



**Universidade de Brasília**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**JULIANA GUSMÃO DE ARAUJO**

**EFEITO DA MELATONINA NA OTOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DA  
CISPLATINA EM RATOS WISTAR**

**BRASÍLIA / DF**

**2019**



**Universidade de Brasília**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**JULIANA GUSMÃO DE ARAUJO**

**EFEITO DA MELATONINA NA OTOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DA  
CISPLATINA EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Lopes Sampaio

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus.

Brasília / DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A AR663e Araujo, Juliana Gusmão de  
Efeito da Melatonina na Ototoxicidade e Genotoxicidade  
da Cisplatina em Ratos Wistar / Juliana Gusmão de Araujo;  
orientador André Luiz Lopes Sampaio; co-orientador Selma  
Aparecida Souza Kückelhaus. -- Brasília, 2019.  
100 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) --  
Universidade de Brasília, 2019.

1. Ototoxicidade. 2. Cisplatina. 3. Melatonina. 4.  
Genotoxicidade. I. Sampaio, André Luiz Lopes, orient. II.  
Kückelhaus, Selma Aparecida Souza, co-orient. III. Título.

**JULIANA GUSMÃO DE ARAUJO**

**EFEITO DA MELATONINA NA OTOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DA  
CISPLATINA EM RATOS WISTAR**

Presidente da banca: Prof. Dr. André Luiz Lopes Sampaio

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Roberta Lemos Vieira Bezerra

Prof. Dr. Luiz Cláudio Gonçalves de Castro

Prof. Dr. Silvio da Silva Caldas Neto

Prof. Dr. Eduardo Magalhães da Silva (suplente)

Às minhas filhas, Letícia e Manuela, que nasceram junto com o doutorado e me trouxeram ainda mais motivos para seguir com este objetivo.

Ao meu marido, Paulo, cuja dedicação, cumplicidade e amor permitiram que meus sonhos profissionais pudessem ser traçados.

Aos meus pais, Paulo e Ana Rosa, por não medirem esforços para a minha felicidade e por me ensinarem a importância da família e o caminho da honestidade e persistência.

Ao meu irmão, Paulinho, pelo companheirismo e incentivo sempre presentes.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz Lopes Sampaio, que me acolheu academicamente e profissionalmente na minha chegada à cidade de Brasília.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus, que tanto contribuiu com seus conhecimentos de metodologia científica e morfologia.

À amiga Lucieny Silva Martins Serra pela incomensurável ajuda e companheirismo durante todas as fases desta pesquisa desde a sua concepção, o desenvolvimento dos protocolos dos exames até a torcida para as publicações.

A Ana Luiza Sarkis, médica veterinária da Universidade de Brasília, pelo suporte na atenção aos animais, ensinando a tratá-los com o respeito e cuidado que eles merecem.

Aos colegas do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Universitário de Brasília, que sempre me acolheram e incentivaram na realização do doutorado.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Costa Pires de Oliveira que me aceitou como sua aluna no início desta pesquisa.

Aos professores e preceptores da residência em Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco por terem despertado em mim a curiosidade científica e a vontade de crescer academicamente.

Aos professores e colegas do Mestrado em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco que me ensinaram metodologia científica, conceitos de bioestatística e melhoraram minha capacidade crítica como pesquisadora.

Às minhas amigas da turma 110 da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco que, embora distantes fisicamente, se fizeram presentes quase diariamente nas conversas sobre medicina e tantos outros assuntos.

Aos alunos de iniciação científica que colaboraram ativamente nas fases experimentais da pesquisa.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação de Ciências Médicas da Universidade de Brasília pelo suporte burocrático durante a realização do doutorado.

## RESUMO

A cisplatina é um agente quimioterapêutico altamente eficaz usado no tratamento de tumores sólidos. No entanto, seus efeitos colaterais graves permanecem como uma limitação para sua ampla utilização, em particular, a ototoxicidade e a genotoxicidade. Foi demonstrado que a melatonina, um derivado do triptofano, pode reduzir os efeitos tóxicos da cisplatina devido à sua atividade antioxidante. Além disso, a melatonina pode aumentar a eficácia da quimioterapia devido a mecanismos citotóxicos que levam à apoptose. **Objetivos:** determinar o efeito da melatonina contra a ototoxicidade e genotoxicidade em ratos Wistar tratados com cisplatina. **Materiais e Métodos:** quarenta e cinco ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle negativo (somente solução salina; grupo 1), melatonina (somente melatonina; grupo 2), cisplatina (cisplatina + solução salina; grupo 3) e cisplatina + melatonina (grupo 4). Aos ratos dos grupos 3 e 4 foi administrada uma dose única intraperitoneal de 10 mg/kg de cisplatina. Aos ratos dos grupos 2 e 4 foram administradas doses intraperitoneais diárias de 1 mg/kg de melatonina. As aferições das emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) foram realizadas nos dias 1 e 8. Os animais foram eutanasiados e perfundidos com solução de formaldeído a 10%. O número de neurônios viáveis e o seu diâmetro médio nos gânglios espiral e vestibular foram analisados. Na estria vascular, ligamento espiral e limbo espiral, foi estudado o número de células viáveis. Para pesquisar o efeito da melatonina contra a genotoxicidade da cisplatina, doze animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: controle negativo (solução salina; grupo A), cisplatina (cisplatina + solução salina; grupo B) e cisplatina + melatonina (grupo C). Aos ratos dos grupos B e C foi administrada uma dose única de 10 mg/kg de cisplatina. Os animais do grupo C receberam uma dose única de 1 mg/kg de melatonina antes da infusão de cisplatina. Todos os animais foram sacrificados após 48 horas. A medula óssea do fêmur dos ratos foi removida. A contagem de micronúcleos e a porcentagem de eritrócitos policromáticos foram analisadas. **Resultados:** Houve diminuição nas amplitudes das EOAPD nos animais que receberam cisplatina; no entanto, o grupo tratado com cisplatina + melatonina apresentou amplitudes de EOAPD comparáveis aos valores dos grupos controle. Verificou-se que os animais tratados com cisplatina (grupo 3) apresentaram maior perda de células em comparação com outros 3 grupos em todas as estruturas cocleares estudadas (gânglio espiral, gânglio vestibular, estria vascular, ligamento espiral e limbo espiral). O diâmetro dos neurônios nos gânglios espiral e vestibular também foi inferior nos animais do grupo 3. Os ratos tratados com melatonina tiveram menor contagem de micronúcleos e maior número de eritrócitos policromáticos que os animais tratados apenas com cisplatina. **Conclusão:** A melatonina pode ser usada como tratamento adjuvante do tumor devido à sua capacidade de diminuir a ototoxicidade e genotoxicidade induzidas por cisplatina.

**Palavras-chave:** Ototoxicidade, Cisplatina, Melatonina, Genotoxicidade, Emissões Otoacústicas.

## ABSTRACT

Cisplatin is a highly effective chemotherapeutic agent that is used to treat solid tumors; however, its severe side effects remain a limitation. In particular, the high incidence of cisplatin-induced ototoxicity and genotoxicity has attracted interest. Melatonin, a tryptophan derivative, has been shown to decrease the toxic effects of cisplatin due to its antioxidant activity. Besides that melatonin could increase the efficacy of cancer chemotherapy due to cytotoxic mechanisms that lead to apoptosis.

**Objectives:** The aim of this study was to determine the effect of melatonin against ototoxicity and genotoxicity in rats treated with cisplatin. **Materials and Methods:** forty-five female Wistar rats were randomly divided into four groups: negative control (saline solution only; group 1), melatonin (melatonin only; group 2), cisplatin (cisplatin + saline solution; group 3) and cisplatin + melatonin (group 4). Rats in groups 3 and 4 were administered a single intraperitoneal dose of 10 mg/kg cisplatin. Rats in groups 2 and 4 were administered a daily intraperitoneal doses of 1 mg/kg melatonin. Cochlear distortion-product otoacoustic emission (DPOAE) measurements were carried out on days 1 and 8. The animals were euthanized and perfused with 10% formaldehyde solution. The number of viable neurons and their mean diameter in the spiral and vestibular ganglia were analyzed. In vascular stria, spiral ligament and spiral limb, the number of viable cells was studied. All animals were sacrificed under anesthesia and bulla was taken out after decapitating. In order to research the protective effect of melatonin against cisplatin genotoxicity, twelve animals were randomly divided into three groups: negative control (saline solution; group A), cisplatin (cisplatin + saline solution; group B) and cisplatin + melatonin (group C). Rats in groups B and C were administered a single dose of 10 mg/kg cisplatin. Animals in group C were administered a single dose of 1 mg/kg melatonin before cisplatin infusion. All animals were sacrificed after 48 hours. The rat femoral bone marrow was removed. Micronucleus and percentage of polychromatic erythrocytes were analyzed. **Results:** There was a decrease in DPOAE amplitudes in the animals that received cisplatin; however, the group treated with cisplatin + melatonin presented DPOAE amplitudes comparable to those of the control groups. Animals treated with cisplatin (group 3) were found to have higher cell lost compared with other three groups in all cochlea structures studied (spiral ganglion, vestibular ganglion, stria vascularis, spiral ligament and spiral limbus). The diameter of neurons in the spiral and vestibular ganglia was also lower in group 3 animals. Rats treated with melatonin have lower micronucleus counts and higher number of polychromatic erythrocytes than rats treated with cisplatin only. **Conclusion:** Melatonin might be used as an adjuvant tumor treatment due to its ability to decrease cisplatin-induced ototoxicity and genotoxicity.

**Keywords:** Ototoxicity, Cisplatin, Melatonin, Genotoxicity, Otoacoustic emissions.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Apaf-1	Fator ativador de protease apoptótica
CTCAE	<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EOADP	Emissão otoacústica por produto de distorção
EOAT	Emissão otoacústica transiente
EPC	Eritrócitos policromáticos
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
MN	Micronúcleos
NCI	<i>National Cancer Institut</i>
NPS	Nível de pressão sonora
PEATE	Potencial evocado auditivo de tronco encefálico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mapa do <i>ranking</i> de câncer como causa de morte em pacientes abaixo de 70 anos em 2015. ....	13
<b>Figura 2</b>	Desenho esquemático da cisplatina. ....	16
<b>Figura 3</b>	Desenho esquemático da melatonina. ....	23
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática de um radical livre. ....	25
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática da ação das substâncias antioxidantes. ....	25
<b>Figura 6</b>	Esquema do labirinto anterior e posterior. ....	30
<b>Figura 7</b>	Corte histológico no plano médio-modiolar da cóclea de cachorro. ....	31
<b>Figura 8</b>	Corte histológico da cóclea. ....	32
<b>Figura 9</b>	Rato posicionado em caixa com proteção acústica para realização da EOADP. ....	40
<b>Figura 10</b>	Visão da cabeça do rato em decúbito dorsal com marcação do meato acústico externo. ....	43
<b>Figura 11</b>	Seguimento contendo as duas bulas timpânicas. ....	43
<b>Figura 12</b>	Amplitudes das Emissões Otoacústicas Produto de Distorção no dia 1 (D1) e no dia (D8). ....	51
<b>Figura 13</b>	Avaliação do gânglio espiral. ....	52
<b>Figura 14</b>	Fotomicrografias do gânglio espiral representativa dos grupos salina (A), melatonina (B), cisplatina (C) e cisplatina+melatonina (D). Aumento 400x, coloração H&E. ....	53
<b>Figura 15</b>	Avaliação do gânglio vestibular. ....	55
<b>Figura 16</b>	Fotomicrografias do gânglio vestibular representativa dos grupos salina (A), melatonina (B), cisplatina (C) e cisplatina+melatonina (D). Coloração H&E. Barra = 80 µm. ....	56
<b>Figura 17</b>	Análise da estria vascular. ....	57
<b>Figura 18</b>	Análise do ligamento espiral. ....	58
<b>Figura 19</b>	Fotomicrografias da estria vascular e ligamento espiral representativos dos grupos salina (A), melatonina (B), cisplatina (C) e cisplatina+melatonina (D). Coloração H&E. Barra = 30 µm. ....	59
<b>Figura 20</b>	Análise do limbo espiral. ....	60

<b>Figura 21</b>	Fotomicrografias do limbo espiral representativas dos grupos salina (A), melatonina (B), cisplatina (C) e cisplatina+melatonina (D). Coloração H&E. Barra = 50 µm. ....	61
<b>Figura 22</b>	Imagem do ducto coclear com visualização da membrana vestibular, estria vascular, ligamento espiral, limbo espiral, membrana tectória, membrana basilar e órgão de Corti.....	62
<b>Figura 23</b>	Imagem do órgão de Corti 1. ....	63
<b>Figura 24</b>	Imagem do órgão de Corti 2. ....	64
<b>Figura 25</b>	Imagem do órgão de Corti com visualização das células ciliadas externas e interna no detalhe. ....	64
<b>Figura 26</b>	Porcentagem de EPC (A) e número de micronúcleos (B) de eritrócitos de medula óssea de ratos (n = 5) após 48 horas da administração de medicamentos. ....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Tabela descritiva do experimento .....	42
<b>Tabela 2</b>	Emissão otoacústica por produto de distorção (EOAPD, dB NPS) avaliados no primeiro (D1) e no oitavo (D8) dia em todos os grupos estudados.....	50

## SUMÁRIO

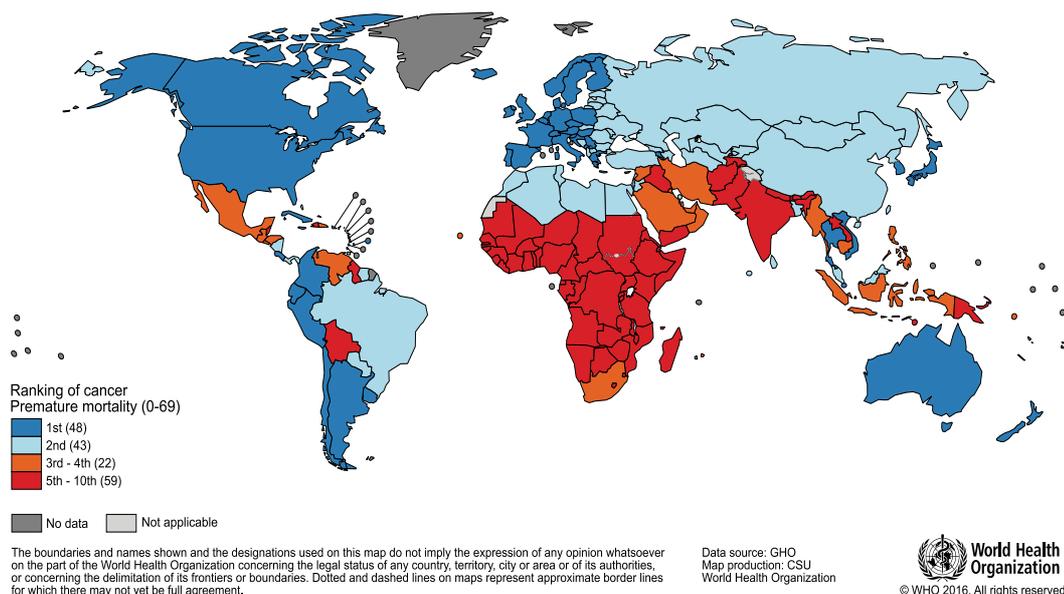
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>1 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>16</b>
1.1 Cisplatina	16
1.2 Toxicidade da cisplatina	18
1.3 Ototoxicidade	19
1.4 Genotoxicidade	22
1.5 Prevenção da toxicidade - Melatonina	23
1.6 Anatomia da orelha	29
1.7 O modelo animal - Rato Wistar	32
1.8 Avaliação funcional	34
1.9 Justificativa	35
1.10 Hipótese	36
1.11 Objetivos	36
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
2.1 Tipo do estudo	37
2.2 Planejamento	37
2.3 Seleção dos animais	38
2.4 Avaliação da Ototoxicidade	38
2.4.1 Critérios de exclusão	38
2.4.2 Procedimentos técnicos	39
2.4.3 Preparação histológica	42
2.5 Avaliação da genotoxicidade	45
2.5.1 Critérios de exclusão	45
2.5.2 Procedimentos técnicos	46
2.6 Procedimentos analíticos	47
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>49</b>
3.1 Avaliação da Ototoxicidade	49
3.1.1 Avaliação funcional	49
3.1.2 Avaliação histológica	51
3.2 Genotoxicidade	65
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>79</b>

<b>ANEXO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>94</b>

## INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte tanto nos países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Figura 1). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, o câncer é a primeira ou a segunda causa de morte antes dos 70 anos em 91 dos 172 países analisados, sobretudo em decorrência da redução das mortes por doenças cardiovasculares. Com o crescimento e o envelhecimento populacional nos países em desenvolvimento, onde residem 82% das pessoas do planeta, espera-se um aumento no número de novos casos [1].

Estima-se que, em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em nações em desenvolvimento. Países como o Brasil, que viveram um desenvolvimento e urbanização mais recentemente, sofrem, na atualidade, as consequências da adoção de estilo de vida que notoriamente predispõe ao aparecimento de tumores. Sabe-se que alguns dos fatores de risco para o câncer são associados ao desenvolvimento econômico, como o sedentarismo, menor número de filhos, maior idade materna no primeiro filho e dieta pobre em alimentos de origem vegetal como frutas, legumes, verduras, cereais integrais e leguminosas, e rica em alimentos processados [1].



**Figura 1** — Mapa do *ranking* de câncer como causa de morte em pacientes abaixo de 70 anos em 2015.

Fonte: Bray *et al.*, 2018 [1].

No Brasil, estima-se a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer no biênio 2018-2019. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, colón e reto entre os mais incidentes, entretanto ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago. Os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres são os mais frequentes [2].

No último século, o desenvolvimento de agentes citotóxicos foi revolucionário para a terapia do câncer. A cisplatina é um agente antineoplásico altamente eficaz e amplamente utilizado. A droga é o quimioterápico de primeira linha para uma grande variedade de neoplasias. É usada no tratamento de tumores sólidos em adultos e crianças, como os de ovário, testículo, pulmão, útero, bexiga e as lesões de cabeça e pescoço [3].

Apesar de seu uso amplo e rotineiro, o constante risco de efeitos secundários pode trazer impactos na qualidade de vida da população tratada. Dentre os eventos indesejados mais encontrados, destacam-se a ototoxicidade, a nefrotoxicidade, a genotoxicidade, a supressão medular e os distúrbios gastrointestinais. Estas ocorrências exigem, em muitas situações, interrupção do tratamento, o que pode, em muitos casos, levar ao comprometimento da sobrevida dos doentes [4].

Além disso, o crescente aumento dos casos de resistência aos quimioterápicos é implicado como causa de fracasso terapêutico em 90% dos pacientes com câncer metastático. Na tentativa de superar a resistência à droga, a dose de cisplatina tem aumentado nos protocolos de tratamento mais recentes. No entanto, a existência de efeitos colaterais potencialmente graves e limitantes, por vezes impede a utilização destas dosagens, que poderiam maximizar os efeitos terapêuticos com impacto benéfico no tratamento [5].

A ação nefrotóxica da cisplatina pode ser amenizada pelo aumento da hidratação, pela utilização de soluções salinas hipertônicas e pela administração de diuréticos, como o manitol. Já os sintomas gastrointestinais podem ser combatidos com utilização de antieméticos [4].

Embora a adoção destas medidas, já bem estabelecidas na literatura, consiga minimizar os efeitos nefrotóxicos e gastrointestinais, a ototoxicidade e a genotoxicidade ainda carecem de estratégias comprovadamente eficazes para prevenção. Há necessidade de desenvolvimento e experimentação de substâncias

capazes de proteger o organismo dos pacientes submetidos a este tipo de tratamento.

A ototoxicidade da cisplatina é, ainda hoje, um efeito colateral da medicação que causa significativa morbidade e grande impacto na qualidade de vida após o tratamento oncológico. De 23 a 54% dos adultos e até 90% das crianças com neoplasias de cabeça e pescoço tratadas com cisplatina desenvolvem ototoxicidade [6]. Esta elevada frequência, associada à alta prevalência das neoplasias sensíveis à cisplatina na população, tornam extremamente necessária e urgente a pesquisa de formas de reduzir os efeitos deletérios da terapia, a fim de otimizar o tratamento e reduzir a morbidade destes pacientes.

Vários modelos animais e culturas celulares já foram utilizados para o estudo dos mecanismos de lesão da cisplatina e para testar possíveis substâncias protetoras, sobretudo ratos [7–10].

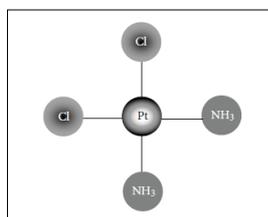
A melatonina é uma substância endogenamente produzida mais conhecida por sua capacidade de sincronizar o ritmo circadiano [11]. Sabe-se que a melatonina estimula a síntese das enzimas antioxidantes e as protege contra o dano oxidativo que, por vezes, prejudica o adequado funcionamento delas [12,13].

Portanto, diante do efeito antioxidante da melatonina já bem demonstrado, espera-se que sua utilização nesta pesquisa estabeleça novas perspectivas para prevenção da ototoxicidade e da genotoxicidade durante o tratamento quimioterápico com a cisplatina, visando a futuras aplicações biomédicas e biotecnológicas.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Cisplatina

A cisplatina foi primeiramente descrita por Reiset em 1844 e, 1 ano após, Michel Peyrone descreveu um outro composto com a mesma fórmula molecular. Apenas em 1893, Alfred Werner propôs serem os 2 compostos isômeros: o complexo de Reiset correspondia ao isômero e o de Peyrone à forma *cis* (Figura 2) [14].



**Figura 2** — Desenho esquemático da cisplatina.

Fonte: Carvalho, 2009 [14].

Apenas em 1960, Barnett Rosenberg na Universidade de Michigan descobriu que a cisplatina inibia a mitose da bactéria *Escherichia coli* ao estudar o efeito do campo elétrico em uma cultura de bactérias, evidenciando suas possíveis propriedades antitumorais [15,16]. No início da década de 70, a cisplatina começou a ser submetida a testes clínicos, inicialmente em pacientes terminais e posteriormente em tumores localizados, como de testículo e ovário [17].

Em 1978 a cisplatina foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de tumores de ovário, testículo e bexiga. O lançamento no mercado americano ocorreu no ano seguinte. A droga revolucionou o tratamento oncológico, chegando a transformar tumores anteriormente quase sempre letais, como o de testículo, em curáveis em até 80% dos casos [4].

O sucesso da droga no entanto veio acompanhado por inúmeros efeitos colaterais, para alguns dos quais ainda hoje não há forma de prevenção ou tratamento. Mais recentemente, tem-se observado também a ampliação da resistência dos tumores ao quimioterápico, tornando necessário o aumento da dosagem usualmente aplicada para se garantir um efeito terapêutico adequado, o que tende a piorar os efeitos adversos da droga [4].

