

Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de varredura

Amifostine otoprotection to cisplatin ototoxicity: a guinea pig study using otoacoustic emission distortion products (DPOEA) and scanning electron microscopy

Miguel Angelo Hyppolito¹, José Antonio A. de Oliveira², Ricardo Miranda Lessa³, Maria Rossato⁴

Palavras-chave: ototoxicidade, cisplatina, amifostina.
Key words: cisplatin, otoprotective agents, amifostine.

Resumo / Summary

A Cisplatina é uma potente droga antineoplásica, largamente utilizada para o tratamento do câncer, tanto em adultos quanto em crianças. Dentre seus efeitos colaterais, a ototoxicidade se apresenta como um dos mais importantes e leva à perda auditiva irreversível, bilateral, para as altas frequências (4KHz -8KHz). Estudos têm tentado identificar drogas que, associadas à cisplatina, possam atuar como otoprotetores. Sabe-se que o mecanismo da ototoxicidade pela cisplatina está relacionado a alterações nos mecanismos antioxidantes das células ciliadas, principalmente as células ciliadas externas da cóclea. A amifostina tem conhecida ação antioxidante, com conhecido efeito otoprotetor aos efeitos lesivos da radioterapia. **Objetivo:** Nossa proposta foi avaliar através de emissões otoacústicas, por produtos de distorção (EOAPD) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a existência de possível efeito otoprotetor da amifostina no tratamento com cisplatina. **Forma de estudo:** Experimental. **Material e método:** O estudo foi realizado em cobaias albinas, que foram divididas em três grupos: Grupo 1: 6 animais -12 orelhas - cisplatina 8,0 mg/Kg/dia (via intraperitoneal) por três dias; Grupo 2: 6 animais - 12 orelhas - amifostina 100 mg/Kg/ dia (via intraperitoneal) e 90 minutos após, cisplatina 8,0 mg/Kg/dia (via intraperitoneal) por três dias; Grupo 3: 03 animais - 06 orelhas - amifostina 100 mg/Kg/dia (via intraperitoneal) por três dias. **Resultado:** Encontramos EOAPD presentes e células ciliadas externas presentes, sem lesão anatômica a MEV, nos grupos 2 e 3. Concluímos que a amifostina, por sua ação antioxidante, atua como otoprotetor a ototoxicidade pela cisplatina. No entanto, seu uso não é recomendável nos casos de tumores potencialmente curáveis, por não se saber exatamente a influência da cisplatina na eficácia da quimioterapia.

Cisplatin is an antineoplastic drug for cancer treatment in children and adults. The side effects of cisplatin ototoxicity are significant: irreversible bilateral hearing damage to high frequencies (4 kHz - 8 kHz). Reports recognize some drugs that are associated with cisplatin to obtain an otoprotector effect. The ototoxicity mechanisms of cisplatin are related to injury of hair cell oxidation mechanism, especially of outer hair cells. **Aim:** Using otoacoustic emissions distortion products (DPOEA) and scanning electron microscopy we intended to verify the action of amifostine, a radioprotective drug that has well known antioxidant characteristics and otoprotector effects to cisplatin injury. **Study design:** Experimental. **Material and Method:** We used an experimental guinea pig model. The study was performed as follows: group 1: 6 animals, 12 ears, cisplatin 8.0 mg/Kg/day (IP), 3 days. Group 2: 6 animals, 12 ears, amifostine 100 mg/Kg/day (IP) and after 90 minutes, cisplatin 8.0 mg/Kg/day (IP), 3 days and group 3: 3 animals, 6 ears, amifostine 100 mg/Kg/day (IP), 3 days. **Results:** DPOEA were present before and after treatment in groups 2 and 3. The normal cilium architecture of outer hair cells was supported in all cochlear turns in groups 2 and 3. We concluded that amifostine has a potential otoprotector effect against cisplatin ototoxicity and could be used in clinical trials.

¹ Doutor em Medicina, Prof. Dr. da FMRP - USP (médico-assistente).

² Professor Titular, Coordenador da Divisão de Otorrinolaringologia do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço - FMRP-USP.

