



Brazilian Journal of
OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org.br



ARTIGO ORIGINAL

Lack of protection against gentamicin ototoxicity by auditory conditioning with noise^{☆,☆☆}

Alex Strose*, Miguel Ângelo Hyppolito, Gleice Cristina Colombari, Maria Rossato, Jose Antônio Aparecido de Oliveira

Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

Recebido em 5 de dezembro de 2013; aceito em 5 de junho de 2014

KEYWORDS

Inner ear;
Sensorineural hearing loss;
Deafness;
Acoustic stimulation;
Deafness;
Toxicity

Abstract

Introduction: Auditory conditioning consists of the pre-exposure to low levels of a potential harmful agent to protect against a subsequent harmful presentation.

Objective: To confirm if conditioning with an agent different from the used to cause the trauma can also be effective.

Method: Experimental study with 17 guinea pigs divided as follows: group Som: exposed to 85 dB broadband noise centered at 4 kHz, 30 minutes a day for 10 consecutive days; group Cont: intramuscular administration of gentamicin 160 mg/kg a day for 10 consecutive days; group Expt: conditioned with noise similarly to group Som and, after each noise presentation, received gentamicin similarly to group Cont. The animals were evaluated by distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs), brainstem auditory evoked potentials (BAEPs) and scanning electron microscopy.

Results: The animals that were conditioned with noise did not show any protective effect compared to the ones that received only the ototoxic gentamicin administration. This lack of protection was observed functionally and morphologically.

Conclusion: Conditioning with 85 dB broadband noise, 30 min a day for 10 consecutive days does not protect against an ototoxic gentamicin administration of 160 mg/kg a day for 10 consecutive days in the guinea pig.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.07.009>

[☆]Como citar este artigo: Strose A, Hyppolito MÂ, Colombari GC, Rossato M, de Oliveira JA. Lack of protection against gentamicin ototoxicity by auditory conditioning with noise. Braz J Otorhinolaryngol. 2014;80:390-6.

^{☆☆}Instituição: Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: alexstrose@yahoo.com.br (A. Strose).

PALAVRAS-CHAVE

Orelha interna;
Perda auditiva
neurossensorial;
Surdez;
Ruído;
Estimulação acústica;
Toxicidade

Falta de proteção contra a ototoxicidade da gentamicina pelo condicionamento auditivo com ruído**Resumo**

Introdução: O condicionamento auditivo consiste da pré-exposição de um agente lesivo em baixos níveis para proteger contra uma posterior apresentação lesiva.

Objetivo: Confirmar se o condicionamento com um agente diferente do utilizado para causar o trauma pode ser efetivo.

Método: Estudo experimental com 17 cobaias albinas divididas como a seguir- grupo Som: exposto a um ruído branco de 85 dB centrado em 4 kHz, 30 minutos por dia, por 10 dias consecutivos; grupo Cont: administração intramuscular de gentamicina 160 mg/kg por dia, por 10 dias consecutivos; grupo Expt: condicionado com ruído como o grupo Som. Após cada exposição ao ruído, recebeu gentamicina similarmente ao grupo Cont. Os animais foram avaliados por emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPDs), potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Resultados: Os animais que foram condicionados com ruído não mostraram qualquer efeito protetor quando comparados com os que receberam apenas a gentamicina em doses ototóxicas. Esta ausência de proteção foi observada tanto funcionalmente quanto morfológicamente.

Conclusão: Os autores concluíram que o condicionamento com ruído branco a 85 dB por 30 minutos, por dia por 10 dias consecutivos, não protege contra uma administração de gentamicina 160 mg/kg/dia, por 10 dias consecutivos.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Introdução

O condicionamento auditivo consiste da pré-exposição de um agente potencialmente lesivo ao sistema auditivo em doses pouco ou não tóxicas, visando estimular mecanismos intrínsecos que aumentem a resistência das estruturas auditivas, tornando-as, assim, mais resistentes contra uma posterior exposição, seja do próprio agente utilizado na pré-exposição, ou de outro potencialmente lesivo ao órgão de Corti. O agente que foi primeiro testado foi o ruído,^{1,2} utilizado tanto para condicionar quanto para causar o trauma auditivo. Desde então, este fenômeno vem sendo testado em diferentes animais como cobaias, chinchillas, *Mongolian gerbils* e, inclusive, em humanos. Os resultados têm demonstrado uma redução dos danos morfológicos e funcionais nos animais condicionados em comparação com os expostos apenas ao estímulo traumático.^{1,3-5} Muitos paradigmas de condicionamento utilizando diferentes frequências, intensidades ou padrões de apresentação, como, por exemplo exposições contínuas ou intermitentes, vêm demonstrando serem efetivos.^{1,3-6} O condicionamento com outros agentes, não apenas ruído, também tem demonstrado ser efetivo. A pré-exposição a doses baixas de amicacina tem mostrado ser efetiva na proteção contra uma posterior administração desta mesma droga em doses lesivas.⁷ O mesmo foi demonstrado com gentamicina.⁸ Foi sugerido que o estresse causado pelo condicionamento, e não a ação de um agente em particular, é responsável por estimular os mecanismos de proteção.⁹ Estes pesquisadores levantaram a hipótese de que este estresse pode estimular a liberação de corticosteroides que, sabidamente, atenuam o dano coclear.

