



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Protective effect of N-acetylcysteine against cisplatin ototoxicity in rats: a study with hearing tests and scanning electron microscopy[☆]



Mehmet Akif Somdaş^{a,*}, İlayet Güntürk^b, Esra Balcıoğlu^c, Deniz Avcı^d,
Cevat Yazıcı^b e Saim Özdamar^c

^a Erciyes University, Faculty of Medicine, Department of Otorhinolaryngology, Kayseri, Turquia

^b Erciyes University, School of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Kayseri, Turquia

^c Erciyes University, School of Medicine, Department of Histology and Embryology, Kayseri, Turquia

^d Patnos State Hospital, Department of Otorhinolaryngology, Ağrı, Turquia

Recebido em 14 de abril de 2018; aceito em 14 de agosto de 2018

Disponível na Internet em 11 de dezembro de 2019

KEYWORDS

Cisplatin;
Electron microscopy;
Hearing tests;
N-acetylcysteine;
Ototoxicity

Abstract

Introduction: Ototoxicity is a health problem appearing after powerful treatments in serious health conditions. It is sometimes inevitable when treatment of the serious disease is required. Cisplatin is an antineoplastic agent which was investigated previously to reveal increased nitrogen and reactive oxygen radicals that damages hair cells, resulting in ototoxicity. N-acetylcysteine, previously shown to decrease ototoxicity caused by different agents, is known to be a powerful *in vitro* antioxidant. Probably N-acetylcysteine, in addition to its antioxidant effect, blocks a cascade where reactive oxygen species result in apoptosis in the cochlea.

Objectives: The possible preventive effect of N-acetylcysteine in cisplatin ototoxicity was studied with auditory brain stem responses, otoacoustic emissions, and histopathological investigation of the cochlea in a scanning electron microscopy.

Methods: This study was conducted on 21 Wistar Albino rats in four groups. 1 mL/kg/day three times in total intraperitoneal (i.p.) Saline ($n=5$), 500 mg/kg/day i.p. three times in total N-acetylcysteine ($n=5$), i.p. 15 mg/kg cisplatin alone (single dose) ($n=5$) and i.p. 15 mg/kg cisplatin plus 500 mg/kg/day N-acetylcysteine ($n=6$) were administered. The rats were anesthetized to study the hearing tests before and after the experiment. The rats were sacrificed to investigate the cochleas by scanning electron microscopy.

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2018.08.002>

[☆] Como citar este artigo: Somdaş MA, Güntürk İ, Balcıoğlu E, Avcı D, Yazıcı C, Özdamar S. Protective effect of N-acetylcysteine against cisplatin ototoxicity in rats: a study with hearing tests and scanning electron microscopy. Braz J Otorhinolaryngol. 2020;86:30–37.

* Autor para correspondência.

E-mail: somdas@erciyes.edu.tr (M.A. Somdaş).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

PALAVRAS-CHAVE

Cisplatina;
Microscópio
eletrônico;
Testes de audição;
N-acetylcysteine;
Ototoxicidade

Results: Auditory brain stem responses and otoacoustic emissions values were attenuated in the cisplatin group. The group that received N-acetylcysteine in addition to cisplatin had better auditory brain stem responses thresholds and otoacoustic emissions. The samples obtained from the cisplatin group showed surface irregularities, degeneration areas, and total or partial severe stereocilia losses. The changes were milder in the cisplatin + N-acetylcysteine group.

Conclusion: Cisplatin ototoxicity can be detected by auditory brain stem responses and otoacoustic emissions testing in rats. N-acetylcysteine may protect the cochlear cells from histopathological changes. We concluded that N-acetylcysteine given 4h after cisplatin injection has a potential otoprotective effect against cisplatin ototoxicity, which suggests it could be used in clinical trials.

© 2018 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Efeito protetor da N-acetilcisteína na ototoxicidade por cisplatina em ratos: um estudo com testes auditivos e microscopia eletrônica de varredura**Resumo**

Introdução: A ototoxicidade é um problema que pode ocorrer após certos tipos de tratamentos para condições graves de saúde. Às vezes é inevitável quando o tratamento da doença é necessário. A cisplatina é um agente antineoplásico cujo uso em pesquisas anteriores demonstrou aumentar os radicais livres de nitrogênio e espécies reativas de oxigênio que danificam as células ciliadas e resultam em ototoxicidade. Por outro lado, a N-acetilcisteína, que já demonstrou diminuir a ototoxicidade causada por diferentes agentes, é conhecida por ser um potente antioxidante *in vitro*. Provavelmente a N-acetilcisteína, além de seu efeito antioxidante, bloqueia uma cascata onde espécies reativas de oxigênio resultam em apoptose na cóclea.

Objetivos: Estudar o possível efeito preventivo da N-acetilcisteína na ototoxicidade por cisplatina por meio de potencial evocado auditivo de tronco encefálico, emissões otoacústicas e investigação histopatológica da cóclea por microscopia eletrônica de varredura.