³ Mestre, Pós-Graduando da Divisão de Otorrinolaringologia do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço - FMRP-USP.

⁴ Técnico de Laboratório.

Endereço para correspondência: Prof. Dr. José Antonio A. de Oliveira - Área de Otorrinolaringologia do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Campus USP - Av. Bandeirantes 3900 Ribeirão Preto SP 14049-900.

Tel (0xx16) 602-2863 - Fax (0xx16) 602-2860.

Artigo recebido em 08 de março de 2005. Artigo aceito em 24 de maio de 2005.

INTRODUÇÃO

A melhora na sobrevivência dos pacientes com câncer, com a utilização de drogas antineoplásicas mais efetivas, como a cisplatina, tem favorecido o aumento na incidência de seus efeitos colaterais, particularmente no sistema nervoso central, rins e a ototoxicidade.¹

Assim sendo, diferentes substâncias têm sido estudadas buscando a proteção destes efeitos, sem reduzir a atividade antitumoral da cisplatina.

A cisplatina causa uma perda auditiva neurosensorial bilateral e simétrica nas frequências de 4 a 8 KHz, com a associação do sintoma de zumbido.²

A incidência de ototoxicidade é aumentada à medida que se aumenta a dose acumulada de cisplatina acima de 200 mg/m² de superfície corporal. Com os estudos através de audiometria de altas frequências, a incidência da perda auditiva aumenta, chegando até 70%, para frequências até 16 KHz.³

McAlpine e Johnstone, 1990, em estudo experimental em cobaias, observaram lesão às células ciliadas externas cocleares, na espira basal da cóclea, sem alterar a stria vascularis.⁴

Estudos da década de 90 mostram que a cisplatina inibe a atividade da adenil ciclase na stria vascularis, inibe o DNA e RNA, a síntese protéica e atua aumentando os níveis de radicais livres de oxigênio, tóxicos para a célula.⁵

Ravi, 1995, mostra que a cóclea pode estar sofrendo alterações na sua capacidade antioxidante, com redução nos níveis de glutathion coclear, diminuição na glutathion oxidase e aumento na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase.⁶

Diferentes drogas otoprotetoras têm sido testadas, sendo que a maioria atua como anti-radical livre celular, entre elas a amifostina. (WR 2721, ácido S - 2[3-aminopropilaminol ethilphospho-rothiol), desenvolvida pelo Walter Red Army Institute, na década de 1950, com o objetivo de proteção aos efeitos tóxicos da radioterapia, sem alterar seu potencial antitumoral.^{7,8}

Yuhás e Culo, 1980, foram os primeiros a mostrar que a amifostina promove uma diminuição na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, sem alterar sua atividade antitumoral, confirmados posteriormente pelos estudos de Glover et al., 1986 e 1987.^{7,9,10}

Mollman et al., 1988, mostraram uma discreta redução na ototoxicidade pela cisplatina em pacientes tratados previamente com amifostina.¹¹ Rubin et al., 1995, mostrou que não houve ototoxicidade em nenhum dos pacientes tratados com amifostina e cisplatina para as frequências da fala.¹²

A amifostina é convertida em um composto ativo sulfídrico, denominado WR1065, que atua como citoprotetor, quelando radicais livres. Existe proteção seletiva da amifostina a células de tecido normal, devido à alta concentração deste composto nestas células em relação à célula tumoral. Tal fato é explicado pela redução na atividade da fosfatase alcalina nas células tumorais, pela baixa vascularização tumoral

e pelo metabolismo anaeróbico tumoral que causa um meio com pH muito baixo, o que não permite a entrada do WR1065 no meio intracelular, pois este necessita de um pH entre 6,6 a 8,2.^{7,8}

A amifostina foi aprovada pelo FDA para uso em pacientes recebendo cisplatina, na década de 80, para prevenir a nefrotoxicidade da cisplatina¹³. No entanto, seu uso não é recomendável nos casos de tumores potencialmente curáveis, por não se saber exatamente a influência da cisplatina na eficácia da quimioterapia.^{12,14}

Não encontramos na literatura estudos experimentais que confirmam a proteção às células ciliadas externas cocleares pela amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina.