O efeito citotóxico da cisplatina é resultado de sua ligação ao DNA, com formação de adutos, originando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais. O mecanismo de ação da droga é, portanto, relacionado à inibição da transcrição e replicação, induzindo a apoptose das células tumorais [14]. Sua atuação envolve ainda a produção de radicais livres, a redução dos mecanismos de defesa antioxidantes e a ativação da cascata das caspases, determinando apoptose celular. No entanto, os efeitos da cisplatina não se restringem apenas às células cangerígenas. Assim, diferentes tecidos e órgãos podem ser impactados pela atuação da medicação [18–20].

A nefrotoxicidade foi a primeira adversidade a limitar a utilização da cisplatina, no entanto os danos renais puderam ser controlados com aumento da hidratação e diurese. Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas visando a redução dos demais efeitos colaterais, de modo que os benefícios terapêuticos da droga continuem sendo alcançados [4]. Além disso, estudos extensos têm sido realizados nas últimas décadas para determinar as causas da resistência à cisplatina e vários mecanismos têm sido implicados variando de acordo com a linhagens celulares específicas e tipo do tumor [21].

Do ponto de vista econômico, a cisplatina é uma droga relativamente barata, o que facilita sua utilização tanto nos hospitais públicos quanto nos privados. O emprego rotineiro de quimioterápicos mais novos e caros ainda não apresentou superioridade claramente demonstrada em relação à cisplatina na maioria dos estudos apesar da existência de vieses de seleção dos pacientes nas publicações sobre o tema. Desta forma, considerando a realidade vivenciada no Brasil, o emprego da cisplatina ainda é amplamente difundido, tendo a droga um papel essencial no tratamento dos mais variados tipos de câncer.

Na rotina oncológica e em estudos experimentais, a cisplatina pode ser aplicada em dose única ou com a dosagem fragmentada em alguns poucos dias. Sabe-se que quando se fragmenta a dose, há minimização dos efeitos colaterais, estratégia muito utilizada na prática clínica por permitir maior dose cumulativa e, portanto, melhor efeito terapêutico. Os ratos Wistar costumam ter menor resistência sistêmica à cisplatina e estudos com maior duração em geral possuem maiores taxas de mortalidade [22,23].

Nas pesquisas em roedores com dose única de cisplatina, há grande variabilidade na dosagem utilizada, desde 10 mg/kg a 20 mg/kg [24–29]. Observa-se

que mesmo as menores doses já são capazes de desencadear dano auditivo e genotoxicidade [30].

## 1.2 Toxicidade da cisplatina

A cisplatina, apesar de ser amplamente utilizada em todo o mundo, apresenta grande toxicidade sistêmica. A suscetibilidade dos pacientes aos efeitos deletérios da cisplatina depende de diversos aspectos. Fatores como a sensibilidade individual, as condições clínicas do indivíduo e a magnitude da dose cumulativa já foram implicados [3,6,31].

Náuseas e vômitos estão entre os mais frequentes efeitos adversos associados à quimioterapia. Dentre as drogas utilizadas na oncologia, a cisplatina particularmente está entre os agentes terapêuticos de maior efeito emético. Há também descrição de outros sintomas gastrointestinais, como anorexia e diarreia. Dentre os fatores que aumentam o risco desses efeitos estão o sexo feminino, dose alta e infusão rápida da cisplatina. O desenvolvimento de antieméticos potentes melhorou bastante a tolerabilidade à droga, permitindo a manutenção dos tratamentos propostos [32–35].

Inicialmente, a nefrotoxicidade foi o achado que mais limitou a utilização de altas dosagens da cisplatina, havendo, por vezes, necessidade de diálise e relato de alguns casos de letalidade. Histologicamente, a cisplatina pode causar lesão tubular aguda grave com redução da filtração glomerular [36]. O tratamento prévio com alguns medicamentos, incluindo outros compostos de platina, ciclosporinas e antibióticos aminoglicosídeos, predispõe os pacientes à nefrotoxicidade induzida por cisplatina [37].

O aumento da hidratação e diurese com manitol ou diuréticos de alça tornou a nefrotoxicidade mais gerenciável, permitindo o aumento seguro da dose para além de 40 mg/m<sup>2</sup> a cada três semanas. Dosagem de até 100 mg/m<sup>2</sup> por até quatro ciclos foi considerada segura em pacientes jovens com tumores de células germinativas, osteossarcomas ou outros tumores sólidos na infância, ampliando a utilização de altas doses para outras indicações, como câncer de ovário [38].

A cisplatina provoca toxicidade hematológica nas diversas linhagens hematopoiéticas, como eritroides, mieloides e linfoides. A leucopenia induzida pela

cisplatina ocorre em até 50% dos pacientes, no entanto a contagem de leucócitos abaixo de  $1,5 \times 10^9/l$  ocorre em apenas 5% dos pacientes. Em humanos, a leucopenia inicia entre o 6º e o 26º dias, havendo recuperação em até 40 dias [35]. Já a trombocitopenia induzida pela cisplatina ocorre em 2 a 50% dos pacientes, atingindo níveis mais alarmantes em menos de 10% deles. A trombocitopenia inicia-se mais tardiamente entre 10 e 26 dias com recuperação em até 45 dias [35].

Nos paciente oncológicos, a anemia certamente é de causa complexa e multifatorial, no entanto o tratamento com cisplatina está diretamente relacionado ao aparecimento da anemia em até 40% dos pacientes [35]. Doses elevadas de cisplatina parecem resultar em maior dano celular e em toxicidade hematológica mais grave. A hidratação e o aumento da diurese não afetam a incidência ou a gravidade da mielossupressão induzida pela cisplatina [32].

Ademais, a cisplatina pode afetar os nervos sensitivos periféricos levando à neuropatia periférica. A cisplatina induz degeneração e morte neuronal. Infelizmente, vários fármacos neuroprotetores e manobras neuroregenerativas não demonstraram eficácia suficiente para permitir a aprovação por agências reguladoras [39].

### **1.3 Ototoxicidade**

Existe uma correlação já bem descrita entre os efeitos ototóxicos e todo subgrupo de quimioterápicos do qual a cisplatina faz parte. No entanto, o mecanismo exato da ototoxicidade da cisplatina ainda não está completamente elucidado. A hipótese mais aceita é a produção de radicais livres e a redução dos mecanismos de defesa antioxidantes cocleares, com ativação da cascata das caspases, determinando apoptose celular [40]. Outro mecanismo aceito é a alteração da produção de proteínas da família do gene Bcl-2, responsáveis pelo controle da apoptose celular [41].

A cisplatina, ao atingir o órgão de Corti, inicia sua ação deletéria pelas células de sustentação, seguidas pelas células ciliadas externas, principalmente nos giros médio e basal, posteriormente estria vascular e células do gânglio espiral [42]. A cisplatina é capaz de causar dano coclear tanto em doses agudas elevadas quanto em altas doses cumulativas [43].

A ototoxicidade pode ser manifestada com perda auditiva, zumbido ou vertigem. A perda auditiva é geralmente neurossensorial bilateral principalmente em altas frequências, dose-dependente, de caráter progressivo e irreversível [44]. O impacto da perda auditiva pode ser significativo para a qualidade de vida destes pacientes. Nas crianças, a repercussão de uma perda auditiva precocemente instalada é ainda mais catastrófica, havendo grande impacto na aquisição de linguagem e no desenvolvimento cognitivo [45].

A prevalência de ototoxicidade induzida pela cisplatina apresenta grande variabilidade nos estudos clínicos dependendo das diversas características da população estudada como idade, forma de administração e dose cumulativa da cisplatina, variando desde 20 a 90% [46].

A grande variabilidade encontrada nos estudos é também resultado dos diferentes critérios utilizados nos artigos para definir e classificar a perda auditiva. Há várias escalas disponíveis e nenhuma delas é de utilização ampla e universal, o que limita o conhecimento da verdadeira prevalência da ototoxicidade da cisplatina ou de qualquer outra droga. Desta forma, o desenvolvimento de modelos de predição de risco de ototoxicidade com a cisplatina são limitados [46,47].

Um comitê de membros da *American Speech-Language-Hearing Association* estabeleceu, em 1994, diretrizes para o monitoramento auditivo de indivíduos que estão fazendo uso de medicações ototóxicas, particularmente cocleotóxicas. Segundo as normas publicadas, a primeira avaliação audiológica, composta por audiometria tonal e vocal, deveria ser realizada antes do início da terapia medicamentosa ou no máximo 24 horas após o início da administração de quimioterápicos, como a cisplatina, e 72 horas após o início da administração de antibióticos. Os indivíduos em tratamento com cisplatina deveriam realizar as avaliações audiológicas dentro das 24 horas após cada ciclo de quimioterapia, para acompanhamento e diagnóstico precoce da toxicidade coclear. Em casos nos quais é impossível a realização da audiometria, deve-se realizar as Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção (EOAPD) ou o Potencial Evocado Auditivo de Tronco Cerebral (PEATE). Este protocolo de avaliação e acompanhamento é utilizado em alguns estudos, mas tem a desvantagem de necessariamente precisar de um exame inicial, o que muitas vezes não é realizado sobretudo em crianças pequenas [47].

Já a escala do *National Cancer Institut* (NCI), *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE), inclui tanto critérios objetivos quanto subjetivos. As notas são atribuídas com base na mudança de limiar em relação à audiometria inicial e não na perda auditiva real, o que impede a adequada avaliação do impacto da alteração na vida do paciente e dificulta bastante a comparação de resultados [48].

Particularmente nas crianças, é comum não haver disponibilidade de realização de exames audiológicos antes do início do tratamento. Desta forma, Brock *et al.* desenvolveram uma escala específica para crianças com a vantagem de não requerer exame prévio [45]. No entanto, a perda auditiva é considerada apenas quando os limiares são superiores a 40dB, fazendo com que muitas crianças com perdas auditivas leves não sejam diagnosticadas. Particularmente em crianças, cujas conexões cerebrais e linguagem encontram-se em construção, ignorar perdas leves pode gerar prejuízos na comunicação e no processamento auditivo central. Na tentativa de corrigir estas falhas, Chang *et al.* definiram um novo critério que classificava como perda auditiva os limiares entre 20 e 40dB [45] e adicionava as frequências de 3Hz e 6kHz às análises [49]. Apesar destas melhorias, a nova escala é mais complexa, o que limita sua ampla utilização.

De modo geral, a maior prevalência de perda auditiva é encontrada nos estudos que avaliam a população pediátrica, particularmente em menores de cinco anos, e em pacientes que recebem maiores doses cumulativas. Os idosos também parecem ter maior predisposição. Quanto à forma de administração, sabe-se que nos estudos nos quais a cisplatina foi administrada por meio de infusão intravenosa rápida houve maior prevalência de ototoxicidade [6].

Além destes fatores, pacientes com função renal deteriorada são mais comumente acometidos pelo dano coclear resultante do uso da cisplatina, bem como aqueles com associação da cisplatina a outras drogas ototóxicas, perda auditiva prévia ou radioterapia na região da orelha ou do nervo auditivo [6,50]. Observa-se ainda uma predisposição geneticamente induzida, havendo destaque das mutações mitocondriais em algumas pesquisas [6].

Há necessidade de monitoramento periódico da audição para identificação dos sinais mais precoces de toxicidade coclear, no entanto, não há tratamento nem medida preventiva conhecidamente eficazes para a ototoxicidade que sejam utilizados na prática clínica [51].

## 1.4 Genotoxicidade

A cisplatina inibe a proliferação celular por intermédio de uma série de mecanismos diferentes, incluindo lesão direta do DNA, alteração no metabolismo do DNA e no processo de mitose celular. Tratamentos bem-sucedidos matam células tumorais, mas também exercem efeitos em tecidos saudáveis, podendo induzir alterações genômicas [52,53].

Na genética, genotoxicidade é a capacidade de algumas substâncias de gerar danos no material genético a elas expostos, afetando a integridade do material genético celular. As substâncias genotóxicas são todas as que têm afinidade para interagir com o DNA, sendo potencialmente mutagênicos ou cancerígenos [54].

A atividade citotóxica da cisplatina já foi reportada em diversos estudos da literatura [55,56]. O mecanismo de ação da citotoxicidade está relacionado à produção de radicais livres e à redução dos mecanismos de defesa antioxidantes, com ativação da cascata das caspases, determinando apoptose celular; bem como a modulação de proteínas da família do gene Bcl-2, responsáveis pelo controle da apoptose celular [18–20].

A mutagenicidade da cisplatina está associada a troca de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas nas células sobretudo da medula óssea [55]. Em células somáticas normais, mutações induzidas pela quimioterapia podem acelerar processos tumorigênicos. Sabe-se que doentes que sobrevivem por longos períodos após tratamentos oncológicos apresentam maiores incidências de tumores secundários em diferentes órgãos [57]. Isto é relevante sobretudo para os pacientes pediátricos. Desta maneira, diversos tecidos e células do corpo, particularmente os proliferativos, podem ser afetados, sendo a leucemia o câncer mais encontrado nestes casos [58,59].

Além disso, as mutações induzidas pelo tratamento nas células cancerígenas sobreviventes aumentam a heterogeneidade genética do tumor e podem contribuir para o desenvolvimento de resistência a tratamentos posteriores [59].

A avaliação da genotoxicidade pode ser feita recorrendo à contagem de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos da medula óssea e da avaliação da razão entre os eritrócitos policromáticos e os eritrócitos normocromáticos. Micronúcleos são pequenos fragmentos de cromossomos ou cromátides envoltos por membrana nuclear adjacentes ao núcleo original da célula. São marcadores de

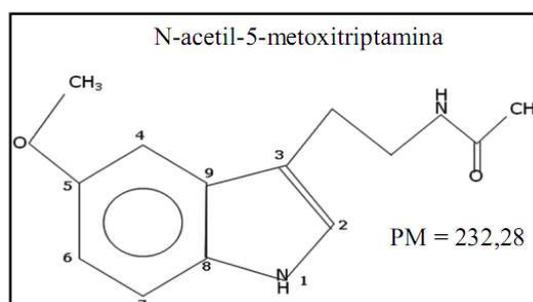
dano cromossômico [60]. A pesquisa de micronúcleos é um teste rápido e fácil para pesquisa de genotoxicidade [61].

Em testes em células da medula óssea, espermatogônias e espermatozóitos de mamíferos (não humanos), a cisplatina induz aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, formação de micronúcleos, adutos de DNA e surgimento de tumores [62,63]. Em células sanguíneas humanas a cisplatina induz aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, formação de micronúcleos, adutos de DNA e mutações [53,64].

### 1.5 Prevenção da toxicidade - Melatonina

Diversas substâncias têm sido testadas com o objetivo de reduzir os efeitos tóxicos da cisplatina. Dentre elas, destacam-se tiosulfato de sódio, dietilcarbamato, ácido 4-metilbenzóico, ácido lipóico, glutathione, metionina, procaína, ginkgo biloba, pirofosfato de tiamina, apomicina, minociclina, vitamina C e compostos sulfurados [22,29,43,65–69].

A melatonina, n-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 3), é uma substância endogenamente produzida mais conhecida por sua capacidade de sincronizar o ritmo circadiano [11]. É produto resultante do metabolismo do triptofano na glândula pineal. No entanto, sabe-se que a substância é também produzida em uma ampla variedade de células e tecidos, como nas células do sistema imunológico, cérebro, epitélio respiratório, medula óssea, intestinos, ovários, testículos, pele e até mesmo na cóclea [70].



**Figura 3** — Desenho esquemático da melatonina.

Fonte: sigmaldrich.com.

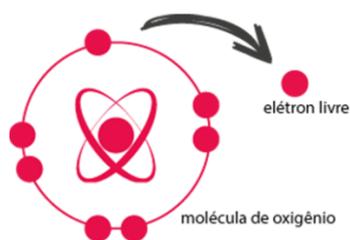
A melatonina possui ações mediadas por receptores e ações não mediadas por receptores. Seus receptores são amplamente distribuídos nas membranas celulares, bem como nos núcleos. Além disso, não existem barreiras morfofisiológicas à melatonina, como a barreira hematoencefálica. Isso significa que a melatonina provavelmente funciona em todas as células com as quais entra em contato [71].

Em mamíferos, a melatonina sinaliza processos intracelulares via ativação de receptores. Há três tipos de receptores de membrana, adequadamente clonados e molecularmente caracterizados. Os receptores de alta afinidade, MT1 e MT2, pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G. Esses receptores estão distribuídos por todo o organismo desde o sistema nervoso central, onde estão presentes em muitas estruturas, até a periferia do organismo, sendo encontrados em muitos órgãos e tecidos. As funções mediadas por estes receptores incluem o controle sazonal da reprodução, a modulação dos processos do sono e as influências no crescimento ósseo e na osteoporose. O terceiro tipo de receptor de membrana é o MT3, cujas ações não estão completamente esclarecidas [71,72].

O receptor nuclear com afinidade para a melatonina é da família dos receptores de ácido retinóico. Alguns dos efeitos atribuídos a essa interação são a regulação da expressão da enzima lipo-oxigenase, da expressão das enzimas antioxidantes, da síntese de interleucina-2 e seu receptor, além da regulação da síntese do receptor de estrógeno do tipo E2 $\alpha$  [72].

A melatonina possui ainda ações diretas, independentes de receptores, sobre os radicais livres de oxigênio e nitrogênio. A droga e seus metabólitos possuem função antioxidante. Esta atuação envolve a remoção direta dos radicais livres e seus produtos, a estimulação das atividades das enzimas antioxidantes, a inibição das enzimas pró-oxidativas, a promoção da síntese da glutatona (importante antioxidante), a ação sinérgica com outros antioxidantes e a redução da geração de radicais livres por meio de mecanismos mitocondriais [71].

De maneira simplificada, o termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, ou seja, são moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons não emparelhados. Esta característica faz deles substâncias com alta reatividade [73] (Figura 4).

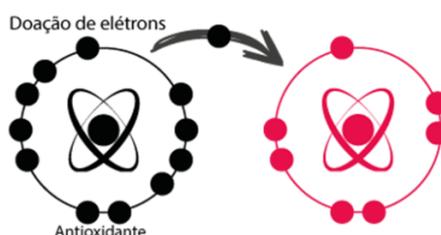


**Figura 4** — Representação esquemática de um radical livre.

Fonte: Sanpei, 2017.

Como a maioria destas substâncias são derivadas do metabolismo do  $O_2$ , utiliza-se o termo “Espécies Reativas do Oxigênio” (ERO). Elas são instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. As ERO são geradas em grande quantidade durante o estresse oxidativo, condição em que são afetadas moléculas como proteínas e DNA. É essencial nos organismos a manutenção do equilíbrio entre as ERO e o sistema de defesa antioxidante [74].

Um desequilíbrio entre a formação e a remoção de radicais livres pode levar a uma condição patológica denominada estresse oxidativo. No entanto, o corpo humano emprega moléculas conhecidas como antioxidantes para combater esses radicais livres [75] (Figura 5).



**Figura 5** — Representação esquemática da ação das substâncias antioxidantes.

Fonte: Sanpei, 2017.

O estresse oxidativo pode desencadear o processo de apoptose celular. Apoptose é uma forma de morte celular programada que fisiologicamente tem um papel essencial na embriogênese, diferenciação celular, proliferação e defesa contra células infectadas, danificadas ou com mutações. Sabe-se alterações nos processos celulares com redução da apoptose podem resultar no surgimento de um câncer [76].

Diferentemente da necrose celular, que não envolve nenhum padrão regular de degradação de DNA ou proteínas, a apoptose é caracterizada morfológicamente por contração citoplasmática, condensação de cromatina, fragmentação nuclear, fragmentação de DNA, formação de bolha de membrana citoplasmática e manutenção da integridade das organelas [77]. A importância primária do conceito de apoptose para a oncologia reside no fato de ser um fenômeno sujeito à estimulação e inibição, regulando o surgimento e crescimento de tumores [78].

A mitocôndria exerce uma função primordial na cascata de eventos que levam à apoptose. Na sua via intrínseca, há um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial que libera proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo c, usualmente confinadas no interior desta organela. O citocromo c liberado no citoplasma agrega-se ao fator ativador de protease apoptótica (Apaf-1) e ao dATP formando o apoptossomo. Este último ativa a caspase 9 dando início à cascata de ativação apoptótica (caspases 3, 6 e 7) [76].

A via extrínseca da apoptose acontece por meio da interação receptor-ligante, como por exemplo o fator de necrose tumoral. Esta ligação ativará uma cascata de proteínas, que culminará na ativação da caspase 8, dando também seguimento na cascata das caspases (caspases 3, 6 e 7) [76].

O crescimento da produção de ERO gera um consumo de antioxidantes como o NADPH e glutatona, danificando a cadeia respiratória mitocondrial e gerando um consequente aumento da permeabilidade da sua membrana, dando início à via intrínseca da apoptose [76].

A melatonina, assim como qualquer antioxidante, possui a capacidade de doar um ou mais elétrons para os radicais livres. Neste processo de eliminação dos radicais livres, a melatonina é convertida em metabólitos que parecem ser tão eficazes quanto ela na neutralização das ERO e dos agentes tóxicos associados [79].

Diferentemente de outros antioxidantes, a melatonina é capaz de regular os níveis de glutatona, estimulando duas enzimas envolvidas em seu metabolismo, a glutatona-peroxidase e a glutatona-redutase. Desta forma, a melatonina restaura os níveis de glutatona, interrompendo o desencadeamento da cascata de apoptose celular [80]. Além disso é capaz de proteger estas enzimas contra o dano oxidativo que, por vezes, prejudica o adequado funcionamento delas [13].

Em estudos comparativos com outros antioxidantes bem conhecidos, como as vitaminas C e E, a melatonina tem sido, muitas vezes, considerada superior em termos da sua capacidade de proteger contra destruição molecular por derivados tóxicos de oxigênio [13]. Uma das vantagens da melatonina em relação a ação de outros antioxidantes é a sua capacidade de penetrar em ambientes lipídicos (membranas celulares) e aquosos (citoplasma), ampliando seus locais de atuação dentro das células. Além disso, as ações de melatonina na mitocôndria, que são normalmente o principal local de geração intracelular de radicais livres, podem também contribuir para a sua elevada eficácia na proteção contra os danos oxidativos [79].

O gene *bcl-2* produz proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak) e antiapoptóticas (*bcl-2* e *bcl-xl*). O aumento da expressão da proteína *bcl-2*, por reduzir a apoptose, pode levar ao processo de oncogênese e ao crescimento de tumores [78]. O tratamento com cisplatina altera os processos de transcrição do gene *bcl-2*, gerando descontrole da homeostase apoptótica com aumento da morte celular, tanto de células cancerígenas quanto de células normais [41,76]. A melatonina parece aumentar a expressão da proteína *bcl-2* com consequente efeito antiapoptótico. Este efeito contribui para o efeito protetor contra a toxicidade da cisplatina às células não-tumorais [81,82].

Estudos anteriores já avaliaram o benefício do efeito antioxidante da melatonina, utilizando-se de vários modelos animais, na degeneração neuronal relacionada à idade, na injúria cerebral traumática e na hipertrofia ventricular [83].