Entretanto, a vasta maioria dos trabalhos utiliza o mesmo agente para condicionar e causar o trauma. Mais recentemente, a efetividade do condicionamento com um agente diverso do utilizado para causar o trauma foi testada. The-

neshkumar et al., em 2009, expuseram ratos a um ruído 8 kHz, em uma intensidade 85 dB, por 15 minutos, com o objetivo de reduzir os danos causados pela cisplatina.¹⁰ Este estudo demonstrou que os animais que foram condicionados com o ruído apresentaram uma menor alteração de seus limiares auditivos, em comparação com aqueles que apenas receberam a droga. Outro estudo condicionou camundongos com canamicina e então expôs os animais a um ruído de banda larga (4-45 kHz) a 110 dB de intensidade, por 30 segundos.¹¹ Os animais que receberam a medicação previamente ao ruído exibiram menor dano coclear, evidenciado pelas avaliações morfológicas e funcionais realizadas no estudo. Um terceiro estudo condicionou cobaias administrando doses não ototóxicas de gentamicina na tentativa de protegê-las contra um posterior trauma acústico. Os animais que foram condicionados com gentamicina apresentaram menores danos cocleares em relação aos que foram tratados apenas com o trauma acústico.¹² Houve também um estudo que condicionou *Mongolian gerbils* com ruído na tentativa de proteger contra uma administração de gentamicina tópica, aplicada através da janela redonda. Foi utilizado um protocolo de condicionamento que consistia de um ruído de frequência entre 1.410 a 5.650 Hz com intensidade de 81 dB, por três semanas continuamente, e foi observado que o grupo tratado com este estímulo mostrou um menor número de lesão às células ciliadas externas e internas.¹³ Outro estudo testou se um condicionamento com um ruído que causasse uma mudança temporária de limiar seria efetivo para proteger camundongos contra ototoxicidade da gentamicina e da cisplatina. Os pesquisadores observaram que a apresentação de um ruído de 8 a 16 kHz em uma intensidade de 91 dB, por 2 horas, causava uma mudança temporária de limiar e também protegia contra a ototoxicidade destas substâncias.¹⁴ O propósito do presente trabalho foi testar se o condicionamento com ruído em níveis não traumáticos

pode proteger as estruturas cocleares contra uma administração de gentamicina em doses ototóxicas.

Material e métodos

Estudo experimental realizado com um total de 17 cobaias albinas pesando entre 350 e 500 g e sem infecção de orelha média, evidenciada por avaliação otoscópica. O tamanho da amostra e sua distribuição foram dimensionados estatisticamente. Isto se deve às exigências do comitê de ética para que o menor número possível de animais seja utilizado. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição (Documento no. 058/2008). Os animais foram selecionados pela presença do reflexo de *Preyer*. Foram incluídos no estudo apenas aqueles com emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) presentes e limiares auditivos eletrofisiológicos de 25 dB estimados pelos potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE).

Os animais foram divididos em três grupos: o primeiro grupo (Cont), que é o controle para a lesão por gentamicina, formado por cinco animais que receberam gentamicina intramuscular em dose ototóxica, 160 mg/Kg/dia, por 10 dias consecutivos.; o segundo grupo (Som), que é o controle para o condicionamento com ruído, formado por seis animais, foi tratado com ruído centrado em 4 kHz a uma intensidade de 85 dB 30 minutos por dia por 10 dias consecutivos. A escolha desta frequência de estímulo se deveu ao fato de os métodos de avaliação funcionais utilizados no presente trabalho serem efetivos para detectar alterações nesta faixa de frequência, e, adicionalmente, para testar se o condicionamento com esta frequência também seria efetivo. O terceiro grupo (Expt), grupo experimental, formado por seis animais, foi condicionado nos mesmos moldes do grupo e *Som*, porém, após 30 minutos da apresentação do ruído, receberam, diariamente, a dose potencialmente lesiva de gentamicina: 160 mg/Kg/dia por 10 dias, nos mesmos moldes do grupo *Cont*. O protocolo de lesão por gentamicina, como mencionado acima, já havia sido utilizado com sucesso em trabalhos anteriores.⁸

Avaliação funcional

A avaliação funcional foi realizada pelos exames de emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) e de potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE). O equipamento utilizado foi o SMART DPOEA/EP e o SMART EP da *Intelligent Hearing Systems* - Miami/Flórida (EUA).