Dois estudos experimentais em "Hamsters", utilizando-se de microscopia eletrônica de superfície e potencial auditivo evocado de tronco cerebral, testaram o potencial de otoproteção da amifostina e outras drogas aos efeitos da cisplatina. Mostraram que o tiosulfato de sódio e o dietilditiocarbamato são mais efetivos como otoprotetores do que a amifostina e a fosfomicina.^{15,16}

Propusemos estudar os efeitos otoprotetores da amifostina aos danos causados pela cisplatina às células ciliadas externas, utilizando medidas funcionais através de emissões otoacústicas por produtos de distorção e avaliação anatômica dos danos causados às células ciliadas externas, por microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção dos Animais Experimentais

Elegemos como animal experimental cobaias albinas, pelo fácil manejo, pela facilidade de dissecação coclear e manipulação, facilidade para vias de infusão das drogas anestésicas e drogas em experimentação pela via intraperitoneal e por serem mais sensíveis aos efeitos da cisplatina, sendo que com a dose de 8,0 mg/Kg/dia por três dias consecutivos, apresentam alterações cocleares significativas.

A cobaia possibilita manutenção adequada, segundo as diretrizes do guia para cuidados e uso de animais de laboratório do Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, DC. (1996).

Os animais foram selecionados no Biotério Central da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto, através da pesquisa do reflexo de Preyer. Escolhemos animais com peso variando entre 400 e 600 gramas, por serem animais mais resistentes aos efeitos colaterais sistêmicos da cisplatina, como inapetência, perda de peso, desidratação e diarreia.^{17,18}

Após um repouso auditivo de 24 horas, os animais eram reavaliados e, desta vez, realizávamos a otoscopia manual. Os animais que apresentavam sinais de otite externa ou média aguda, cerume de difícil remoção, alterações inflamatórias do conduto auditivo externo, ou mesmo conduto auditivo muito estreito para acomodar ade-

quadamente a sonda do equipamento de emissões otoacústicas, eram descartados do experimento e os que apresentavam apenas rolha de cerume de fácil remoção eram mantidos.

Submetiam-se então as cobaias a uma triagem auditiva por EOAPD em cabine com isolamento acústico e sob anestesia com Ketamina (65 mg/Kg) e Xylasina (6,5 mg/Kg). As que apresentavam EOAPD presentes, em pelo menos uma das orelhas, eram selecionadas para o experimento.

Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Por se tratar de um experimento com utilização de drogas sistêmicas, para cada animal consideramos duas cócleas e o animal que apresentou EOA presente em uma única orelha foi utilizado.

Drogas Utilizadas, Doses e Via de Administração

1. Cisplatina (10 mg/ml) - 0,75; 1,5 e 8,0 mg/Kg/dia via intraperitoneal;
2. Xilazina (2g/100ml) - 6,5mg/Kg via intraperitoneal;
3. Cloridrato de Cetamina (50 mg/ml) - 65mg/Kg - via intraperitoneal;
4. Amifostina 100 mg/ Kg/ dia - via intraperitoneal.

Para a aplicação controlada das drogas em teste, foram utilizadas seringas descartáveis de 1cc, milimetradas para cada animal. Para a aplicação intraperitoneal utilizou-se de agulhas descartáveis BD tamanho 21G1 (25 X 8 - 0.8 x 25 milímetros).

Grupos de Estudo

Grupo 1: 06 animais - 12 orelhas - dose de cisplatina de 8,0 mg/Kg/dia, por via intraperitoneal, por três dias.

Grupo 2: 06 animais - 12 orelhas - dose de Amifostina de 100 mg/Kg/dia, por via intraperitoneal e 90 minutos após, cisplatina 8,0 mg/Kg/dia, por via intraperitoneal por três dias.

Grupo 3: 03 animais - 06 orelhas - dose de Amifostina de 100 mg/Kg/ dia, por via intraperitoneal por três dias.

