

O uso de *Maytenus ilicifolia* na prevenção da ototoxicidade induzida pela cisplatina

The use of *Maytenus ilicifolia* to prevent cisplatin-induced ototoxicity

Cristiane Akemi Kasse¹, Oswaldo L M Cruz², Luis C
N Iba³, Henrique O Costa⁴, Elaine C Lopes⁵, Flávia
Coelho⁶

Palavras-chave: maytenus, radicais livres, toxicidade de
drogas.

Keywords: maytenus, free radicals, drug toxicity.

Resumo / Summary

Maytenus ilicifolia é uma planta sul americana apresenta várias propriedades medicinais, entre elas, a ação antioxidante. **Objetivo:** Por meio de um modelo original de ototoxicidade induzida pela cisplatina, verificar uma possível ação otoprotetora do extrato aquoso desta planta. **Material e método:** Estudo clínico e experimental com cobaias fêmeas, albinas divididas em 5 grupos: 9 animais recebendo somente 3 doses de 7,5mg/kg/d do protocolo de cisplatina, 4 animais somente com o extrato, 10 animais com cisplatina e 1g/kg/d de extrato por 8 dias, 5 animais com cisplatina e 3g/kg/d do extrato por 8 dias e 5 animais recebendo extrato por 3 semanas e cisplatina na última semana. Os exames foram emissões otoacústica por produtos de distorção, potencial de tronco encefálico pré e após administração de cisplatina e, microscopia eletrônica de varredura. **Resultados:** Os animais que receberam a cisplatina com o extrato, independente da dose, obtiveram alterações em todos os testes, com lesões na região basal na microscopia eletrônica. **Conclusão:** Apesar do efeito antioxidante da *Maytenus ilicifolia*, ela não foi suficiente para bloquear o efeito ototóxico da cisplatina.

Maytenus ilicifolia is a native plant from South America, with several medicinal properties including antioxidant effects. **Aim:** using an original cisplatin induced ototoxicity model, we evaluated a possible otoprotection caused by *Maytenus ilicifolia* extract. **Materials and methods:** clinical and experimental study design with female albino guinea pigs divided in groups as follows: 9 animals receiving cisplatin only (three doses of 7.5mg/kg/day), 4 animals receiving the plant extract only, 10 animals receiving the cisplatin protocol and 1g/kg/day of extract for 8 days, 5 animals with cisplatin and 3g/kg/day of extract for 8 days, and 5 animals receiving extract for 3 weeks and cisplatin in the last week. The tests were distortion product otoacoustic emissions, brainstem auditory response, before and after medication and scanning electron microscopy. **Results:** the animals receiving cisplatin plus plant extract, had alterations in all the tests, showing lesions on the basal cochlear region under electron microscopy. **Conclusions:** Despite of the plant extract's antioxidant effect, it was not sufficient to protect the cochlea against cisplatin ototoxicity.

¹ Mestre e Doutora pela Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-EPM. Professora Pesquisadora da Universidade Bandeirantes, UNIBAN.

² Prof. Livre docente pela Universidade de São Paulo, USP, Prof. Afiliado da disciplina de Otorrinolaringologia da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP.

³ Mestre pela da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Doutorando pela Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP.

⁴ Doutor pela Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Prof. da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

⁵ Doutora em farmacologia pela Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Pesquisadora do Instituto de Ciências Avançadas em otorrinolaringologia, ICAO.

⁶ Veterinária da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e do Hospital Sírio Libanês. Pesquisadora do Instituto de Ciências Avançadas em otorrinolaringologia, ICAO. Departamento de distúrbios da comunicação humana, disciplina de Otorrinolaringologia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Endereço para correspondência: Av. Fagundes Filho 789 apto. 91 V. Monte Alegre São Paulo 04304-011.

E-mail: cristianekasse@yahoo.com.br

FAPESP, CAPES.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 20 de maio de 2007. cod.4533

Artigo aceito em 1 de fevereiro de 2008.