Para realizar os testes, os animais foram anestesiados com Ketamina intramuscular na dose de 65mg/kg, uma droga anestésica sem efeitos significativos sobre o funcionamento do sistema auditivo.¹⁵

Potencial evocado auditivo de tronco encefálico e emissões otoacústicas produto de distorção

A avaliação funcional pelos exames de PEATE e EOAPD foi realizada nos seguintes tempos: antes de qualquer tratamento em todos os animais; 1 hora após o condicionamento com ruído para avaliar se este procedimento era inócuo ao

sistema auditivo; e após 1 dia da administração da última dose de gentamicina, tanto no grupo que foi tratado apenas com esta medicação (Cont), quanto no que foi condicionado com ruído previamente à administração da gentamicina.

Para avaliação dos potenciais auditivos eletrofisiológicos (PEATE), os eletrodos de superfície foram posicionados no vértex craniano (positivo), na porção posterior do pavilhão auricular bilateralmente (negativos), e um eletrodo de referência na fronte (terra). A resposta dos potenciais auditivos foi obtida da média de 2.048 estímulos, para cada intensidade. Foi utilizado o estímulo tipo *click*. O estímulo foi apresentado a uma taxa de repetição de 11,1/s. O limiar auditivo foi definido como a menor intensidade em que era possível identificar uma onda II em dois registros.

As OEAPDs foram realizadas de acordo com a relação 2F1-F2, com a razão F1:F2 = 1,22. A intensidade de ambas as frequências foi de 70 dB. Foram avaliadas as respostas a partir da frequência de 1 kHz até a frequência de 4 kHz. Foi considerada a presença ou ausência de resposta de acordo com a relação sinal/ruído. Adicionalmente, foram estudados estatisticamente os valores obtidos antes e após cada tratamento para cada grupo.

Avaliação morfológica

Microscopia eletrônica de varredura

Todas as *guinea pigs* sofreram eutanásia em tempo programado, 1 hora após a última avaliação funcional, após anestesia com Cloridrato de Ketamina (65 mg/kg) e Xilazina (6,5 mg/kg), ambas via intramuscular. Foram, então, decapitadas e suas cócleas removidas da bula.

Através da janela redonda foi injetada, para fixação, uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1 M, pH de 7,4, por 4 horas, a 4°C; as cócleas foram lavadas três vezes por 5 minutos com o mesmo tampão, depois fixadas com tetróxido de Ósmio 1% por 2 horas, a 4°C, 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, passou-se para a fase de secagem pelo método do ponto crítico em CO₂, em que o material é desprovido de água. Após ser fixado em porta espécime adequado, o material foi revestido, em câmara de vácuo, com vapor de ouro e examinado em microscópio eletrônico de varredura.

Para a análise e fotografia dos espécimes em MEV foi utilizado o Microscópio Eletrônico JEOL SCANNING MICROSCOPE - JSM 5200.

Para a análise estatística, uma célula ciliada lesionada foi definida como sendo aquela com ausência total de cílios; qualquer outra alteração a estas estruturas não foi levada em consideração para o cálculo estatístico. Foram consideradas apenas as células ciliadas externas. A cóclea da *guinea pig* é formada por três espiras e meia, isto é, primeira, segunda e terceira espiras, e a porção apical é formada por meia espira. Cada espira pode ser dividida em três terços: terço inicial, médio e final. A porcentagem de células ciliadas externas lesadas sobre o total de células ciliadas foi calculado para cada terço médio de cada espira, exceto a apical. Este cálculo foi obtido a partir de um cocleograma. Este foi por nós definido como a representação gráfica de uma fotografia de microscopia eletrônica de varredura do

terço médio da primeira, segundo e terceira espiras cocleares, em um campo de aumento de 500 vezes. A região apical não foi incluída no cálculo estatístico por apresentar um natural desarranjo de cílios, o que dificulta a diferenciação de estruturas normais com lesadas. Cálculos adicionais foram feitos para determinar a porcentagem total de células ciliadas lesadas e a porcentagem de células ciliadas lesadas por cada fileira de células ciliadas externas.

Condicionamento com ruído

As *guinea pigs* foram condicionadas com ruído branco centrado em 4 kHz, em uma intensidade de 85 dB, 30 minutos por dia, por 10 dias consecutivos. A exposição foi feita com os animais dentro de uma caixa de isolamento acústico (EP - 125 Audio Signal Generator - Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). As dimensões do equipamento eram, em milímetros, de 760, 485 por 705. Dentro da caixa, os animais foram dispostos em uma gaiola com três divisões iguais, sendo colocados três de cada vez. Os animais tinham livre acesso à água e alimentos e ficavam em um ciclo de claro-escuro de 12 horas cada. Os amplificadores de som ficavam presos à parte superior da caixa a 25 cm de distância da parte superior da gaiola. A variação da intensidade do ruído era menor do que 2 dB em qualquer ponto do interior da caixa.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através dos testes não paramétricos de Mann-Whitney e Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de 5% ($p = 0,05$). As análises foram realizadas pelos programas SPSS, Minitab e Excel.