Método: Este estudo foi realizado em 21 ratos albinos Wistar, separados em quatro grupos. Foram administrados: 1 mL/kg/dia intraperitoneal (i.p.) de solução salina (n=5), três vezes no total; 500 mg/kg/dia i.p. de N-acetilcisteína (n=5), três vezes no total; 15 mg/kg i.p. (dose única) somente de cisplatina (n=5) e 15 mg/kg i.p. de cisplatina e 500 mg/kg/dia i.p. de N-acetilcisteína (n=6). Os ratos foram anestesiados para estudo dos testes auditivos antes e depois do experimento. Os ratos foram sacrificados para investigação da cóclea por microscopia eletrônica de varredura.

Resultados: Os potenciais evocados auditivos de tronco encefálico e os valores das emissões otoacústicas estavam atenuados no grupo cisplatina. O grupo que recebeu N-acetilcisteína além da cisplatina apresentou melhores limiares de respostas auditivas do tronco encefálico e emissões otoacústicas. As amostras obtidas do grupo cisplatina apresentaram irregularidades de superfície, áreas de degeneração, com perdas graves totais ou parciais de estereocílios. As alterações foram mais leves no grupo cisplatina + N-acetilcisteína.

Conclusão: A ototoxicidade por cisplatina pode ser detectada por meio de potenciais evocados auditivos de tronco encefálico e pelo teste de emissões otoacústicas em ratos. A N-acetilcisteína pode proteger as células cocleares contra alterações histopatológicas. Concluímos que a N-acetilcisteína administrada 4 horas após a injeção de cisplatina tem potencial efeito otoprotetor contra a ototoxicidade por cisplatina e pode ser utilizada em ensaios clínicos.

© 2018 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A ototoxicidade é um problema que pode ocorrer após tratamentos intensos de condições graves de saúde.¹⁻³ Às vezes é inevitável quando o tratamento da doença é uma

necessidade, como nos sobreviventes de câncer. Para pacientes com câncer, a cisplatina é um agente antineoplásico comum, foi investigado anteriormente, demonstrou produzir um aumento de radicais livres de nitrogênio e espécies

reativas de oxigênio, prejudiciais às células ciliadas, e causar ototoxicidade.³⁻⁸

Existem alguns agentes, inclusive tiosulfato de sódio, amifostina, D-metionina, vitamina E, dexametasona, salicilatos, neurotrofinas, flunarizina, ácido lipoico, ebselen, dietilditiocarbamato e ácido 4-metilbenzóico, aos quais se atribui a capacidade de prevenir ototoxicidade.⁹⁻¹⁵ A N-acetilcisteína (NAC), que já demonstrou diminuir a ototoxicidade causada por diferentes agentes, é conhecida por ser um potente antioxidante *in vitro*.¹⁶⁻¹⁸

A ototoxicidade é mediada por espécies reativas de oxigênio, o que resulta em morte celular.¹⁻³ Em contrapartida, a N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante, originalmente usado como agente mucolítico para o tratamento pulmonar. Entretanto, também é usado para doenças dos pulmões, fígado, coração e rim, com o objetivo de tratar as lesões tóxicas e isquêmicas.¹⁹ Por exemplo, a NAC melhora a hemodinâmica renal em ratos com nefrotoxicidade induzida por cisplatina.²⁰ Provavelmente, além de seu efeito antioxidante, a NAC possa bloquear a cascata onde espécies reativas de oxigênio resultam em apoptose na cóclea.²¹

A ototoxicidade permanente é uma condição incapacitante que pode afastar ainda mais o paciente do ambiente social, além dos efeitos devastadores da doença primária. A detecção dela por meio de emissões otoacústicas (EOAs), potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) e a prevenção de sua persistência, com o uso da NAC, pode ser muito benéfica para o paciente, que já lida com os problemas da doença primária.

O objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis propriedades protetoras de um potente antioxidante (NAC) contra a ototoxicidade da cisplatina, que ocorre através dos radicais livres. A NAC poderá contribuir para a literatura sobre prevenção da ototoxicidade na quimioterapia com cisplatina, uma vez que pode ser usada em seres humanos.

Método

O artigo foi aprovado pelo comitê regional de ética em pesquisa animal (nº 16/147). Os experimentos foram feitos em laboratório de animais. Este é um estudo prospectivo e controlado em animais, sobre a ototoxicidade da cisplatina.

Nos experimentos, 21 ratos albinos machos Wistar, com 5 meses de idade e peso médio de 300-350 g, receberam uma dieta-padrão de laboratório. Todos os ratos foram mantidos em jaulas na mesma sala e sob as mesmas condições ambientais, com ciclos claro/escuro de 12/12 horas, a uma temperatura de 22 ± 3 °C e nível de ruído inferior a 50 dB. Os ratos foram alimentados *ad libitum*.

Inicialmente, cada rato foi anestesiado com cetamina (40 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.). Após a anestesia, o meato acústico externo e as membranas timpânicas de cada rato foram submetidos a otomicroscopia, não foi encontrado sinal de doença. As emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) e os potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE) foram feitos para ambas as orelhas de cada animal para avaliação basal do limiar auditivo. Durante os experimentos, três ratos que pertenciam ao grupo controle, grupo cisplatina e grupo NAC e dois ratos que pertenciam ao grupo cisplatina + NAC não se recuperaram da anestesia e foram excluídos do estudo;

Tabela 1 Características de distribuição de todos os grupos

Grupo	Protocolo de tratamento
Grupo 1 (n = 5)	1 mL/kg Solução Salina Intraperitoneal (i.p.)
Grupo 2 (n = 5)	NAC 500 mg/kg (i.p.)
Grupo 3 (n = 5)	Cisplatina 15 mg/kg (i.p.)
Grupo 4 (n = 6)	Cisplatina 15 mg/kg + NAC 500 mg/kg (i.p.)

portanto, novos ratos foram incluídos no lugar dos animais mortos no estudo. Como conclusão, 42 orelhas funcionalmente normais de 21 ratos foram incluídas na pesquisa.