Segundo Espino *et al.*, a melatonina auxilia o sistema defensor antioxidante do organismo, atuando na remoção dos radicais livres, tanto pela sua atuação quanto pela ação de seus metabólitos. A melatonina age neutralizando as ERO e outros agentes tóxicos, o que explica a citoproteção na medula óssea dos ratos, evidenciada pelo estudo [79].

A administração da melatonina mostrou-se capaz de exercer efeito protetor na função renal em modelos experimentais de nefrotoxicidade induzida pela cisplatina [83–87]. Já foi também bem demonstrado o benefício na prevenção da toxicidade na medula óssea e ao dano reprodutivo [88–90].

Especificamente em relação à ototoxicidade, a melatonina já demonstrou ser eficaz na prevenção do dano gerado pelos antibióticos gentamicina e amicacina [91,92]. Lopez *et al.*, em 2000, demonstraram o efeito protetor da melatonina em

associação com outros antioxidantes contra a ototoxicidade induzida pela cisplatina [25].

É importante salientar que quando se busca uma droga capaz de reduzir efeitos colaterais de qualquer quimioterápico, é imprescindível o conhecimento acerca dos efeitos desta substância na ação antineoplásica do medicamento antineoplásico. Diante disto, estudos foram conduzidos para atestar a segurança da utilização da melatonina em pacientes oncológicos sem que isso prejudicasse o tratamento do tumor. Foi observado que a melatonina não apenas previne algumas das reações adversas dos quimioterápicos e melhora a qualidade de vida dos doentes, mas também pode melhorar a sobrevida destes pacientes [93,94,103–109,95–102].

A melatonina demonstra ter uma ação antimitótica resultante da redução da expressão gênica intranuclear e da inibição da liberação e da atividade dos fatores de crescimento, atuando como molécula antiproliferativa. Neste aspecto, já estão bem estabelecidos efeitos antitumorais da melatonina em muitos tipos de câncer, reduzindo a proliferação de células cancerígenas em baixas concentrações. Além disso, em altas concentrações a melatonina parece induzir apoptose em alguns tipos específicos de câncer. Um efeito sinérgico foi encontrado em vários tipos de câncer quando é administrado em combinação com agentes quimioterapêuticos [103,105,108,110–113]

A melatonina poderia ainda contribuir para os tratamentos quimioterápicos por intermédio de outros mecanismos, incluindo efeitos antiangiogênicos, antiaquéticos, anti-inflamatórios e imunoestimulantes [104,108].

Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, a melatonina tem seu uso estabelecido na clínica médica no tratamento de alguns distúrbios do sono como insônia por fase retardada, ciclo vigília-sono com períodos diferentes de 24h, latência prolongada para o sono, fragmentação do sono, distúrbios comportamentais do sono REM, correções do sono do idoso, dessincronização entre o ciclo vigília-sono e o dia e a noite, como observado com frequência em alguns tipos de cegueira. Além disso, por ser um agente antioxidante, antiamiloidogênico, neurotrófico e neuroplástico, é usado como um coadjuvante terapêutico para tratamento dos distúrbios do sono de pacientes com doenças neurológicas e degenerativas como doenças do espectro do autismo, síndrome de déficit de atenção e hiperatividade, e Smith-Magenis [72].

A variabilidade observada nas doses de melatonina utilizadas é grande. Para tratamento dos distúrbios do sono, utiliza-se doses de 5 a 10 mg do indivíduo adulto. No entanto, nos estudos que advogam o uso da melatonina pelo seu potencial antioxidante, são observadas doses bem superiores, chegando a 40 mg ao dia nos estudos em humanos, particularmente nos pacientes oncológicos [104,114].

Nas pesquisas em animais que avaliam o efeito protetor da melatonina contra os mais diversos eventos adversos, existem experimentos que utilizam uma dose única antes da aplicação da droga tóxica. Dentre estes, há pesquisas aplicando entre 2 e 10 mg/kg em dose única [84,115,116]. Existem também artigos que mostram uso diário da melatonina ao longo de períodos variáveis de observação. Nestes, as doses variaram de 1 a 5 mg/kg/dia durante períodos de três a oito dias, com doses totais alcançando até 25 mg/kg nos estudos de maior tempo de duração [85,86,117,118]. Ademais, dosagens de até 250 mg/kg já foram utilizadas para demonstrar a segurança da melatonina [88,119,120]

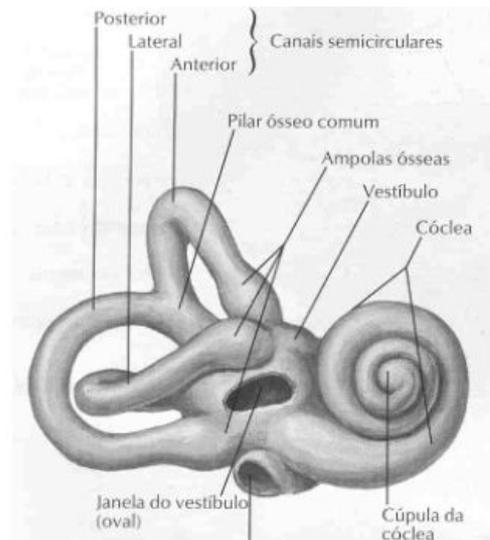
Em relação à via de administração, em seres humanos utiliza-se a via oral. Já em pesquisas com animais, particularmente ratos, utiliza-se principalmente a via intraperitoneal [25,121]. Apesar da grande facilidade da administração oral não é possível a padronização e controle da quantidade de medicação ingerida pelos animais, o que pode prejudicar as inferências sobre os possíveis efeitos benéficos da melatonina.

Há ainda um estudo utilizando melatonina oral em gel (gel contendo 3% de melatonina fabricado pela Fagron Ibérica SAU, Terrasa, Spain) [122], mas esta apresentação da droga não é disponível para utilização. Há ainda a possibilidade de aplicação por gavagem, que permite uma segurança maior que a via oral simples, mas há certa dificuldade técnica [120].

## **1.6 Anatomia da orelha**

A orelha é o órgão responsável pela sensibilidade ao som e aos efeitos gravitacionais e do movimento. Está localizado no interior do osso temporal e é dividida em três partes: orelha externa; orelha média; e orelha interna. Quando se fala de ototoxicidade, a orelha interna é o segmento acometido [123].

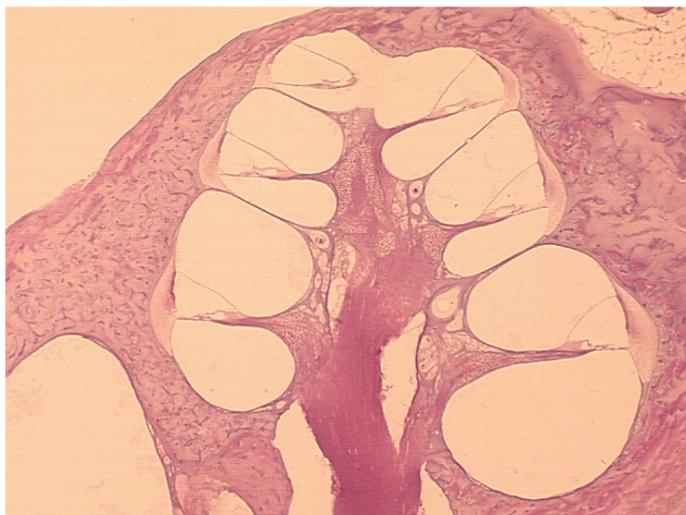
No interior da orelha interna, existe a cóclea, órgão responsável pela percepção de som. A cóclea tem o aspecto de concha de caracol e é composta pelo labirinto ósseo e pelo labirinto membranoso. O labirinto ósseo é formado pela cápsula óptica e pelo modíolo, tubo ósseo que forma o eixo central da cóclea [123] (Figura 6).



**Figura 6** — Esquema do labirinto anterior e posterior.

Fonte: Netter. Atlas de anatomia humana, 2000.

A base do modíolo é larga e corresponde ao fundo do meato acústico interno. Ao redor do modíolo, forma-se um espiral da base até o ápice da cóclea dividido em três compartimentos: escala vestibular; escala timpânica; e escala média ou ducto coclear [123] (Figura 7).



**Figura 7** — Corte histológico no plano médio-modiolar da cóclea de cachorro.

Fonte: Sampaio *et al.* em Otorrinolaringologia princípios e prática 2ª ed, 2006. [123]

O ducto coclear é constituído por três paredes: ligamento espiral, membrana basilar e membrana vestibular ou de *Reissner*. No interior do ducto coclear, uma região sobre a membrana basilar passa por um alto grau de diferenciação formando o órgão de Corti. Este é formado pelas células ciliadas internas em uma única fileira medialmente e próxima ao modiolo, por três fileiras de células ciliadas externas lateralmente às células ciliadas internas e por células de sustentação [123].

A membrana tectorial é uma estrutura semelhante a um gel acelular composta de matriz extracelular. Ela parece ter um papel fundamental como transdutor sensorial devido ao seu íntimo contato com as células ciliadas [123].

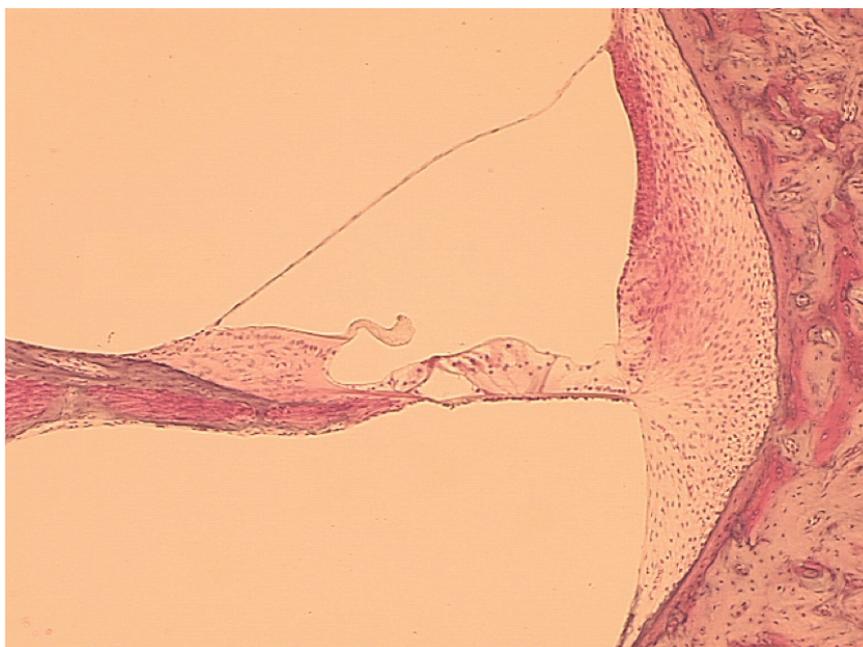
A lâmina espiral óssea e a membrana basilar separam o ducto coclear da escala timpânica. A lâmina espiral óssea é formada por uma projeção do modiolo. A metade superior dela está praticamente dentro do ducto coclear e o periósteo que a reveste é muito espessado, formando o limbo espiral, onde se prende à membrana vestibular [123].

A membrana vestibular, composta por uma camada de células epiteliais e outra de células mesoteliais, separa a escala vestibular arada do ducto coclear. Ela se estende do limbo da lâmina espiral óssea até a parte mais alta do ligamento espiral acima da estria vascular [123].

A estria vascular, por sua vez, consiste em um epitélio estratificado especializado altamente vascularizado localizado na parede lateral da cóclea na área do ligamento espiral abaixo da região de fixação da membrana vestibular. O

ligamento espiral é uma camada especializada resultante do espessamento do endósteo coclear, que ocupa a sua parede lateral. É composta por células epiteliais, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e matriz extracelular, dando suporte para a estria vascular e para a membrana basilar [123].

As células da estria vascular são ricas em ATPase  $\text{Na}^+\text{K}^+$ , sendo capaz de secretar ativamente potássio na escala média, e assim contribuir para a gênese do potencial endococlear [123] (Figura 8).



**Figura 8** — Corte histológico da cóclea com visualização da membrana vestibular, estria vascular, ligamento espiral, limbo espiral, membrana tectória, membrana basal e órgão de Corti

Fonte: Sampaio *et al.* em Otorrinolaringologia princípios e prática 2ª ed, 2006. [123]

### 1.7 O modelo animal - Rato Wistar

As características morfológicas da cóclea humana são difíceis de serem estudadas, uma vez que a biópsia ou a excisão resultam na perda completa da audição. Desta forma, mesmo nos dias atuais, o conhecimento sobre otopatologia ainda é limitado para diversas doenças do ouvido humano [123].

Existe um pequeno número de banco de ossos temporais humanos no mundo e a maioria dos espécimes apresentam algum grau de artefato decorrente do atraso na fixação e processamento do osso temporal após a morte. Além disso, os achados obtidos dos ossos temporais apenas possuem valor se a história clínica do indivíduo

for conhecida em detalhes. Portanto, a utilização de modelos animais são essenciais para o melhor entendimento das diversas patologias otológicas e o desenvolvimento de tratamentos com embasamento funcional e principalmente histológico [124].

Boa parte da pesquisa na área médica é realizada com animais de pequeno porte (camundongo, rato, hamster, cobaia ou gerbil) pela facilidade de manuseio, menores custos para obtenção e maior permissividade dos comitês de ética em pesquisa animal em relação a mamíferos de maior porte como cachorros e chimpanzés [124].

Em relação aos animais utilizados na pesquisa otológica, particularmente para avaliação audiológica, os roedores são os mais utilizados, inclusive para pesquisas de ototoxicidade. Nas pesquisas sobre ototoxicidade, nas quais é necessária a investigação dos mecanismos fisiopatológicos de danos auditivos estes animais são bastante úteis [125].

Os ratos Wistar são uma linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*. Esta linhagem foi a primeira a ser utilizada como organismo-modelo numa época em que pesquisadores utilizavam primariamente camundongos da espécie *Mus musculus*. A linhagem Wistar é uma das mais utilizadas mundialmente em pesquisas de laboratório [126].

A anatomia da orelha do rato possui algumas peculiaridades que a diferenciam dos humanos. Nos humanos, a cóclea possui dois giros completos e três quartos de um novo giro. Já em roedores, a cóclea possui dois giros e metade de outro giro. As estruturas morfológicas, no entanto, são bastante similares às encontradas nos humanos. Presença de membrana tectória, membrana de *Reissner*, estria vascular e órgão de Corti é bem estabelecida [127].

Sua membrana timpânica não veda inteiramente o conduto auditivo externo e a tuba auditiva é mais horizontalizada. Estes aspectos fazem com que os ratos possuam grande incidência de otite média. Outra diferença relevante se refere ao trajeto do nervo facial, que emerge mais superficialmente e anterorrostral do osso temporal. Adicionalmente há diferença na espessura dos ossículos na orelha média, que ficam quase totalmente ocultos no epítimpano e a artéria carótida que passa entre as cruras do estribo [127].

## 1.8 Avaliação funcional

A detecção precoce dos sinais de ototoxicidade em animais habitualmente é realizada por meio da pesquisa das emissões otoacústicas. Na ototoxicidade e no trauma acústico, as emissões otoacústicas desaparecem antes mesmo dos limiares auditivos ficarem comprometidos mostrando o importante papel deste método diagnóstico na prática clínica [123].

As emissões otoacústicas são sons mensurados no conduto auditivo externo que refletem o movimento das células ciliadas externas no órgão de Corti. O mecanismo pelo qual a cóclea produz energia é conhecido como amplificador coclear, uma vez que ele aumenta o sinal contribuindo para uma melhor audição. A amplificação proporcionada por este mecanismo pode chegar a 50dB NPS, no entanto a energia aferida no conduto auditivo externo é normalmente entre 0 e 15dB NPS, uma vez que muita energia é perdida na transmissão da cóclea para o conduto auditivo externo [128].

Existem dois tipos de emissões otoacústicas evocadas amplamente e utilizadas clinicamente, a transiente (EOAT) e a por produto de distorção (EOAPD). As EOAPD são evocadas por dois tons puros ( $f_1$  e  $f_2$ ) apresentados habitualmente numa intensidade de 55dB NPS e 65dB NPS respectivamente. Uma importante vantagem das EOAPD sobre as EOAT é a detecção precoce de danos às frequências altas, independentemente de sua etiologia, uma vez que as EOAT avaliam apenas até cerca de 5000Hz enquanto que as EOAPD podem ser aferidas de 500Hz a 8000Hz e algumas vezes em frequências mais elevadas dependendo do equipamento [128].

O microfone inserido no conduto auditivo externo é capaz de detectar as emissões otoacústicas e também qualquer outro som presente. Por intermédio de algoritmos sofisticados, o equipamento é capaz de diferenciar as emissões destes outros sons, confirmando assim sua presença. Os valores de amplitude das emissões são bastante sensíveis e confiáveis para a avaliação de eventuais modificações na função coclear decorrente de ototoxicidade e exposição ao ruído [123].

É um exame não invasivo, rápido e tecnicamente simples [128]. Por não ser doloroso há necessidade apenas de mínima sedação para sua realização em animais, uma vez que é essencial que o animal esteja imóvel durante a avaliação.

Desta forma, há redução no sofrimento e efeitos colaterais para os animais estudados. Estas dentre outras razões fazem com que as EOAPD sejam amplamente utilizadas em pesquisa em animais, inclusive na espécie utilizada nesta pesquisa.

O exame, no entanto, apresenta algumas limitações. A presença das emissões otoacústicas indica funcionamento normal das células ciliadas externas, todavia não fornece nenhuma informação sobre as células ciliadas internas e o nervo auditivo. Desta forma, embora seja pouco provável que haja lesão destas regiões sem danos prévios às células ciliadas externas, caso este fato ocorra, não seria possível detectar com este exame [129].

Além disso, alterações na orelha média e externa, mesmo que seja uma ínfima quantidade de cerume, podem prejudicar a obtenção das EOAPD. Assim, uma otoscopia cuidadosa deve sempre ser realizada para excluir problemas nestas regiões [9].

## **1.9 Justificativa**

Na realidade epidemiológica atual, com o aumento da incidência de doenças neoplásicas, pesquisas que permitam a melhora da sobrevida dos doentes e menor morbidade pós-tratamento são de extrema importância para garantia de melhor qualidade de vida para os pacientes oncológicos.

A cisplatina possui amplo espectro de ação, além de ser barata e efetiva, mas apresenta inúmeros efeitos colaterais e crescente resistência. Dentre as ações tóxicas da cisplatina, a ototoxicidade e a genotoxicidade destacam-se por ainda limitar, por vezes, a sua utilização. Esta última adicionalmente está envolvida nos mecanismos de desenvolvimento de resistência à droga [59,130,131].

A melatonina, por sua vez, apresenta ação antioxidante já bem estabelecida em estudos anteriores [73,132,133]. Sua potencial ação benéfica contra alguns dos efeitos deletérios da cisplatina já foi demonstrada em estudos anteriores [83–87], bem como a atuação prevenindo a ototoxicidade de aminoglicosídeos [91,92].

Assim há relevância significativa no tema e fundamentação teórica e em estudos anteriores para utilização da melatonina na tentativa de reduzir a ototoxicidade e a genotoxicidade da cisplatina.

### **1.10 Hipótese**

A melatonina possui efeito benéfico na prevenção da ototoxicidade e da genotoxicidade da cisplatina.

### **1.11 Objetivos**

#### **Objetivo geral:**

Verificar o efeito da melatonina na prevenção da ototoxicidade e da genotoxicidade da cisplatina em ratos Wistar.

#### **Objetivos específicos:**

Comparar entre ratos tratados com cisplatina com e sem associação à melatonina:

- a) A amplitude das OEAPD
- b) Os achados histológicos da orelha interna
- c) Os achados histológicos/citológicos da medula óssea do fêmur

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Tipo do estudo

Trata-se de um estudo experimental, prospectivo e de intervenção, realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Otorrinolaringologia (LEPO) e no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada da Faculdade de Medicina (NuPMIA/FM-UnB).

O estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso Animal em 24/02/2015 (UnBDOc n.º 7117/2015) - (ANEXO 1).

### 2.2 Planejamento

Antes da definição dos procedimentos de pesquisa utilizados neste estudo, foram realizados experimentos pilotos com o objetivo de testar os protocolos de exame mais adequados para utilização na pesquisa, além de treinamento e aprimoramento da técnica para obtenção das EOAPD nos animais estudados.

Em virtude da grande variabilidade individual das EOAPD, visando minimizar seus efeitos, além da aquisição das EOAPD por meio do equipamento ILO 292 (*Otodynamics Ltd*), todas as medidas foram também realizadas no *Otoread (Interacoustics)*. Esta dupla aferição foi necessária para padronizar a técnica e validar nosso método.

Além disso, foi necessária a padronização da melhor forma de dissecação e inclusão na parafina da bula timpânica do animal para obtenção de melhor plano de corte nas lâminas histológicas. Houve também definição da melhor técnica histológica visando preservação celular e mínimo artefato nas lâminas a serem estudadas. Esta etapa, realizada com apoio da equipe do NuPMIA, foi essencial para estabelecer o melhor protocolo de extração, fixação, descalcificação, inclusão, microtomia (espessura de corte) e por fim coloração das lâminas. Nesta fase inicial foram utilizadas cabeças de animais descartadas em outras pesquisas realizadas no NuPMIA.

A fim de atingir os objetivos do estudo, a pesquisa foi dividida em duas etapas. Inicialmente foram realizados os experimentos para avaliação da

ototoxicidade. Em sequência foram realizados os procedimentos para avaliação da genotoxicidade.

Fases da pesquisa:

- Avaliação da Ototoxicidade
- Avaliação da Genotoxicidade

### **2.3 Seleção dos animais**

Os animais utilizados nos experimentos foram adquiridos no biotério da Universidade Federal de Goiás após desmame. Foram obtidas 45 ratas fêmeas da variedade Wistar, adultas jovens, entre 6 e 8 semanas de vida e peso de 150 a 250g.

Destes animais, 33 ratos foram utilizados na primeira etapa do experimento para avaliação da ototoxicidade. Os demais ratos, foram utilizados para o estudo da genotoxicidade.

Antes do início dos experimentos, todos os animais foram examinados pela médica veterinária da Universidade de Brasília para avaliação e sinais de possíveis alterações sistêmicas.

### **2.4 Avaliação da Ototoxicidade**

Os animais foram submetidos a inspeção geral de saúde.

Foi realizado também exame de EOADP e otoscopia nos animais sob sedação.

#### **2.4.1 Critérios de exclusão**

- Doenças sistêmicas diagnosticáveis no exame físico pela médica veterinária;
- Alteração na orelha média e/ou externa que impedisse ou dificultasse a adequada avaliação da função auditiva por meio das EOAPD, tais como, edema e hiperemia de conduto auditivo externo, tumorações ou rolha de

cerume impactada, sinais de doença da orelha média, como opacificação, abaulamento e hiperemia de membrana timpânica, ou perfuração dessa membrana;

- EOAPD ausentes em alguma das frequências estudadas (2,8; 4,0; 6,0 e 8,0 kHz), antes da administração das drogas.