Resultados

Ao analisar as EOAPDs, pudemos observar, para os grupos Cont, que receberam apenas a gentamicina em doses ototóxicas, e para o grupo Expt, condicionado com ruído previamente à administração do aminoglicosídeo, em todas as frequências houve ausência de resposta nas avaliações realizadas após administração desta droga. Em uma avaliação mais detalhada desses resultados, observamos que, comparando estes dois grupos, Cont e Expt, além de ambos mostrarem ausência de resposta após a administração da gentamicina, o grupo que foi condicionado com ruído previamente a esta medicação (grupo Expt) apresentou valores significativamente piores nas frequências de 3 e 4 kHz, do que o tratado apenas com o aminoglicosídeo ($p = 0,009$ e $p = 0,007$, respectivamente) (tabela 1), sugerindo uma potencialização dos efeitos deletérios da medicação pela pré-exposição ao ruído. O grupo Som, tratado apenas com o condicionamento com ruído, mostrou resultados interessantes. Observamos respostas presentes nas EOAPDs pós-ruído em todas as frequências para este grupo e, adicionalmente, houve uma melhora nos valores das EOAPDs no pós-tratamento em comparação com os valores iniciais, de pré-tratamento. Esta melhora foi observada em todas as frequências, sendo a diferença significativa apenas nas frequências de 1 kHz ($p = 0,006$) e 4 kHz ($p = 0,023$) (tabela 2). Com relação aos limiares auditivos eletrofisiológicos obtidos pelo PEATE, observamos que apenas o grupo Som, condicionado com ruído, não apresentou piora de seus limiares após

Tabela 1 Valores das EOAPDs pré-condicionamento com ruído e pós-exposição à gentamicina em dose ototóxica – Grupo Expt

Grupo Expt	F 1	F 1,5	F 2	F 3	F 4
Pré	24,08	25,33	20,33	18 ^a	26,33 ^a
Pós	8,75	9,17	12,58	3,5 ^a	12,92 ^a

^a Diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2 Valores das EOAPDs pré e pós-exposição ao ruído condicionante – Grupo Som

Grupo Som	F 1	F 1,5	F 2	F 3	F 4
Pré	23,58 ^a	26,08	20,17	23,58	25,08 ^a
Pós	36,33 ^a	35,58	24,67	24,17	37,75 ^a

^a Diferença estatisticamente significativa.

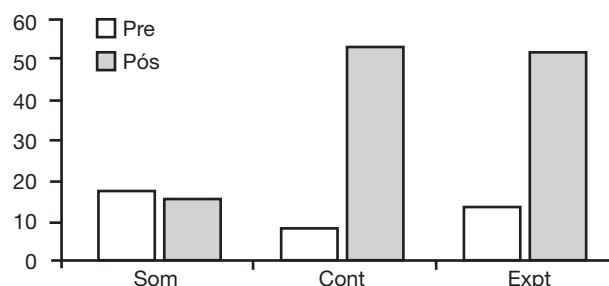


Figura 1 Limiares auditivos (em dB) pré e pós os respectivos tratamentos para os Grupos Som, Cont e Expt.

o respectivo tratamento (condicionamento com ruído). Seus limiares pré e pós foram 17,9 dB e 15,8 dB, respectivamente. Os grupos Cont e Expt apresentaram piora semelhante de seus limiares auditivos na comparação pré e pós. Os limiares auditivos dos animais destes grupos apresentavam valor médio, antes de qualquer tratamento, de 8,5 e 13,7 dB, respectivamente. Após a administração do aminoglicosídeo, os limiares dos grupos Cont e Expt passaram a ser, na média, 53,5 e 52 dB, respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa para estes valores (fig. 1).

A avaliação histológica mostrou que o grupo Som não sofreu danos decorrentes do condicionamento auditivo com ruído branco de 4 kHz na intensidade de 85 dB, 30 minutos por dia, por 10 dias consecutivos (fig. 2). A análise histológica e dos cocleogramas mostrou a seguinte porcentagem média de lesão para cada grupo: Som: 2,2%; Cont: 39,9% e Expt: 47,3% (figs. 3, 4 e 5). Discriminando melhor estes resultados e avaliando o percentual médio de lesão por cada espira, observamos que os grupos Cont, que recebeu apenas a gentamicina em doses ototóxicas, e Expt, condicionado com ruído previamente à administração desta droga, apresentaram valores semelhantes de lesão na primeira e segunda espiras cocleares - Cont (primeira espira): 52,7% e Expt (primeira espira): 53,2%; Cont (segunda espira): 32,8% e Expt (segunda espira): 36,9%. Entretanto, ao compararmos os valores médios de lesão de células ciliadas externas entre