INTRODUÇÃO

O grande desafio da Otologia neste século é o estudo e o tratamento das disacusias sensoriais, cada vez mais frequentes, devido à exposição aos ruídos, envelhecimento, provocado por medicamentos etc. Os estudos recentes com plantas medicinais¹⁻³ despertaram um grande interesse em nosso grupo na busca de alguma propriedade otoprotetora para atenuar ou bloquear as lesões cocleares.

A *Maytenus ilicifolia* é uma planta nativa de muitas partes da América do sul e sudeste do Brasil, com várias possíveis ações medicinais como analgésica, antiinflamatória¹, antitumoral, antiulcerosa² e antioxidante³. Escolhemos a *Maytenus ilicifolia* para verificar uma possível ação otoprotetora, pelo fato de apresentar propriedades antioxidantes (presença de flavonóides e de agentes alcalóides)^{4,5}, baixo efeito colateral no homem, minimizando ações tóxicas de diversos agentes⁶⁻⁸.

Para provocar as lesões na cóclea, escolhemos a cisplatina, um importante quimioterápico para combate de tumores sólidos, em adultos e crianças, que provoca lesão auditiva, às vezes de modo irreversível, além de ser nefrotóxico⁹, com efeitos colaterais gastrointestinais e neurológicos importantes^{10,11}. A cisplatina lesa várias estruturas da cóclea, desde as células ciliadas, células de suporte, estria vascular e nervo auditivo^{12,13}. O mecanismo de ação da cisplatina é a produção de radicais livres, interferindo sobre o sistema antioxidante da célula, acarretando a morte celular¹⁴. O grau de lesão depende da dose administrada e de sua via¹². Testamos alguns protocolos de ototoxicidade em cobaias¹⁵⁻¹⁷. Não observamos o grau de lesão referido em alguns destes¹⁷ ou houve um alto índice de mortalidade com as doses propostas para desencadear a ototoxicidade¹⁶. Por esta razão, desenvolvemos um protocolo original no qual obtivemos lesões nos três giros da cóclea, ratificado pelos exames de produtos de distorção das emissões otoacústica (PDEOA), potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) e microscopia eletrônica de varredura (ME), com menor índice de letalidade. A dose ideal foi de 22,5 mg/kg, intraperitoneal, dividida em 3 doses, com espaço de 5 dias entre a primeira e a segunda dose e de 1 dia entre as últimas doses¹⁸.

O objetivo deste estudo foi verificar a possível ação otoprotetora do extrato aquoso da *Maytenus ilicifolia* em cobaias tratadas com cisplatina por meio de estudos funcionais.

METODOLOGIA

Estudo clínico e experimental com a aprovação do comitê de ética da universidade (Número 1461/04). Os animais escolhidos foram as cobaias fêmeas albinas entre 3 a 4 meses de vida, pesando entre 350 a 450g. A escolha do peso, da ausência de pigmentação e do gênero, baseou-se na observação clínica e dados da literatura¹⁹,

relacionados à sensibilidade, à ototoxicidade pela cisplatina, maior sobrevivência dos animais e uniformidade nas respostas dos exames. Todos os animais eram saudáveis e com otoscópias normais.

Obtenção do Extrato Aquoso (EA) de *Maytenus ilicifolia*

A *Maytenus ilicifolia* foi fornecida pelo Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas onde a espécie é cultivada, pelos Drs. Pedro Mellilo Magalhães e Ílio Montanari Jr., sob condições agrônômicas controladas: fertilidade do solo, umidade, radiação solar, temperatura, herbívora e poluição do solo.

O pó das folhas de *Maytenus ilicifolia* foi extraído por infusão (5%, 50 g/l) em água durante 30 minutos à temperatura de 73°C. O infuso obtido foi filtrado, concentrado até 150 ml em rota evaporador sob vácuo a 50°C e liofilizado dando origem EA de *Maytenus ilicifolia*.