Avaliação Funcional Auditiva

Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção

Equipamento: ILO 92 CAE System Otodynamics LTD

As cobaias eram anestesiadas com Cloridrato de Cetamin e Xylasina para serem submetidas aos testes. Antes da realização do registro das EOA eram submetidas à

otoscopia manual para avaliação do conduto auditivo externo e membrana timpânica, sendo descartadas aquelas que apresentavam sinais de otites ou cerume de difícil remoção.

O teste de EOAPD foi realizado pré-tratamento e momentos antes dos animais serem sacrificados, seguindo a relação de frequências 2F1 - F2 com relação F1:F2 = 1,22, resolução dois pontos por oitava.

Consideramos as EOA a partir de 1,5 kHz, pois as dimensões do conduto auditivo externo da cobaia fazem com que haja uma dificuldade de detecção das EOA abaixo desta frequência, obtendo respostas que coincidam com as respostas do ruído.

Desta forma, ao analisarmos a frequência de 2 kHz, oferecemos um tom puro um pouco acima e um pouco abaixo, de tal modo que a relação entre eles seja de 1,22, obtendo assim, automaticamente, uma resposta de frequência resultante seguindo a relação 2F1-F2 (abaixo da frequência avaliada) e 2F2-F1 (acima da frequência resultante). Deve-se ainda levar em consideração que as intensidades de F2 e F1 podem ser iguais ou diferentes. Neste estudo utilizamos intensidades iguais de 70 dB NPS. A intensidade do estímulo desencadeante pode variar numa faixa de 0 a 70 dB NPS e podem ser medidas na faixa de 500 a 8000Hz.¹⁹

As otoemissões resultantes costumam ser em torno de 55 dB NPS menos intensas que o estímulo provocante. Com um estímulo de 70 dB NPS, provavelmente teríamos uma EOAPD, com variabilidade de mais ou menos 10 ou 15 NPS.²⁰

Deste modo observa-se o chamado "DPGRAM", o audiococleograma, onde se tem um estímulo que é o som e uma resposta que também é um som e que fornece a função das células ciliadas externas cocleares responsáveis pelas frequências analisadas.²¹

Neste estudo o que consideramos mais importantes foram as EOA nas frequências mais agudas, que avaliam qualitativamente o estado funcional das células ciliadas externas na espira basal da cóclea. Foram consideradas as EOAPD como presentes e ausentes.

Avaliação Anatômica

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Equipamento: Microscópio Eletrônico JEOL SCANNING MICROSCOPE - JSM 5200

As cobaias foram sacrificadas em tempo programado após administração das drogas via intraperitoneal e anestesia com éter, tendo sido decapitadas e suas cócleas removidas da bula.

Com dissecação microscópica as cócleas foram perfundidas com solução de fixação com glutaraldeído 3% a 4º Celsius e mantidas na solução por 24 horas para a fixação. Os passos seguintes foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Morfologia da FMRP-USP.

Através da janela redonda foi injetado, nas cócleas, para fixação uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7,4, por 4 horas a 4° Celsius, lavadas três vezes por 5 minutos com o mesmo tampão. Depois de dissecadas as cócleas foram fixadas com tetróxido de Ósmio 1% por 2 horas a 4° Celsius e submetidas a uma desidratação à temperatura ambiente em uma bateria crescente de etanol (50%, 70%, 90% e 95% - uma vez por 10 minutos em cada concentração) e etanol absoluto três vezes por 15 minutos. Terminada a desidratação, seguiu-se para a secagem pelo método do ponto crítico em CO₂, onde o material ficou desprovido de água. Após ser fixado em porta espécime adequado, o material foi revestido em câmara de vácuo com vapores de ouro e examinados em microscópio eletrônico de varredura.²²⁻²⁵

Os resultados obtidos da MEV, depois de fotografados, foram analisados através de cocleogramas. Foram utilizadas as contagens do número de células ciliadas externas da espira basal da cóclea, em determinado campo fotográfico, sendo contadas dez células, presentes ou ausentes, conforme a Figura 1.

Os dados foram tratados estatisticamente, utilizando-se o programa estatístico Statistical Package for Social Sciences - (S.P.S.S.).

Foram considerados na comparação dos resultados e tratados estatisticamente somente os dados referentes à espira basal, que é a que mais interessa do ponto de vista de lesão pela cisplatina, entretanto, mostramos em valores absolutos, plotados em gráficos, os dados referentes às outras espiras da cóclea.

