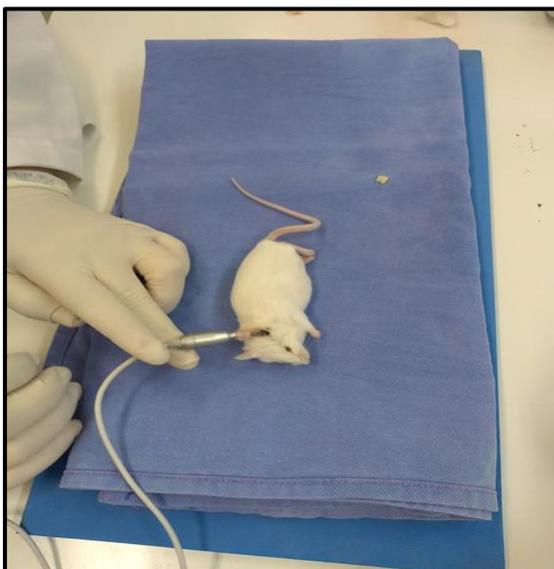
4.6 EXAMES DE EOAPD

Os animais foram avaliados com exame de EOAPD no T0(24 horas antes do início da medicação) e 24 horas após o T14 (último dia de uso da medicação).

Para viabilizar a realização do exame de EOA, os animais foram pesados e anestesiados com Cloridrato de cetamina (65 mg/kg [50 mg/ml]) e Xilasina (6,5 mg/kg [20mg/ml]). Após a administração da anestesia, foi realizado o exame em uma sala silenciosa com vistas à redução da interferência do ruído ambiental (medido através de decibelímetro modelo DEC-415 **Instrutherm**). (Figura 7).

Os exames foram realizados com equipamento de Emissões Otoacústicas **Ero-Scan**.

Figura 7: Pesquisadora realizando exame de EOAPD no camundongo SWISS.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

4.7 ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO

A administração da medicação foi realizada diariamente, **via intraperitoneal** por um período de 14 dias. A dosagem foi estabelecida pela curva de ganho ponderal de camundongos (48). Os animais do grupo controle (G1) receberam uma dose diária de 10mg/kg/dia de Cloreto de Sódio (NaCl) e os animais do grupo ototóxico (G2) receberam Sulfato de Amicacina (250mg/ml) na concentração de 400mg/kg/dia. O medicamento foi adquirido do Laboratório TEUTO, e foi diluído em NaCl, conforme orientação do fabricante.

A administração foi realizada pelas pesquisadoras diariamente dentro de sala do biotério, onde cada animal era colocado por vez em uma mesa, imobilizado manualmente e recebia o medicamento via intraperitoneal (Figura 8), realizado através de rodízio dos quadrantes peritoneais (Figura 9).

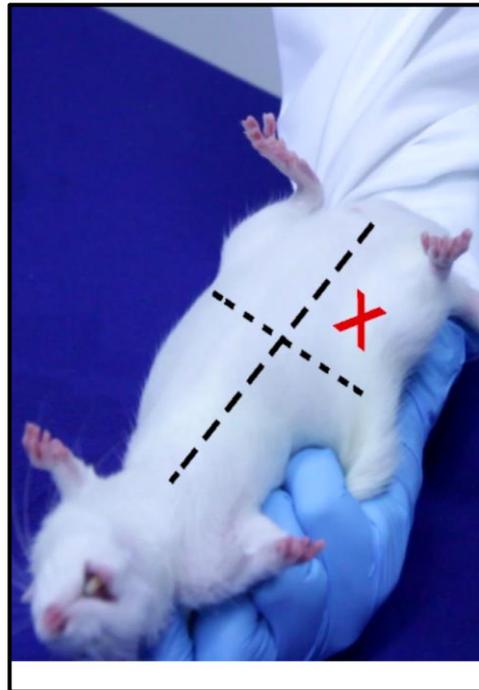
Materiais utilizados para administração da Amicacina e soro fisiológico nos animais: luvas de procedimento; seringa(1ml); agulha hipotérmica (calibre 22G); Amicacina; álcool etílico 70% (limpeza da área a ser administrada); algodão ou gaze. Em cada animal o volume do medicamento e do veículo era aplicado de acordo com o grupo a que pertencesse, conforme a curva de ganho de peso (Figura 10 e Apêndice A).

Figura 8: Pesquisadora administrando a medicação



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

Figura 9: Quadrantes da Aplicação da Amicacina



Fonte: bpeanimal.iq.usp.br (boas práticas em experimentação animal)
(<http://lattes.cnpq.br/6324887528915882>), 2019.

Figura 10: Curva de ganho de peso no camundongo



*Fonte: Fonte: Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, 2020

4.8 EUTANÁSIA

Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados. Para tanto, foram colocados em câmara com concentração de 40% de CO₂, resultando em morte pela depressão excessiva do Sistema Nervoso Central (SNC) e hipóxia, devido ao deslocamento do oxigênio durante a troca gasosa alveolar. O emprego desse método sobressai-se aos demais por ser rápido, indolor, de baixo custo e por manter os tecidos sem resíduos químicos.

4.9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a eutanásia, foi feita a injeção de fixador no sistema circulatório dos animais pela punção cardíaca e dissecação da cápsula ótica do osso temporal, decorridas 2 horas da fixação, (Figura 11A). Em seguida, os blocos ósseos foram descalcificados em solução ácido fórmico a 5% por 48 horas, seguida de lavagem em água corrente, (Figura 11B). Posteriormente, os espécimes foram desidratados em soluções com concentrações crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 3x 100%), diafanizados em xilol por 30 minutos (2 banhos), impregnados, (Figura 12), e emblocados em parablax a 60 graus (3 banhos), (Figura 13), e seccionados em secções de cinco (5) μ m de espessura e corados. Para o estudo histopatológico, as secções histológicas foram coradas com H&E para avaliar possíveis infiltrados

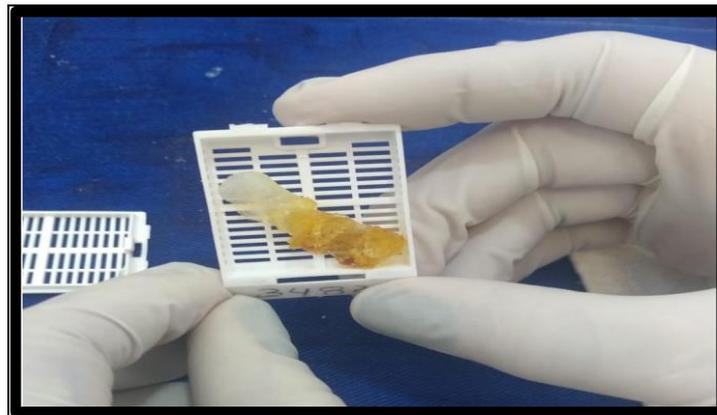
inflamatórios, com Tricromio de Gomori para avaliar a matriz extracelular do tecido conjuntivo. Depois de coradas as imagens foram capturadas com o equipamento AperioScanScope® e avaliadas no programa ImageScopeversion 11.2.0.780 (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA) por um único observador (200x, 400x e 1000x).

Figura 11A: Recipientes com as Bulas timpânicas do camundongo SWISS.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

Figura 11B: Bulas timpânicas do camundongo SWISS.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

Figura 12: Processamento Histológico das bulas timpânicas dos camundongos SWISS.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

Figura 13: Bulas emblocadas



Fonte: arquivo pessoal, 2021

4.10. OBTENÇÃO DOS DADOS HISTOLÓGICOS

Foram realizadas análises monocegas das lâminas escaneadas no equipamento AperioScanScope® e avaliadas no programa ImageScopeversion 11.2.0.780 (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA) por um único observador (200x, 400x e 1000x). Durante a análise foi considerado o critério de células viáveis presentes em cada imagem da lâmina, fracionadas pela área seleccionada (100 μ m²). Foram

realizadas análises morfométricas e histopatológicas das CCE e CCI, gânglio espiral, estria vascular, limbo ligamento espiral.

4.10.1 Procedimentos analíticos

O tamanho da amostra (n=20 animais) foi definido com base no cálculo realizado pelo CEUA-UNB cuja fórmula é a seguinte: $n=1 + [2C * (s/d)^2]$ $C=(z\alpha + z\beta)^2$. A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias, empregando-se o teste de Bartlett. Para comparações entre dois grupos com distribuição normal, foram usados o Teste t para os dados paramétricos ou Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Foram consideradas significativas, diferenças com $p < 0,05$. As análises foram realizadas empregando-se o programa GraphPad Prism 5.0® Software Package (GraphPad, USA, 2005).

As variáveis foram comparadas entre os grupos, quais sejam, a amplitude do sinal da DPOAEs, a relação S/R das DPOAEs e a quantidade de células viáveis: estruturas do gânglio espiral, ligamento espiral, estria vascular e limbo espiral. A hipótese nula (H_0) foi considerada quando a comparação entre as variáveis estudadas entre os grupos não apresentou diferença estatística, ou seja, $p > 0,05$. Nesta situação infere-se que aplicação da Amicacina não promoveu ototoxicidade. A hipótese alternativa neste estudo foi a de que a Amicacina promoveu ototoxicidade coclear na dose administrada $p < 0,05$.

4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade de Brasília (CEUA) com número de protocolo 63/2019 (Anexo 1).