Estudo clínico preliminar

Inicialmente, foi feito um estudo preliminar para ototoxicidade em 20 ratos. A cisplatina foi administrada a 15 ratos albinos Wistar e a ototoxicidade foi determinada por decréscimo dos valores dos limiares. Solução salina foi administrada a 5 ratos. Os ratos albinos Wistar receberam cisplatina, a primeira dose foi de 5 mg/kg, seguida de 10 mg/kg e 15 mg/kg até a ototoxicidade resultante. A dose de 15 mg/kg de cisplatina foi considerada ototóxica pelos testes de EOAs e PEATE. Portanto, no estudo foram usados 15 mg/kg de cisplatina.

Formação de grupos e procedimentos experimentais

Os animais foram randomizados em 4 grupos, conforme mostrado na [tabela 1](#).

Os ratos do terceiro e quarto grupos receberam cisplatina apenas uma vez durante o estudo. Para o quarto grupo, a NAC foi administrada três vezes no total (dose total de 1.500 mg/kg) no primeiro dia e 4 horas após a cisplatina, no segundo e terceiro dias. Nos dias 0 e 7, os animais foram submetidos a anestesia seguida de avaliação das EOAs e PEATE para as funções auditivas e os resultados foram registrados.

Depois que todas as injeções e medidas foram feitas, os ratos foram eutanasiados com a administração de uma dose alta de anestésicos e as cócleas foram colhidas e fixadas em solução de formol para estudos histopatológicos.

Medidas de emissões otoacústicas

Os valores da relação sinal-ruído (SNR, do inglês *Signal-to-Noise Ratio*), calculados com a subtração do nível de ruído de fundo das medidas das EOAPD em decibéis (dB), foram usados para interpretação dos resultados dos testes. Um sistema de EOA e sondas neonatais foram usados para triagem das EOAPD. A relação f2/f1 foi fixada em 1,22 e a diferença L1-L2 foi ajustada para 10 dB de nível de pressão sonora (L1 = 70 dB NPS; L2 = 60 dB NPS). As EOAPD foram avaliadas nos tons iguais a 2f1-f2 e geradas nas frequências correspondentes à média geométrica de f1 e f2. Os valores da SNR foram registrados de ambas as orelhas nos dias 0 e 7 a 2000, 3000, 4000, 6000 e 8000 Hz.

Medidas do PEATE

As respostas do PEATE foram registradas por eletrodos-agulhas subdermicamente posicionados com o eletrodo ativo no vértice, o eletrodo-terra na glabella e os eletrodos referência nos campos do mastoide direito e esquerdo. Os cliques foram apresentados como estímulos auditivos de acordo com os seguintes parâmetros: filtros passa-banda de 100–3000 Hz e uma taxa de repetição de 21s. O limiar do PEATE ocorreu na quinta onda. O limiar foi identificado a 70 dB e quando uma forma de onda apropriada era obtida, o volume era diminuído em 20 dB por vez. Caso não ocorresse uma forma de onda apropriada, usava-se 90 dB. Quando a onda estava prestes a desaparecer, eram aplicados decréscimos de 10 dB. O volume da última onda, antes de desaparecer, representa o limiar caso confirmada a reprodutibilidade e a identificação do limiar for melhorada em dois testes.

Avaliação histopatológica

O segmento médio das cócleas foi removido dos ratos sob anestesia com xilazina e cetamina no 7º dia após a aplicação. Após a remoção do tecido ósseo que envolve o meato auditivo interno, o lúmen coclear foi fixado em glutaraldeído a 2,5% por 48 horas para o exame de microscopia eletrônica. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio a 1% (OsO₄) e tratada com séries crescentes de acetona (50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, 100%) por 15 minutos e seca com secador de ponto crítico em CO₂ líquido. As amostras foram colocadas em blocos de metal e revestidas com ouro-paládio com uma espessura de 18–20 nm, com um dispositivo de revestimento Sputter, e examinadas com microscópio eletrônico de varredura LEO 440 em modo de elétron secundário a 15 kV.

Análise estatística

O programa SPSS for Windows 16.0 foi usado para analisar os achados deste experimento. Para a análise estatística, as variáveis foram expressas e usadas como número (n), porcentagem (%) e média $\pm$ desvio-padrão. O teste de Shapiro-Wilk, Q-Q e histogramas foram usados para avaliar a normalidade dos dados. As comparações foram feitas com análise de variância de dois fatores com medidas repetidas. O teste de Kruskal-Wallis unidirecional foi usado para comparar os resultados das EOAPD entre os grupos antes e após a aplicação do medicamento. O teste de Bonferroni foi implantado para comparações múltiplas. Comparações intragrupo foram usadas com base na análise de Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram aceitos como estatisticamente significantes.