RESULTADOS

Quanto à avaliação anatômica, no grupo 1, tratado com cisplatina isolada (8,0 mg/Kg/dia por três dias consecutivos) houve lesão com ausência de cílios nas três fileiras de células ciliadas externas em nível da espira basal, seguida da espira 2 e espira 3. As alterações mais evidentes foram na espira basal, mas observamos também distorção ciliar com desarranjo no padrão em “v” (ou “w”), com cílios dobrados ou ausência parcial de um dos “braços” do “v”, Figura 2. Em nível das células ciliadas internas também observamos alterações ciliares, com cílios presentes, mas desarranjados.

Na Figura 3, observamos a comparação por estria das cócleas dos grupos 1, 2 e 3.

No grupo tratado previamente com amifostina observamos a manutenção da arquitetura normal das células ciliadas externas, à microscopia eletrônica de varredura e

V V	V V V V V V V V V V	V V	CCI.
V V	V V V V V V V V V V	V V	CCE. 1ª FILEIRA
V V	V V V V V V V V V V	V V	CCE. 2ª FILEIRA
V V	V V V V V V V V V V	V V	CCE. 3ª FILEIRA

Figura 1. Representação esquemática do cocleograma utilizado para a contagem do número de células ciliadas por espira, sendo que: V = célula ciliada normal
V = célula ciliada lesada

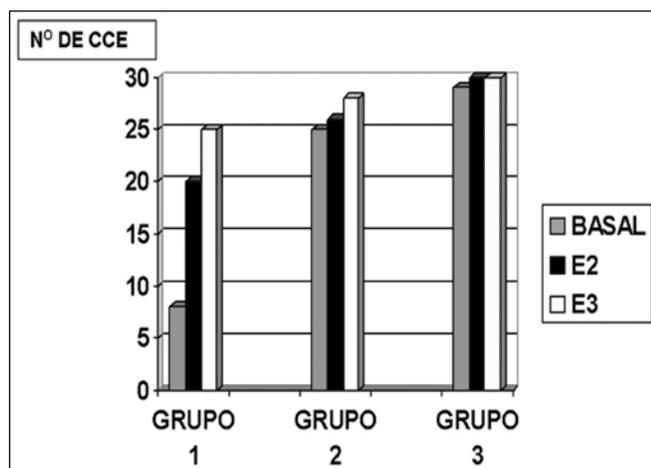


Figura 2. MEV, com aumento de 1.500X, da cóclea de cobaia do grupo 1.

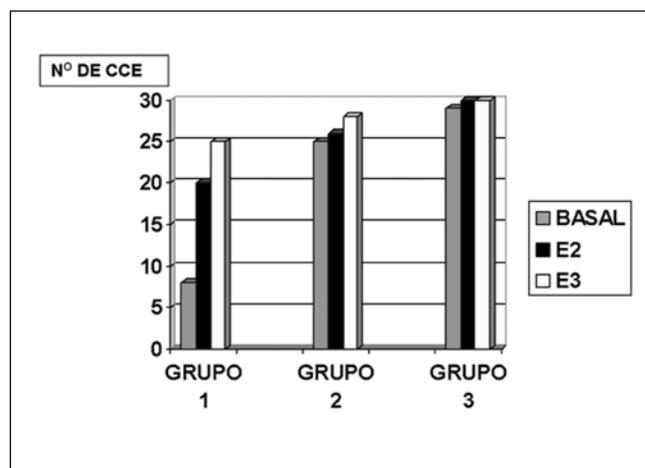


Figura 3. Média do número de células ciliadas externas presentes nas espiras da cóclea, basal, E2 e E3 encontradas nos grupos 1, 2 e 3.

emissões otoacústicas por produtos de distorção presentes em todas as cócleas testadas.