#### **2.4.2 Procedimentos técnicos**

No primeiro dia de experimento, para efeito de organização denominado D1, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (75 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) para realização de otoscopia, a fim de observar a preservação anatômica das estruturas da orelha externa e média.

Em seguida, as EOAPD foram obtidas com o equipamento ILO 292 (*Otodynamics Ltd*) em uma sala silenciosa. Uma caixa com isolamento acústico foi confeccionada para facilitar a realização dos exames (Figura 9), permitindo a adequada análise dos parâmetros obtidos. Foram utilizadas olivas de recém-nascido que se adaptavam perfeitamente ao conduto auditivo externo do rato. Desta forma, a sonda foi introduzida no canal auditivo externo dos animais para aquisição das emissões. Como definido no protocolo, o estímulo consistiu em dois tons puros (F1 e F2; relação  $F1 / F2 = 1,22$ ) a 70 dB NPS. No total, foram analisadas 1.000 aquisições. As emissões otoacústicas resultantes foram avaliadas em 2,8; 4,0; 6,0 e 8,0 kHz.



**Figura 9** — Rato posicionado em caixa com proteção acústica para realização da EOAPD.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Após consideração dos aspectos citados nos critérios de exclusão, 12 ratos foram excluídos desta primeira fase do experimento. A maior parte das exclusões foi decorrente de otite média serosa e, conseqüente, falha no exame de EOAPD. Estes animais foram direcionados para a segunda etapa da pesquisa.

Os animais utilizados no estudo foram mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, com temperatura ambiente ( $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração balanceada e água potável *ad libitum*.

Os animais foram então distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

- Grupo 1 (5 animais): Solução salina no volume idêntico ao aplicado de melatonina (diariamente);
- Grupo 2 (5 animais): Melatonina (Sigma-Aldrich 1 mg/kg diariamente);
- Grupo 3 (12 animais): Cisplatina (C-Platin®, laboratório Blau contendo 1mg/ml) 10 mg/kg em dose única no D4 + solução salina (diariamente);

- Grupo 4 (11 animais): Cisplatina (C-Platin®, laboratório Blau contendo 1mg/ml) 10 mg/kg em dose única no D4 + Melatonina (Sigma-Aldrich 1 mg/kg diariamente).

A melatonina foi pesada diariamente em balança de precisão e diluída conforme recomendação do fabricante. O volume resultante de melatonina foi o mesmo utilizado de solução salina nos grupos 1 e 3.

As soluções foram aplicadas via intraperitoneal pela pesquisadora com uso de agulhas e seringas descartáveis após imobilização do animal por um auxiliar, estudante vinculado ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica. As aplicações foram iniciadas no primeiro dia da pesquisa (D1) e mantidas diariamente até o D7.

A cisplatina (C-Platin®, laboratório Blau contendo 1 mg/ml) foi mantida em recipiente de vidro escuro em temperatura ambiente de modo que sua formulação fosse conservada. A droga foi diluída em solução fisiológica a 0,9% para que a solução resultante contivesse 0,3% de NaCl, conforme orientação do fabricante presentes na bula. Esta quantidade de íons cloreto é essencial para a manutenção da estabilidade da cisplatina na solução intravenosa.

A aplicação na cisplatina nos grupos 3 e 4 foi realizada em dose única no D4. Os animais foram pesados no dia da medicação e a dose de cisplatina de 10 mg/kg calculada de acordo com o peso de cada indivíduo. Igual volume de solução salina foi aplicado nos animais dos grupos 1 e 2.

No D8, realizou-se o exame de EOAPD em todos os animais. Foram mantidas constantes as condições de teste passíveis de controle, tais como: tamanho de oliva, número de apresentações e intensidade.

Após aquisição das EOAPD, os animais foram sedados e sacrificados em câmara com concentração de 40% de CO<sub>2</sub>, resultando em morte pela depressão excessiva do sistema nervoso central e hipóxia.

**Tabela 1** — Tabela descritiva do experimento.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
MELATONINA/ SALINA								
CISPLATINA								
EOAPD								
SACRIFÍCIO								

Fonte: Própria autora, 2019

### 2.4.3 Preparação histológica

Após serem sacrificados, foi realizada a perfusão dos animais com 20 ml de solução de formaldeído a 10% via cateter inserido no ventrículo esquerdo e abertura do átrio direito. A cabeça foi removida e inserida em solução do mesmo fixador por no mínimo 12 horas. Após estas etapas, foi definido e iniciado o protocolo para obtenção das secções histológicas. Os processos foram determinados após realização de pilotos com animais sacrificados em outras pesquisas, cujas bulas timpânicas não seriam utilizadas.

Além da cabeça, foram removidos órgãos como baço, fígado, pulmões, rins e medula óssea proveniente do fêmur dos ratos.

Protocolo para obtenção das amostras:

1. Descalcificação incompleta por 24 horas (para facilitar o acesso à bula timpânica) em solução de EDTA (0,78 mg / 95 ml de água corrente) acrescida com 5 ml de ácido nítrico PA.
2. Lavagem em água corrente por duas horas e posterior abertura da calvária na região mediana com uma tesoura de ponta fina e remoção de 0,5 cm desta calvária, retirando todo o encéfalo com o auxílio de uma pinça de ponta grossa.
3. Colocação da cabeça em decúbito dorsal e delicadamente, tendo como ponto de referência o meato acústico externo, foi removido o tecido muscular até acessar a bula timpânica (Figura 10)



**Figura 10** — Visão da cabeça do rato em decúbito dorsal com marcação do meato acústico externo.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

4. Identificação do meato acústico direito com um barbante, fio de sutura ou outro. Remoção da região anterior da cabeça, preservando no mínimo 2 cm de largura das bulas timpânicas (Figura 11).



**Figura 11** — Seguimento contendo as duas bulas timpânicas.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

5. Finalização da descalcificação por imersão da peça na solução descalcificadora descrita previamente por um período de quarenta minutos até duas horas, observando a textura adequada.
6. Lavagem em água corrente por no mínimo uma hora. Posterior lavagem da peça em três banhos de água, totalizando dez minutos em água destilada.

Depois de descalcificados, as peças foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol, impregnadas em parafina (60°C), seccionadas e coradas com corantes de rotina. As imagens foram digitalizadas com auxílio do microscópio (*Axion Vision, Zeiss®*) com câmera acoplada e avaliadas por um único observador que não conhecia a distribuição dos grupos (monocego).

Todas as análises de imagem foram realizadas por meio do programa de edição de imagens GIMP (versão 2.10.8).

Foram estudadas as seguintes regiões da cóclea: gânglio espiral, gânglio vestibular, estria vascular, ligamento espiral e limbo espiral. De cada animal, foram selecionadas três diferentes lâminas que estivessem no plano de corte medio-modiolar e não apresentassem artefatos significativos como retração tecidual, dobras ou ruptura de membranas.

Durante a análise histológica, foram analisados o número de células viáveis por área pré-estabelecida e o diâmetro médio das células a justaposição (junção entre células epiteliais). A análise da densidade celular foi realizada pela quantificação dos neurônios ou células viáveis presentes em uma área determinada de cada fotomicrografia. Já o diâmetro dos neurônios foi obtido pela média entre os diâmetros maior e menor de dez células escolhidas randomicamente em cada secção histológica analisada.

Para a análise do gânglio espiral e do gânglio vestibular, foi adicionado filtro gradeado em todas as imagens com quadrados de dimensões 80 x 80 *pixels*, permitindo a delimitação da área de gânglio espiral presente em cada fotomicrografia.

Foi realizada, então, a contagem de neurônios viáveis presentes na região demarcada. A diferenciação dos neurônios viáveis foi feita por critérios de integridade da membrana e principalmente pelas características do núcleo celular, sua delimitação e sua proporção em relação à célula, determinando se haveria ou

não o início do processo da apoptose. Desta forma, foi definido o critério da densidade celular, por meio da razão entre o número de células viáveis e a área estudada. A medida da área foi convertida de *pixels* para micrômetros por meio da medida do tamanho das hemácias presentes na lâmina.

Além disso, para cada fotomicrografia, foram selecionados dez neurônios de forma aleatória. Estes neurônios tiveram seus diâmetros aferidos utilizando também como parâmetro a medida do tamanho das hemácias presentes na lâmina.

Já em relação à estria vascular, foram contabilizadas o número de células viáveis na estria vascular por meio de critérios semelhantes aos utilizados nos neurônios dos gânglios. Foi analisada a presença ou não de justaposição celular, averiguando se os limites entre as células estavam bem estabelecidos e se havia integridade da membrana celular. Simultaneamente às análises da estria vascular, foi estudado o parâmetro de densidade celular também na região do ligamento espiral.

A análise do limbo espiral foi realizada por meio da densidade celular da região. Os critérios utilizados para contagem de células viáveis foram os mesmos utilizados nos gânglios e também na estria vascular e ligamento espiral, buscando abranger os 120 quadrados de área, mas respeitando e registrando a área disponível para análise em cada fotomicrografia.

## **2.5 Avaliação da genotoxicidade**

Foram utilizadas doze ratas fêmeas da variedade Wistar, obtidas do biotério da Universidade Federal de Goiás, adultas jovens, entre 6 e 8 semanas de vida e peso de 150 a 250g. Estes animais foram selecionados a partir dos animais excluídos na etapa anterior da pesquisa, que avaliou a ototoxicidade.

### **2.5.1 Critérios de exclusão**

Doenças sistêmicas diagnosticáveis no exame físico pela médica veterinária.

## 2.5.2 Procedimentos técnicos

Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: controle negativo (solução salina); controle positivo (cisplatina); e um grupo tratado concomitantemente com cisplatina (10 mg/kg) e melatonina (1 mg/kg). A melatonina e a cisplatina foram administradas por via intraperitoneal em dose única. Após 48 horas os animais foram eutanasiados com CO<sub>2</sub> para a retirada dos fêmures.

Os grupos de estudo foram compostos:

- Grupo A (4 animais): apenas solução salina;
- Grupo B (4 animais): cisplatina (C-Platin®, laboratório Blau 1mg/ml) na dose de 10 mg/kg + solução salina;
- Grupo C (4 animais): cisplatina (C-Platin®, laboratório Blau 1mg/ml) na dose de 10 mg/kg + melatonina (Sigma-Aldrich) na dose 1 mg/kg.

Obteve-se a medula óssea lavando os fêmures com solução salina e depois homogeneizaram-se suavemente. Todos os espécimes depois de obtidos foram fixados em solução de formol a 10% e depois submetidos ao processamento para a obtenção das secções histológicas. Então, os espécimes depois de fixados, foram desidratados em soluções com concentrações crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 3x 100%), diafanizados em xilol por 30 minutos (2 banhos) e impregnados em parafina a 60 graus (3 banhos) e em seguida emblocados em parafina.

Posteriormente, os espécimes foram seccionados em secções de 5µm de espessura e corados. Para o estudo histopatológico as secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliar possíveis infiltrados inflamatórios, com Tricrômio de Gomori para avaliar a matriz extracelular do tecido conjuntivo. Depois de coradas as secções histológicas foram fotografadas com o microscópio (Axion Vision, Zeiss®) ou capturadas com o equipamento Aperio ScanScope® e avaliadas no programa ImageScope version 11.2.0.780 (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA) e posteriormente analisadas por um único observador (200x, 400x e 1000x).

A avaliação do efeito protetor da melatonina na toxicidade causada pela cisplatina aos eritrócitos medulares foi realizada por meio da quantificação de micronúcleos e da porcentagem dos eritrócitos policromáticos (EPC).

Após preparação da distensão celular da medula óssea, fixação e coloração, a contagem das células foi feita por meio de microscopia de luz, em aumento de 1000 vezes. Para a contagem de micronúcleos, foram analisados 1000 eritrócitos / animal e os resultados foram expressos pela frequência de micronúcleos na amostra.

Além da frequência de micronúcleo, que permite inferir sobre a genotoxicidade, a contagem de eritrócitos policromáticos (EPC, células jovens) e normocromáticos (ENC) fornece dados sobre a citotoxicidade da amostra. Em indivíduos normais, a proporção de EPC e ENC em indivíduos normais gira em torno de 1:1. Desta forma, foi realizada a contagem de EPC em 1000 eritrócitos para cada animal e os resultados foram expressos pela porcentagem de EPC obtida por  $[\text{EPC} / (\text{EPC} + \text{ENC})] \times 100$ . A citotoxicidade é observada quando há uma redução significativa da porcentagem de EPC indicando que houve inibição da divisão e maturação das células hematopoiéticas, e morte de células tronco.

## **2.6 Procedimentos analíticos**

Na análise dos dados de EOAPD obtidos, a normalidade das variáveis foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn foi usado para comparar amostras não paramétricas de cada grupo no D1 e D8. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar duas amostras não normais pareadas para identificar as diferenças significativas entre D1 e D8. O teste t pareado (bicaudal) foi usado para comparar 2 amostras normais pareadas para identificar as diferenças significativas entre D1 e D8.

Para a análise dos dados histológicos, a normalidade foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Considerando a normalidade e a variabilidade das variáveis, utilizou-se para as múltiplas comparações o teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn (dados não paramétricos).

Na análise de genotoxicidade, a normalidade das variáveis foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para identificar quais grupos são significativamente diferentes uns dos outros.

Todas as análises e a representação dos resultados foram feitas no programa Prism 5® software package (GraphPad, USA) e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação da Ototoxicidade

##### 3.1.1 Avaliação funcional

Não houve diferenças nas amplitudes das EOAPD avaliadas no dia 1 entre os 4 grupos, para todas as frequências (método Kruskal-Wallis / Dunn; 2,8 kHz,  $p = 0,194$ ; 4,0 kHz,  $p = 0,212$ ; 6,0 kHz,  $p = 0,114$ ; 8,0 kHz  $p = 0,414$ ).

Na segunda avaliação (D8), os valores de amplitude das EOAPD foram menores no grupo tratado com cisplatina + salina do que no grupo tratado com salina em todas as frequências testadas (método de Kruskal-Wallis/Dunn; 2,8 kHz,  $p = 0,011$ ; 4,0 kHz,  $p = 0,049$ ; 6,0 kHz,  $p = 0,047$ ; 8,0 kHz,  $p = 0,030$ ).

Por outro lado, os valores de amplitude das EOAPD não diferiram entre os grupos salina e melatonina ou cisplatina + melatonina (Tabela 2).

Na análise pareada, as amplitudes das EOAPD não diferiram entre D1 e D8 nos grupos de controle negativo (2,8 kHz  $p = 0,600$ ; 4,0 kHz  $p = 0,528$ ; 6,0 kHz  $p = 0,132$ ; 8 kHz  $p = 0,688$ ) e no grupo controle-melatonina ( 2,8 kHz  $p = 0,990$ ; 4,0 kHz  $p = 0,825$ ; 6,0 kHz  $p = 0,260$ ; 8 kHz  $p = 0,240$ ) em todas as frequências testadas (Figura 12). Além disso, não houve diferenças na amplitude das EOAPD obtidas no D1 e D8 do tratamento no grupo controle (cisplatina + melatonina) em nenhuma frequência (2,8 kHz  $p = 0,495$ ; 4,0 kHz  $p = 0,292$ ; 6,0 kHz  $p = 0,223$ ; 8 kHz  $p = 0,087$ ) (Figura 12).

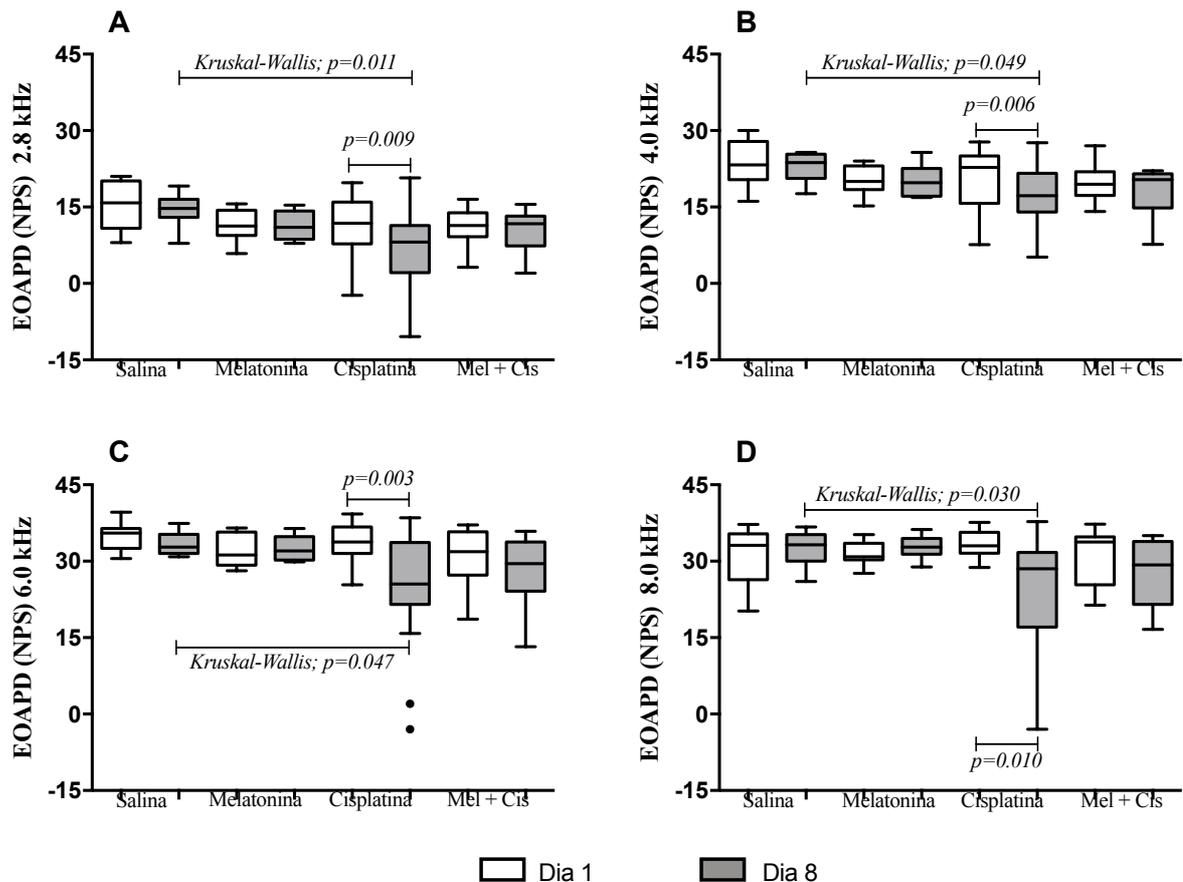
Já no grupo de estudo (cisplatina + salina), as amplitudes das EOAPD foram significativamente maiores no dia 1 quando comparadas aos valores obtidos no dia 8, em todas as frequências (2,8 kHz  $p = 0,009$ ; 4,0 kHz  $p = 0,006$ ; 6,0 kHz  $p = 0,003$ ; 8 kHz  $p = 0,010$ ) (Figura 12).

**Tabela 2** — Emissão otoacústica por produto de distorção (EOAPD, dB NPS) avaliados no primeiro (D1) e no oitavo (D8) dia em todos os grupos estudados.

Frequências (→)	2.8 kHz		4.0 kHz		6.0 kHz		8.0 kHz	
	D1	D8	D1	D8	D1	D8	D1	D8
Salina	11.9	11.7	22.8	23.7	35.5	32.8	33.1	33.2
Melatonina	11.3	11.0	20.1	19.8	31.2	32.0	30.9	32.8
Cisplatina + Salina	11.8	8.1*	22.8	16.8*	33.8	25.6*	33.1	28.6*
Cisplatina + Melatonina	11.4	11.7	20.0	20.4	31.9	29.5	33.8	29.3

Fonte: Própria autora, 2019.

Os dados estão expressos por medianas. \*Valores com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo salina.



**Figura 12** — Amplitudes das Emissões Otoacústicas Produto de Distorção no dia 1 (D1) e no dia (D8).

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

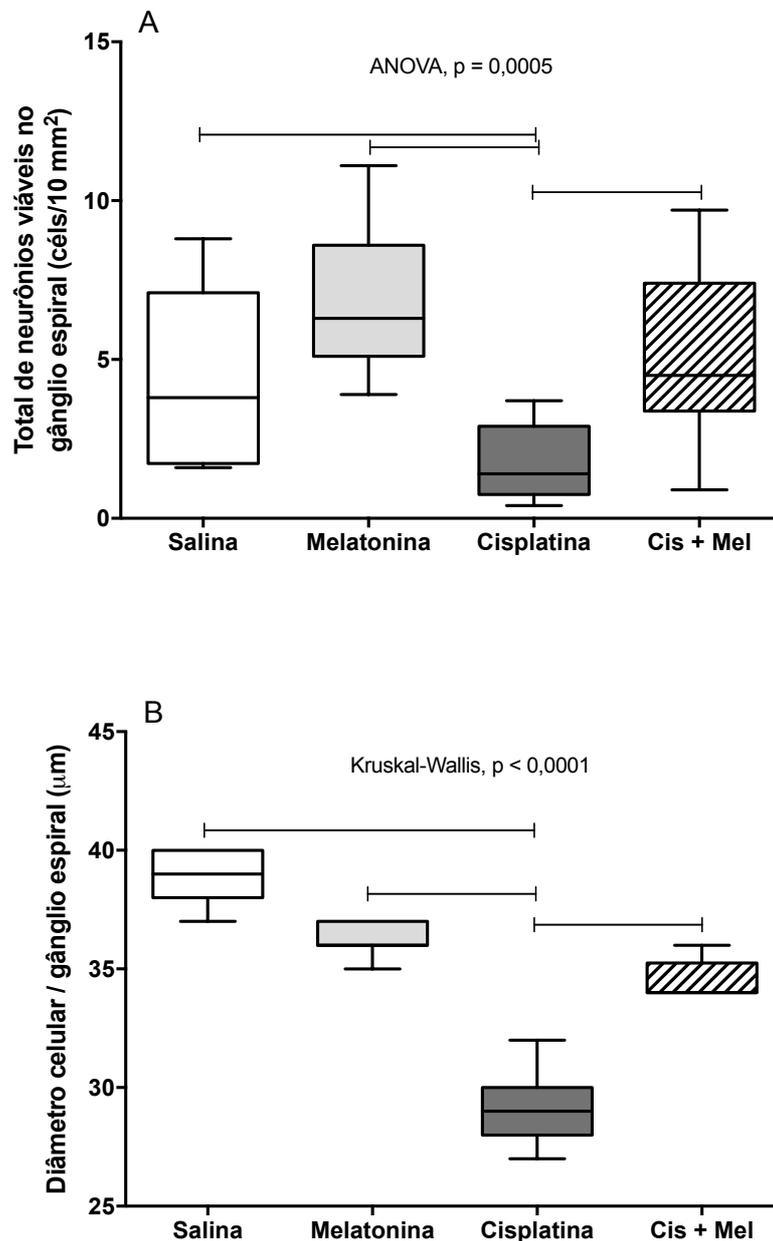
### 3.1.2 Avaliação histológica

#### a) Gânglio espiral

Em relação ao critério da densidade celular do gânglio espiral (Figura 13), observa-se o grupo melatonina com a maior mediana, de 6,8 células/mm<sup>2</sup>, seguida do grupo melatonina com cisplatina, 5,4 células/mm<sup>2</sup>; do grupo solução salina 4,4 células/mm<sup>2</sup>, e por fim o grupo tratado somente com a cisplatina, com 1,7 células/mm<sup>2</sup>. Diante disso, ao submeter esses dados perante análise estatística, foi observada diferença significativa entre o grupo cisplatina e os demais grupos, com valor de  $p=0,0004$ .