Resultados

Avaliação dos resultados das EOAPD e dos PEATE

Os valores das EOAPD iniciais não foram significativamente diferentes entre os grupos e intragrupos. Após a aplicação da cisplatina, os valores das EOAPD e dos limiares dos PEATE foram atenuados. Houve alterações estatisticamente

Tabela 2 Limiares do potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) pré-tratamento e pós-tratamento nos grupos (valor médio)

Grupo	Pré-tratamento	Pós-tratamento	<i>p</i>
Grupo Controle	26 $\pm$ 14,29	23 $\pm$ 10,59	0,083
Grupo NAC	28 $\pm$ 7,88	17 $\pm$ 11,5	0,004 ^a
Grupo Cisplatina	26 $\pm$ 10,74	37 $\pm$ 11,59	0,005 ^a
Grupo Cisplatina + NAC	–11,25 $\pm$ 17,72	–5 $\pm$ 15,81	0,006 ^a

Comparações intragrupo foram feitas com o teste de postos sinalizados de Wilcoxon.

^a Pós-tratamento estatisticamente significativo.

Tabela 3 Comparações do potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) pós-tratamento entre os grupos

Grupos	Estatísticas do teste	Erro-padrão	<i>p</i>
1–2	–7,5	5,345	0,963
1–3	19,150	5,345	0,002 ^a
1–4	12,867	5,117	0,072
2–3	26,650	5,345	0,000 ^a
2–4	20,367	5,117	0,000 ^a
3–4	25,350	5,180	0,000 ^a

1, Grupo Controle; 2, Grupo NAC; 3, Grupo Cisplatina; 4, Grupo Cisplatina + NAC.

Teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar os resultados do PEATE entre os grupos.

^a Estatisticamente significativo.

significantes nos limiares dos PEATE antes e após a administração de cisplatina ($p < 0,05$) (tabela 2). Os outros grupos que receberam cisplatina mais NAC, solução salina ou apenas NAC não apresentaram alterações significantes nos limiares auditivos após o tratamento (tabela 2). Observaram-se mudanças estatisticamente significantes nas comparações do PEATE entre os grupos 1–3, 2–3, 2–4 e 3–4 ($p < 0,05$) (tabela 3). O tratamento com cisplatina reduziu acentuadamente as respostas das EOAPD em todas as frequências (tabela 4). As alterações nas respostas das EOAPD e nos limiares dos PEATES nos outros três grupos não foram significantes. Houve alterações estatisticamente significantes nos limiares dos PEATES entre o pré-tratamento e o pós-tratamento no grupo NAC e no grupo Cisplatina + NAC. Mas essa condição não representou ototoxicidade. É importante mencionar o fato de que, após o tratamento, houve melhoria nos limiares dos grupos com NAC e cisplatina + NAC.

Resultados histopatológicos

As células ciliadas externas do grupo controle estavam dispostas em forma de U ou V. Houve um aumento gradual no comprimento dos estereocílios localizados na superfície externa, em comparação com aqueles localizados na superfície interna. Os estereocílios na superfície das células do grupo controle estavam dispostos individualmente e de maneira regular, refletiram as funções de absorção e secreção dessas células (fig. 1).

No exame de microscopia eletrônica da morfologia da superfície do órgão de Corti nos grupos NAC, os estereocílios

Tabela 4 Respostas das emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) pré-tratamento e pós-tratamento em todas as frequências (valores médios de SNR, S, mínimo e máximo, p)

	Solução Salina				NAC				Cisplatina				Cisplatina + NAC			
	SNR	A/B	DP	p	SNR	A/B	DP	p	SNR	A/B	DP	p	SNR	A/B	DP	p
Pré 2000	1,56	-8/7	5,0		-0,76	-9/6	5,4		1,31	-9/6	4,2		6,85	-4/12	3,8	
Pós 2000	2,13	-8/14	6,8	0,959	-2,77	-14/6	5,8	0,44	-4,9	-13/2	5,2	0,03 ^a	6,33	-3/12	4,3	1,0
Pré 3000	7,92	3/10	1,9		5,1	-4/11	5,5		6,28	4/7	0,8		12,55	6/21	5,3	
Pós 3000	5,32	1/10	3,1	0,057	5,69	0/13	3,8	0,95	4,58	0/6	2,3	0,00 ^a	11,71	1/21	5,8	0,75
Pré 4000	6,63	0/18	5,2		6,65	-2/15	5,2		4	-5/16	5,5		18,28	6/29	9	
Pós 4000	5,66	-1/14	4,9	0,333	3,87	-7/21	8,6	0,20	0,93	-4/7	4	0,04 ^a	15,96	6/27	6,7	0,58
Pré 6000	10,53	1/1	8,7		6,14	-12/32	12		2,73	-5/16	7,2		21,91	3/34	11,6	
Pós 6000	5,36	27/8	2,2	0,074	7,23	-5/22	9,6	0,95	-3,74	-15/6	7,1	0,01 ^a	18,16	-2/33	11,3	0,15
Pré 8000	11,37	0/-3	10		14,06	-11/38	14		2,66	-4/10	5,2		25,69	-5/46	16,2	
Pós 8000	8,91	32/23	7,7	0,059	4,56	-14/25	11	0,00 ^a	-4,53	-17/6	8,3	0,01 ^a	17,95	-11/43	19,3	0,02 ^a

A, valor mínimo; B, valor máximo; DP, desvio-padrão; SNR, relação sinal-ruído.