Quanto à análise estatística dos dados apresentados, para comparar a variável número de células ciliadas exter-

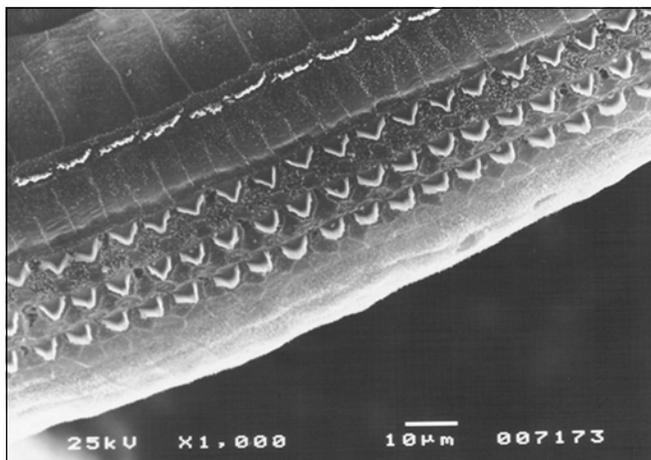


Figura 4. MEV, com aumento de 1.000X, da cóclea de cobaia do grupo 2.

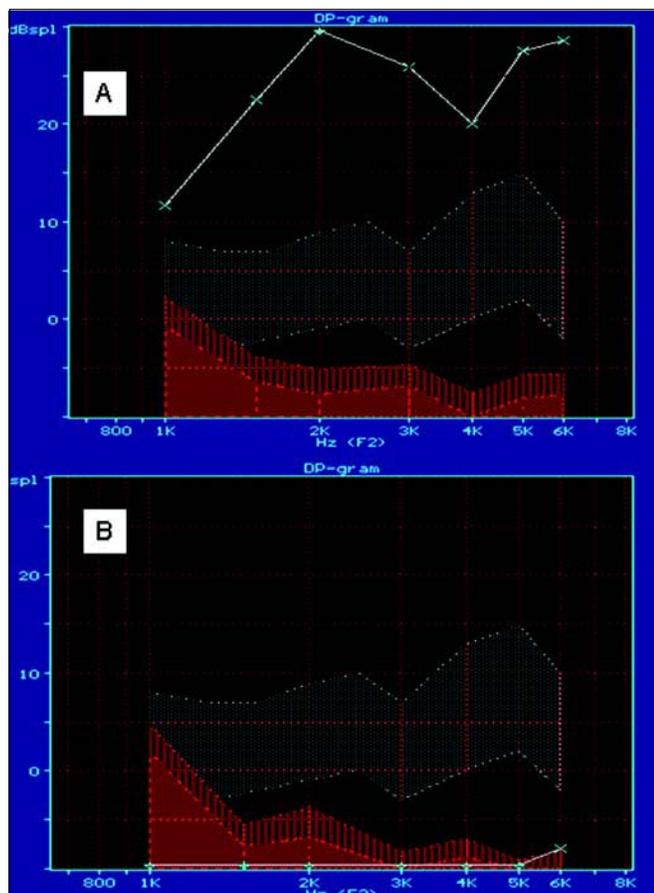


Figura 5. Emissões otoacústicas por produtos de distorção em cobaia tratada com amifostina e cisplatina (grupo 2) (A) e em cobaia tratada com cisplatina (grupo 1) (B).

nas na espira basal da cóclea, entre os grupos 1, 2 e 3, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Optou-se por tal metodologia não-paramétrica, pois os dados não seguem uma normalidade nesta variável (teste de Kolmogorov-Smirnoff com $p < 0.001$). Assim, a hipótese H_0 foi:

H_0 : os valores dos 3 grupos em questão são equivalentes entre si

X

H_1 : existe ao menos um par de grupos que difere significativamente.

Caso H_0 fosse rejeitada usaríamos o teste *post-boc* de Dunn para verificar quais as diferenças detectadas.

Adotamos $p \leq 0.05$ como nível de significância. O resultado do teste foi $p < 0.001$, mostrando que existiu diferença significativa entre os grupos. Pelo teste de Dunn constatamos que o número de células ciliadas externas no GRUPO 1 (CISPLATINA 8,0 mg/ Kg/dia) é **menor** que no GRUPO 2 (amifostina 100 mg/Kg/dia e CISPLATINA 8,0 mg/Kg/dia), que por sua vez é **igual** ao número do GRUPO 3 (amifostina 100 mg/Kg/dia).