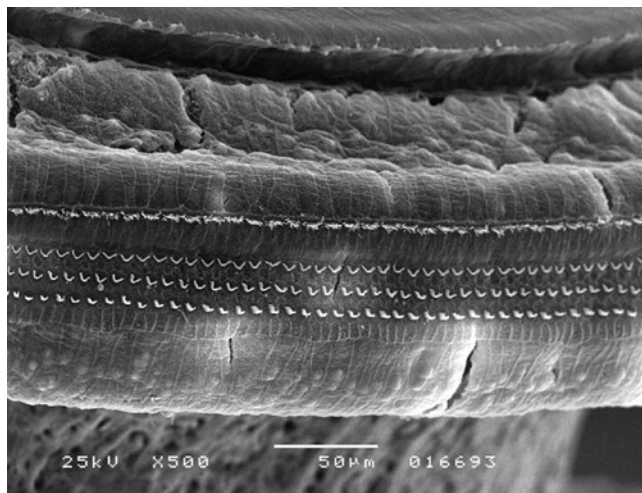


Figura 2 Foto de microscopia eletrônica de varredura do grupo (Som) mostrando ausência de lesões às células ciliadas externas. Aumento de 5000 mm.

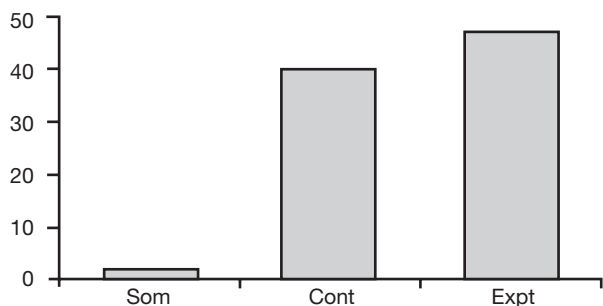


Figura 3 Porcentagem de lesão de CCE em cada grupo após os respectivos tratamentos.

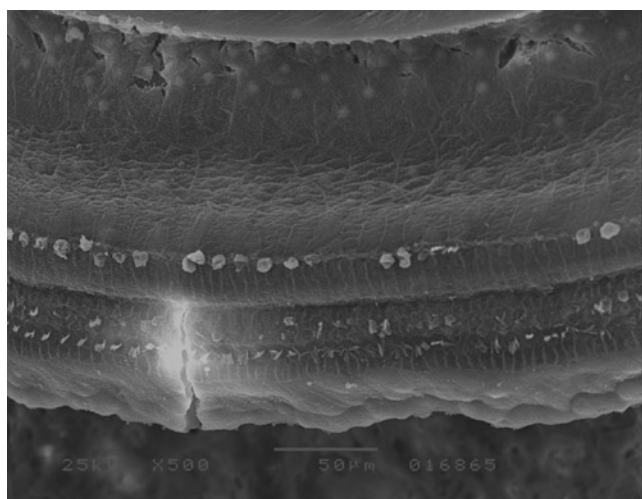


Figura 4 Fotografia de microscopia eletrônica de varredura do grupo Cont. Aumento de 500x.

estes dois grupos, observamos que o grupo Expt apresentou um número maior de lesão em comparação com o grupo Cont, 47,3% e 39,9%, respectivamente. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

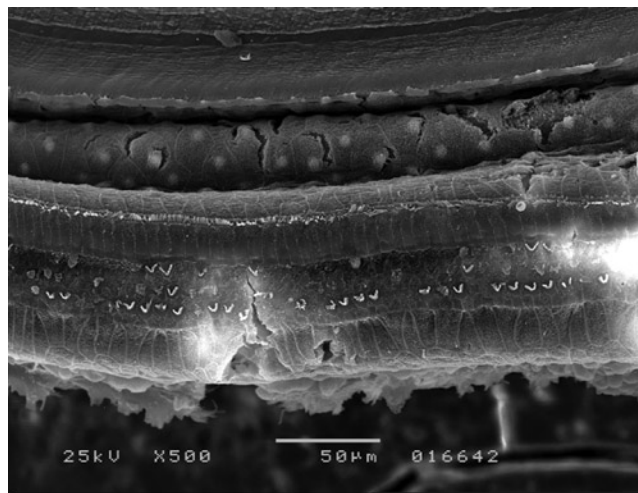


Figura 5 Fotografia de microscopia eletrônica de varredura do grupo Expt. Aumento de 500x.