Avaliação da função auditiva

Todos os animais foram submetidos aos exames de PEATE e PDEOA com a intenção de se mensurar o limiar auditivo e a integridade das células ciliadas externas (CCEs), realizados com aparelho Bio-logic, modelo Navigator-Pro e Audix. As cobaias foram sedadas com xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de ketamina (40 mg/kg).

O ambiente era acusticamente adequado e os eletrodos foram posicionados na região mastóide de cada orelha a ser examinado e no vértice da cabeça, com os fones de ouvido nas orelhas correspondentes.

O estímulo do PEATE foi do tipo click, monocal, com filtro entre 0.1 a 1,5 kHz, 10,66ms de janela, duração do click de 100ms, a taxa do estímulo foi de 13,3 vezes por segundo, ganho em média de 50.000, visualizado pelo osciloscópio. As frequências analisadas foram de 1 a 3 kHz. Limiar definido como a menor intensidade que reproduz os traços de deflexão das ondas. As respostas foram determinadas em SPL (nível de pressão sonora).

Utilizamos a PDEOA por ser um exame altamente sensível para lesões em CCEs provocadas pela cisplatina^{15,16}. Analisamos as respostas nas frequências de 500, 1, 2, 3,4 e 8 kHz, com intensidade de L1 e L2 de 65 a 55 SPL, respectivamente e relação F1/F2 de 1,2. Uma sonda responsável pela emissão dos sons (f1 e f2) posicionada na orelha analisada até obtermos a resposta. Comparamos os parâmetros de ruído de fundo (NF) e a resposta (DP) e analisamos a diferença entre ambos (DP-NF) antes e depois do tratamento.

As cobaias com alterações prévias em algum dos testes foram automaticamente excluídas.

Estudo com microscopia eletrônica de varredura

Realizamos a microscopia eletrônica de varredura nos animais, para exemplificar as lesões provocadas pela cisplatina nas CCEs, principalmente no giro basal¹⁶ e obser-

var as possíveis alterações morfológicas naquelas tratadas com o extrato aquoso.

Após o término da medicação, as cobaias foram sacrificadas através da injeção letal de anestésico (ketamina), decapitadas e as cócleas dissecadas por técnica microcirúrgica.

Fixamos a cóclea através da técnica de perfusão, com solução de glutaraldeído 2,5%, tamponado com acetato até pH 7, 4, por 24 hs, sendo injetado também através da janela redonda uma quantidade suficiente para saída da perilinfa pelo ápice. A seguir o material foi colocado em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 12 horas. Seguimos para a etapa da desidratação com etanol em aumento gradual de concentração de 50% a 100%, sendo cada etapa com duração de 30 minutos. Realizamos o ponto crítico por 60 minutos e banho de ouro por 1 hora. As amostras foram colocadas nos suportes e fixadas com esmalte e visualizadas no aparelho JEOL modelo 5300 de ME, na magnitude de 1500 a 2000X. Observamos as três camadas de CCEs e uma camada de células ciliadas internas (CCIs), nos três giros e meio, escolhemos as áreas com menos artefato e com menos perda de tecido. Os giros foram colados separadamente e as áreas de difícil visualização foram desprezadas.

Tratamentos

Os grupos foram divididos conforme o esquema abaixo:

Grupo 1: 10 cobaias (20 orelhas) com 3 doses de cisplatina (7,5 mg/kg/d), no 1º, 5º e 6º dias.

Grupo 2: 10 cobaias (20 orelhas) utilizando somente o EA 3 g/kg/d por 7 dias.

Grupo 3: 10 cobaias (20 orelhas) utilizando 1 g/kg/d do EA por dia por 7 dias e 3 doses de cisplatina.

Grupo 4: 5 cobaias (10 orelhas) utilizando 3 g/kg/d do EA por dia por 7 dias e 3 doses de cisplatina.