Desde o início da fase experimental do estudo, os animais foram mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina, em gaiolas, com 3 ou 4 animais em cada uma, com enriquecimento ambiental (o enriquecimento fornecido incluiu papel picado e algodão), acesso a ração balanceada, água potável, temperatura ambiente

(25° C e 30°C), ciclos naturais de sono e vigília. Os animais foram manuseados conforme as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (49).

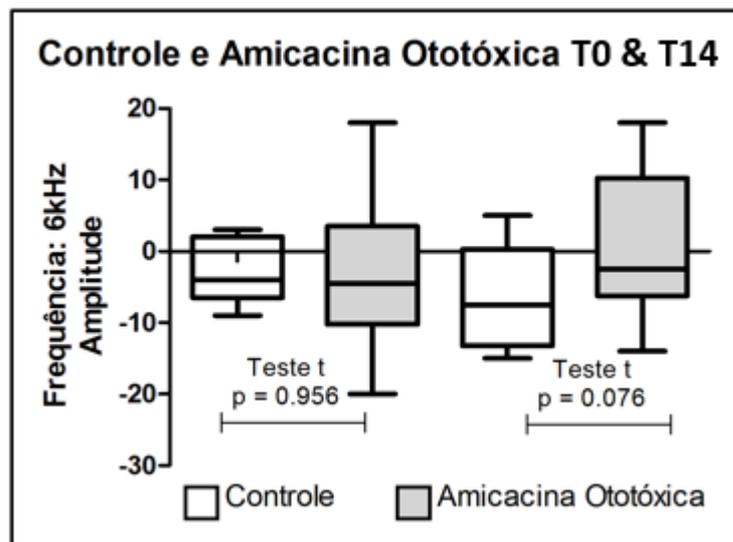
5 RESULTADOS

Completaram o experimento 17 animais (34 orelhas). Não foram verificadas diferenças entre as orelhas direitas e esquerdas dos animais do G 1 (Teste t, $p=0,956$) e do G 2 (Teste t, $p=0,076$). Desta forma as análises comparativas foram feitas levando-se em consideração o número de orelhas em cada grupo de estudo. O Reflexo de Preyer manteve-se presente nas avaliações pré e pós tratamento e também não foram observadas diferenças histológicas em ambos os grupos.

5.1 FREQUÊNCIA DE 6kHz

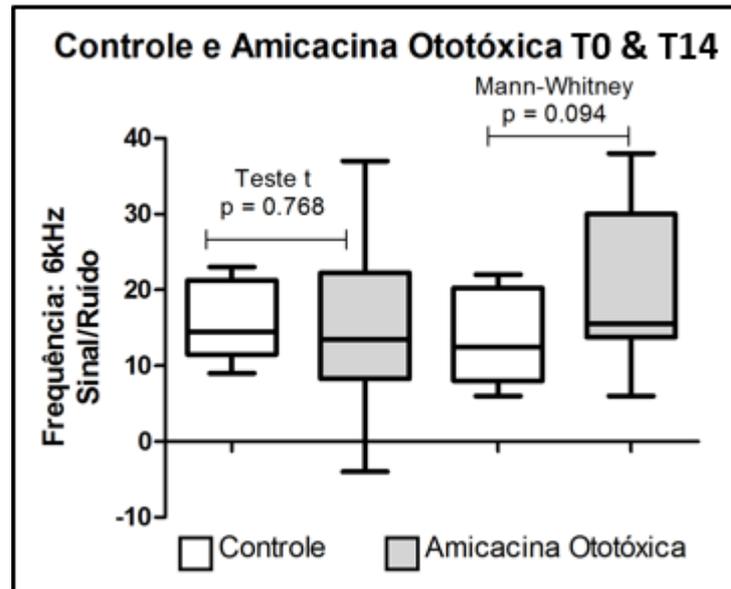
Na análise da amplitude na frequência de 6kHz não houve diferença entre as medianas do G1 e G2 no primeiro exame realizado T0 (-4.0 e -4.5, Teste t, $p = 0.956$), assim como no segundo exame realizado T14 (-7.5 e - .5, Teste t, $p = 0.076$) (Figura 14A).

Figura 14A: Boxplot da variação da amplitude do sinal na frequência de 6kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T0) e no décimo quarto dia (T14). Em branco, os valores referentes ao grupo controle e, em cinza, do grupo que fez uso de Amicacina ototóxica.



Os valores das análises da relação S/R na frequência de 6 kHz entre G1 e G2 no T0 (14.5 e 13.5, Teste t, $p = 0.768$) e no T14 (12.5 e 15.5, MW, $p = 0.094$) também não apresentaram diferenças entre os grupos, conforme pode ser observado na figura 14B.

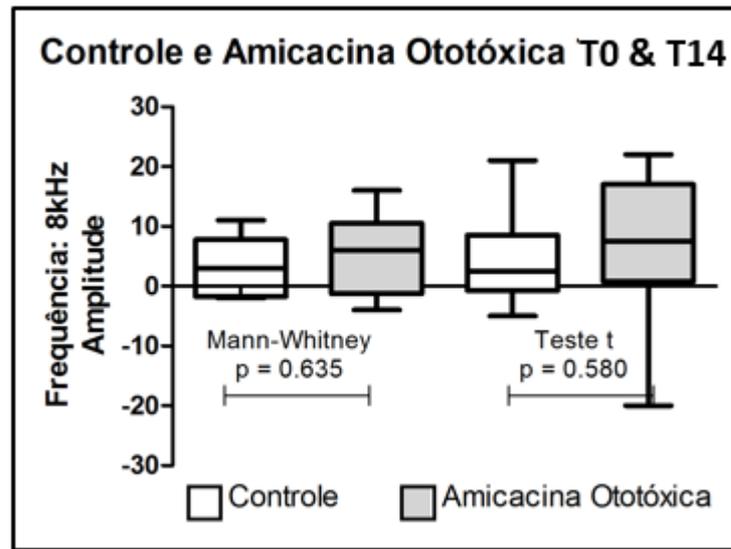
Figura 14B: Boxplot da variação da relação sinal/ruído na frequência de 6kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T0) e no décimo quarto dia (T14). Em branco, os valores referentes ao grupo controle e, em cinza, do grupo que fez uso de Amicacina ototóxica.



5.2 FREQUÊNCIA DE 8kHz

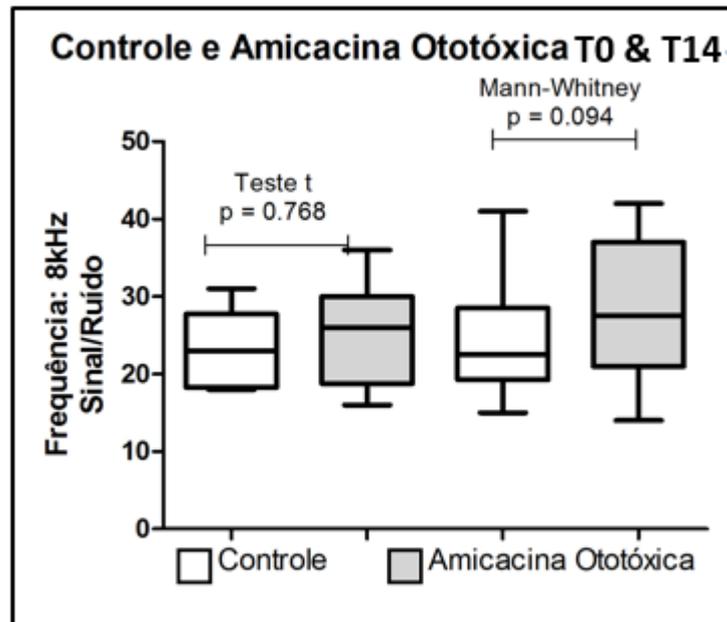
Não foram verificadas diferença entre as medianas dos grupos na análise da amplitude na frequência de 8kHz no primeiro exame realizado T0 (3.0 e 6.0, MW, $p = 0.638$), assim como no segundo exame realizado T14 (2.5 e 7.5, Teste t, $p = 0.580$). (Figura 15A)

Figura 15A: Boxplot da variação da amplitude do sinal na frequência de 8kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T0) e no décimo quarto dia (T14). Em branco, os valores referentes ao grupo controle e, em cinza, do grupo que fez uso de Amicacina ototóxica.



Os valores das análises da relação S/R na frequência de 8 kHz entre G1 e G2 no T0 (23.0 e 26.0, MW, $p = 0.676$) e no T14 (22.5 e 27.5, Teste t, $p = 0.349$) também não apresentaram diferenças entre os grupos. (Figura 15B)

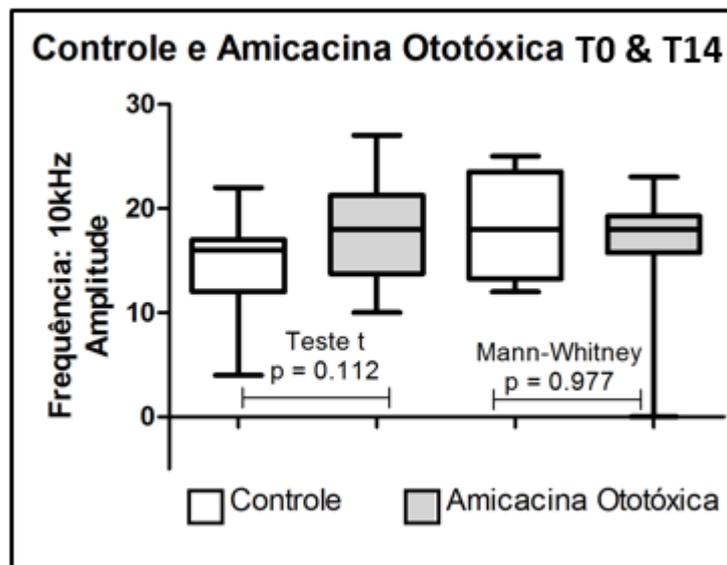
Figura 15B: Boxplot da variação da relação sinal/ruído na frequência de 8kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T0) e no décimo quarto dia (T14). Em branco, os valores referentes ao grupo controle e, em cinza, do grupo que fez uso de Amicacina ototóxica.