Em relação ao diâmetro celular médio dos neurônios do gânglio espiral (Figura 13), foi observado o maior valor no grupo salina, com mediana de 39  $\mu\text{m}$ , seguido do grupo melatonina, com mediana de 36  $\mu\text{m}$ , do grupo cisplatina com

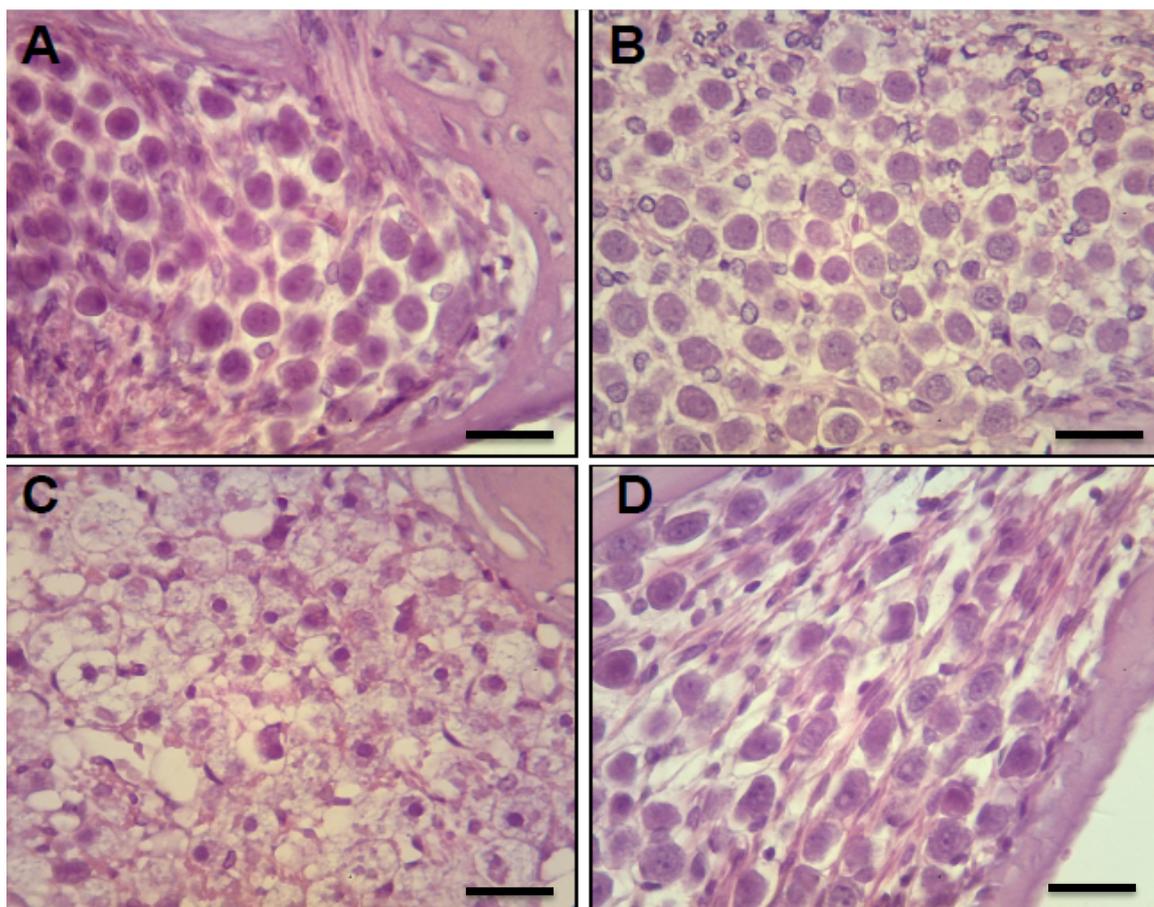
melatonina, tendo 34  $\mu\text{m}$  de mediana, e, por fim o grupo cisplatina, com média de 29  $\mu\text{m}$ . A análise estatística desses dados demonstrou semelhanças em relação aos dados da densidade, apresentando relevância estatística novamente na diferença entre grupos cisplatina e os demais grupos, com valor de  $p < 0,0001$  (Figura 13).



**Figura 13** — Avaliação do gânglio espiral. Em A, a densidade de células neuronais viáveis no gânglio espiral das lâminas dos 4 grupos analisados (solução salina, melatonina, cisplatina e cisplatina com melatonina). Em B, a diâmetro médio das células neuronais do gânglio espiral em cada um dos grupos do estudo. As linhas entre as colunas indicam a presença de relevância estatística significativa entre os grupos. Estão apresentadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Nas fotomicrografias abaixo A e B, controle e melatonina, são observados cortes do gânglio espiral com preservação total dos neurônios. Em C observa-se diminuição da densidade celular, assim como o diâmetro dos neurônios. Com a administração diária da melatonina, os animais tratados com a cisplatina (D) apresentaram, o gânglio espiral estruturalmente similar ao grupo controle (Figura 14).



**Figura 14** — Fotomicrografias do gânglio espiral representativa dos grupos salina (A), melatonina (B), cisplatina (C) e cisplatina+melatonina (D). Aumento 400x, coloração H&E.

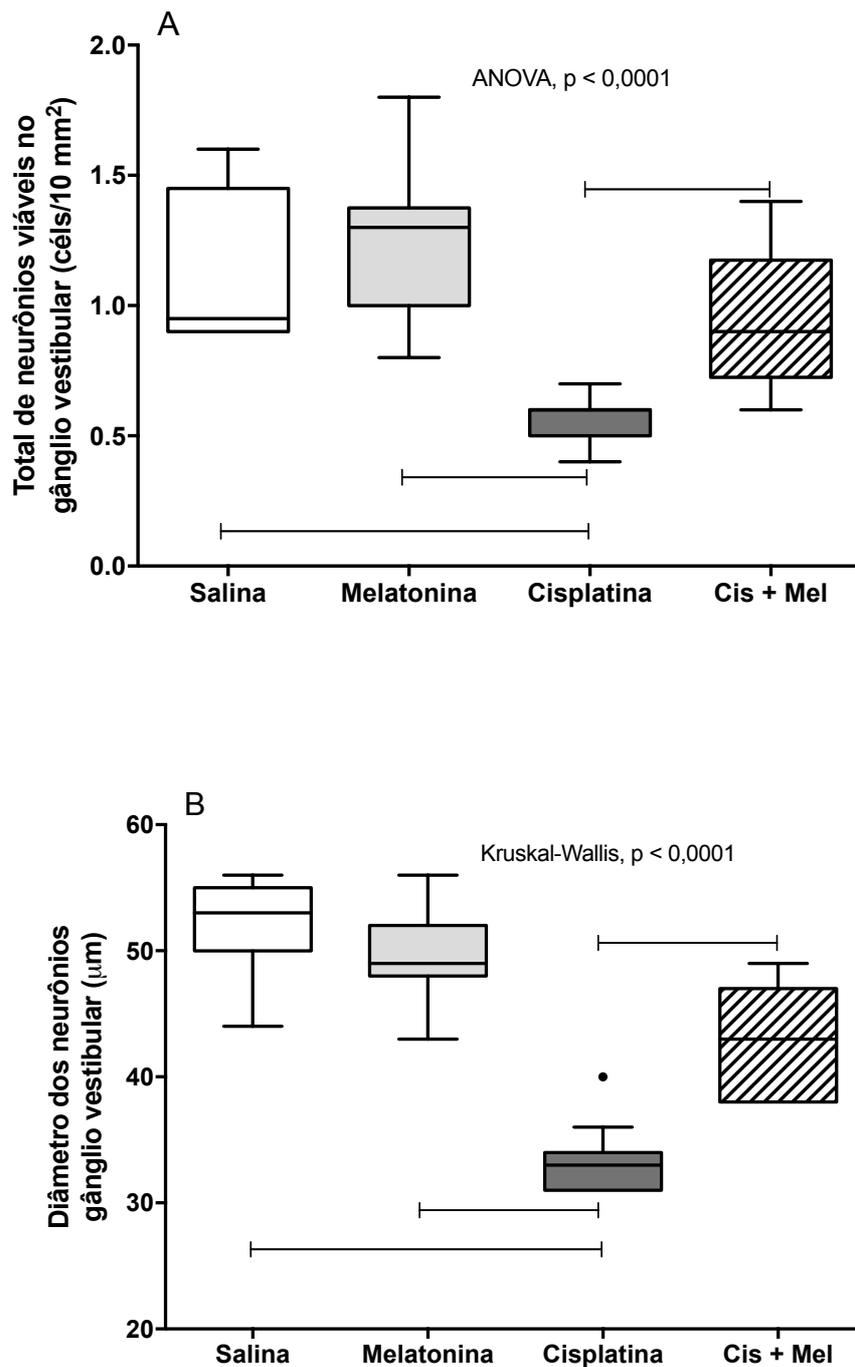
Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

### **b) Gânglio vestibular**

Em relação ao critério da densidade celular do gânglio vestibular, observa-se o grupo melatonina e o grupo salina com a maior mediana, de 1,2 células/mm<sup>2</sup>, seguida do grupo melatonina com cisplatina, 0,9 células/mm<sup>2</sup>, e por fim o grupo tratado somente com a cisplatina, com 0,5 células/mm<sup>2</sup>. Foi observada diferença

significativa entre o grupo cisplatina e o grupo melatonina e entre o grupo cisplatina e o grupo cisplatina com melatonina, com valor de  $p=0,0001$  (Figura 15).

Em relação ao diâmetro celular médio dos neurônios do gânglio vestibular (Figura 6), foi observado o maior valor no grupo salina, com mediana de 53  $\mu\text{m}$ , seguido do grupo melatonina, com mediana de 49  $\mu\text{m}$ , do grupo cisplatina com melatonina, tendo 43  $\mu\text{m}$  de média, e, por fim o grupo cisplatina, com mediana de 33  $\mu\text{m}$ . A análise estatística desses dados demonstrou relevância estatística na diferença entre o grupo cisplatina e os demais grupos, com valor de  $p<0,0001$  (Figura 15).



**Figura 15** — Avaliação do gânglio vestibular. Em A, a densidade de células neuronais viáveis no gânglio vestibular das lâminas dos 4 grupos analisados (solução salina, melatonina, cisplatina e cisplatina com melatonina). Em B, a diâmetro médio das células neuronais do gânglio vestibular em cada um dos grupos do estudo. As linhas entre as colunas indicam a presença de relevância estatística significativa entre os grupos. Estão apresentadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Nas fotomicrografias abaixo A e B, controle e melatonina, são observados cortes do gânglio espiral com preservação total dos neurônios do gânglio vestibular.

Em C observa-se diminuição da densidade celular com grande alteração da citoarquitetura do gânglio espiral, assim como alteração no diâmetro dos neurônios. Com a administração diária da melatonina, os animais tratados com a cisplatina (D) apresentaram, o gânglio espiral estruturalmente similar ao grupo controle (Figura 16).

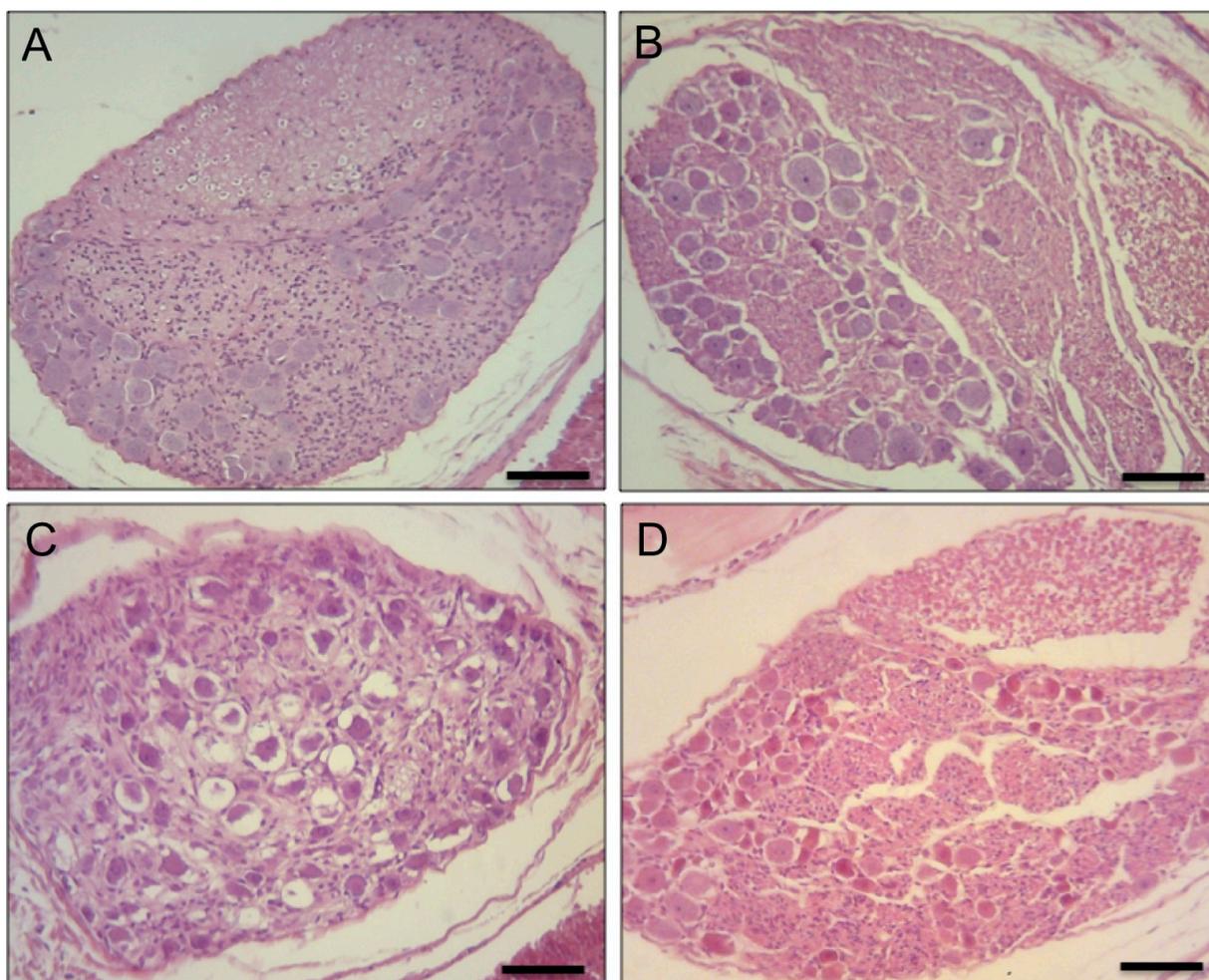


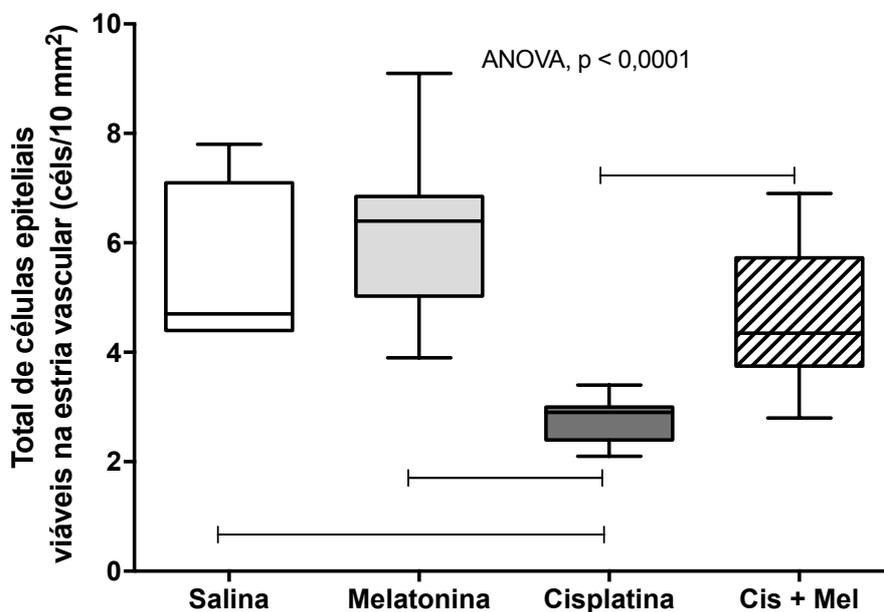
Figura 16 — Fotomicrografias do gânglio vestibular representativa dos grupos salina (A), melatonina (B), cisplatina (C) e cisplatina+melatonina (D). Coloração H&E. Barra = 80  $\mu\text{m}$ .

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

### c) Estria vascular

Em relação ao critério da densidade celular da estria vascular, observa-se o grupo melatonina com a maior mediana, de 6,2 células/ $\text{mm}^2$ , seguida do grupo salina 5,4 células/ $\text{mm}^2$ ; do grupo cisplatina com melatonina 4,6 células/ $\text{mm}^2$ , e por fim o grupo tratado somente com a cisplatina, com 2,7 células/ $\text{mm}^2$ . Na análise

estatística, foi observada diferença significativa entre o grupo cisplatina e os demais grupos, com valor de  $p=0,0001$  (Figura 17).



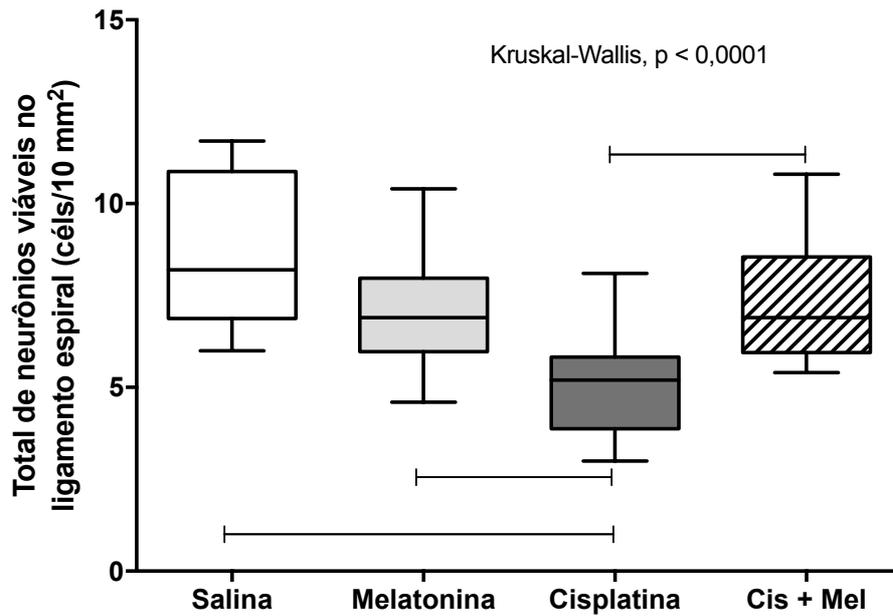
**Figura 17** — Análise da estria vascular. Em A, a densidade de células neuronais viáveis na estria vascular das lâminas dos 4 grupos analisados (solução salina, melatonina, cisplatina e cisplatina com melatonina). As linhas entre as colunas indicam a presença de relevância estatística significativa entre os grupos. Estão apresentadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Nas fotomicrografias, ilustradas conjuntamente com a região do ligamento espiral, observa-se em A e B, controle e melatonina, preservação celular. Em C observa-se diminuição da densidade celular com grande alteração da citoarquitetura. Com a administração diária da melatonina, os animais tratados com a cisplatina (D) apresentaram a estria vascular estruturalmente similar ao grupo controle (Figura 19).

#### **d) Ligamento espiral**

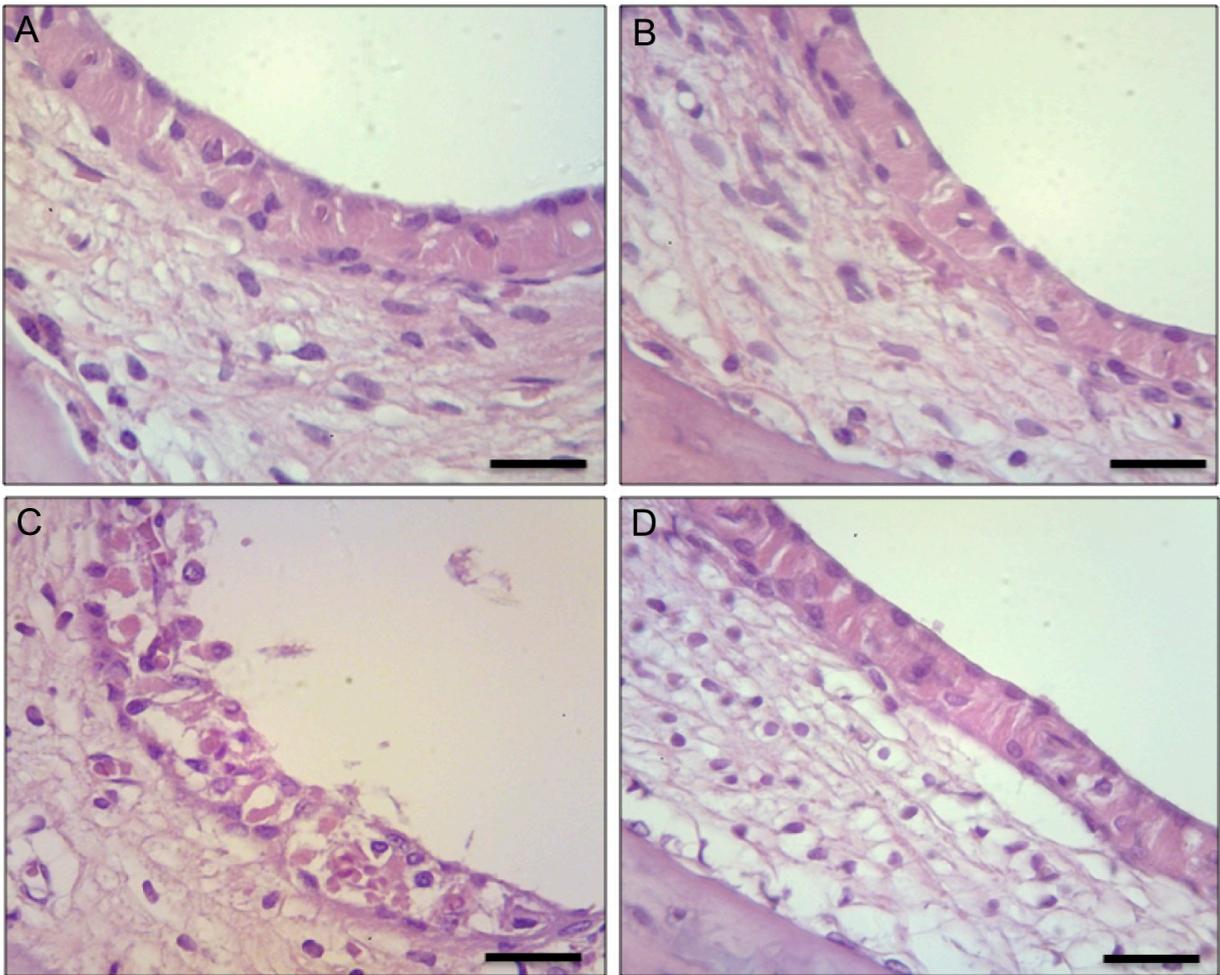
Em relação ao critério da densidade celular do ligamento espiral, observa-se o grupo salina com a maior mediana, de 8,2 células/mm<sup>2</sup>, seguida do grupo cisplatina com melatonina, 6,9 células/mm<sup>2</sup>; do grupo solução melatonina 6,7 células/mm<sup>2</sup>, e por fim o grupo tratado somente com a cisplatina, com 5,2 células/mm<sup>2</sup>. Na análise estatística, foi observada diferença significativa entre o grupo cisplatina e os demais grupos, com valor de  $p=0,0001$  (Figura 18).