Grupo 5: 5 cobaias (10 orelhas) com 3 semanas de EA 1g/kg/d e 3 doses de cisplatina na última semana.

As cobaias foram sacrificadas 24 horas após a última dose da cisplatina. A administração do extrato foi via oral, com jejum prévio de 4 horas, uma vez ao dia, com início dia antes da primeira dose de cisplatina.

Realizou-se o PEATE e o PDEOA antes do início da medicação e 24 horas após a última dose administrada. O ganho e a perda ponderal também foram anotados. Comparamos os resultados pré e pós-tratamento.

Metodologia estatística

Analisamos os dados de cada orelha de cada cobaia, separadamente, como se fosse um dado isolado e depois os agrupamos em grupos, pois cada uma das orelhas apresentou uma resposta com um valor diferente nos testes, variação interindividual, dentro da normalidade, principalmente no PDEOA.

Aplicamos o teste de ANOVA para analisar os dados dos resultados obtidos no teste de PEATE, com nível de significância de 5%. Para analisar os resultados do teste de PDEOA, utilizamos o teste qui-quadrado com o mesmo valor de significância.

RESULTADOS

PDEOA

Os dados das médias das diferenças dos valores do DP antes e após o tratamento, com a aplicação do teste estatístico, estão inseridos na Tabela 1. O grupo tratado somente com o EA (grupo 2) apresentou em todos os valores das frequências, diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$) em relação ao grupo tratado somente com cisplatina (grupo 1). Observamos que somente nas frequências (GM-geometric mean) de 7206, 5434 e 2730 houve diferença estatística entre os grupos tratados com o EA e a cisplatina (grupos 3, 4 e 5) em comparação com o grupo 1 (somente cisplatina), porém nas outras 5 frequências não observamos esta diferença.

Tabela 1. Média dos valores do DP-NF pré menos DP-NF após tratamento em cada grupo de acordo com a média geométrica das frequências (GM).

Grupos	Frequências (GM)							
	7206	5434	3616	2730	1818	1352	886	676
1	37,33	35	15,5	23	18	4	7,67	7
2	-11,6	-2,1	-1,5	-4,6	-0,9	-1,4	4,2	-1,2
3	52,0	40,0	31,0	21,3	16,3	19,3	1,5	10,0
4	28,0	21,6	22,3	16,0	21,0	4,0	24,0	6,7
5	18	23,10	20,5	28	21	6,67	14	7,7
p	< 0.001	0.018	0.14	0.001	0.694	0.40	0.572	0.230

PEATE

Os resultados dos exames pré e pós-medicação estão inseridos na Tabela 2, considerando a média (M) e o desvio-padrão (DP).

O grupo 1 apresentou um aumento importante dos limiares após a medicação, em comparação com o grupo que somente usou o EA (grupo 2) e este dado foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$). Analisando os valores das respostas dos grupos 3,4 e 5 (grupos com cisplatina e EA) com o grupo 1 (somente cisplatina), obtivemos o $p = 0,31$, sem diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2. Valor médio e DP do PTE antes e depois do tratamento, sendo M (média) e DP (desvio padrão).

Grupos					
	1	2 *	3**	4**	5**
Média	90	42	98	89	91
DP	16,8	7	14	11	15
n	18	10	20	10	10

* $p < 0,001$ (grupo 1 x grupo 2) ** $p = 0,31$ (grupo 1 x grupos 3,4,5)

Microscopia eletrônica de varredura

Quanto às alterações morfológicas na microscopia eletrônica de varredura em algumas cobaias, observamos lesões severas (mais de 70% de perda de CCEs) e totais (100% de perda de CCEs), nos giros médio e principalmente basal, nas cobaias que foram tratadas somente com cisplatina (Figura 1). As cobaias tratadas com o EA, independente da dose, apresentaram lesões severas, com conservação de algumas CCEs.