Comparações intragrupo foram feitas com o teste de postos sinalizados de Wilcoxon.

^a Estatisticamente significante.

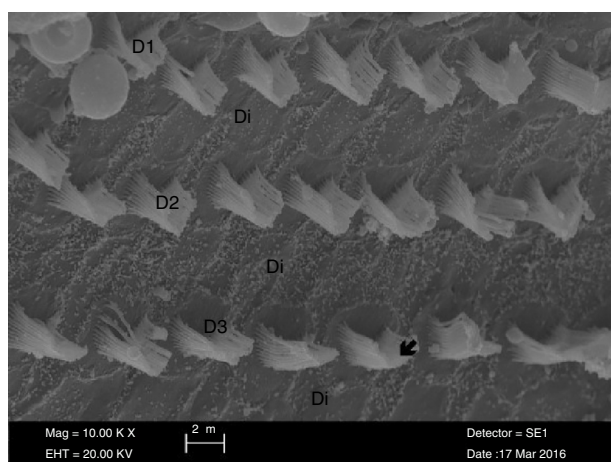


Figura 1 Fileiras de células ciliadas externas (D1 – D2 – D3) e as células de Deiters que dão suporte (Di) e a visão dos estereocílios organizados regularmente (↖) no grupo de controle ($\times 10.000$).

nas células ciliadas externas eram semelhantes às do grupo controle e seus formatos em U ou V estavam preservados. No entanto, as seções apicais dos estereocílios dessas células estavam firmemente aderidas umas às outras. Não foi possível diferenciar cada estereocílio devido a essas aderências. Além disso, foram observadas irregularidades estruturais e rupturas nos estereocílios. Semelhantemente ao grupo controle, as células ciliadas externas preservaram sua organização de três camadas. No entanto, havia aderência e união entre estereocílios em formato de U ou V no grupo NAC, embora não houvesse aderência entre os estereocílios localizados nas seções superiores das células ciliadas externas e os estereocílios das células ciliadas externas adjacentes no grupo controle. Houve perda parcial de estereocílios e perda total de células em células ciliadas externas sucessivamente (fig. 2).

Havia dissociação, irregularidades e ondulações entre os estereocílios no exame da morfologia da superfície do

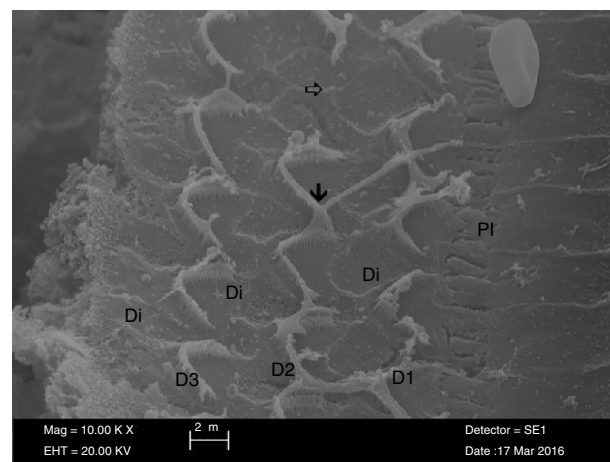


Figura 2 Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das estruturas das células ciliadas externas (D1-D2-D3) cercadas por células de Deiters (Di) no grupo NAC. Imagem das áreas de aderências na seção apical dos estereocílios (↙) e as áreas de perda na célula ciliada externa (↗) PI, células pilares internas ($\times 10.000$).

órgão de Corti no grupo cisplatina. Além disso, rupturas foram observadas no arranjo em U ou V das células ciliadas externas. Em particular, houve perda total ou parcial de estereocílios e áreas de degeneração nos três arranjos das células ciliadas externas. Havia também uma ampla gama de áreas de deformação celular nas células ciliadas internas (fig. 3). Protrusões semelhantes a balões na estrutura das células ciliadas externas, adjacentes às células de Hensen, também foram observadas (fig. 4).

No grupo cisplatina mais NAC, as células ciliadas externas eram semelhantes às do grupo controle e preservaram seus formatos em U ou V. No entanto, havia aderências, embora não tão graves como no grupo NAC, nos estereocílios localizados na parte superior das células ciliadas externas. Houve perda total ou parcial de estereocílios entre as células

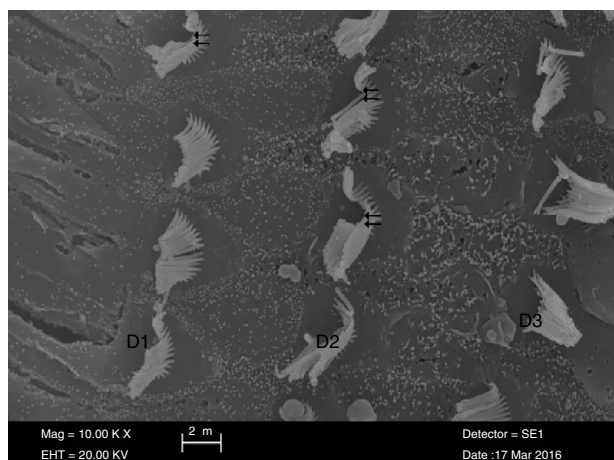


Figura 3 Imagem dos estereocílios irregulares (D1 – D2 – D3) das células ciliadas externas (E) no grupo cisplatina ($\times 10.000$).