**Figura 18** — Análise do ligamento espiral. Em A, a densidade de células neuronais viáveis no ligamento espiral das lâminas dos 4 grupos analisados (solução salina, melatonina, cisplatina e cisplatina com melatonina). Em B, a diâmetro médio das células neuronais do gânglio espiral em cada um dos grupos do estudo. As linhas entre as colunas indicam a presença de relevância estatística significativa entre os grupos. Estão apresentadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Nas fotomicrografias, ilustradas conjuntamente com a região da estria vascular, observa-se em A e B, controle e melatonina, preservação celular. Em C observa-se diminuição da densidade celular com grande alteração da citoarquitetura. Com a administração diária da melatonina, os animais tratados com a cisplatina (D) apresentaram o ligamento espiral estruturalmente similar ao grupo controle (Figura 19).

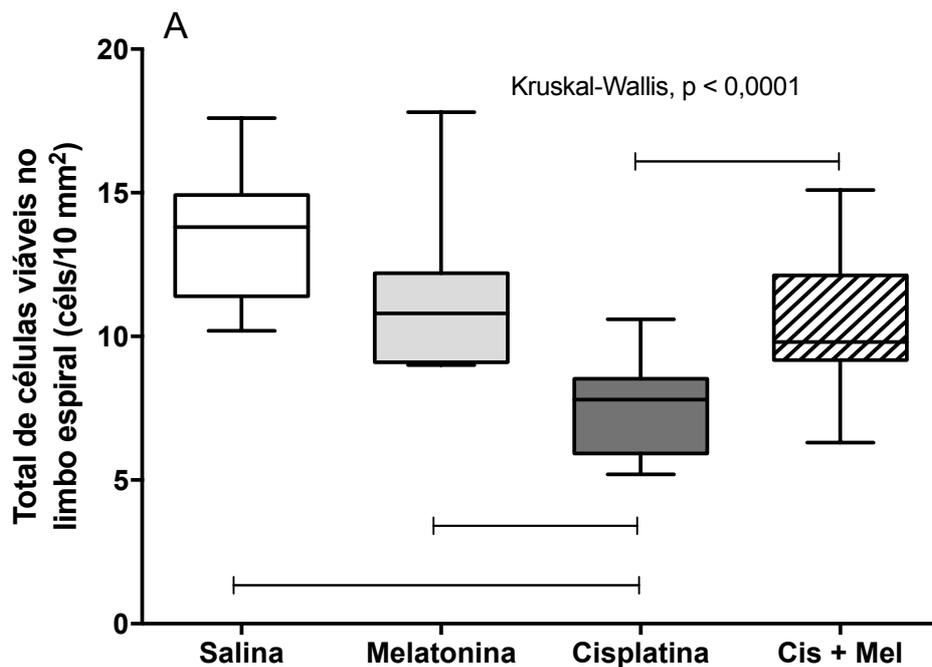


**Figura 19** — Fotomicrografias da estria vascular e ligamento espiral representativos dos grupos salina (A), melatonina (B), cisplatina (C) e cisplatina+melatonina (D). Coloração H&E. Barra = 30  $\mu\text{m}$ .

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

### e) Limbo espiral

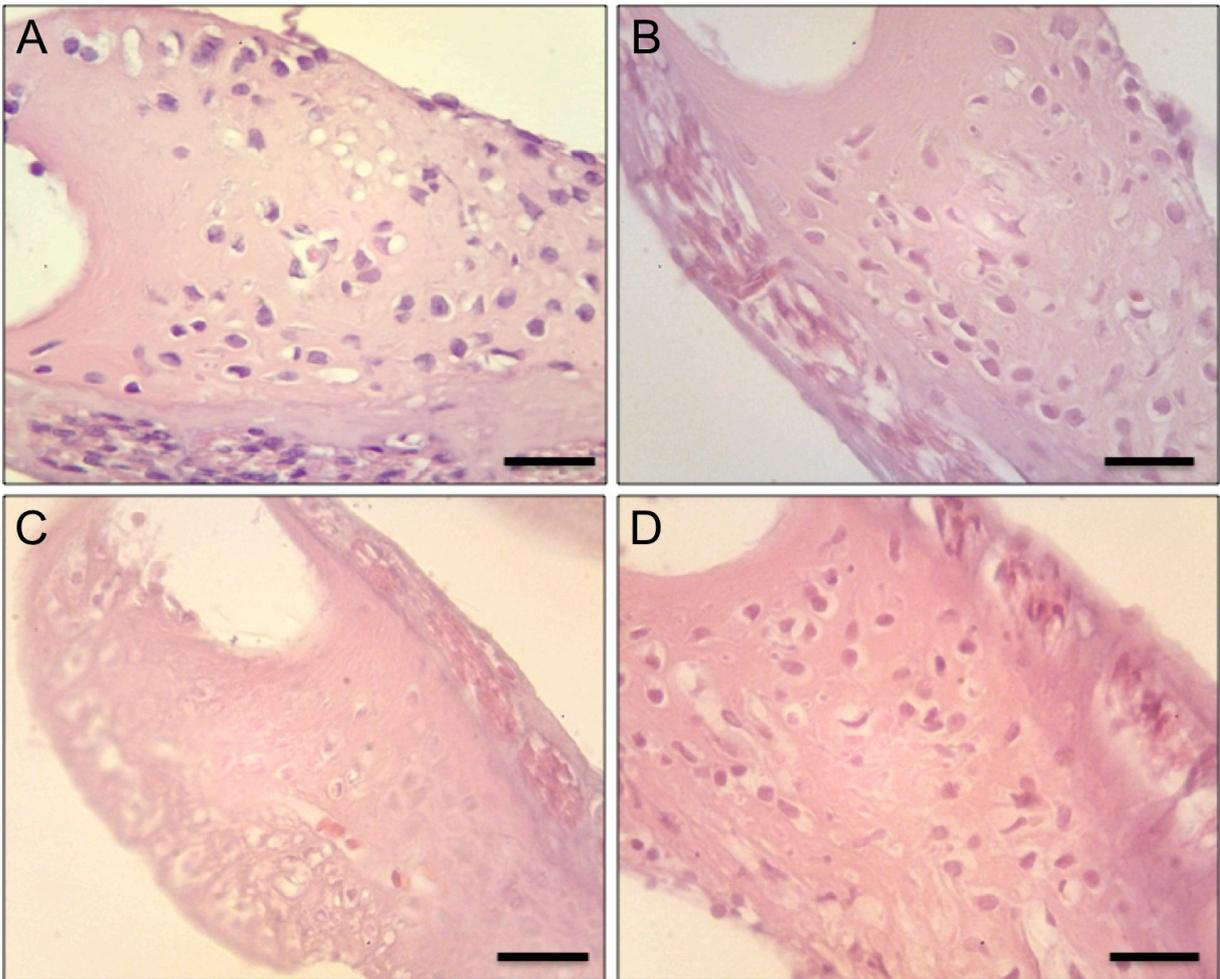
Em relação ao critério da densidade celular do limbo espiral, observa-se o grupo salina com a maior mediana, de 13,8 células/ $\text{mm}^2$ , seguida do grupo melatonina 10,8 células/ $\text{mm}^2$ ; do grupo cisplatina com melatonina 9,8 células/ $\text{mm}^2$ , e por fim o grupo tratado somente com a cisplatina, com 7,8 células/ $\text{mm}^2$ . Na análise estatística, foi observada diferença significativa entre o grupo cisplatina e os demais grupos, com valor de  $p=0,0001$  (Figura 20).



**Figura 20** — Análise do limbo espiral. Em A, a densidade de células neuronais viáveis no limbo espiral das lâminas dos 4 grupos analisados (solução salina, melatonina, cisplatina e cisplatina com melatonina). As linhas entre as colunas indicam a presença de relevância estatística significativa entre os grupos. Estão apresentadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Nas fotomicrografias, observou-se em A e B, controle e melatonina, preservação celular. Em C observa-se diminuição da densidade celular com grande alteração da citoarquitetura. Com a administração diária da melatonina, os animais tratados com a cisplatina (D) apresentaram o limbo espiral estruturalmente similar ao grupo controle (Figura 21).

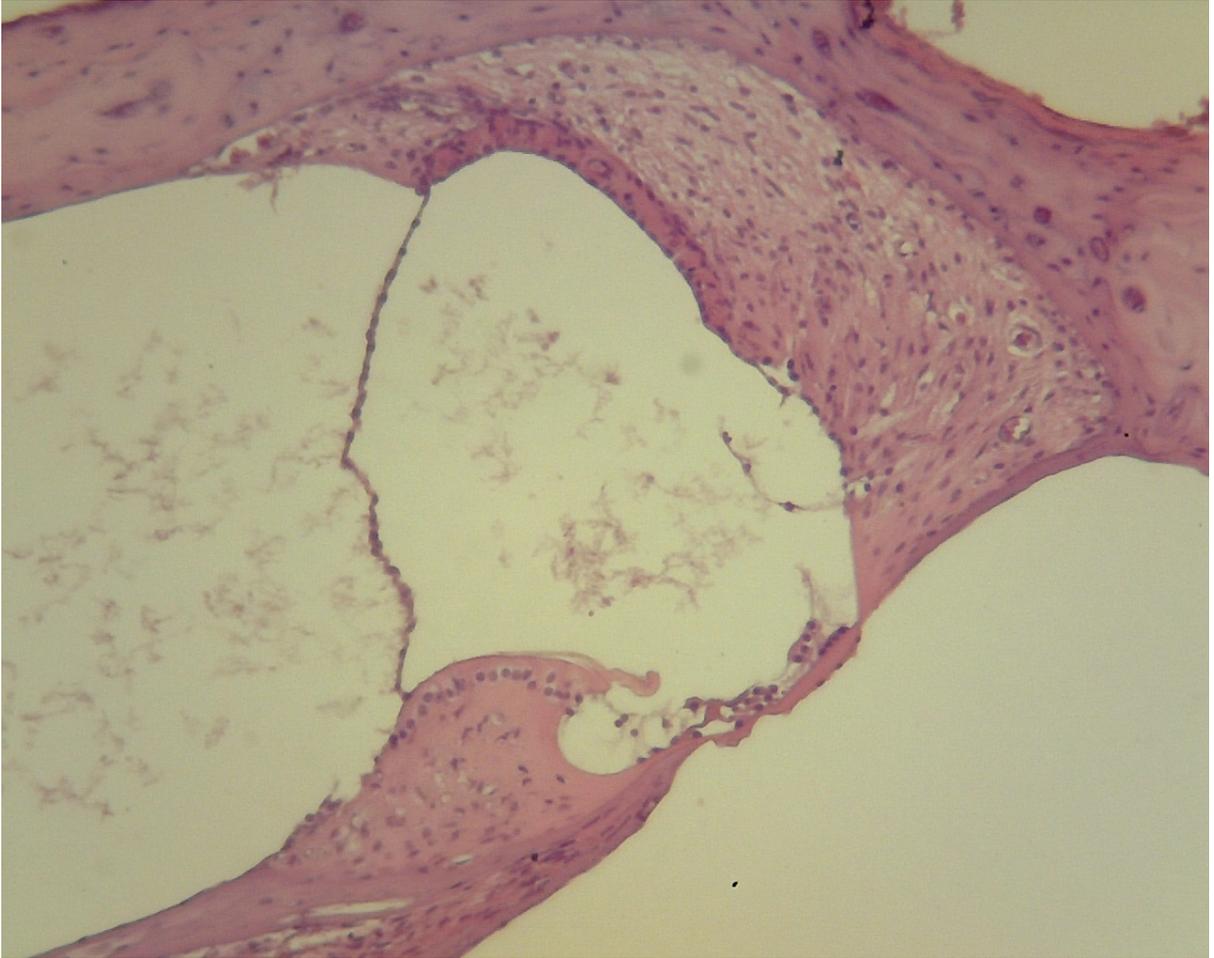


**Figura 21** — Fotomicrografias do limbo espiral representativas dos grupos salina (A), melatonina (B), cisplatina (C) e cisplatina+melatonina (D). Coloração H&E. Barra = 50  $\mu$ m.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

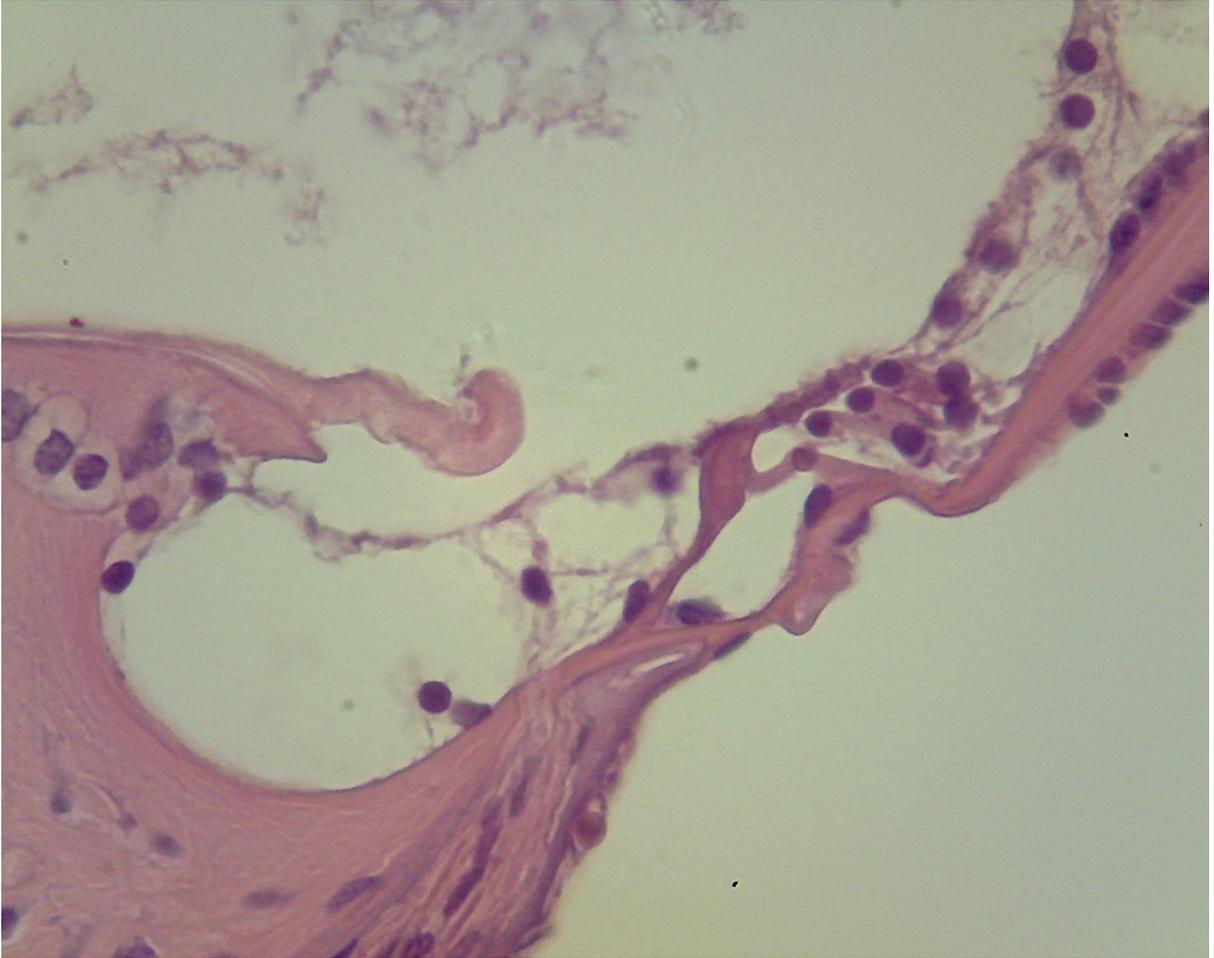
#### f) Imagens iniciais do Órgão de Corti

Apesar de não existirem imagens suficientes para comparação entre os grupos estudados, destacam-se algumas imagens do órgão de Corti obtidas do grupo 2 (controle melatonina). Apesar de alguns artefatos, observa-se alguma preservação da citoarquitetura (Figuras 22-25).



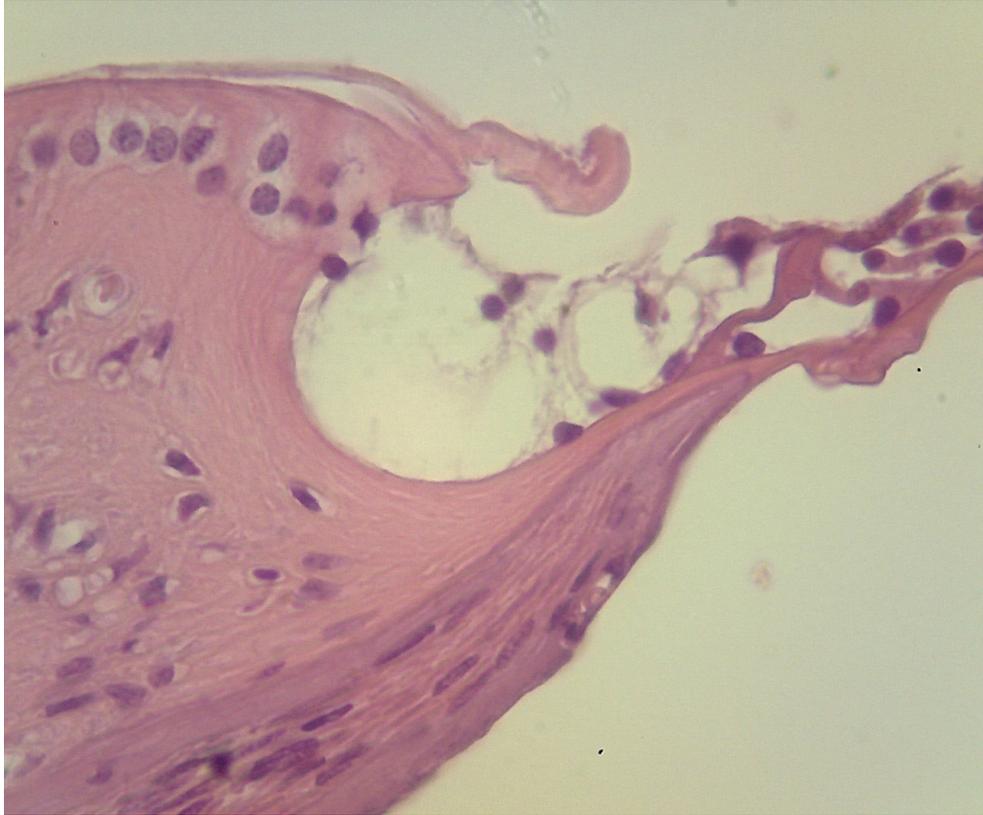
**Figura 22** — Imagem do ducto coclear com visualização da membrana vestibular, estria vascular, ligamento espiral, limbo espiral, membrana tectória, membrana basilar e órgão de Corti.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.



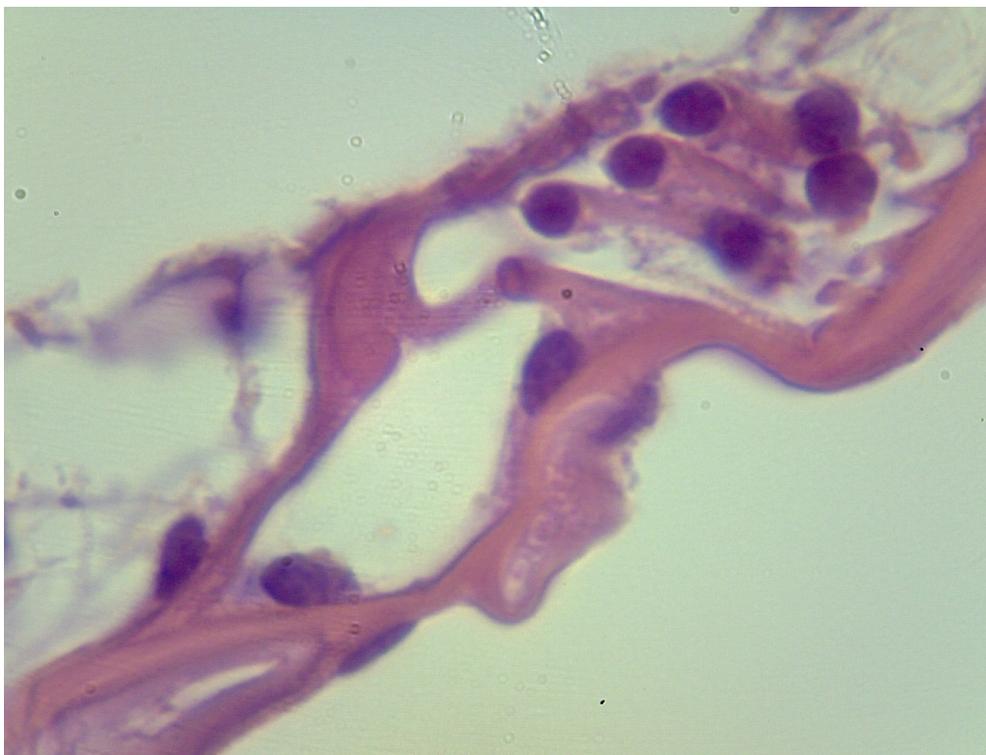
**Figura 23** — Imagem do órgão de Corti 1.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.