A Figura 1 representa uma foto de ME de uma cobaia do grupo 1 em que se observa uma extensa lesão das CCEs no giro basal. A Figura 2 representa a ME das CCEs de uma das cobaias do grupo 2 em que as estruturas estão preservadas.

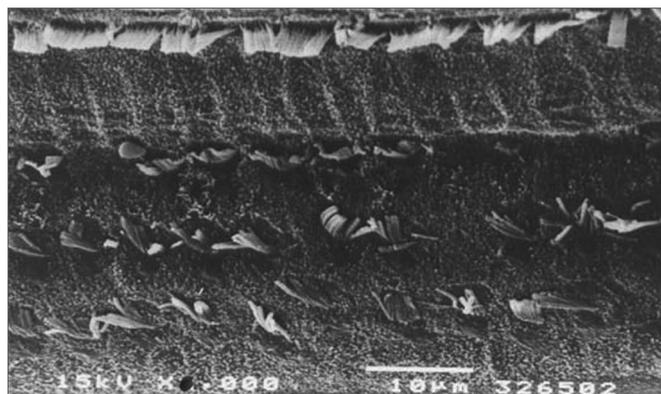


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de um animal do grupo 1. Observa-se extensa lesão nas CCEs, na porção basal da cóclea. Escala = $10\mu\text{M}$. Magnificação de 1500X.

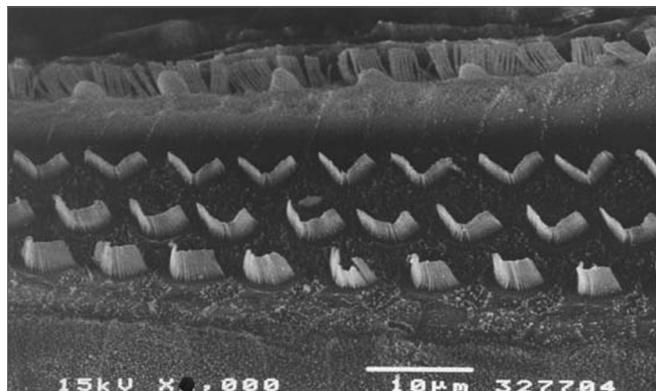


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de um animal do grupo 2. Observa-se preservação dos cílios das CCEs, na porção basal da cóclea. Escala = $10\mu\text{M}$. Magnificação de 2000X.

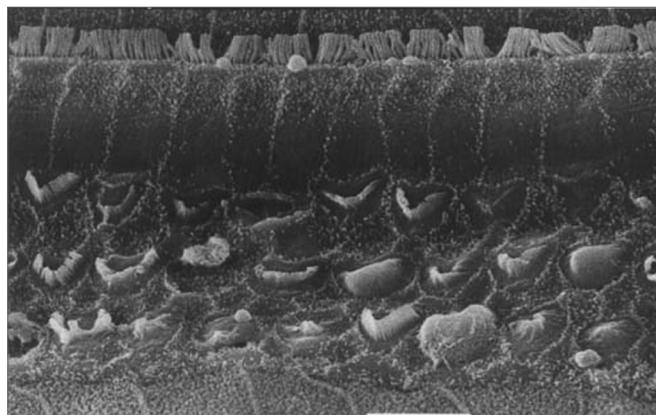


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de um animal do grupo 3 (tratado com cisplatina e EA), com lesão extensa das CCEs, na porção basal da cóclea. Escala = $10\mu\text{M}$. Magnificação de 2000X.