5.3 FREQUÊNCIA DE 10kHz

Não foram verificadas diferença entre as medianas dos grupos na análise da amplitude na frequência de 10kHz no primeiro exame realizado T0 (16.0 e 18.0, Teste t, $p = 0.112$), assim como no segundo exame realizado T14 (18.0 e 18.0, MW, $p = 0.977$). (Figura 16A).

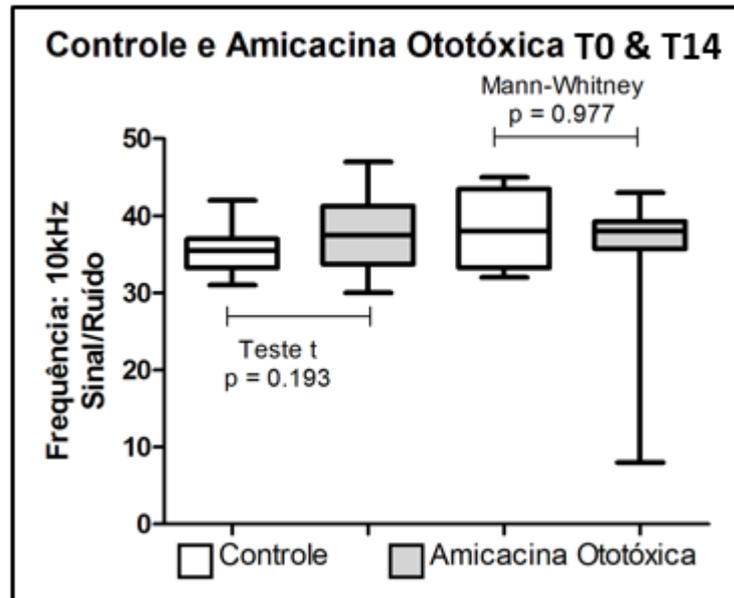
Figura 16A: Boxplot da variação da amplitude do sinal na frequência de 10kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T0) e no décimo quarto dia (T14). Em branco, os valores referentes ao grupo controle e, em cinza, do grupo que fez uso de Amicacina ototóxica



Fonte, própria do autor, 2021

Os valores das análises da relação S/R na frequência de 10 kHz entre G1 e G2 no T0 (35.50 e 37.5, Teste t, $p = 0.193$) e no T14 (38.0 e 38.0, MW, $p = 0.977$) também não apresentaram diferenças entre os grupos (Figura 16B)

Figura 16B: Boxplot da variação da relação sinal/ruído na frequência de 10kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T0) e no décimo quarto dia (T14). Em branco, os valores referentes ao grupo controle e, em cinza, do grupo que fez uso de Amicacina ototóxica.

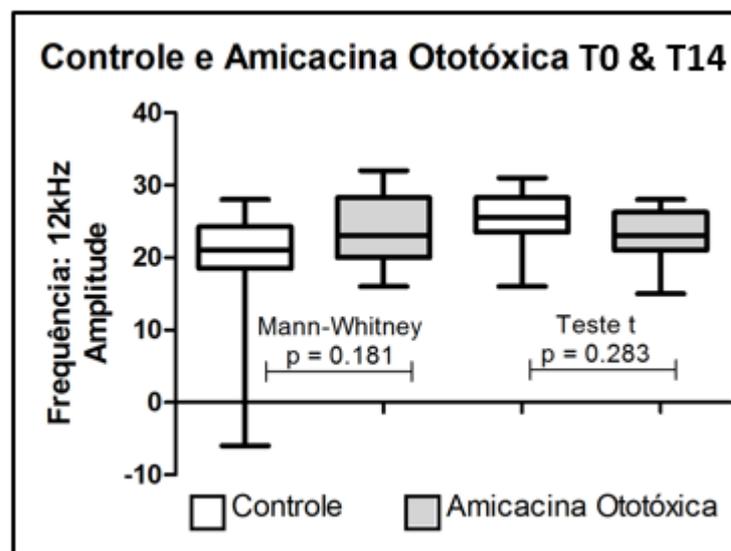


Fonte, Própria do autor, 2021

5.4 FREQUÊNCIA DE 12kHz

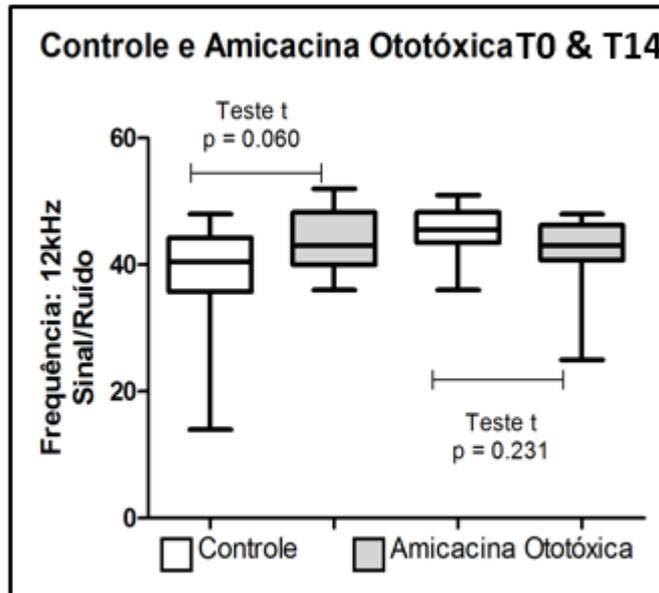
Assim como nas outras frequências analisadas, não foi verificada diferença entre as medianas dos grupos na análise da amplitude na frequência de 12kHz no primeiro exame realizado T0 (21.0 e 23.0, MW, $p = 0.181$), assim como no segundo exame realizado T14 (25.5 e 23.0, Teste t, $p = 0.283$). (Figura 17A)

Figura 17A: Boxplot da variação da amplitude do sinal na frequência de 12kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T0) e no décimo quarto dia (T14). Em branco, os valores referentes ao grupo controle e, em cinza, do grupo que fez uso de Amicacina ototóxica.



Os valores das análises da relação S/R na frequência de 12 kHz entre G1 e G2 no T0 (40.50 e 43.0, Teste t, $p = 0.060$) e no T14 (45.5 e 43.0, Teste t, $p = 0.231$) também não apresentaram diferenças entre os grupos (Figura 17B).

Figura 17B: Boxplot da variação da relação sinal/ruído na frequência de 12kHz em camundongos SWISS obtidas no primeiro (T0) e no décimo quarto dia (T14). Em branco, os valores referentes ao grupo controle e, em cinza, do grupo que fez uso de Amicacina ototóxica



Nas Tabelas 1 e 2 é possível verificar os valores das médias, medianas, desvio padrão, mínimo e máximo de cada grupo em cada tempo de exames:

Tabela 1. Mediana da variação de amplitude em camundongos *swiss*, no exame de emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) em grupo controle e tratado com amicacina ototóxica.

AMPLITUDE DO SINAL	T0			T14		
FREQUÊNCIA	CONTROLE Média ± DP Mediana (Min-Máx)	AMICACINA OTOTÓXICA Média ± DP Mediana (Min-Máx)	p	CONTROLE Média ± DP Mediana (Min-Máx)	AMICACINA OTOTÓXICA Média ± DP Mediana (Min-Máx)	p
6	-2.75 ± 4.528 -4.0 (-9.0 – 3.0)	-2.94 ± 9.36 -4.5 (-20.0 – 18.0)	0.956	-6.62 ± 7.15 -7.5 (-15.0 – 5.0)	0.33 ± 9.44 -2.5 (-14.0 – 18.0)	0.076
8	3.37 ± 5.37 3.0 (-2.0 – 11.0)	5.27 ± 6.65 6.0 (-4.0 – 16.0)	0.638	4.5 ± 8.03 2.5 (-5.0 – 21.0)	6.94 ± 11.06 7.50 (-20.0 – 22.0)	0.580
10	14.75 ± 5.28 16.0 (4.0 – 22.0)	18.06 ± 4.47 18.0 (10.0 – 27.0)	0.112	18.25 ± 5.03 18.0 (12.0 – 25.0)	17.28 ± 5.07 18.0 (0.0 – 23.0)	0.977
12	18.63 ± 10.42 21.0 (-6.0 – 28.0)	23.89 ± 4.84 23.0 (16.0 – 32.0)	0.181	25.13 ± 4.45 25.50 (16.0 – 31.0)	23.33 ± 3.56 23.0 (15.0 – 28.0)	0.283

Não foi verificada significância estatística nas frequências testadas

Tabela 2. Mediana da variação de relação sinal ruído em camundongos *swiss*, no exame de emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) em grupo controle e tratado com amicacina ototóxica.