**Figura 24** — Imagem do órgão de Corti 2.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.



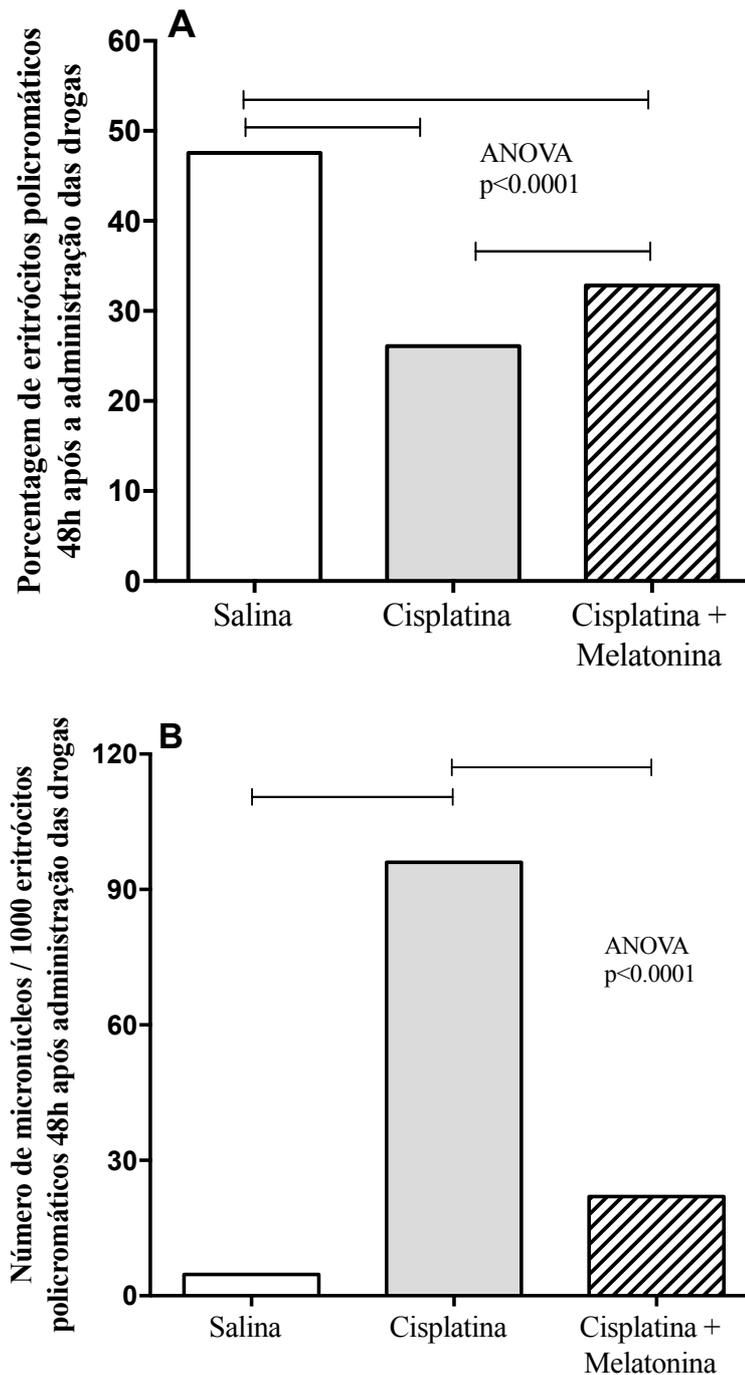
**Figura 25** — Imagem do órgão de Corti com visualização das células ciliadas externas e interna no detalhe.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

### 3.2 Genotoxicidade

Os resultados, analisados pelo teste ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls, mostraram que a porcentagem de EPC diminuiu nos grupos tratados com cisplatina ( $26,1 \pm 1,1\%$ ) e cisplatina + melatonina ( $32,8 \pm 1,7\%$ ), quando comparada ao grupo salina ( $47,6 \pm 3,1\%$ ) ( $p < 0,05$ ). Observou-se maior porcentagem de EPC no grupo cisplatina + melatonina ( $32,8 \pm 1,7\%$ ) do que no grupo cisplatina ( $26,1 \pm 1,1\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 26).

O número de micronúcleos (MN) no grupo salina ( $4,8 \pm 0,9$  MN / 1000 EPC) foi bem inferior aos grupos tratados com cisplatina ( $96,0 \pm 19,6$  MN / 1000 EPC). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo salina e o grupo cisplatina + melatonina ( $22,0 \pm 5,2$  MN / 1000 EPC) ( $p < 0,05$ ). Portanto, observou-se que 1 mg/kg de melatonina, administrado concomitantemente com cisplatina ( $22,0 \pm 5,2$  MN / 1000 EPC), foi capaz de reduzir o número de micronúcleos em comparação ao grupo cisplatina ( $96,0 \pm 19,6$  MN / 1000 EPC) ( $p < 0,05$ ) (Figura 26).



**Figura 26** — Porcentagem de EPC (A) e número de micronúcleos (B) de eritrócitos de medula óssea de ratos ( $n = 5$ ) após 48 horas da administração de medicamentos. Os resultados, analisados pela ANOVA seguida por Student-Newman-Keuls, mostraram que, quando comparados à porcentagem do grupo Salina, o EPC diminuiu nos grupos Cisplatina e Cisplatina + Melatonina ( $p < 0,05$ ); a porcentagem de EPC no grupo Cisplatina + Melatonina foi maior que no grupo cisplatina ( $p < 0,05$ ). O MN no grupo Salina foi menor que a cisplatina ( $p < 0,05$ ); MN do grupo Cisplatina foi maior que o grupo Mel + Cis ( $p < 0,05$ ). Os dados são representados por média  $\pm$  DP.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019

## 4 DISCUSSÃO

A prevenção dos efeitos colaterais da cisplatina continua sendo um grande problema para os pacientes que necessitam de tratamentos oncológicos. A ototoxicidade e a genotoxicidade, diferentemente de alguns dos outros efeitos colaterais, permanecem como fatores limitantes para utilização da droga, sobretudo em maiores dosagens. Na realidade atual, na qual a resistência aos quimioterápicos é vista cada vez com maior frequência, otimização dos tratamentos com doses mais elevadas poderiam maximizar os efeitos terapêuticos.

Neste experimento, foi utilizada uma dose diária de 1 mg/kg durante sete dias. Diferentemente da maior parte das pesquisas que avaliam os benefícios da melatonina, optou-se por iniciar a medicação quatro dias antes da administração da cisplatina na pesquisa para estudo da ototoxicidade na tentativa de aumentar as reservas orgânicas de antioxidantes permitindo a utilização de uma menor dose da medicação.

A fim de conseguir avaliar a ototoxicidade e genotoxicidade com mínimo sofrimento e perda de animais, definiu-se a utilização de apenas uma dose única de cisplatina permitindo a conclusão do estudo em curto intervalo de tempo. Há grande variabilidade de dosagens encontradas na literatura na avaliação da ototoxicidade em dose única, desde 10 mg/kg a 20 mg/kg [24–29], mas se sabe que a genotoxicidade é desencadeada mesmo em dosagens mais baixas [30]. Visando minimizar a mortalidade e sofrimento dos ratos, optou-se por utilizar 10 mg/kg de cisplatina.

Na avaliação funcional, os resultados obtidos neste experimento mostraram que a dose única de cisplatina de 10 mg/kg foi suficiente para reduzir as amplitudes das EOAPD nos animais, confirmando os dados já disponíveis na literatura que descrevem a cisplatina como droga ototóxica. As alterações funcionais foram acompanhadas de lesões histológicas no gânglio espiral, gânglio vestibular, estria vascular, limbo espiral e ligamento espiral. Não houve mortes nos grupos estudados, permitindo menor sofrimento e utilização de quantidade mínima de animais para atingir os objetivos da pesquisa.

A via de administração utilizada para aplicação da melatonina e da cisplatina, bem como da solução salina dos grupos controles, foi a intraperitoneal. Esta via foi efetiva para desencadear a ototoxicidade e a genotoxicidade nos ratos com uso da cisplatina. É a forma administração sistêmica de cisplatina vista na maioria dos experimentos de ototoxicidade em ratos, sobretudo pela facilidade técnica e segurança, mas outras vias também poderiam ser utilizadas como venosa, subcutânea e intramuscular. A melatonina poderia também ter sido administrada por via oral, mas há concordância que quando se opta por vias parenterais, há maior segurança e controle da dosagem oferecida aos animais. Apesar do conhecido risco de peritonite, não foi observado nenhum caso nos experimentos, provavelmente em virtude da curta duração da pesquisa [9].

O grupo tratado com cisplatina + melatonina (Grupo 4) apresentou amplitudes de EOAPD comparáveis às amplitudes dos grupos controle negativo e controle melatonina (Grupo 1 e Grupo 2 respectivamente), demonstrando seu efeito protetor na ototoxicidade causada pela cisplatina. Efeito semelhante foi observado quando avaliamos as contagens de células viáveis nas regiões estudadas, bem como o diâmetro neuronal dos gânglios espiral e vestibular.

Observa-se que, a melatonina protegeu contra a ototoxicidade da cisplatina em ratos em todas as frequências estudadas. Vale ressaltar que o efeito foi mais evidente nas frequências 2,8; 4 e 6 kHz do que na de 8kHz, embora o efeito ainda tenha significância estatística nesta frequência. Este menor efeito pode ter acontecido em decorrência da maior toxicidade classicamente descrita em frequências mais elevadas.

Com relação aos efeitos genotóxicos, na análise da porcentagem de EPC, pode-se observar que a cisplatina nos grupos expostos à droga por 48 horas, reduziu o número de eritrócitos jovens, possivelmente em decorrência de morte de células tronco por danos citotóxicos. Já no grupo tratado com cisplatina e melatonina, o efeito foi menos intenso, evidenciando certa ação protetora da melatonina na medula óssea dos ratos.

Efeitos protetores de outros agentes antioxidantes administrados concomitantemente com a cisplatina já foram previamente sugeridos. Apesar disto, nenhuma destas drogas são utilizadas clinicamente. Uma das razões para não haver droga formalmente indicada para prevenção da ototoxicidade é que, muitas vezes, a segurança para sua utilização ainda não foi efetivamente provada [23,26].

Qualquer droga potencialmente útil na redução dos efeitos colaterais relacionados à quimioterapia deve ser cuidadosamente avaliada. Além de analisar a toxicidade sistêmica da medicação, é imprescindível verificar o grau de interação da substância em questão com as drogas utilizadas na quimioterapia e identificar qualquer possível efeito negativo no tratamento oncológico. Uma vez que os medicamentos utilizados na prevenção dos efeitos deletérios da cisplatina a princípio devem antagonizar sua ação, a repercussão da droga nas taxas remissão do tumor e na sobrevida do paciente deve ser cuidadosamente testada.

A melatonina já foi testada em diferentes espécies de animais e em diversas doses, desde concentrações fisiológicas a altas concentrações, para determinar seu potencial de toxicidade. Nenhum efeito colateral importante foi relatado na literatura mesmo em altas dosagens. Há estudos com administração de até 100 mg/kg de melatonina por quilograma de peso corporal em ratos [119] e 250 mg/kg em camundongos [134], ambos demonstrando segurança.

Mesmo quando utilizada durante a gravidez em doses de até 200 mg/kg, não foi observada toxicidade embrionária/fetal significativa [120]. Estes dados demonstram a segurança já amplamente estudada para utilização da melatonina. As observações desta pesquisa corroboram com os achados destes estudos anteriores, uma vez que nenhum efeito adverso foi descrito na dose proposta.

Particularmente em relação à ototoxicidade, o grupo exposto apenas à melatonina, grupo 2, demonstrou achados semelhantes ao grupo controle negativo, exposto apenas à solução salina nos parâmetros detalhados na pesquisa tanto funcionais quanto histológicos.

Nota-se, contudo, que algumas das ações benéficas da melatonina se contrapõem aos mecanismos de ação dos quimioterápicos, gerando o temor de haver um desfecho negativo no combate às células cancerígenas prejudicando o prognóstico dos pacientes. O mesmo receio atinge os demais antioxidantes. No entanto, no caso da melatonina, estes efeitos não parecem afetar às células cancerígenas, agindo apenas na proteção das células normais.

A melatonina parece ter uma ação benéfica no prognóstico dos pacientes com câncer. A associação entre a redução dos níveis de melatonina e a progressão do tumor sugere que ela pode ser um agente modificador nas células cancerígenas. No entanto, os mecanismos pelos quais a melatonina pode agir dessa maneira ainda não foram completamente elucidados [104].

Os efeitos da administração da melatonina na sobrevida dos pacientes oncológicos resultam em parte da melhora do estado clínico geral dos pacientes, uma vez que a administração da melatonina simultaneamente aos tratamentos quimioterápicos reduz significativamente a frequência de eventos adversos que sabidamente aumentam a mortalidade, como trombocitopenia, neurotoxicidade e cardiotoxicidade [102]. Ademais a melatonina parece ter efeito citotóxico direto em algumas linhagens de células neoplásicas [52].

Uma das explicações para esta ação citotóxica é que, apesar de classicamente descrita como um antioxidante, a melatonina pode atuar também como um agente pró-oxidativo, sendo, portanto, uma molécula moduladora do estresse oxidativo. Enquanto a inibição da proliferação das células cancerígenas se correlaciona com uma diminuição nas ERO e aumento das defesas antioxidantes, a indução da apoptose das células danificadas, seja por infecções ou mutações, relaciona-se a um aumento nas ERO intracelulares e diminuição das defesas antioxidantes [106].

Já foi visto que a melatonina apresenta efeito citotóxico direto em linfócitos extraídos de pacientes com leucemia linfocítica aguda. Este efeito aparece mesmo quando a melatonina é utilizada isoladamente sem acréscimo de nenhum quimioterápico. Quando algum agente antineoplásico é adicionado ao experimento, a melatonina age de forma sinérgica, ampliando a capacidade de tratamento destas drogas. Adicionalmente nenhum efeito é observado nos linfócitos saudáveis, havendo preservação da estrutura e viabilidade deles mesmo em concentrações elevadas [52].

Vários estudos já demonstraram benefício da utilização da melatonina durante a quimioterapia para tumores sólidos [93,103–105,107–109]. A administração concomitante da melatonina no tratamento de tumores metastáticos de pulmão não pequenas células e gastrointestinais demonstrou resultar em maiores taxas de regressão do tumor e maior sobrevida em dois anos [108] bem como melhoria nos escores de qualidade de vida [114].

Também foram comprovados benefícios da utilização da melatonina nos tumores de pulmão pequenas células não metastáticos na terapia combinada com cisplatina e etoposídeo. Tanto a taxa geral de regressão do tumor quanto os resultados de sobrevida em cinco anos foram significativamente maiores em pacientes tratados concomitantemente com melatonina. Além disso, a quimioterapia

foi mais bem tolerada [103]. No câncer de pâncreas, há redução da viabilidade das linhagens celulares tumorais [93], assim como se observa benefício no tratamento dos tumores colorretais [98].

Gliomas são tumores originados no parênquima cerebral. Eles possuem usualmente mau prognóstico com sobrevida média não superior a um ano. Visando o controle de metástases e invasão local, tem sido sugerida a utilização concomitante da melatonina, devido aos seus efeitos na redução da migração e invasão das células cancerígenas, bem como na inibição da ativação das ERO [96,101].

Há ainda estudos sugerindo benefício da utilização da melatonina no neuroblastoma e em doenças linfoproliferativas [94,97,99]. Em pacientes com câncer de mama, a associação da melatonina ao tamoxifeno resulta em melhor resposta ao tratamento, maior sobrevida em um ano e redução dos níveis de ansiedade e depressão [95].

Mills *et al.* [104], em 2005, publicaram a primeira meta-análise avaliando o impacto da melatonina em vários tipos de câncer. Foi demonstrada melhora consistente na sobrevida de um ano quando a terapia adjuvante com melatonina era utilizada em uma variedade de cânceres. Destacam-se o pequeno Número Necessário Tratar (NNT), os poucos eventos adversos relatados e os baixos custos relacionados a esta intervenção [104].

Wang *et al.* [100], em 2012, publicaram uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados que avaliaram a eficácia e segurança da melatonina utilizada juntamente com quimioterapia ou radioterapia em tumores sólidos. Na maioria dos estudos, a terapia com melatonina levou a maiores taxas de remissão do tumor, melhor sobrevida em um ano e menos efeitos colaterais relacionados à radioterapia e à quimioterapia, como trombocitopenia, neurotoxicidade e fadiga.

Assim, parece haver consistentes fundamentações na literatura para utilização da melatonina como adjuvante ao tratamento oncológico. Os efeitos descritos corroboram com os estudos acerca da sua utilização na tentativa de prevenir alguns dos efeitos deletérios da cisplatina e ainda há a vantagem de otimizar o tratamento quimioterápico.

Desta forma, a melatonina se apresenta como uma opção segura e eficaz nos inúmeros estudos com animais e em vários estudos em humanos, como adjuvante ao tratamento quimioterápico. Os resultados favoráveis obtidos nesta pesquisa na prevenção da ototoxicidade e genotoxicidade da cisplatina com a administração de melatonina em ratos, juntamente com a segurança de seu uso durante o tratamento e o efeito benéfico no prognóstico oncológico, previamente demonstrado, sugerem que a melatonina pode ser uma excelente opção para a prevenção da toxicidade da cisplatina.

Analisando-se os efeitos adversos da cisplatina especificamente, a melatonina pode conferir proteção contra o dano provocado pelo estresse oxidativo severo ao tecido renal [84,86]. A melatonina possui a capacidade de sequestrar radicais livres, bem como de ativar a enzima glutathione peroxidase, protegendo contra o dano aos rins [10]. Além disso também possui atividade reguladora da função renal [10,85,87]. Kilic *et al.*, em 2013, sugeriram que a melatonina atenua a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina [83].

Assim como a função renal, o sistema reprodutivo é bastante vulnerável à quimioterapia. Muitas drogas podem levar à infertilidade, a alterações na estrutura ou função dos órgãos, bem como a disfunções dos hormônios sexuais [135]. A melatonina possui efeitos citoprotetores por meio de vários mecanismos, protegendo o sistema reprodutivo. Além da eliminação de radicais livres e da modulação de enzimas antioxidantes, a melatonina tem ação benéfica na lesão reprodutiva pela ação na modulação dos hormônios sexuais [89].

A função testicular é particularmente afetada pela cisplatina. No entanto, o tratamento combinado com a melatonina foi capaz de prevenir grande parte da toxicidade testicular em ratos [116]. Há redução significativa no peso corporal e testicular, na contagem, motilidade e morfologia dos espermatozoides durante o tratamento com cisplatina. Observa-se ainda decréscimo nos níveis de glutathione e aumento no nível de malondialdeído. Quando se associa melatonina ao tratamento, há aumento dos níveis de glutathione e da atividade da glutathione peroxidase, diminuindo o nível de malondialdeído no tecido testicular. A melatonina ainda melhora significativamente as alterações testiculares histopatológicas [90].

Em relação à ototoxicidade, há evidências de que a melatonina parece proteger contra a lesão auditiva induzida pela gentamicina e pela amicacina. A

melatonina foi capaz de melhorar as lesões cocleares sem interferir na função dos antibióticos [92,117].

Neste experimento, a dose de 10 mg/kg de cisplatina foi capaz de desencadear a ototoxicidade mensurável pelas EOADP em diferentes frequências, dado com amplo suporte na literatura. A melatonina administrada isoladamente não afetou as medidas das EOADP dos animais, o que confirmou a segurança do seu uso. Quando a melatonina foi administrada precoce e concomitante com a cisplatina, a ototoxicidade aferida pelas EOADP foi amenizada.

O método de avaliação da ototoxicidade, EOADP, é classicamente descrito como forma de detecção precoce dos danos às células ciliadas externas, principal alvo do efeito tóxico da cisplatina. Sua realização em animais está bem estabelecida. Particularmente em ratos, EOADP em frequências de 1 a 8 kHz já foram bem identificadas [23,91,98,117].

O equipamento utilizado nos experimentos, o ILO 292 (*Otodynamics Ltd*), é bastante utilizado em pesquisas científicas. Seu emprego em experimentos com animais, particularmente ratos, já está bem estabelecido com diversas publicações fortalecendo sua utilização [23,25,69,91,117]. Em relação às frequências avaliadas (2.8, 4, 6 e 8KHz), observa-se que na maioria dos estudos citados, as frequências pesquisadas neste experimento foram fidedignas e reprodutíveis.

Sabe-se que 72 horas após a aplicação da droga já é possível evidenciar os efeitos ototóxicos [7]. Neste estudo, o tempo de análise após o tratamento com cisplatina foi de 96 horas, suficientes para demonstrar as lesões provenientes do uso da cisplatina. Entretanto, apesar dos efeitos benéficos da melatonina terem sido claramente demonstrados, não se pode garantir que estas ações serão mantidas tardiamente. Porém é notório que após 96 horas, há grande mortalidade dos ratos expostos ao quimioterápico [9], assim sendo a avaliação do efeito da melatonina em longo prazo deve ser preferencialmente realizada com a utilização de outro modelo animal.

Uma limitação da utilização das EOAPD para avaliação da ototoxicidade é a grande variabilidade individual de respostas à ototoxicidade da cisplatina nos ratos. Conseqüentemente há um maior desvio padrão da amplitude das respostas, diminuindo o poder dos testes estatísticos. Assim torna-se mais difícil de identificar o efeitos ototóxicos da cisplatina [8,9]. Apesar desta peculiaridade, foi possível

observar redução na amplitude das EOAPD com significância estatística no grupo exposto ao tratamento com cisplatina neste experimento.

Outra limitação da EOAPD é que ela avalia basicamente as células ciliadas externas [128]. Desta forma, lesões tóxicas que preservassem estas estruturas poderiam não ser identificadas. É conhecido que a cisplatina afeta os nervos sensoriais periféricos e induz neuropatias periféricas em pacientes, sendo, portanto, provável que haja algum efeito sobre o nervo auditivo. No entanto, sabe-se que, na prática, a lesão da cisplatina se inicia pelas células ciliadas externas, particularmente no giro basal da cóclea [39], assim, para que haja dano a outras regiões cocleares certamente as células ciliadas externas já teriam sido afetadas.

Outra particularidade da EOAPD é que este exame não permite definição de limiar auditivo e, conseqüentemente, classificação da perda auditiva. Desta forma, apesar do efeito benéfico da melatonina ter sido claramente identificado tanto na avaliação funcional quanto na análise histológica, não é possível quantificar o tamanho deste efeito na análise da EOAPD.