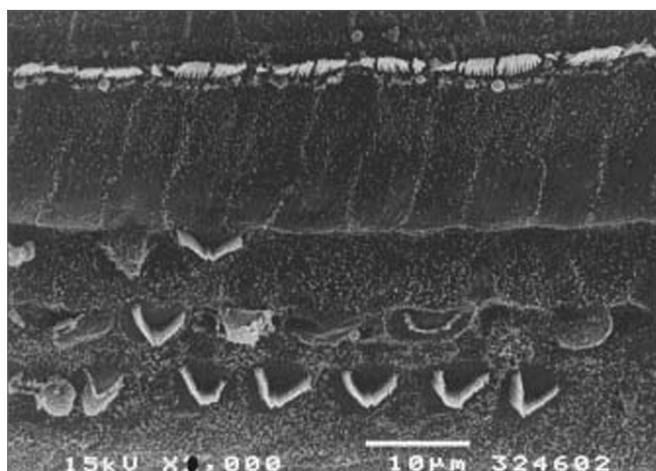


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de um animal do grupo 4 (tratado com cisplatina e EA- 3g/d), com lesão menos intensa das CCEs, na porção basal da cóclea. Escala = $10\mu\text{M}$. Magnificação de 2000X. *Maytenus ilicifolia* na prevenção da ototoxicidade induzida pela cisplatina.

As Figuras 3, 4 e 5 são imagens das CCEs no giro basal de cobaias dos grupos 3, 4 e 5 com uma grande área de perda de células ciliadas, preservação de algumas células edeformação de suas estruturas.

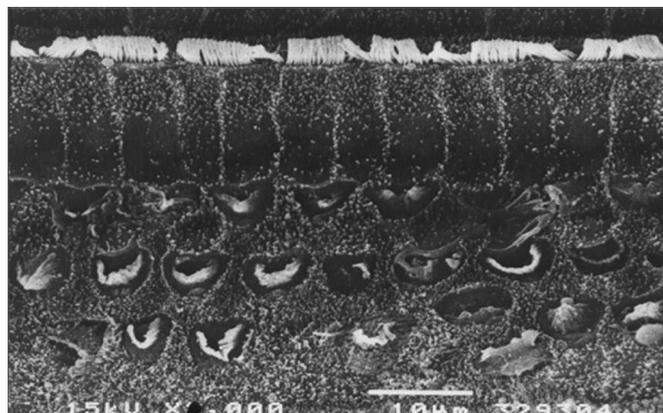


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura de um animal do grupo 5 (tratado com cisplatina e EA por 3 semanas), com lesão extensa das CCEs, na porção basal da cóclea. Escala = 10µM. Magnificação de 2000X.

Condições clínicas e peso

As cobaias tratadas conjuntamente com EA não ficaram com a pelagem eriçada, não diminuíram a ingestão de água e alimento, eram mais ativas e o aspecto físico final era melhor. A exceção foi observada somente naquelas tratadas por três semanas (Tabela 3).

A mortalidade do grupo que usou somente cisplatina (grupo 1) foi de 50%, os grupos 2, 4 e 5 não apresentaram mortalidade e o grupo 3, 20% dos animais não sobreviveram acima de 5 dias.

dação “in vitro”, por meio da produção de espécies reativas (agentes antioxidantes) em cérebro de ratos.

Oliveira et al.²², através do estudo de hemácias e proteínas do plasma, com tecnécio radioativo, também sugeriram a presença de agentes antioxidantes no extrato da planta.

Melo et al.²³ induziram a produção de radicais livres em bactérias do tipo E. Coli após serem tratados com SnCl₂ e compararam a *Maytenus ilicifolia* com a *Cymbopogon citratus* e a *Baccharis genistelloides* quanto às suas propriedades antioxidantes. A *Maytenus* foi superior em relação às outras plantas.

Neste trabalho, o EA de *Maytenus ilicifolia* foi administrado em doses de 1g/d por 8 dias e 3g/d por 8 dias, 24 horas antes e junto com a cisplatina, para verificar a possível ação otoprotetora da planta, através do seu mecanismo de ação antioxidante.