SINAL RÚIDO	T0			T14		
FREQUÊNCIA	CONTROLE Média ± DP Mediana (Min-Máx)	AMICACINA OTOTÓXICA Média ± DP Mediana (Min-Máx)	p	CONTROLE Média ± DP Mediana (Min-Máx)	AMICACINA OTOTÓXICA Média ± DP Mediana (Min-Máx)	p
6	15.75 ± 5.09 14.5 (9.0 – 23.0)	14.56 ± 10.71 13.50 (-4.0 – 37.0)	0.768	13.25 ± 6.15 12.50 (6.0 – 22.0)	19.44 ± 9.35 15.50 (6.0 – 38.0)	0.094
8	23.38 ± 5.37 23.0 (18.0 – 31.0)	25.0 ± 6.32 26.0 (16.0 – 36.0)	0.676	24.50 ± 8.03 22.50 (15.0 – 41.0)	28.06 ± 9.04 27.50 (14.0 – 42.0)	0.349
10	35.63 ± 3.29 35.50 (31.0 – 42.0)	38.0 ± 4.48 37.50 (30.0 – 47.0)	0.193	38.25 ± 5.03 38.0 (32.0 – 45.0)	36.61 ± 7.62 38.0 (8.0 – 43.0)	0.977
12	37.88 ± 10.44 40.50 (14.0 – 48.0)	43.89 ± 4.84 43.0 (36.0 – 52.0)	0.060	45.13 ± 4.45 45.50 (36.0 – 51.0)	42.39 ± 5.53 43.0 (25.0 – 48.0)	0.231

Não foi verificada significância estatística nas frequências testadas

5.5 AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA CÓCLEA

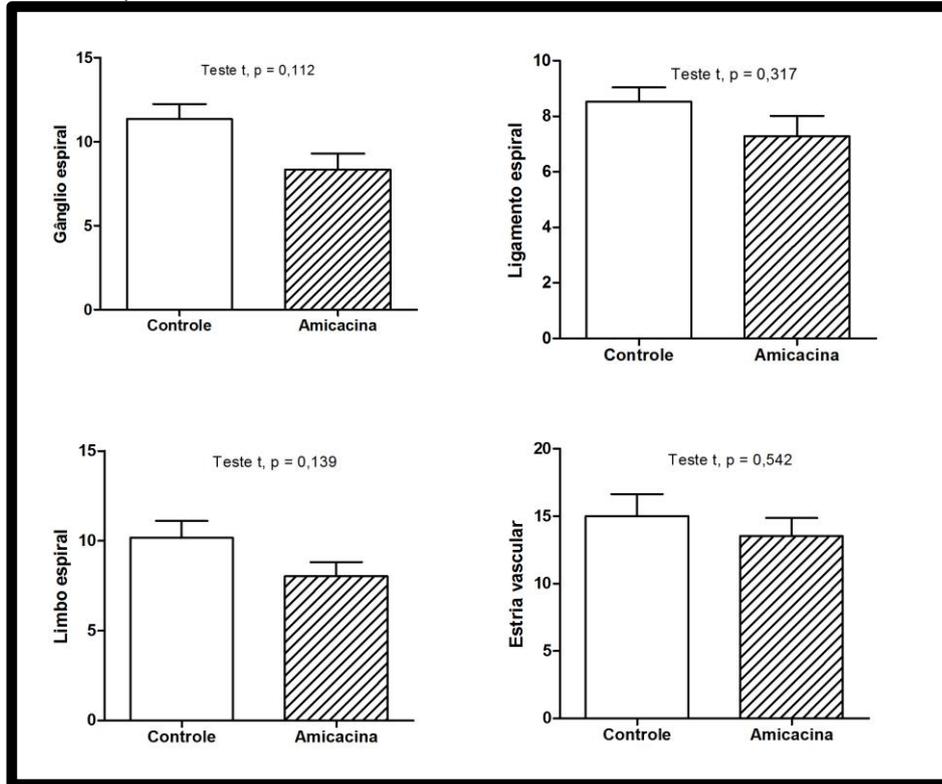
Neste estudo foram realizadas análises morfométricas e histopatológicas das diferentes estruturas que compõem a cóclea (gânglio espiral, estria vascular, ligamento espiral e limbo espiral).

Para a quantificação das células viáveis delimitou-se as áreas nas secções histológicas do gânglio espiral, estria vascular, ligamento e limbo espiral para cada animal e, depois de quantificadas as células, os resultados foram normalizados para as comparações (células/1000 μm^2).

Os resultados mostraram que no total de células viáveis nas regiões do gânglio espiral, estria vascular, ligamento e limbo espiral, não houve diferenças entre os grupos (Figura 18).

As células ciliadas internas e externas não foram possíveis de serem analisadas em virtude da dificuldade de contagem com H&E. No gânglio espiral, no G1, a mediana do total de neurônios ganglionares viáveis foi de 11,65 céls/100 μm^2 e no G2 o valor encontrado foi de 9,44 céls/100 μm^2 (Teste-t = 0,112). No ligamento espiral no G1, a mediana do total de neurônios viáveis foi de 8,70 céls/100 μm^2 e no G2 o valor encontrado foi de 7,22 céls/100 μm^2 (Teste-t = 0,317). No limbo espiral no G1, a mediana do total de neurônios viáveis foi de 10,0 céls/100 μm^2 e no G2 o valor encontrado foi de 8,74 céls/100 μm^2 (Teste-t = 0,139). Na estria Vascular no G1, a mediana do total de neurônios viáveis foi de 16,90 céls/100 μm^2 e no G2 o valor encontrado foi de 13,69 céls/100 μm^2 (Teste-t = 0,542). (Tabela 3).

Figura 18. Total de células viáveis nas diferentes regiões da cóclea de camundongos SWISS do G1 (n = 4) e no G2(n = 13). Os resultados mostraram que o total de células viáveis nas regiões do gânglio espiral, estria vascular, ligamento e limbo espiral, não houve diferenças entre os grupos ($p < 0,05$ não houve diferenças entre os grupos para as demais regiões da cóclea ($p < 0,05$). Estão mostrados as médias e os desvios padrão



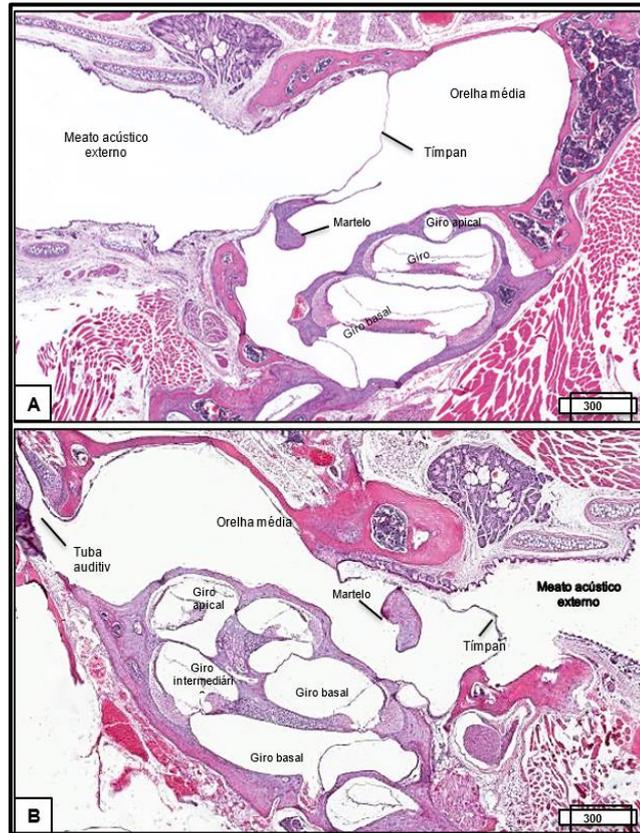
A Tabela 3 representa os valores de mínimo/máximo, desvio padrão, média e mediana da análise histológica.

Tabela 3- Análise histológica em camundongos SWISS, no G1: grupo controle e tratado com Amicacina ototóxica.