Com relação à variável EOAPD, foi considerada a comparação dos percentuais de **presente** e **ausente**. No grupo 1 foram obtidos 100% de **ausências**, com tamanho 12, e, nos grupos 2 e 3, obteve-se 100% de **presença**, com grupos de tamanho 12 e 06. Com esses valores, pelo teste Exato de Fisher, temos com $p < 0.001$ que os grupos 2 e 3 são equivalentes e significativamente diferentes dos grupos 1.

DISCUSSÃO

A amifostina tem mostrado baixa toxicidade e bons resultados quanto à proteção contra os efeitos ototóxicos da radioterapia como relatam Foster Nora e Siden, 1997.¹³

Quanto à otoproteção contra agentes antineoplásicos, principalmente a cisplatina, Church et al. (1995), encontraram estudo eletrofisiológico por Potencial auditivo evocado encefálico, em hamsters, proteção pelo tiossulfato de sódio e dietildimetiltiocarbamato, não observando proteção efetiva pela amifostina e fosfomicina.¹⁵

Kaltenbach et al. (1997) analisaram as mesmas drogas, agora associando avaliação anatômica por Microscopia eletrônica de varredura e potencial auditivo evocado de tronco encefálico. Encontraram 91% de manutenção de células ciliadas externas com o tiossulfato de sódio, 68% com o dietildimetilcarbamato, 52% com a fosfomicina e 45% com a amifostina.¹⁶

Apesar destes dados experimentais em animais, estudos em humanos utilizando cisplatina para o tratamento de diferentes neoplasias mostram uma tendência a nefroproteção, neuroproteção, otoproteção e mieloproteção

aos efeitos tóxicos da cisplatina. Foster Nora e Siden, 1997, relataram que estes estudos englobam pequenos números de pacientes com diferentes tipos de tumores e interação de antineoplásicos, além de estarem recebendo diferentes dosagens de cisplatina.¹³

Alguns centros de tratamento do câncer têm incluído em seus "Guidelines" o uso da amifostina para prevenir alguns dos efeitos tóxicos da cisplatina, em situações específicas e dose dependente, principalmente após a autorização e padronização do seu uso a partir de 1980 pelo FDA, conforme os estudos de Vincent et al. (2003).²⁶

Pelo que podemos observar em cobaias albinas tratadas com cisplatina 90 minutos após a administração da amifostina, avaliadas funcionalmente através das emissões otoacústicas por produtos de distorção e Microscopia eletrônica de varredura, encontramos proteção significativa funcional e estrutural aos efeitos ototóxicos agudos da cisplatina, diferente do que encontraram Kaltenbach et al. (1997), em hamsters, mostrando evidências do potencial de otoproteção da amifostina, em tratamentos agudos pela cisplatina, com doses sabidamente ototóxicas. Tais achados podem justificar sua indicação conforme é realizado em diferentes centros de tratamento do câncer, seguindo as orientações do FDA (1980).¹⁶

No entanto, seu uso não é recomendável nos casos de tumores potencialmente curáveis, por não se saber exatamente a influência da cisplatina na eficácia da quimioterapia.^{12,14}

CONCLUSÃO

A amifostina mostra evidentes sinais de otoproteção aos efeitos ototóxicos produzidos pela cisplatina em cobaias albinas.

No entanto, seu uso não é recomendável nos casos de tumores potencialmente curáveis, por não se saber exatamente a influência da cisplatina na eficácia da quimioterapia.^{12,14}