Independente da dose administrada de EA, a medicação não bloqueou a agressão produzida pela cisplatina nas CCEs, confirmados pelos testes auditivos. Apesar de os resultados do teste de PDEOA mostrarem respostas estatisticamente significantes em algumas frequências, em relação ao grupo de cisplatina, a maioria das frequências apresentou respostas ruins. Este fato pode ser explicado observando na microscopia de varredura de algumas cobaias, lesões na maioria das CCEs, porém, em algumas fileiras, algumas células estavam conservadas ou somente com alterações estruturais, sem perda dos cílios, podendo talvez, gerar uma boa resposta em algumas frequências nos PDEOA.

O EA também conservou melhor as condições físicas dos animais com menor perda de peso e menor letalidade. Mesmo ao utilizarmos o EA previamente à ad-

Tabela 3. Variação da média dos pesos das cobaias durante o tratamento e no dia da eutanásia, e a perda (-) ou ganho () médio.

Grupos	Média do 1º dia (peso g)	Média do 5º dia (peso g)	Média do 6º dia (peso g)	Dia da eutanásia (peso g)	Varição (peso g)
1	497.5	469	457.4	427.2	-70.2
2	470.4	486	480.8	49.06	20.2
3	400.5	370	357.5	347.9	-52.6
4	426	411	408	388.6	-37.4
5	531.6	482.8	481.8	456.8	-74.8

DISCUSSÃO

A flora brasileira é estimada entre 40.000 a 60.000 espécies de plantas, sendo considerado um país com grande potencial para produzir medicações. A *Maytenus ilicifolia* é uma destas plantas largamente estudadas, com efeitos medicinais já comprovados²⁰⁻²⁴.

Mattei e Carlini¹¹ verificaram que o extrato de *Maytenus ilicifolia* exerce uma importante atividade antioxidante, através do método de inibição do processo de lipoperoxidação

da cisplatina, pensando em um mecanismo de produção de antioxidantes antecedendo a administração do agente ototóxico, não houve uma maior preservação da audição (grupo 5).

Algumas hipóteses podem explicar esses resultados. O EA atua, de certa forma, preservando as condições clínicas das cobaias expostas à cisplatina, por meio de possíveis ações antioxidantes nos outros órgãos, pois a perda de peso e a mortalidade foram nitidamente diferentes en-

tre os grupos. Entretanto, o metabolismo nestes órgãos difere do aparelho auditivo e, especificamente neste, a influência da medicação não foi suficiente para bloquear totalmente a ação ototóxica da cisplatina. Uma segunda hipótese seria a de que o EA não ultrapassaria a barreira hematoencefálica para atingir a cóclea, explicando desta forma a atuação somente em alguns órgãos. Uma terceira hipótese seria a de que o mecanismo de bloqueio de radicais livres proporcionado pelo EA seria insuficiente, na dose administrada, para atuar diante do grau de agressão provocado pela cisplatina no órgão de Corti.