ESTRUTURA	CONTROLE <i>Média ± DP</i> <i>Mediana</i> <i>(Min-Máx)</i>	AMICACINA OTOTÓXICA <i>Média ±</i> <i>DP</i> <i>Mediana</i> <i>(Min-Máx)</i>	p
Gânglio espiral	11.35 ± 1.79 11.65 (8.9 – 13.20)	8.33 ± 3.35 9.44 (1.73 – 12.05)	0,112
Ligamento espiral	8.52 ± 1.15 8.7 (7.2 – 10.10)	7.28 ± 2.52 7.22 (2.25 – 11.08)	0,317
Estria Vascular	15.0 ± 3.65 16.90 (10.60 – 18.40)	13.53 ± 4.68 13.69 (6.24 – 20.61)	0,542
Limbo	10.16 ± 2.10 10.0 (7.30 – 13.0)	8.03 ± 2.71 8.74 (3.96 – 13.27)	0,139

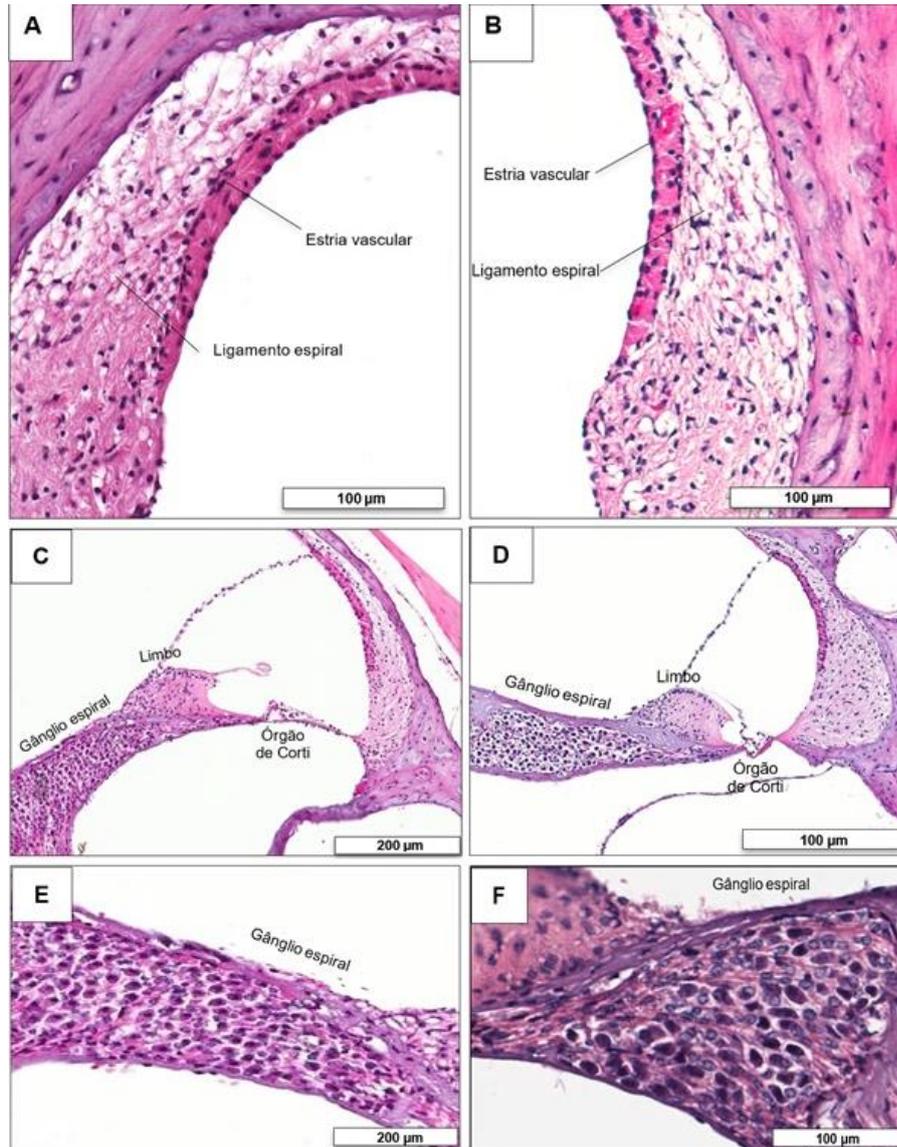
A avaliação topográfica mostrou que em ambos os grupos, G1 e G2, os componentes da orelha externa, média e interna eram normais. Especialmente a avaliação detalhada da cóclea mostrou que os giros basal, intermediário e apical estavam preservados (Figura 19 A,B) , assim como os tecidos relacionados ao órgão da audição – gânglio e limbo espiral, ligamento e estria vascular, órgão de Corti, membrana de Reissner (Figura 20). As análises morfométricas semiquantitativas mostraram que o total de células/1000 no gânglio espiral, estria vascular, ligamento espiral (A e B) e limbo (C1, D1), não diferiram entre os grupos. Coloração H&E.

Figura 19 A e B. Fotomicrografia da orelha mostrando a topografia de parte da orelha externa, da orelha média e da cóclea de um camundongo do G1 (A) e o G2(B). A avaliação topográfica das cócleas não mostrou diferenças entre os grupos, estando preservadas as estruturas do órgão vestibulococlear. Coloração H&E.



Fonte, Autora, 2021

Figura 20. Fotomicrografias do órgão vestibulococlear de camundongos do G1(A, C e E) e G2 (B, D e F).



Fonte, Autora 2021

6 DISCUSSÃO

Embora os aminoglicosídeos apresentem alto potencial nefrotóxico e ototóxico, o seu uso, muitas vezes, é imprescindível para o sucesso do tratamento clínico dos indivíduos. No que se refere a ototoxicidade da Amicacina, este estudo não verificou esse efeito nos camundongos SWISS na dose 400mg/kg/dia na via intraperitoneal.

Diferentes doses e meios de administração são utilizados para atingir efeitos ototóxicos em roedores. O meio de administração usado neste estudo foi o intraperitoneal (IP). Na literatura, pesquisas acerca das vias de administração de drogas como a Amicacina em camundongos são variadas no âmbito experimental. A via intraperitoneal, apesar do risco de peritonite, é a mais utilizada pela equipe de veterinários no alojamento de animais da FM/UNB. Outras vias podem ser utilizadas, como a intramuscular, subcutânea, venosa e a arterial. No que se refere a dose ofertada, algumas pesquisas utilizaram 500mg/kg/dia (50), porém, neste estudo optou-se pela dose de 400mg/kg/dia para assegurar o bem estar dos animais e ainda o efeito ototóxico da droga.

Neste estudo foram realizadas análises de EOAPD nas frequências a partir de 6kHz pois em camundongos as respostas de EOAPD são mais robustas a partir dessa frequência. Estudos anteriores os autores também optaram pela EOAPD a partir da frequência de 6kHz (37,45). A dimensão do CAE dos camundongos faz com que as respostas encontradas em frequências inferiores coincidam com respostas do ruído interno do animal e do ruído do ambiente.

No tocante ao ruído ambiental foram realizadas mensurações desses níveis no alojamento de animais da FM/UNB e, a partir disso, foi possível verificar que os níveis de ruído estão dentro do preconizado pela Resolução normativa nº 15 das normas do CONCEA para biotérios. Considerando que esses animais são utilizados em pesquisas auditivas, o controle rigoroso do ruído nesse ambiente é imprescindível para não lançar dúvidas e invalidar os resultados gerados (50).

Um estudo acerca da resistência aos aminoglicosídeos tobramicina (40mg/kg) e Amicacina (120mg/kg) utilizando injeções intravenosas (IV) diárias durante o período de 2 semanas de tratamento em camundongos C57BL/6J não induziu perda auditiva

significativa nas altas frequências, resultado que corrobora com o do presente estudo, embora os exames utilizados fossem diferentes. É necessário ressaltar que a dose utilizada da Amicacina no estudo com camundongos C57BL/6J configura uma dose ototóxica do fármaco na via utilizada, de acordo com outros achados da literatura (50).

Estudo realizado com 30 camundongos CBA/Ca demonstrou que a Amicacina na dosagem de 500mg/kg/dia via subcutânea administrada por 14 dias consecutivos levou a evidências comportamentais flutuantes de hiperacusia e zumbido, avaliado pelo reflexo de sobressalto acústico (54).

A audição e o comportamento desses animais foram rastreados por 14 semanas. Foram realizadas avaliações eletrofisiológicas que demonstraram aumento da atividade central do tronco encefálico auditivo através de mudanças dos limiares e amplitudes das ondas do PEATE (potencial evocado auditivo de tronco encefálico), porém, essas alterações foram consideradas pelos autores como moderadas e temporárias, uma vez que flutuavam ao longo de 3 a 4 meses (54).

Esses dados em conjunto sugeriram que a disfunção auditiva periférica levou a hiperatividade central e possíveis manifestações comportamentais de hiperacusia e zumbido, porém, a porcentagem de orelhas que mostraram perda auditiva clinicamente relevante foi mínima e concentrada nos primeiros 14 dias, diminuindo gradualmente para perto de níveis basais na semana 14 (54).

Embora a metodologia de avaliação utilizada tenha sido diferente daquela realizada no presente estudo, os resultados alcançados foram semelhantes, uma vez que cepas diferentes apresentaram resultados semelhantes, não tendo sido verificada alteração auditiva em função do uso do aminoglicosídeo (51).

Um estudo prospectivo, avaliou os efeitos ototóxicos em pacientes recebendo Amicacina gentamicina, netilmicina e tobramicina, encontrando uma incidência de 11% para Amicacina, 12,9% para gentamicina, 11,5 para netilmicina e 2% para tobramicina (52).

Esses e outros estudos demonstram a grande variabilidade da ototoxicidade desses fármacos (53). No que se refere às avaliações de EOA realizadas em animais

submetidos a uso de aminoglicosídeos, essa forma de avaliação das células ciliadas externas da cóclea seja a mais adequada, as EOAPD são consideradas um método de fácil execução, baixo custo e alta reprodutibilidade, apresentando boa correlação com a análise morfológica das células ciliadas externas cocleares (40).

As EOAPD foram utilizadas na avaliação da resistência a Amicacina em cobaias albinas (*Cavia porcellus*). No estudo foram ofertadas doses com intervalos de 30 a 60 dias, as doses protetoras foram de 20mg/kg/dia via intramuscular por 30 dias antes da oferta da dose ototóxica de 400mg/kg/dia por 12 dias. A Amicacina apresentou efeito otoprotetor coclear contra a dosagem lesiva do mesmo aminoglicosídeo por período de tempo de 30 a 60 dias, constatado por meio dos exames de EOAPD e microscopia eletrônica de varredura (54).