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gandara DR, Perez EA, Wiebe V, De Gregorio MW. Cisplatin Chemoprotection and Rescue: pharmacologic modulation of toxicity. *Sem Oncology* 1991; 18: 49-55.
- Piel IJ, Meyer D, Percia CP, Wolfe VI. Effects of cis-diamminedichloroplatinun (NSC - 119875) on hearing function in man. *Cancer Chemother Rep* 1974; 58: 871-5.
- Dreschler WA, Van Der Hulst RJ, Tange RA, Urbanus NA. Role of high-frequency audiometry in the early detection of ototoxicity. II - clinical aspects. *Audiology* 1989; 28(4): 211- 20.
- McAlpine D, Johnstone BM. The ototoxic mechanism of cisplatin. *Hear Res* 1990; 47: 191-203.
- Schewetzer VG. Cisplatin induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. *The Laryngoscope* 1993; 103 Suppl 59.
- Ravi R, Somani SM, Rybak LP. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacology & Toxicology* 1995; 76: 386-94.
- Glover D, Glick J, Weiter C. Phase I/II Trials of WR-2721 and Cisplatin. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 1509-12.
- Kalaycioglu M, Bukowski R. Clinical Status of the new chemoprotective agent amifostine. *Oncology* 1994; 8: 15-23.
- Glover D, Glick J, Weiter C. WR-2721 and High-dose Cisplatin: an active Combination in the Treatment of Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 1987; 5: 574-8.
- Yohas JM & Culo F. Selective Inhibition of the Nephrotoxicity of Cis-dichlorodiammineplatinun (II) by WR-2721 Without Altering its Antitumor Properties. *Cancer Treat Rep* 1980; 64: 57-64.
- Mollman JE, Glover DJ, Hogen WM. Cisplatin Neuropathy: risk factors prognosis and protection by WR-2721. *Cancer* 1988; 61: 2192-5.
- Rubin JS, Waler S, Beitter JJ, Haynes H, Razenblit A, McGill F, Goldeberg G, Runowicz C. Audiological findings in a phase I protocol investigating the effect of WR-2721 high-dose cisplatin and radiation therapy in patients with locally advanced cervical carcinoma. *J Laryngol Otol* 1995; 109: 744-7.
- Foster Nora JA & Siden R. Amifostine for Protection From Antineoplastic Drug Toxicity. *Am J Health Syst Pharm* 1997; (54) 787-800.
- Ramath N, Lorusso P, Simon M. Phase II evaluation of cisplatin and WR-2721 of refractory metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol* 1997; 20: 368-72.
- Church MW, Kaltenbach JA, Blakley BW, Burgio DL. The Comparative Effects of Sodium Thiosulfate Diethyldithiocarbamate Fosfomicin and WR-2721 on Ameliorating Cisplatin - induced ototoxicity. *Hear Res* 1995; 86 (1-2): 195-203.
- 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(5): 493-500.
- Jero J, Coling DE, Lalwani AK. The use of Preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. *Acta Otolaryngol* Jul 2001; 121(5): 585-9.
- Preyer W. *Die Seele des Kindes*. Leipzig: Grieben - Verlag; 1882.
- He NJ, Schmiedt RA. Fine structure of the 2F1-F2 acoustic distortion product: changes with primary level. *J Acoust Soc Am* 1993; 94(5): 2659-69.
- Rasmussen AN, Popelka GR, Osterhammel PA, Nielsen LH. Clinical significance of relative probe tone levels on distortion products otoacoustic emissions. *Scand Audiol* 1993; 22(4): 223 -9.
- Lopes Filho O, Carlos R, Redondo MC. Produtos de distorção das emissões otoacústicas. *Rev Brasileira de Otorrinolaringologia* 1995; 61(6): 485-94.
- Saito T, Aran J.M. Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1994; 56(6): 315-20.
- Cardinaal RM, Groot JCMJ, Huizing EH, Veldman JE, Smoorenburg G.F. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hearing Res* 2000; 144: 135-46.
- Demarco RC. Uso da gentamicina intra-timpânica para induzir ablação vestibular unilateral em cobaias. Tese de Dissertação de Mestrado FMRP-USP; 2001.
- Oliveira JAAO, Canedo DM, Rossato M. Autodefesa contra a ototoxicidade de antibióticos aminoglicosídeos. *Rev Brasileira de Otorrinolaringologia* 2002; 68(1): 7-13.
- Vincent M, Bramwell V, Moran LA, Anderson D. Use of aminofostine to ameliorate the toxic effects of chemotherapy in the treatment of cancer. Toronto(ON): Cancer Care Ontario (OCO). Practice Guideline 2003; 12-6.