CONCLUSÃO

O EA de *Maytenus ilicifolia* não apresenta efeito otoprotetor suficiente contra as doses de cisplatina administradas neste estudo, porém preserva melhores condições físicas dos animais e diminui a letalidade pelo quimioterápico.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi patrocinada pela FAPESP e pela ICAO. A autora Cristiane foi bolsista da CAPES neste período.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira MAS, Januário AH, Queiroz MEC, Carvalho D, França SC. *Maytenus aquifolia* e *Maytenus ilicifolia*: polimorfismo e perfil químico. XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, anais, res. 06.011, 1998, Águas de Lindóia, SP.
2. Macaubas CIP, Oliveira MGM de, Formigoni MLO, Silveira Filho NG da, Carlini EA. Estudo da eventual ação antiúlcera gástrica do Bálamo (*Sedum* sp) Folha de Fortuna (*Bryophyllum calycinum*) Couve (*Brassica oleraceae*) e de Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. Central de Medicamentos (Brasil). Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* "espinheira-santa" e outras). Brasília, Central de Medicamentos 1988; p.5-20.
3. Stellfeld CA. A Espinheira-Santa: contribuição ao estudo farmacognóstico. Boletim da Associação Brasileira de Farmácia 1934;15:551-70.
4. Ahmed MS, Fong HHS, Soejarto DD, Dobberstein RH, Waller DP. High performance liquid chromatograph separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. J Chromatography 1981;213:340-4.
5. Xavier HS & D'Angelo LCA. Perfil cromatográfico dos componentes polifenólicos de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil 1992, Curitiba, PR.
6. Pereira MV. Contribuição ao estudo do princípio ativo e outros constituintes básicos do *Maytenus ilicifolia*. Rev Bras Quim 1962;54(322):416-7.
7. Ohsaki A, Imai Y, Naruse M, Ayabe SI, Komiyama K, Takashima J. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. J Nat Prod 2004;67(3):469-71.
8. Mattei R & Carlini EA. Propriedades antioxidantes (lipoperoxidação) da *Pfaffia paniculata*, *Heteropteris aphrodisiaca* e *Maytenus ilicifolia*: estudo in vitro. XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil 1998, Águas de Lindóia, SP.
9. Ekborn A, Lindberg A, Laurell G, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. Cancer Chemother Pharmacol 2003;51(1):36-42.
10. Schell MJ, McHaney VA, Green AA. Hearing loss in children receiving cisplatin with or without prior cranial irradiation. J Clin Oncol 1989;7:754-60.
11. Faustini SA, Schechter MA, Rapport BZ, Frey MF, Mass RE. Cisplatin ototoxicity: selected case reports. Cancer 1984;53:224-31.
12. Laurell G & Bagger-Sjoberg D. Degeneration of organ of Corti following intravenous administration of cisplatin. Acta Otolaryngol (Stock) 1991;111:891-8.
13. Hinoja R, Riggs LC, Strauss M et al. Temporal bone histopathology of cisplatin ototoxicity. Am J Otol 1995;16:731-41.
14. Ravi R, Somani SM, Rybak LP. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. Pharmacol Toxicol 1995;76:386-94.
15. Hyppolito MA, Oliveira JA, Rossato M, Holanda F. Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. Rev Bras Otorrinolaringol 2003;69(4):504-11.
16. Hyppolito MA, Oliveira JA, Lessa RM, Rossato M. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produzidas por distorção e microscopia eletrônica de varredura. Rev Bras Otorrinolaringol 2005;71(3):268-73.
17. Saito T, Aran JM. Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. ORL 1994;56:320-5.
18. Iha L, Kasse C, Neto OM, Almeida CR, Cruz OLMC. Ototoxicidade induzida pela cisplatina em cobaias: efeito dose-dependente- avaliação funcional. Acta ORL 2007;25:112-8.
19. Schweitzer VG. Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. Laryngoscope 1993;103:1-52.
20. Lima OG, Coelho JSB, Weigert E, D'Albuquerque IL, Souza MAM. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Rev Inst Antibiot 1971;11:35-8.
21. Souza-Formigoni ML, Oliveira MG, Monteiro MG, da Silveira-Filho NG, Carlini EA. Antiulcerogenic effect of two *Maytenus* species in laboratory animals. J Ethnopharmacol 1991;34:21-7.
22. Oliveira JF, Braga ACS, Oliveira MBN, Ávila AS, de Araújo AC, Cardoso VN, Bezerra RJAC, Bernardo-Filho M. Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labelling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. J Ethnopharmacol 2000;72:179-84.
23. Melo SF, Soares SF, Costa RF, Silva CR, Oliveira MBN, Bezerra RJAC, de Araújo AC, Cardoso VN, Bernardo-Filho M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. Mutat Res 2001;496:33-8.
24. Mossi AJ, Cansian RL, Carvalho AZ, Dariva C, Vladimir OJ, Mazutti M, Filho IN, Echeverrigaray S. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO₂. Fitoterapia 2004;75(2):168-78.