Outro estudo que também avaliou a cóclea com uso de EOAPD foi realizado com 31 cobaias machos, que fizeram uso de gentamicina 10mg/kg/dia e Amicacina 400mg/kg/dia, isoladamente e associadas, via intramuscular por 12, 30 e 42 dias (12). Os resultados da avaliação funcional com EOAPD e MEV demonstraram que a gentamicina em doses não lesivas, na forma de habituação, não protegeu as células ciliadas internas da orelha interna dessas cobaias contra a ototoxicidade da Amicacina, apresentando queda nos valores das EOAPD (12). Como observado, os resultados são extremamente variáveis e neste sentido projetamos o presente estudo neste modelo de camundongo, uma vez que os dados da literatura são insuficientes para que seja evidenciada a susceptibilidade deste modelo animal aos efeitos ototóxicos da Amicacina.

Neste experimento foi realizada análise histológica nas estruturas da orelha interna. Assim como no exame funcional, não foram verificadas alterações quando comparados os G1 e G2. No órgão de Corti não foram realizadas análise quantitativas em virtude da metodologia empregada não permitir esse nível de análise. Na avaliação qualitativa ambos os grupos mantinham as estruturas preservadas. Nos seres humanos e em alguns roedores, como por exemplo os *wistar*, os aminoglicosídeos causam perda auditiva por induzir a degeneração das células ciliadas sensoriais (12).

O aminoglicosídeo é inicialmente transportado através da barreira hemato-labiríntica para entrar nos compartimentos da orelha interna preenchidos com endolinfa (54). Em seguida esses fármacos atravessam os canais mecanotransdutores ou outros canais de cátions para entrar nas células ciliadas internas, resultando na morte celular como resultado da geração de espécies reativas de oxigênio. O modelo de camundongo utilizado neste estudo apresenta alta taxa metabólica até o final do primeiro mês de vida, uma vez que as barreiras vasculares não estão totalmente desenvolvidas, o que pode torná-los suscetíveis à ototoxicidade causada pela Amicacina nesse momento (55,56). Após esse período essa taxa metabólica se normaliza e o animal passa então a apresentar resistência à ototoxicidade causada pelos aminoglicosídeos. O presente estudo foi iniciado quando os animais estavam próximo a completar 1 mês de vida, o que pode ser uma hipótese para explicar o fato de não ter ocorrido a ototoxicidade. Não foram observados declínios dos parâmetros das EOAPD, o Reflexo de Preyer manteve-se presente nas avaliações pré e pós tratamento, não foram observadas alterações histológicas em ambos os grupos.

Estudos sugerem que os aminoglicosídeos podem induzir ROS citoplasmático em células ciliadas externas, interrompendo a homeostase do cálcio entre o retículo endoplasmático e as mitocôndrias (57). O aminoglicosídeo aumentaria o fluxo de cálcio na mitocôndria, levando a aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial, liberação de cálcio, bem como aumento da produção e liberação de EROS no citoplasma, com consequente dano e morte a CCE (58). A alta taxa metabólica do camundongo SWISS e a rápida eliminação da droga evitam que os níveis séricos atinjam os níveis ototóxicos (59).

Já foi demonstrado que para acessar a superfície das células ciliadas os aminoglicosídeos devem primeiro passar pela barreira do labirinto sanguíneo, que é composta por uma rede capilar altamente especializada na estria vascular (60). Estudos utilizando aminoglicosídeos marcados com fluorescência também destacaram a importância da rede capilar estria e células marginais como um ponto de entrada para aminoglicosídeos. A barreira sangue-endolinfa dentro da estria vascular é uma das mais fortes barreiras tecido-sangue em mamíferos. No entanto, os componentes intrínsecos do tecido podem alterar a integridade dessa barreira (61).

Não podemos afirmar se ocorreu resistência do animal ao aminoglicosídeo Amicacina ou se a droga não conseguiu penetrar nesta resistente barreira sangue-endolinfa do modelo Murino SWISS. Nas análises deste estudo demonstramos que funções das CCE registradas pelas EOAPD e as análises histológicas das estruturas da orelha interna não sofreram alterações.

As células ciliadas externas são mais susceptíveis à morte do que as células ciliadas internas (62). Em estudos realizados com uso de aminoglicosídeos o padrão observado de morte das células ciliadas externas tem início na extremidade basal da alta frequência e progride em direção ao ápice coclear, onde as frequências mais baixas são codificadas. A entrada dos aminoglicosídeos nas células ciliadas é predominantemente por meio dos canais do transdutor mecanoelétrico (MET) localizado nas pontas dos estereocílios. Os canais de MET atuam diretamente como válvulas unilaterais, prendendo os aminoglicosídeos no interior das células, com rápido acúmulo dessa substância, desencadeando uma cadeia de eventos resultando na morte de células ciliadas. No modelo de animal estudado as frequências testadas nas EOAPD não sofreram alterações, e as estruturas topográficas da cóclea e tecidos estudados na avaliação histológica estavam preservadas (62).

A audição nos seres humanos é considerada como “precoce”, uma vez que o desenvolvimento da capacidade de ouvir começa no útero. Já nos camundongos o desenvolvimento coclear e a capacidade de ouvir ocorrem no período pós-natal e o canal auditivo não abre até a segunda semana de vida. Desta forma, quando se desejar translacionar resultados que ocorrem em recém-nascidos humanos, candidatos ao uso de Amicacinas nas UTIs neonatais, nos deparamos com a limitação da escolha do modelo animal.

Um desafio para quem estuda lesão causada por aminoglicosídeos pré-clinicamente é a seleção do modelo animal. As diretrizes de conversão de humano para o camundongo com base na área de superfície corporal, sugerem que uma dose humana deve ser multiplicada por 12,3 para atingir uma dose equivalente no camundongo. No entanto, tais conversões permanecem controversas e altas doses de aminoglicosídeos foram imediatamente letais nos camundongos ao longo da trajetória dos estudos com modelos animais (63).

Essas respostas imediatas com risco de vida em virtude do uso dos aminoglicosídeos raramente acontecem na espécie humana, podendo indicar que essa espécie têm uma capacidade intrínseca de tolerar aminoglicosídeos sistêmicos quando comparados aos camundongos, e como resultado, apenas tecidos suscetíveis, como o rim e o ouvido são danificados. No que se refere a dose ofertada, algumas pesquisas utilizaram 500mg/kg/dia, porém neste estudo, optou-se pela dose de 400mg/kg/dia para assegurar o bem-estar dos animais e ainda o efeito ototóxico da droga (12).

As análises morfométricas e histopatológicas das diferentes estruturas que compõem a cóclea (gânglio espiral, estria vascular, ligamento espiral e limbo espiral) não mostraram diferenças entre os grupos. Isso demonstra que houve preservação da morfoestrutura da orelha interna mesmo nos animais que fizeram uso da Amicacina. Apesar de não ter sido possível realizar a contagem das células ciliadas internas e externas, a avaliação detalhada da cóclea mostrou que os giros basal, intermediário e apical estavam preservados em ambos os grupos. Tais avaliações corroboram com os dados funcionais, obtidos por meio da EOAPD (64).

Qualquer estudo em camundongo de toxicidade de drogas ou valor terapêutico deve ser realizado em mais de uma cepa consanguínea. Uma limitação do nosso estudo foi o fechamento do Biotério de UNB por causa da pandemia do Coronavírus em 2020, inviabilizando estudo com outra cepa de camundongo para fins comparativos.

As pesquisas realizadas com animais preenchem lacunas da genômica humana e agregam grande aprendizado para o desenvolvimento de diagnósticos, tratamentos e prevenção, contribuindo para a qualidade de vida da população. Até o momento não existe nenhum medicamento aprovado disponível para a prevenção e tratamento da perda auditiva. O inconveniente social da perda auditiva não tratada nos dias atuais recebe um maior reconhecimento, pois a perda auditiva está associada a maiores riscos de ansiedade, isolamento social e declínio cognitivo. Sendo assim a busca de modelos que possam ser translacionadas para a espécie humana é uma constante. Por outro lado, o entendimento dos mecanismos que tornaram esta espécie

resistente ao desenvolvimento da ototoxicidade pode ajudar no entendimento para o tratamento e prevenção desta situação na espécie humana.

Este estudo demonstrou que a linhagem de camundongo SWISS apresentou resistência à ototoxicidade causada pela Amicacina na dose de 400mg/kg/dia via intraperitoneal. Estudos futuros envolvendo avaliações farmacocinéticas e farmacodinâmicas da Amicacina, assim como o conhecimento dos mecanismos otoprotetores intrínsecos do camundongo SWISS podem colaborar para o desenvolvimento de bases clínicas e de estratégias futuras de ototoxicidade e otoproteção na espécie humana.

Novos estudos comparativos com linhagens diversas devem ser realizados a fim de tentar elucidar as diferenças entre as linhagens que faz com que alguns animais sejam resistentes e outros susceptíveis.

7 CONCLUSÃO

O modelo Murino SWISS não demonstrou susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões de CCE vistas pela avaliação da EOAPD e demais estruturas cocleares causadas em virtude do aminoglicosídeo Amicacina na dosagem de 400mg/kg/dia por 14 dias via intraperitoneal.