Discussão

A grande maioria dos trabalhos que vêm testando o condicionamento auditivo tem demonstrado bons resultados. Muitos tipos de ruído e drogas têm sido testados com sucesso. A grande maioria destes trabalhos utilizou o mesmo fator na fase de condicionamento e na fase traumática. O primeiro trabalho que demonstrou este fenômeno condicionou cobaias com ruído para estimular o organismo a desenvolver mecanismos de proteção, ainda não totalmente esclarecidos, contra uma posterior apresentação de um trauma acústico.¹ Vários outros trabalhos se seguiram a este, também utilizando ruído tanto como agente protetor quanto como fator traumático, todos com resultados positivos.¹⁻⁶ Outra causa muito comum de perda auditiva é a ototoxicidade por drogas aminoglicosídicas. Partindo do mesmo princípio do condicionamento auditivo com ruído, outros estudos testaram se a pré-exposição de doses não traumáticas de aminoglicosídeos também evitaria ou, ao menos, reduziria os danos causados por uma administração ototóxica destas drogas. Os resultados mostraram que o condicionamento também era efetivo com drogas.^{7,8} O protocolo de lesão por gentamicina utilizado no presente trabalho foi o mesmo do trabalho mencionado acima.⁸ Adicionalmente, foi testada a utilização de drogas diferentes na fase de condicionamento e trauma, como condicionamento com salicilato para proteção contra gentamicina ou contra cisplatina.^{16,17} Estes trabalhos também mostraram resultados positivos. Apenas um estudo não demonstrou proteção pelo condicionamento cruzado com diferentes drogas. Foram administradas doses não ototóxicas de gentamicina para proteção contra uma posterior ototoxicidade por amicacina. Os resultados mostraram que os animais tratados previamente com a gentamicina (condicionados) não apresentavam sinais de proteção em comparação com os tratados apenas com a amicacina.¹⁸

Tem sido sugerido que o estresse resultante do procedimento de condicionamento auditivo, mais do que a ação de qualquer agente em específico, promove a proteção observada. Isto se daria pela liberação de corticosteroides em resposta ao estresse.⁹ Esta hipótese foi recentemente contes-

tada por um estudo que testou se o condicionamento com canamicina era efetivo na proteção contra um trauma acústico. Para determinar se o próprio processo de condicionamento era responsável por estimular os mecanismos de proteção, um dos grupos do estudo recebeu, ao invés de canamicina, solução fisiológica, nos mesmos esquemas de administração dos animais que foram condicionados com canamicina. Ambos os grupos foram expostos ao trauma acústico. Os animais que receberam solução salina fisiológica não demonstraram qualquer efeito protetor, o que levou os autores a concluir que a proteção resultante do estresse da manipulação dos animais e injeções não era significativo.¹¹

Tomamos conhecimento de poucos estudos que testaram o condicionamento com um agente físico (som) na tentativa de prevenção contra um posterior trauma ototóxico por drogas (antibióticos aminoglicosídeos ou antineoplásicos) ou vice-versa. Em um deles, ratos foram expostos a um ruído branco centrado em 8 kHz em uma intensidade de 85 dB por 15 minutos, e após 45 minutos foi administrada cisplatina endovenosa na dose de 14 mg/kg, dose única. A avaliação foi feita pela determinação dos limiares eletrofisiológicos por PEATE antes e após a administração de cisplatina. Os pesquisadores observaram que os animais que foram condicionados com ruído apresentaram uma alteração de limiar auditivo significativamente menor do que os que receberam apenas a cisplatina.¹⁰ Em outro estudo, que não tinha como objetivo primário estudar o fenômeno do condicionamento auditivo, mas sim, estudar o sinergismo entre amicacina e ruído, em uma população de camundongos CBA/J jovens, os pesquisadores relataram a “surpreendente conclusão” de que a administração do antibiótico, previamente ao trauma acústico, não apenas não causou uma potencialização dos danos causados por este último, como protegeu as células ciliadas externas que, nos animais que receberam amicacina previamente ao trauma acústico, mostravam menor lesão.¹¹ Outro estudo testou o condicionamento com gentamicina em doses não traumáticas para proteção contra um trauma acústico. Foram utilizadas cobaias albinas que receberam 30 mg/kg/dia por 30 dias consecutivos de gentamicina intramuscular e posteriormente expostos a um trauma acústico de 110 dB centrado em 4 kHz por 72 horas, ininterruptamente. Os pesquisadores observaram que os animais que foram condicionados com gentamicina apresentaram menores danos morfológicos, avaliados por microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, não foi observada uma proteção funcional, já que a mudança de limiares foi semelhante tanto no grupo condicionado quanto no não condicionado.¹² O condicionamento com ruído em uma frequência entre 1.410 a 5.650 Hz a 81 dB por 3 semanas continuamente foi utilizado em outro estudo para testar se promoveria proteção contra uma administração tópica de gentamicina intratimpânica.¹⁴ Os pesquisadores observaram que os animais condicionados com este estímulo apresentavam menor lesão de células ciliadas externas e internas. Não foram feitas avaliações funcionais. O condicionamento utilizando um ruído traumático, que leva a uma diminuição temporária dos limiares, também foi testado para proteção contra a ototoxicidade da cisplatina e da gentamicina. Este condicionamento se mostrou efetivo contra ambas as drogas, tanto morfológica quanto funcionalmente.¹³