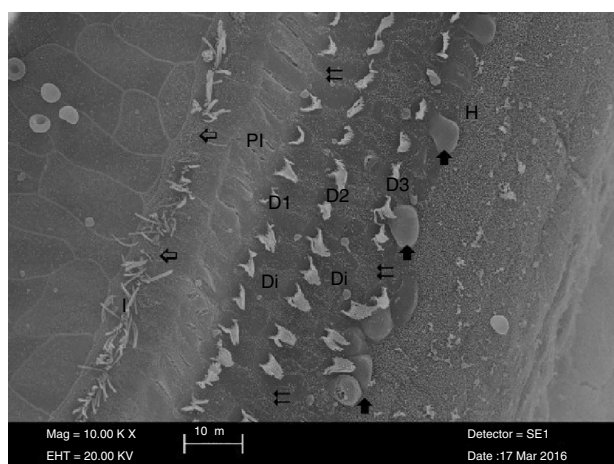


Figura 4 Área de perda parcial (i) nos estereocílios das células ciliadas internas (i) e perda total (E) nas células ciliadas externas (D1-D2-D3) no grupo cisplatina. Visualização de protrusões em forma de balão (H) nas células ciliadas externas adjacentes às células de Deiters (Di). PI, células pilares internas; H, célula de Hensen ($\times 3.000$).

ciliadas externas organizadas em três camadas. Além disso, havia áreas de degeneração nos estereocílios (fig. 5).

Discussão

Diferentes aspectos da ototoxicidade e agentes preventivos foram estudados anteriormente.⁹⁻¹⁵ Embora existam outros métodos para a detecção da ototoxicidade, inclusive a histopatologia pós-morte, o rastreamento com EOAs e PEATE é uma maneira confiável. O decréscimo nas EOAs produzidas pelas células ciliadas externas é a evidência de ototoxicidade estudada anteriormente.^{5,7,17}

O NAC diminui o peróxido de hidrogênio e aumenta a glutatona celular, assim conhecida por reduzir a ototoxicidade da cisplatina.^{22,23} A NAC pode exercer atividade osteogênica através do aumento da síntese de glutatona.²⁴ Nenhuma osteogênese foi observada após o uso de NAC neste estudo. Mas discute-se se a NAC também poderia diminuir

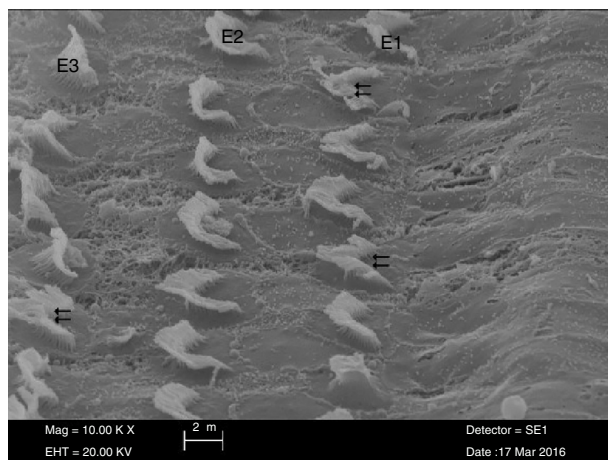


Figura 5 Imagem dos estereocílios irregulares e aderidos (E) das células ciliadas externas (E1-E2-E3) no grupo cisplatina + NAC ($\times 10.000$).

o efeito antitumoral, uma vez que se sabe que ela interage com a molécula de cisplatina. Para evitar essa atenuação no efeito antitumoral, a NAC foi introduzida através de uma via totalmente diferente, ou seja, transtimpânica, o que garantiu que as duas moléculas não interagissem.²⁵ A introdução transtimpânica de diferentes moléculas protetoras, por exemplo, o tiossulfato de sódio, também foi tentado por outros autores.²⁶ Para resolver o problema de interação, Muldoon et al.²⁷ introduziram a NAC 4 horas após a quimioterapia e alegaram que a quimioproteção da NAC não alterava a terapia com cisplatina, se adiada em até 4 horas (h) após a quimioterapia. Eles também alegaram que esse tipo de protocolo evita a ototoxicidade. Para testar isso em nosso estudo atual, também introduzimos a NAC protetora 4 horas após a injeção de cisplatina, o que acabou reduzindo o efeito ototóxico da cisplatina. Enquanto as EOAs e PEATE estivessem diminuídos no grupo cisplatina, a NAC administrada 4 horas após a cisplatina não alterou as EOAs e o PEATE. Fomos capazes de detectar claramente a ototoxicidade com essas medidas *in vivo*. O grupo cisplatina revelou os piores resultados nos testes de EOAs e PEATE. As EOAs e o PEATE não estavam alterados no grupo que recebeu NAC, significou que a NAC não afetou a audição por si só. Low et al.¹⁸ avaliaram a NAC administrada 72 h após a radiação e afirmaram ter observado menos radicais de oxigênio no ouvido interno, o que resultou em menos apoptose da cóclea. Isso é semelhante à ideia que testamos no presente estudo. Em estudos de fertilidade animal, nenhum efeito adverso foi relatado em doses de até 250 mg/kg de NAC e nenhum efeito teratogênico foi observado em doses de até 2000 mg/kg de NAC.²⁸ Duan et al.²⁹ observaram que uma dose cumulativa de NAC (1750 mg/kg), administrada antes e após o trauma causado por ruídos de impulso resultou em um maior desvio permanente do limiar e maior perda de células ciliadas internas em comparação aos animais controle. Em vez disso, uma dose cumulativa de 1.050 mg/kg, durante 5 dias resultou em uma proteção significativa contra o ruído de impulso. Em outro experimento, dois grupos de animais foram tratados com duas doses cumulativas diferentes e não foram expostos a trauma acústico: estes animais não apresentaram qualquer mudança no limiar. Assim, embora a NAC não