Os valores médios dos amplitudes do sinal e da relação S/R das EOAPD nas frequências de 6 a 12kHz e a avaliação morfológica-qualitativa e semiquantitativa não diferiram entre os grupos no início e o fim do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 World Health Organization. **Deafness and hearing loss**. June, 2018. (acesso em: 10/12/2019). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>
- 2 Allegnert, K.; Anderson, B.J. **Interindividual variability of aminoglycoside pharmacokinetics in preterm neonats at birth**. Eur J Clin Pharmacol. 2006 Dec;62(12):1011-2. doi: 10.1007/s00228-006-0204-1. Epub 2006 Sep 28. PMID: 17006675.
- 3 Touw, D.J.; Wezterman, E.M.; Sprij, A.J.: **Therapeutic drug monitoring of aminoglycoside in neonates**. Clin Pharmacokinet. 2009;48(2):71-88. Review. Erratum in: Clin Pharmacokinet. 2009;48(3):209-10.
- 4 Vohn, B.R.; Widen, J.E.; Cone-Wesson, B.; Sininger, Y.S.; Gorga, M.P.; Folsom, R.C.; Norton, S.J.; **Identification of neonatal Hearing impairment: characteristics of infants in the neonatal intensive care unit well-baby nursery**. Ear Hear 2000;21(5):373-82.
- 5 Oliveira, J.A.; Bernal, T.M.O. **Prevenção contra aminoglicosídeos e otoproteção experimental**. IN: Costa, S.S. *et al.* Otorrinolaringologia Princípios e Prática. 2ª ed. Porto Alegre: Artemed; 2006.
- 6 Bertino, J.S.; Rodvold, K.A.; Destache, C.J. **Cost Consideration in therapeutic drug monitoring of aminoglycosides**. Clin. Pharmacokinet., Auckland, v. 26, n.1, p.71-81,1994.
- 7 Hyppolito, M.A.; Silva, J.G; Prado, V.B.; Carvalho, I.; Corrado, A.P. **Toxicidade coclear e vestibular específica induzida por novos aminoglicosídeos semi-sintéticos (agas): implicações para o tratamento da doença de ménière (dm)**. Ver. Bras. Otorrinol, 2007; Suplemento. 73 (2). MAR/ABR. 2007.
- 8 Oliveira, J.A.A.; Canedo, D.M.; Rossato, M. **Otoproteção das células ciliadas auditivas contra a ototoxicidade da Amicacina**. Rev Bras Otorrinolaringol 2002;68(1):7-13.
- 9 Geyer, B.L. *et al.* **Limiars auditivos em altas frequências e emissões otoacústicas na fibrose cística**. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, v. 81, p. 589-597, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1808869415001500?via%3Dihub>. Acesso em: 30 Set 2020.
- 10 Baggio, C.L.; Silveira, A.F.; Hyppolito, M.A.; Salata, F.F.; Rossato, M. **Cocleotoxicidade da gentamicina por doses habituais para neonatos - estudo funcional**. Braz J Otorhinolaryngol. 2010; 76(1):91-5.
- 11 Hyppolito, M.A; Oliveira, A.A.; Lessa R.M.; Rossato, M. **Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produto de distorção e microscopia eletrônica de varredura**. Ver. Bras. Otorrinol. 2005; 71:268-73.

- 12 Aquino, T.J.M. **Ototoxicidade e otoproteção em orelha interna de cobaias utilizando gentamicina e Amicacina: aspectos ultra-estruturais e funcionais.** Tese Doutorado. 2007, disponível em <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp037202.pdf>.
- 13 Acar, J.F.; Witchitz, J.L.; Goldstein, F.; Talbot, J.N.; Le Goffic, I. **Susceptibility of aminoglycoside-resistant gram-negative bacilli to amikacin:** delinieation of individual resistance patterns. *J. Infect Dis.*, (SUPPL. 134):280-5,197.
- 14 Bush, K. **Antibacterial drug discovery in the 21st century.** August 1973 Ph.D. 22 July 1888-16. *Med.* 1973;79(5):64
- 15 Sharp, P.M.; Saenz, C.A.; **Amikacin (BB-K8) treatment of multiple drug-resistant proteus infection.** *Antimicrob Agents Chemother*, 5:435-8,1974.
- 16 Ribeiro, A.M.F. **Farmacologia dos antibióticos aminoglicosídeos. Dissertação de Mestrado.** Universidade João Pessoa, 2017.
- 17 Matias, E.E.F.; Santos, K.K.A.; Almeida, T.S.; Costa, J.G.M.; Coutinho, H.D.M. **Enhancement of Antibiotic Activity by Cordia verbenacea DC.** *Latin Am J Pharm.* 2010;29(6):1049–1052.
- 18 Oliveira, J.F.P.; Cipullo, J.P.; Burdmann, E.A. **Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos.** *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 21 (4) (2006), pp. 444-452.
- 19 Guimarães, D.O.; Momesso, L.S.; Pupo, M.T. **Antibióticos:** importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim Nova* 2010; 33(3):667-79.
- 20 Trabulsi, L. R.; Soares, L. A. **Antibióticos Aminoglicosídeos.** In: Penildon Silva (Ed.). *Farmacologia.* 6ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.103, p. 1040-1048.
- 21 Hyppolito, M.A.; Oliveira, J.A.; **Ototoxicidade, otoproteção e autodefesa das células ciliadas da cóclea.** *Medicina (Ribeirão Preto)* 2005; 38:279-89.
- 22 Auto, H.F.; Constant, J.M.C.; Constant, A.B.L. **Antibióticos e quimioterápicos.** (2008) UFAM, Maceió.
- 23 Garetz, S.L.; Schacht, J. **Ototoxicity of mice and men.** In: Van de Walter, T.R.; Popper, N.A.; Fay, R.R. (eds) *Handbook of auditory research vol VII: Clinical aspects of Hearing.* New York: Springer Verlag, 1996:116-54.
- 24 Marques, M.T. **Pharmacokinetic Monitoring of Amikacin in Cancer Patients.** Universidade de Coimbra, 2017.
- 25 Harrison, R.V.; *et al.* **Morphological changes to the cochlea in an animal model of profound deafness.** *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, (SUPPL.489), p. 5-11, 1991.
- 26 Da Costa, S.S.; Cruz, O.L.M.; De Oliveira, J.A.A.; **Otorrinolaringologia Princípios e Prática.** 2a Edição. São Paulo: Artmed; 2006

- 27 Guida, H.L.; Giacheti, C.M.; Zorzetto, N.L.; **Neuroanatomia do Processamento Auditivo**. In: GIACHETI, C.M.; PASCHOAL, S.R.G. (Org.). **Perspectivas multidisciplinares em Fonoaudiologia: da avaliação à intervenção**. 1. ed. Marília, SP. Cultura acadêmica. 2013. p. 57-72.
- 28 Leggett, J. E. **Aminoglycosides**. Infectious Diseases (Fourth Edition), 2, 2017. pp. 1233-1238.
- 29 Sousa, J. C.; **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. 2006.
- 30 Guimarães, S. *et al.* **Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas**. Porto: Porto Editora, 2006.
- 31 Lanvers-Kaminsky, C. *et al.* (2017). **Drug-induced ototoxicity: Mechanisms, Pharmacogenetics, and protective strategies**. Clin Pharmacol Ther., 101(4), pp. 491-500.
- 32 Guthrie, O. W. **Aminoglycoside induced ototoxicity**. Toxicology, 249, 2008. pp. 91-96.
- 33 Ellis, R.E.; Yuan, J.Y.; Horvitz, H.R.; **Mechanisms and functions of cell death**. Annu Rev Cell Biol, 1991. 7: p. 663-98.
- 34 Sola, S. Pedro, T. Ferreira, H.; Rodrigues, C.M.; **Apoptose: Uma questão de vida ou de morte**. Biologias, 2001, Ordem dos Biólogos: <http://ordembilogos.pt/wp-content/uploads/2015/11/Apoptose-01Fev01.pdf>
- 35 Sola, S.; Morgado, A.L.; Rodrigues, C.M. **Death receptors and mitochondria: two prime triggers of neural apoptosis and differentiation**. Biochim Biophys Acta, 2013. 1830(1): p. 2160-6.
- 36 Krakauer, D.C.; Payne, R.J. **The evolution of virus-induced apoptosis**. Proc Biol Sci, 1997. 264(1389): p. 1757-62.
- 37 Dourado, A.D.C.M.; *et al.* **As emissões otoacústicas no diagnóstico audiológico na oncologia pediátrica**. Revista Saúde & Ciência Online 8.2 (2019): 40-50.
- 38 Araújo, J. G. **Efeito da melatonina na ototoxicidade e genotoxicidade da cisplatina em ratos wistar**. 2019. 99 f., il. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
- 39 Parolin, M.B.; Reosan, I.J.M. **Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares**. Arq Gastroenterol 2001;38(2):138-144.
- 40 Vallejo, J. C.; Silva, M. N.; De Oliveira, J. A.; Carneiro, J. J.; Rocha, L. S.; Figueiredo, J. F. & Chiosi, M. F. **Detecção precoce de ototoxicidade usando emissões otoacústicas produtivas de distorção**. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, 67(6). (2001) 845-851.