No presente estudo, os animais que foram condicionados com ruído não apresentaram proteção em comparação com

os animais que foram tratados apenas com doses ototóxicas de gentamicina. Esta ausência de proteção pôde ser observada tanto funcionalmente quanto morfológica. Os animais condicionados com ruído apresentaram ausência de EOAPD, mudança de limiares eletrofisiológicos e lesão às células ciliadas externas semelhantes a dos animais que receberam apenas a droga. Não tomamos conhecimento de outro estudo que utilizou o protocolo de condicionamento nos mesmos moldes do utilizado no presente trabalho. A maioria dos trabalhos que testaram o condicionamento auditivo utilizou ruídos por períodos mais prolongados que o utilizado no presente trabalho. Algumas vezes o condicionamento foi feito com ruído por dias consecutivos.¹⁴ Baseamos a escolha de um condicionamento com ruído por um período mais curto em um estudo mencionado anteriormente, que mostrou bons resultados contra a ototoxicidade da cisplatina.¹⁰ Optamos por testar um protocolo um pouco mais longo do que o utilizado neste referido trabalho, que utilizou uma única apresentação de ruído por 15 minutos.

Outros estudos já haviam conseguido resultados positivos com o condicionamento com ruído para prevenir contra a ototoxicidade pela cisplatina.^{10,14} Um deles condicionou com ruído branco centrado em 8 kHz em uma intensidade de 85 dB por 15 minutos, para proteger contra uma dose única de cisplatina 14 mg/kg. O outro utilizou um ruído de 8-16 kHz a 91 dB, por 2 horas, o qual causava uma mudança temporária de limiar; este último também observou proteção dos animais condicionados com este ruído contra a ototoxicidade da cisplatina e também da gentamicina. Nosso protocolo de lesão ototóxica por gentamicina foi o mesmo utilizado em trabalhos anteriores e consistia de 160 mg/kg/dia, por 10 dias consecutivos.⁸ No presente trabalho, a apresentação do ruído condicionante foi feita em um período 30 minutos antes de cada administração do antibiótico. Nossa hipótese para a ausência de proteção desencadeada por este protocolo de condicionamento é de que ele não foi intenso o suficiente para desencadear os mecanismos intrínsecos responsáveis pela proteção; ao menos não intenso o suficiente para proteger contra um trauma da magnitude do causado por 160 mg/kg/dia, por 10 dias consecutivos. Uma das hipóteses de mecanismo com a qual condicionamento com ruído seja efetivo é pelo estresse desencadeado pela estimulação e a resultante liberação de *heat shock protein*.¹⁴ Portanto, parece ser importante que o estímulo de condicionamento gere algum tipo de estresse às estruturas cocleares. Estudos anteriores já mostraram que esta dose de gentamicina causa extensas lesões às células ciliadas externas.⁸ Sabendo que um protocolo de condicionamento havia sido efetivo pré-expondo a apenas 15 minutos de um ruído branco centrado em 8 kHz a uma intensidade de 85 dB, como no trabalho referido acima, quisemos testar se um protocolo de condicionamento utilizando uma exposição por curto período também seria eficaz. Encontrar protocolos de condicionamento mais simples e o menos traumático possíveis é de grande interesse quando se pensa em possíveis aplicações clínicas deste paradigma futuramente. É importante ressaltar algumas diferenças entre o estudo acima mencionado, que conseguiu resultados positivos com o condicionamento com ruído por 15 minutos, e o presente estudo. O animal por eles estudado era outro e, adicionalmente, a ototoxicidade foi conseguida com administração de dose única de cisplatina. Outro ponto importante é que a avaliação por eles realizada foi apenas funcional, estimando-se os limiares eletrofisiológicos, e existem estudos

que mostram desacordo entre os limiares auditivos e as alterações morfológicas.¹⁹ Os achados das EOAPD mostram que o condicionamento por nós utilizado parece ter estimulado as células ciliadas externas, já que os valores obtidos por este exame após a exposição ao ruído, no grupo Som, mostraram uma melhora da resposta, sendo que esta foi estatisticamente significativa para as frequências 1 e 4 kHz, conforme mostrado nos resultados. Portanto, o condicionamento com ruído a 85 dB por 30 minutos, por 10 dias consecutivos, parece ter estimulado as células ciliadas externas, mas não o suficiente para protegê-las contra a lesão ototóxica ou, talvez, esta alteração fosse apenas um sinal de início de lesão às estruturas cocleares. Tanto por nossa experiência pessoal quanto pelas informações obtidas por outros estudos, acreditamos que o condicionamento deve ser de uma intensidade não tão lesiva, que cause muitos danos cocleares, nem tão suaves que não leve a uma alteração às estruturas cocleares, o que parece ter sido o caso no presente protocolo de condicionamento.