seja tóxica para a cóclea isoladamente, a dosagem do fármaco é crítica para induzir seu efeito protetor. Fetoni et al.³⁰ usaram uma dose de 500 mg/kg i.p. administrada imediatamente após a exposição ao ruído e, em seguida, durante os dois dias seguintes (dose cumulativa de 1500 mg/kg). Então, usamos uma dose de 500 mg/kg i.p. de NAC. Não observamos o efeito tóxico da NAC.

Como Okur et al.²² revelaram que a ototoxicidade da carboplatina aumentou os níveis de óxido nítrico e a N-acetilcisteína evitou a produção de NO, pode haver mecanismos diferentes de ototoxicidade e prevenção.

Com relação à otopreservação em presença de drogas antineoplásicas, particularmente a cisplatina, Church et al.³¹ encontraram preservação do potencial encefálico eletrofisiológica induzido em hamsters com tiosulfato de sódio e dietildimetiltiocarbamato e não observaram proteção significativa contra a amifostina e a fosfomicina. Kaltenbach et al.³² investigaram os mesmos fármacos, agora associados à avaliação estrutural por microscopia eletrônica e potencial evocado auditivo do tronco encefálico. Eles determinaram 91% de renovação das células ciliadas externas com tiosulfato de sódio, 68% com dietildimetiltiocarbamato, 52% com fosfomicina e 45% com amifostina.

Fetoni et al.³⁰ revelaram que as células ciliadas externas desapareceram e feixes desorganizados de estereocílios das células ciliadas externas foram observados. Em contraste, aqueles expostos ao ruído e a NAC mostraram apenas uma perda moderada de células ciliadas externas nas mesmas regiões e os estereocílios estavam normais.

Que seja de nosso conhecimento, os achados audiológicos e histopatológicos combinados em relação à ototoxicidade por cisplatina e a proteção por N-acetilcisteína não foram relatados anteriormente. Mostramos que os valores de PEATE e EOAs e o número de células danificadas não se alteraram acentuadamente no grupo que recebeu cisplatina e NAC, enquanto aqueles que receberam somente cisplatina mostraram alteração marcante. Os achados histopatológicos na cóclea também foram semelhantes aos achados audiológicos. A microscopia eletrônica mostrou perda de células ciliadas externas na ototoxicidade por cisplatina. Concluímos que a ototoxicidade por cisplatina pode ser evitada com o uso de NAC em ratos.

Em conclusão, houve aumento do comprimento das células ciliadas da base ao ápice na estrutura coclear. Com base nesses achados, o comprimento das células ciliadas internas e externas não pôde ser comparado entre o grupo experimental e o grupo controle. Portanto, concluímos que a deficiência auditiva pode se desenvolver como resultado de problemas no fluxo de K⁺ causados por irregularidades em junções apertadas e desmossomos em estereocílios ou bloqueio de canais por cisplatina, considerando o fato de que a informação sensorial é transportada das células ciliadas externas para a canais auditivos.

Considerando a sua dose efetiva, tempo e modo de administração, a NAC pode servir como um agente antioxidante valioso para minimizar a ototoxicidade não apenas da cisplatina, mas também de outras substâncias. Outros estudos semelhantes também são necessários para apoiar a introdução tardia do agente protetor.