- 41 Kemp, D.T. **Stimulates acoustic emissions from within the human auditory system.** J Acoust Soc Am, 64:1386-91, 1978.
- 42 Brown, A.M.; McDowell, B.; Forge, A. **Acoustic distortion products can be used to monitor the effects of chronic gentamicin treatment.** Hearing Research, 36:143-56, 1989.
- 43 Mor, R. & Azevedo, M. F. D. **Emissões otoacústicas e sistema olivococlear medial: pacientes com zumbido sem perda auditiva.** Pró-Fono Revista de Atualização Científica, 17(3), (2005) 283-292.
- 44 Durante, A. S. *et al.* **Mecanismos Fisiológicos subjacentes à geração de emissões otoacústicas.** Tratado de audiologia [2ed.]. Guanabara Koogan, 2015.
- 45 Serra, L. S. M. **Estudo da supressão das emissões otoacústicas evocadas e a relação com o incômodo do zumbido em indivíduos com limiares auditivos normais.** Disponível em <https://repositorio.unb.br/handle/10482/15697> 2014.
- 46 Andersen, M.L.; D'Almeida, V. Ko, G.M.; Kawakami, R.; Martins, P.J.F.; De Magalhães, L.E.; **Princípios éticos e práticos do uso de animais de laboratório.** São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 2004.
- 47 Spinelli, M.O.; Cruz, R.J.; Godoy, C.M.S.; Junqueira, M.S.; Motta, M.C.; Bortolatto, J. **Perfil bioquímico dos animais de laboratório do Biotério da Faculdade de Medicina da USP.** Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (RESBCAL). São Paulo, 2012; jan/Fev/ Mar, 1(1): 76-81.
- 48 Harrison, R.V.; Shirane, M.; Fukushima, N.; Mount, R.J. **Morphological changes to the cochlea in an animal model of profound deafness.** Acta Otolaryngol. (Stockh), (SUPPL.489):5-11, 1991.
- 49 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). **Princípios éticos na experimentação animal.** Acesso em: abril 5, 2006. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>.
- 50 Ogier, J.M.; Lockhart, P.J.; Burt, R.A. **Intravenously delivered aminoglycoside antibiotics, tobramycin and amikacin, are not ototoxic in mice.** Hear Res. 2020 Feb;386:107870. doi: 10.1016/j.heares.2019.107870. Epub 2019 Dec 13. PMID: 31864009.
- 51 Oliveira, A.A. *et al.* **Persistência do efeito otoprotetor: qual a duração da otoproteção à Amicacina?** Braz. j. otorhinolaryngol. [online]. 2012, vol.78, n.6, pp.47-50. ISSN 1808-8694. <https://doi.org/10.5935/1808-8694.20120032>.
- 52 Gatell, J.M. *et al.* **Univariate and multivariate analyses of risk factors predisposing to auditory toxicity in patients receiving aminoglycosides.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 31:1383-7, 1987.
- 53 Longenecker, R.J.; Gu, R.; Homan, J.; Kil, J.A.; **Novel Mouse Model of Aminoglycoside-Induced Hyperacusis and Tinnitus.** Front Neurosci. 2020; 14: 561185. Publicado em 18 de setembro de 2020. Doi: 10.3389 / fnins.2020.561185.

- 54 Kakigi, A; Hirakawa, H.; Harel, N; Mount, R.J.; Harrison, R.V. **Comparison of distortion product and transient evoked otoacoustic emissions with ABR threshold shift in chinchillas with ototoxic damage.** *Auris Nasus Larynx*, 25:223-32, 1998.
- 55 Neely, S.T.; Kim, D.O. **A model for active elements in cochlear biomechanics.** *J Acoust Soc Am*, 79:1472-80, 1986.
- 56 Brown, A.M.; Mcdowell, B.; FORGE, A. **Acoustic distortion products can be used to monitor the effects of chronic gentamicin treatment.** *Hearing Research*, 36:143-56, 1989.
- 57 De Oliveira, J.A.A.; Canedo, D.M.; Rossato, M. **Otoproteção das células ciliadas auditivas contra a ototoxicidade da Amicacina.** *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2002;68(1):7-13.
- 58 POIRRIER, A. L.; *et al.* **Oxidative Stress in the Cochlea: An Update.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 31, p. 1-14, 2010.
- 59 KAKIGI, A.; *et al.* **Basal cochlear lesions result in increased amplitude of otoacoustic emissions.** *Audiol Neurotol*, 3:361-72, 1998.
- 60 Shi, Xiaorui. **Pathophysiology of the cochlear intrastrial fluid-blood barrier.** *Hearing research* 338 (2016): 52-63.
- 61 Ogier, J.M.; Lockhart, P. J.; Burt R.A. **Intravenously delivered aminoglycoside antibiotics, tobramycin and amikacin, are not ototoxic in mice.** *Hearing research* 386 (2020): 107870.
- 62 Imamura, Shun-ichi, and Joe C. Adams. **Changes in cytochemistry of sensory and nonsensory cells in gentamicin-treated cochleas.** *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 4.2 (2003): 196-218.
- 63 Wang, Qi, and Peter S. Steyger. **Trafficking of systemic fluorescent gentamicin into the cochlea and hair cells.** *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 10.2 (2009): 205-219.
- 64 Huth, M. E.; Ricci; A.J.; Cheng, A.G. **Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection.** *International journal of otolaryngology* 2011 (2011).

APÊNDICE A – GANHO DE PESO ESTIMADO DOS ANIMAIS

<i>Dias</i>	<i>Cx 1 C1</i>	<i>Cx 1 C2</i>	<i>Cx 1 C3</i>	<i>Cx 1 C4</i>
0	20,89	27,05	26,67	24,8
1	22,1	28,1	27,7	25,9
2	23,3	29,1	28,7	27,0
3	24,5	30,1	29,7	28,1
4	25,8	31,1	30,7	29,1
5	27,0	32,1	31,8	30,2
6	28,2	33,1	32,8	31,3
7	29,4	34,1	33,8	32,4
8	29,9	34,8	34,5	33,0
9	30,4	35,4	35,1	33,6
10	30,9	36,1	35,8	34,2
11	31,4	36,8	36,5	34,8
12	31,9	37,5	37,1	35,4
13	32,4	38,1	37,8	36,0
14	32,9	38,8	38,5	36,7

Grupo controle - Peso Estimado de D1 a D13

Medidas Reais do D0 e do D14

Cx = Caixa - C1 / C2 / C3 e C4 = Animais

<i>Dias</i>	<i>Cx2 C1</i>	<i>Cx2 C2</i>	<i>Cx2 C3</i>	<i>Cx3 C1</i>	<i>Cx3 C2</i>	<i>Cx3 C3</i>	<i>Cx3 C4</i>	<i>Cx4 C1</i>	<i>Cx4 C2</i>	<i>Cx4 C3</i>	<i>Cx5 C1</i>	<i>Cx5 C2</i>	<i>Cx5 C3</i>
0	27,2	29,01	25,52	31,65	26,03	29,01	26,87	27,66	27,01	27,8	27,5	28,25	27,84
1	28,2	29,9	26,6	32,5	27,1	29,9	27,9	28,6	28,0	28,8	28,5	29,2	28,8
2	29,2	30,9	27,6	33,3	28,1	30,9	28,9	29,6	29,0	29,8	29,5	30,2	29,8
3	30,2	31,8	28,7	34,2	29,2	31,8	29,9	30,6	30,0	30,7	30,5	31,1	30,8
4	31,2	32,8	29,8	35,0	30,2	32,8	30,9	31,6	31,0	31,7	31,5	32,1	31,8
5	32,2	33,7	30,8	35,9	31,2	33,7	31,9	32,6	32,0	32,7	32,5	33,1	32,7
6	33,2	34,6	31,9	36,7	32,3	34,6	32,9	33,6	33,1	33,7	33,4	34,0	33,7
7	34,2	35,6	32,9	37,6	33,3	35,6	34,0	34,6	34,1	34,7	34,4	35,0	34,7
8	34,9	36,3	33,6	38,4	34,0	36,3	34,6	35,3	34,7	35,4	35,1	35,7	35,4
9	35,6	37,0	34,2	39,2	34,6	37,0	35,3	35,9	35,4	36,1	35,8	36,4	36,1
10	36,2	37,8	34,8	40,0	35,3	37,8	36,0	36,6	36,1	36,8	36,5	37,1	36,8
11	36,9	38,5	35,5	40,8	35,9	38,5	36,6	37,3	36,8	37,5	37,2	37,8	37,5
12	37,6	39,2	36,1	41,6	36,6	39,2	37,3	38,0	37,4	38,2	37,9	38,6	38,2
13	38,3	40,0	36,7	42,4	37,2	40,0	38,0	38,7	38,1	38,9	38,6	39,3	38,9
14	39,0	40,7	37,4	43,3	37,8	40,7	38,7	39,4	38,8	39,5	39,3	40,0	39,6

Grupo Amicacina Ototóxica - Peso Estimado de D1 a D13

Medidas Reais do D0 e do D14

Cx = Caixa - C1 à C4 = Animais

ANEXO 01 DECLARAÇÃO CEUA-UNB



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 22 de fevereiro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**EFEITO ANTIOXIDANTE DA MELATONINA E DO LICOPENO NA PREVENÇÃO DA OTOTOXICIDADE CAUSADA PELO AMINOGLICOSÍDEO AMICACINA EM MODELO MURINO.**" Protocolo n.º 63/2018, sob responsabilidade do Professor André Luiz Lopes Sampaio foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (B1 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 20/08/2018 a 20/01/2020.



Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.