O potencial efeito sinérgico entre ruído e antibióticos aminoglicosídeos tem que ser levado em, já que estes agentes são potencialmente lesivos para o sistema auditivo, e há estudos que mostram que animais que são expostos a eles simultaneamente apresentam lesão maior do que a apresentada pela simples soma dos danos de cada agente separadamente.²⁰ Nossos resultados mostram uma tendência de sinergismo entre o ruído e a gentamicina, já que os animais que receberam ambos fatores apresentaram resultados piores do que os que receberam cada fator isoladamente, apesar de não podermos, pelos resultados obtidos por este estudo, afirmar que, efetivamente, houve sinergismo entre estes fatores. Como referido acima, os animais que receberam apenas o ruído praticamente não apresentaram lesão. Já os animais do grupo Expt, que receberam gentamicina após o ruído, apresentaram maiores alterações do que os que foram tratados apenas com gentamicina. Funcionalmente, a variação de limiares auditivos foi muito semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa. Já os resultados das EOAPDs mostraram, nas frequências de 3 e 4 kHz, que os animais que receberam os dois fatores apresentaram uma piora dos resultados estatisticamente significativa, em comparação aos animais que receberam apenas a gentamicina. Histologicamente, os animais do grupo Expt, que foram tratados com os dois fatores, também apresentaram um número maior de lesão às células ciliadas externas. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que o condicionamento com ruído branco centrado em 4 kHz a uma intensidade de 85 dB por 30 minutos, por dia por 10 dias consecutivos, não foi efetivo em prevenir lesão coclear causada pela administração de gentamicina intramuscular na dose de 160 mg/kg/dia, por 10 dias consecutivos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Canlon B, Borg E, Flock A. Protection against noise trauma by pre-exposure to a low level acoustic stimulus. *Hear Res.* 1988;34:197-200.
2. Canlon B, Frasson A. Morphological and functional preservation of the outer hair cells from noise trauma by sound conditioning. *Hear Res.* 1995;84:112-24.
3. Campo P, Subramaniam M, Henderson D. The effect of 'conditioning' exposures on hearing loss from traumatic exposure. *Hear Res.* 1991;55:195-200.
4. Ryan AF, Bennett TM, Woolf NK, Axelsson A. Protection from noise-induced hearing loss by prior exposure to a nontraumatic stimulus: Role of the middle ear muscles. *Hear Res.* 1994;72:23-8.
5. Miyakita T, Hellström P, Frimanson E, Axelsson A. Effect of low level acoustic stimulation on temporary threshold shift in Young humans. *Hear Res.* 1992;60:149-55.
6. White DR, Boettcher FA, Miles LR, Grantton MA. Effectiveness of intermittent and continuous acoustic stimulation in preventing noise-induced hearing and hair cell loss. *J Acoust Soc Am.* 1997;103:1566-72.
7. Oliveira JAA, Canedo DM, Rossato M. Otoprotection of auditory hair cells against amikacin ototoxicity. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2002;68:7-13.
8. Maudonnet EN, Oliveira JAA, Rossato M, Hyppolito MA. Gentamicin Attenuates Gentamicin-Induced Ototoxicity - Self-Protection. *Drug Chem Toxicol.* 2008;31:11-25.
9. Wang Y, Hirose K, Liberman MC. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2002;3:248-68.
10. Theneshkumar S, Lorito G, Giordano P, Petrucci J, Martini A, Hatzopoulos S. Effect of noise conditioning on cisplatin-induced ototoxicity: A pilot study. *Med Sci Monit.* 2009;15:173-7.
11. Fernandez EA, Ohlemiller KK, Gagnon PM, Clark WW. Protection against Noise-Induced Hearing Loss in Young CBA/J Mice by Low-Dose Kanamycin. *JARO.* 2010;11:235-44.
12. Strose A, Colombari GC, Rossato M, Hyppolito MA, Oliveira JAA. Gentamicin conditioning confers auditory protection against noise trauma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013. doi:10.1007/s00405-013-2707-6.
13. Roy S, Ryals MM, Van den Bruele AB, Fitzgerald TS, Cunningham LL. Sound preconditioning therapy inhibits ototoxic hearing loss in mice. *J Clin Invest.* 2013;123:4945-9.
14. Suryadevara AC, Wanamaker HH, Pack A. The effects of sound conditioning on gentamicin-induced vestibulocochlear toxicity in gerbils. *Laryngoscope.* 2009;119:1166-70.
15. Smith DI, Mills JH. Anesthesia effects: auditory brainstem response. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1989;72:422-8.
16. Sha SH, Schacht J. Salicylate attenuates Gentamicin induced ototoxicity. *Lab Invest.* 1999;79:807-13.
17. Hyppolito MA, Oliveira JAA, Rossato M. Cisplatin ototoxicity and otoprotection with sodium salicylate. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006;263:798-803.
18. Aquino TJM. Ototoxicidade e otoproteção em orelha interna de cobaias utilizando gentamicina e amicacina: aspectos ultraestruturais e funcionais. [Tese de doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2007.
19. Chen YS, Liu TC, Cheng CH, Yeh TH, Lee SY, Hsu CJ. Changes of hair cell stereocilia and threshold shift after acoustic trauma in guinea pigs: Comparison between inner and outer hair cells. *ORL.* 2003;65:266-74.
20. Brown JJ, Brummett RE, Meikle MB, Vernon J. Combined effects of noise and neomycin Cochlear changes in the guinea pig. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1978;86:394-400.