Conclusão

A NAC não exerce efeito adverso na orelha interna quando usada isoladamente. Em nosso modelo experimental, a cisplatina desencadeou a ototoxicidade com sucesso, o que é evidente com base nos decréscimos nos resultados das EOAPD e PEATE e dos achados morfológicos; a NAC mostra sinais evidentes de proteção contra a ototoxicidade causada pela cisplatina no sétimo dia após a aplicação. A administração da NAC 4 horas após a injeção de cisplatina foi um fator protetor contra os achados histopatológicos negativos e a atenuação dos limiares das EOAs e PEATE causados pela cisplatina.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Scott PM, Griffiths MV. A clinical review of ototoxicity. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1994;19:3–8.
2. Tokgoz B, Somdas MA, Ucar C, Kocyigit I, Unal A, Sipahioğlu MH, et al. Correlation between hearing loss and peritonitis frequency and administration of ototoxic intraperitoneal antibiotics in patients with CAPD. *Ren Fail.* 2010;32:179–84.
3. Rybak L, Ramkumar V. Ototoxicity. *Kidney Int.* 2007;72:931–5.
4. Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, Endo T, Shiga A, Iguchi F, et al. Role of reactive radicals in degeneration of the auditory system of mice following cisplatin treatment. *Acta Otolaryngol.* 2004;124:1131–5.
5. van Ruijven MW, de Groot JC, Klis SF, Smoorenburg GF. The cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hear Res.* 2005;205:241–8.
6. Hatzipoulos S, Di Stefano M, Albertin A, Martini A. Evaluation of cisplatin ototoxicity in a rat animal model. *Ann NY Acad Sci.* 1999;884:211–25.
7. Sockalingam R, Freeman S, Cherny TL, Sohmer H. Effect of high-dose cisplatin on auditory brainstem responses and otoacoustic emissions in laboratory animals. *Am J Otol.* 2000;21:521–7.
8. Oh SH, Yu WS, Song BH, Lim D, Koo JW, Chang SO, et al. Expression of heat shock protein 72 in rat cochlea with cisplatin-induced acute ototoxicity. *Acta Otolaryngol.* 2000;120:146–50.
9. Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C, Somani S. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol.* 2000;21:513–20.
10. Gillissen A, Jaworska M, Orth M, Coffiner M, Maes P, App EM, et al. Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. *Respir Med.* 1997;91:159–68.
11. Rybak LP, Mukherjee D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med.* 2009;219:177–86.
12. Lopez-Gonzalez MA, Guerrero JM, Rojas F, Delgado F. Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. *J Pineal Res.* 2000;28:73–80.
13. Campbell KC, Meech RP, Rybak LP, Hughes LF. The effect of D-methionine on cochlear oxidative state with and without cisplatin administration: mechanisms of otoprotection. *J Am Acad Audiol.* 2003;14:144–56.
14. Teranishi M, Nakashima T, Wakabayashi T. Effects of alphatocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Hear Res.* 2001;151:61–70.

15. Daldal A, Odabasi O, Serbetcioglu B. The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;137:747–52.
16. Tokgoz B, Ucar C, Kocyigit I, Somdas M, Unal A, Vural A, et al. Protective effect of N-acetylcysteine from drug-induced ototoxicity in uraemic patients with CAPD peritonitis. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26:4073–8.
17. Somdaş MA, Korkmaz F, Gürgen SG, Sagit M, Akçadağ A. N-acetylcysteine prevents gentamicin ototoxicity in a rat model. *J Int Adv Otol.* 2015;11:12–8.
18. Low WK, Sun L, Tan MG, Chua AW, Wang DY. L-N-Acetylcysteine protects against radiation-induced apoptosis in a cochlear cell line. *Acta Otolaryngol.* 2008;128:440–5.
19. Mazzon E, Britti D, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol.* 2001;424:75–83.
20. Abdelrahman AM, Al Salam S, Al Mahruqi AS, Al Husseni IS, Mansour MA, Ali BH. N-acetylcysteine improves renal hemodynamics in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity. *J Appl Toxicol.* 2010;30:15–21.
21. Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312:424–31.
22. Okur E, Kilinc M, Yildirim I, Kilic MA, Tolun FI. Effect of N-acetylcysteine on carboplatin-induced ototoxicity and nitric oxide levels in a rat model. *Laryngoscope.* 2007;117:2183–6.
23. Feghali JG, Liu W, Van De Water TR. L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *Laryngoscope.* 2001;111:1147–55.
24. Jun JH, Lee SH, Kwak HB, Lee ZH, Seo SB, Woo KM, et al. N-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells. *J Cell Biochem.* 2008;103:1246–55.
25. Choe WT, Chinosornvatana N, Chang KW. Prevention of cisplatin ototoxicity using transtympanic N-acetylcysteine and lactate. *Otol Neurotol.* 2004;25:910–5.
26. Wang J, Lloyd Faulconbridge RV, Fetoni A, Guitton MJ, Pujol R, Puel JL. Local application of sodium thiosulfate prevents cisplatin-induced hearing loss in the guinea pig. *Neuropharmacology.* 2003;45:380–93.
27. Muldoon LL, Wu YJ, Pagel MA, Neuwelt EA. N-acetylcysteine chemoprotection without decreased cisplatin antitumor efficacy in pediatric tumor models. *J Neurooncol.* 2015;121:433–40.
28. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev.* 1998;3:114–27.
29. Duan M, Qiu J, Laurell G, Olofsson A, Counter SA, Borg E. Dose and time-dependent protection of the antioxidant N-acetylcysteine against impulse noise trauma. *Hear Res.* 2004;192:1–9.
30. Fetoni AR, Ralli M, Sergi B, Parrilla C, Troiani D, Paludetti G. Protective effects of N-acetylcysteine on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2009;29:70–5.
31. Church MW, Kaltenbach JA, Blakley BW, Burgio DL. The comparative effects of sodium thiosulfate diethyldithiocarbamate fosfomycin and WR-2721 on ameliorating cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res.* 1995;86:195–203.
32. Kaltenbach JA, Church MW, Blakley BW, McCaslin DL, Burgio DL. Comparison of five agents in protecting the cochlea against the ototoxic effects of cisplatin in the hamster. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;117:493–500.