A avaliação adicional dos Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Cerebral (PEATE) certamente enriqueceria o estudo, já que com este exame é possível determinar limiares auditivos, permitindo a classificação das perdas auditivas. No entanto, apesar de amplamente empregado em estudos com roedores, não há uma padronização técnica do exame para este fim. Há controvérsia sobre qual onda deve ser utilizada para se determinar o limiar auditivo e sobre o tipo de estímulo utilizado (*click* ou *tone burst*) [9]. Assim sendo, a realização de tal exame, exigiria, além da disponibilidade do equipamento no laboratório, um tempo razoável para definição do protocolo de realização do exame e para treinamento da equipe, o que certamente não seria possível para esta tese.

A avaliação histológica da cóclea se ateve ao gânglio espiral, gânglio vestibular, estria vascular, limbo espiral e ligamento espiral. Houve limitação da pesquisa por não ter realizado o estudo do órgão de Corti e suas células ciliadas, local sabidamente bastante acometido pela toxicidade da cisplatina. Ressalta-se que esta foi a primeira pesquisa experimental na área de otorrinolaringologia realizada na Universidade de Brasília e desta maneira, o primeiro experimento a fazer análise histológica da cóclea nesta instituição. Assim sendo, todo o protocolo de preparação das lâminas para análise, desde a extração da cóclea até a inclusão e microtomia, foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa e, embora a avaliação das regiões acima

mencionadas tenha sido bastante satisfatória, não foi possível obter um número mínimo de imagens adequadas do órgão de Corti em todos os grupos, impedindo a análise estatística dos resultados.

Além das alterações classicamente encontradas no órgão Corti como perda de células ciliadas internas e externas, ausência da membrana tectória e até ausência total do órgão, sabe-se que a cisplatina provoca extensa perda da microcitoarquitetura geral da cóclea, alterações da estria vascular e rarefação dos neurônios do gânglio espiral com alterações celulares como a ausência de núcleos [31].

Os estudos histológicos em humanos são limitados, mas inúmeras pesquisas nos mais diversos modelos animais já demonstraram que a cisplatina agride fortemente diferentes segmentos cocleares com seu alto poder citotóxico [22,24,39]. A ototoxicidade da cisplatina demonstrou ter pelo menos três alvos principais na cóclea: órgão de Corti, células do gânglio espiral e parede lateral (estria vascular e ligamento espiral) [39].

Na análise da região da parede lateral da cóclea, estria vascular e ligamento espiral, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo 3 (cisplatina) e todos os demais grupos, demonstrando que a aplicação da melatonina protege contra os danos gerados pela cisplatina. O mesmo achado se repetiu na região do limbo espiral. Particularmente na estria vascular, há descrição na literatura de lesões histológicas reversíveis [39]. No entanto, como o experimento teve curta duração, não foi possível definir se, em longo prazo, as alterações na estria vascular se perpetuariam.

Além disso, a cisplatina é conhecida por afetar os nervos sensoriais periféricos e induzir neuropatias periféricas nos pacientes [39]. Assim, danos aos elementos neurais presentes na cóclea e adjacências podem ser encontrados. Há morte neuronal induzida pela cisplatina e degeneração de células ganglionares demonstradas neste experimento. Tanto no parâmetro de densidade celular, quanto no diâmetro dos neurônios, a melatonina parece proteger contra os efeitos deletérios da cisplatina.

Os efeitos tóxicos da cisplatina no gânglio espiral já são bem estabelecidos, porém, apesar do clássico efeito neurotóxico da cisplatina, as lesões do gânglio vestibular não são usualmente descritas. Neste experimento, houve claro dano à

citoarquitetura do gânglio vestibular com evidente rarefação dos neurônios. O uso da melatonina também demonstrou benefícios nestas lesões.

A vestibulotoxicidade da cisplatina é bastante variável nos estudos [136,137]. Embora possa haver comprometimento da postura, marcha e reflexo vestibulo-ocular dos animais estudados, as análises histopatológicas usualmente mostram preservação do neuroepitélio do labirinto posterior [42]. Não era objetivo deste experimento a avaliação das estruturas do labirinto posterior, porém, na análise do gânglio vestibular, foi demonstrada redução no número e diâmetro de seus neurônios. Estas alterações poderiam justificar, em parte, os sintomas clínicos descritos por outros pesquisadores.

Em relação à genotoxicidade, há muito já se sabe dos efeitos deletérios da cisplatina no DNA, gerando alterações genômicas. Quando se fala de dano ao material genético, destaca-se inicialmente a possibilidade de tumores secundários após a quimioterapia [59]. Particularmente em pacientes pediátricos, estes danos podem induzir o aparecimento de tumores. As células proliferativas, como as da medula óssea, parecem ser mais suscetíveis. O uso da cisplatina é associado ao aumento de incidência de leucemia [21].

Embora o mecanismo de resistência da cisplatina seja complexo, os danos genotóxicos induzidos pela droga nas células cancerígenas remanescentes aumentam a heterogeneidade genética do tumor, podendo contribuir para o desenvolvimento de resistência ao quimioterápico [20,59].

O dano ao material genético observado com o uso da cisplatina e outros quimioterápicos pode resultar não apenas em morte celular, mas também em mutações tanto em células somáticas como germinativas. Desta maneira, a identificação de sinais de genotoxicidade fornece, de forma indireta, a informação que a droga possui potencial carcinogênico.

Os efeitos genotóxicos da cisplatina já foram demonstrados em humanos e em diferentes espécies animais. A pesquisa da genotoxicidade pode ser realizada em células da medula óssea, linfócitos do sangue periférico, espermatogônias e culturas celulares [54]. Neste experimento, foram estudadas as células da medula óssea dos ratos.

Os testes mais importantes atualmente aprovados para pesquisa de genotoxicidade são o ensaio cometa, o teste para detecção de aberrações cromossômicas e a pesquisa de micronúcleos [59]. Neste estudo, foi utilizada a

pesquisa de micronúcleos e também a porcentagem de eritrócitos policromáticos (EPC), cuja redução indica inibição da divisão das células hematopoiéticas.

Os eritroblastos ao expelirem seus núcleos, transformando-se em eritrócitos. Os eritrócitos jovens são policromáticos. Micronúcleos são fragmentos cromossômicos cercados por membrana nuclear morfológicamente semelhantes ao núcleo normal, mas menor em tamanho. Quando se identificam micronúcleos neste tipo celular (EPC), significa que foram formados na mitose anterior, na presença de uma substância mutagênica [61].

Neste estudo, a porcentagem de EPC diminuiu nos grupos tratados com cisplatina (grupos B e C) quando comparada ao grupo controle negativo (grupo A). É importante ressaltar, que se notou maior porcentagem de EPC no grupo cisplatina + melatonina (grupo C) que no grupo cisplatina (grupo B). Tais dados são indicativos de toxicidade celular com inibição da divisão e morte celular na medula óssea dos ratos tratados com cisplatina e demonstram um efeito protetor da aplicação da melatonina. A redução do EPC nos animais submetidos ao tratamento com cisplatina pode ser explicada tanto pela citotoxicidade direta a células tronco, quanto pelo dano extenso ao material genético celular culminando com sua morte.

Sabe-se que a cisplatina induz a formação de micronúcleos na medula óssea de ratos, resultantes do dano ao DNA ocasionados pela droga [54]. Observou-se que 1 mg/kg de melatonina, administrado concomitantemente com cisplatina (grupo C) reduziu o número de micronúcleos em comparação ao grupo medicado apenas com cisplatina (grupo B). A indução de um número significativo de micronúcleos por 1000 EPC com a utilização da cisplatina já foi bem descrita e estabelecida [57]. Nesta pesquisa, foi possível minimizar a formação de micronúcleos por meio da utilização da melatonina.

A melatonina parece proteger as células hematopoiéticas, sendo, portanto, possível que efeitos negativos da quimioterapia, como anemia e redução da imunidade celular sejam minimizados com a utilização do medicamento como adjuvante. Além disso, espera-se que o potencial carcinogênico da cisplatina seja minimizado.

Este estudo experimental em modelo Wistar corrobora com os dados da literatura a respeito do efeito ototóxico e genotóxico da cisplatina. Cogita-se que, aumentando a dose de melatonina, possamos maximizar seu efeito benéfico, obtendo uma melhor proteção principalmente nas frequências mais altas.

Houve boa resposta à melatonina também nos parâmetros histológicos. A contagem de células viáveis no gânglio espiral, gânglio vestibular, estria vascular, ligamento espiral e limbo espiral no grupo que utilizou a melatonina (grupo 4) foi comparável aos grupos controles (grupo 1 e 2). O diâmetro dos neurônios dos gânglios espiral e vestibular foram notadamente reduzidos com o uso da cisplatina de forma isolada. Já no grupo que fez uso de cisplatina e melatonina os diâmetros neuronais se compararam aos grupos controles. Todavia, não foi possível analisar os efeitos da cisplatina e da melatonina no órgão de Corti. Espera-se que o aprimoramento das técnicas histológicas permita a aquisição de melhores lâminas em pesquisas futuras.

Quanto à genotoxicidade, há maior porcentagem de EPC e menor número de micronúcleos / 1000 EPC nos animais que fizeram o tratamento da cisplatina associada à melatonina (grupo C) quando os comparamos com os ratos que utilizaram apenas a cisplatina (grupo B).

Os resultados encontrados apontam para a aplicabilidade da melatonina como adjuvante no tratamento de neoplasias, uma vez que pode diminuir a ototoxicidade e a genotoxicidade causada pela cisplatina. Realização de estudos a respeito do uso de melatonina como complemento à quimioterapia em humanos com o intuito evitar os efeitos colaterais indesejáveis da cisplatina e melhorar a sobrevida dos doentes é uma meta importante para o futuro.

## 5 CONCLUSÃO

Em relação à ototoxicidade da cisplatina, a melatonina exerce um efeito protetor, com preservação histológica da orelha interna e da amplitude das EOAPD. Com respeito à genotoxicidade da cisplatina, a melatonina exerce um efeito protetor, apresentando maior porcentagem de EPC e menor número de micronúcleos na medula óssea.

## ANEXO

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

Brasília, 24 de fevereiro de 2015.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "**O PAPEL DA MELATONINA NA PREVENÇÃO DA OTOTOXICIDADE DA CISPLATINA.**", UNBDoC n.º 7117/2015, sob responsabilidade do Professor Carlos Augusto Costa Pires de Oliveira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de Ratos Wistar: 45 A presente aprovação é válida pelo período de 01/03/2015 a 01/03/2017.

*ufgalera*

Profa. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA

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

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- [2] Instituto Nacional do Câncer. Cancer Incidence in Brazil - Estimate/2018. vol. 222. 2017. doi:978-85-7318-194-4.
- [3] Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med* 2009;219:177–86.
- [4] Muggia FM, Bonetti A, Hoeschele JD, Rozenzweig M, Howell SB. Platinum antitumor complexes: 50 Years since Barnett Rosenberg's discovery. *J Clin Oncol* 2015;33:4219–30. doi:10.1200/JCO.2015.60.7481.
- [5] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;13:714–26. doi:10.1038/nrc3599.
- [6] Rybak LP. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;15:364–9. doi:10.1097/MOO.0b013e3282eee452.
- [7] Ravi R, Somani SM, Rybak LP. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol* 1995;76:386–94. doi:10.1111/j.1600-0773.1995.tb00167.x.
- [8] Hatzopoulos S, Di Stefano M, Albertin A, Martini A. Evaluation of cisplatin ototoxicity in a rat animal model. *Ann N Y Acad Sci* 1999;884:211–25. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08643.x.
- [9] Freitas MR De, Anne G, Brito DC, Junior DC, Gomes RM, Ribeiro RDA. Distortion-product otoacoustic emissions and auditory brainstem responses sensitivity assessment in cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Braz J Otorhinolaryngol* 2009;75:476–84.
- [10] Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 2007;226:157–67. doi:10.1016/j.heares.2006.09.015.
- [11] Sletten TL, Vincenzi S, Redman JR, Lockley SW, Rajaratnam SMW. Timing of sleep and its relationship with the endogenous melatonin rhythm. *Front Neurol* 2010;1:137.

- [12] Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, et al. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999;27:838–47. doi:S0891-5849(99)00131-8 [pii].
- [13] Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz a., Fuentes-Broto L. Drug-mediated ototoxicity and tinnitus: Alleviation with melatonin. *J Physiol Pharmacol* 2011;62:151–7.
- [14] Carvalho M dos S. Síntese, Determinação Estrutural e Avaliação Citotóxica in vitro de Novos Compostos de Coordenação de Platina contendo como ligantes Compostos Imidazolidínicos Derivados da 2-tioxo-imidazolidin-4-ona e da Imidazolidina-2,4-diona. Recife - Tese (Doutorado Em Ciências Biológicas) UFPE 2009.
- [15] Monti-Bragadin C, Ramani L, Samer L, Mestroni G, Zassinovich G. Effects of cis-Dichlorodiammineplatinum (II) and Related Transition Metal Complexes on *Escherichia coli* 1975;7:825–7.
- [16] Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969;222:385–6. doi:10.1038/222385a0.
- [17] Lelieveld P, Van Der Vijgh WJF, Veldhuizen RW, Van Velzen D, Van Putten LM, Atassi G, et al. Preclinical studies on toxicity, antitumour activity and pharmacokinetics of cisplatin and three recently developed derivatives. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984;20:1087–104. doi:10.1016/0277-5379(84)90112-3.
- [18] Rebillard A, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel M-T. Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. *Curr Med Chem* 2008;15:2656–63. doi:10.2174/092986708786242903.
- [19] Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1229–35. doi:10.1007/PL00000762.
- [20] Cepeda V, Fuertes M a, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7:3–18. doi:10.2174/187152007779314044.
- [21] Dertinger SD, Avlasevich SL, Torous DK, Bemis JC, Phonethepswath S, Labash C, et al. Persistence of cisplatin-induced mutagenicity in hematopoietic stem cells: Implications for secondary cancer risk following chemotherapy. *Toxicol Sci* 2014;140:307–14. doi:10.1093/toxsci/kfu078.
- [22] Kuduban O, Kucur C, Sener E, Suleyman H, Akcay F. The role of thiamine pyrophosphate in prevention of cisplatin ototoxicity in an animal model. *ScientificWorldJournal* 2013;2013:182694. doi:10.1155/2013/182694.

- [23] Yazici ZM, Meric A, Midi A, Arıncı YV, Kahya V, Hafız G. Reduction of cisplatin ototoxicity in rats by oral administration of pomegranate extract. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2012;269:45–52. doi:10.1007/s00405-011-1582-2.
- [24] Meech RP, Campbell KCM, Hughes LP, Rybak LP. A semiquantitative analysis of the effects of cisplatin on the rat stria vascularis. *Hear Res* 1998;124:44–59. doi:10.1016/S0378-5955(98)00116-6.
- [25] Lopez-Gonzalez M a, Guerrero JM, Rojas F, Delgado F. Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. *J Pineal Res* 2000;28:73–80. doi:10.1034/j.1600-079X.2001.280202.x.
- [26] Tokgöz SA, Vuralkan E, Sonbay ND, Çalışkan M, Saka C, Beşalti Ö, et al. Protective effects of vitamins E, B and C and L-carnitine in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity in rats. *J Laryngol Otol* 2012;126:464–9. doi:10.1017/S0022215112000382.
- [27] Lynch ED, Gu R, Pierce C, Kil J. Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. *Hear Res* 2005;201:81–9.
- [28] Paksoy M, Ayduran E, Sanlı A, Eken M, Aydın S, Oktay ZA. The protective effects of intratympanic dexamethasone and vitamin E on cisplatin-induced ototoxicity are demonstrated in rats. *Med Oncol* 2011;28:615–21. doi:10.1007/s12032-010-9477-4.
- [29] Lee CK, Shin JI, Cho YS. Protective effect of minocycline against cisplatin-induced ototoxicity. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2011;4:77–82. doi:10.3342/ceo.2011.4.2.77.
- [30] Ananthi R, Chandra N, Santhiya ST. Protective effect of *Hemidesmus indicus* R.Br. root extract against cisplatin-induced cytogenetic damage in mouse bone marrow cells. *Genet Mol Biol* 2010;33:182–5. doi:10.1590/S1415-47572010005000011.
- [31] Franceschi CM De, Tochetto T, Silveira AF Da, Fantinel MR, Algarve TD. Cisplatin effects on guinea pigs: cochlear histology and genotoxicity. *Braz J Otorhinolaryngol* 2011;77:728–35.
- [32] Blumenreich MS, Woodcock TM, Jones M, Richman SP, Gentile PS, Kubota TT, et al. High-dose cisplatin in patients with advanced malignancies. *Cancer* 1985;55:1118–22. doi:10.1002/1097-0142(19850301)55:5<1118::AID-CNCR2820550529>3.0.CO;2-5.
- [33] Gralla RJ, Itri LM, Pisko SE, Squillante AE, Kelsen DP, Braun DW, et al. Antiemetic Efficacy of High-Dose Metoclopramide: Randomized Trials with Placebo and Prochlorperazine in Patients with Chemotherapy-Induced Nausea

- and Vomiting. *N Engl J Med* 2010. doi:10.1056/nejm198110153051601.
- [34] du Bois A, Meerpohl HG, Kommos FGM, Pfeleiderer A, Vach W, Fenzl E. Course, patterns, and risk-factors for chemotherapy-induced emesis in cisplatin-pretreated patients: a study with ondansetron. *Eur J Cancer* 1992. doi:10.1016/S0959-8049(05)80075-9.
- [35] Von Hoff DD, Schilsky R, Reichert MC, Reddick LR, Rozenzweig M, Young CR, et al. Toxic effects of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in man. *Cancer Treat Rep* 1979;63:1527–31.
- [36] Ali BH, Al Moundhri MS. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. *Food Chem Toxicol* 2006;44:1173–83. doi:10.1016/j.fct.2006.01.013.
- [37] Gonzalez-Vitale JC, Hayes DM, Cvitkovic E, Sternberg SS. The renal pathology in clinical trials of Cis-platinum (II) diamminedichloride. *Cancer* 1977;39:1362–71. doi:10.1002/1097-0142(197704)39:4<1362::AID-CNCR2820390403>3.0.CO;2-N.
- [38] Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2003;21:3194–200. doi:10.1200/JCO.2003.02.153.
- [39] Van Ruijven MWM, De Groot JCMJ, Klis SFL, Smoorenburg GF. The cochlear targets of cisplatin: An electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hear Res* 2005;205:241–8. doi:10.1016/j.heares.2005.03.023.
- [40] Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C, Somani S. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* 2000;21:513–20.
- [41] Wang J, Wei Q, Wang CY, Hill WD, Hess DC, Dong Z. Minocycline Up-regulates Bcl-2 and Protects against Cell Death in Mitochondria. *J Biol Chem* 2004;279:19948–54. doi:10.1074/jbc.M313629200.
- [42] Sergi B, Ferraresi A, Troiani D, Paludetti G, Fetoni AR. Cisplatin ototoxicity in the guinea pig: vestibular and cochlear damage. *Hear Res* 2003;182:56–64. doi:10.1016/S0378-5955(03)00142-4.
- [43] Hyppolito MA, Rossato M, Holanda F. Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. *Braz J Otorhinolaryngol* 2003;69:504–11.
- [44] Tian CJ, Kim YJ, Kim SW, Lim HJ, Kim YS, Choung Y-H. A combination of cilostazol and Ginkgo biloba extract protects against cisplatin-induced Cochleo-

- vestibular dysfunction by inhibiting the mitochondrial apoptotic and ERK pathways. *Cell Death Dis* 2013;4:e509. doi:10.1038/cddis.2013.33.
- [45] Brock PR, Bellman SC, Yeomans EC, Pinkerton CR, Pritchard J. Cisplatin ototoxicity in children: A practical grading system. *Med Pediatr Oncol* 1991;19:295–300. doi:10.1002/mpo.2950190415.
- [46] Landier W. Ototoxicity and cancer therapy. *Cancer* 2016;june:1647–58. doi:10.1002/cncr.29779.
- [47] American Speech-Language Hearing Association. Guidelines for the audiologic management of individuals receiving cochleotoxic drug therapy. *Am Speech-Lang Hear Assoc* 1994;36:11–9. doi:10.1044/policy.GL1994-00003.
- [48] National Institute of Cancer. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). 2010. doi:10.1080/00140139.2010.489653.
- [49] Chang KW, Chinosornvatana N. Practical grading system for evaluating cisplatin ototoxicity in children. *J Clin Oncol* 2010;1–9. doi:10.1200/JCO.2009.24.4228.
- [50] Bokemeyer C, Berger CC, Hartmann JT, Kollmannsberger C, Schmoll HJ, Kuczyk MA, et al. Analysis of risk factors for cisplatin-induced ototoxicity in patients with testicular cancer. *Br J Cancer* 1998;77:1355–62.
- [51] Ekborn A. Cisplatin-induced ototoxicity. Pharmacokinetics, prediction and prevention. 2003.
- [52] Zhelev Z, Ivanova D, Bakalova R, Aoki I, Higashi T. Synergistic Cytotoxicity of Melatonin and New-generation Anticancer Drugs Against Leukemia Lymphocytes But Not Normal Lymphocytes. *Anticancer Res* 2017;37:149–60. doi:10.21873/anticanres.11300.
- [53] Bublej GJ, Teicher BA, Ogata GK, Sandoval LS, Kusumoto T. Differences in in vivo and in vitro sequence-specific sites of cisplatin-DNA adduct formation and detection of a dose-response relationship. *Biochem Pharmacol* 1994;48:145–53. doi:10.1016/0006-2952(94)90234-8.
- [54] Rjiba-Touati K, Ayed-Boussema I, Skhiri H, Belarbia A, Zellema D, Achour A, et al. Induction of DNA fragmentation, chromosome aberrations and micronuclei by cisplatin in rat bone-marrow cells: Protective effect of recombinant human erythropoietin. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2012;747:202–6. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.05.011.
- [55] Sánchez-Suárez P, Ostrosky-Wegman P, Gallegos-Hernández F, Peñarroja-Flores R, Toledo-García J, Bravo JL, et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer.

- Mutat Res 2008;2:8–15. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.11.008.
- [56] Elsendoorn TJ, Weijl NI, Mithoe S, Zwinderman AH, Van Dam F, De Zwart FA, et al. Chemotherapy-induced chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients supplemented with antioxidants or placebo. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2001;15:145–58. doi:10.1016/S1383-5718(01)00278-9.
- [57] Choudhury R, Jagdale MB, Misra S. Cytogenetic Toxicity of Cisplatin in Bone Marrow Cells of Swiss Mice. *J Chemother* 2000;12:173–82. doi:10.1179/joc.2000.12.2.173.
- [58] Choi DK, Helenowski I, Hijya N. Secondary malignancies in pediatric cancer survivors: Perspectives and review of the literature. *Int J Cancer* 2014;135:1764–73. doi:10.1002/ijc.28991.
- [59] Szikriszt B, PótiÁdám, Pipek O, Krzystanek M, Kanu N, Molnár J, et al. A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome Biol* 2016;17:1–16. doi:10.1186/s13059-016-0963-7.
- [60] Kliesch U, Adler ID. Micronucleus test in bone marrow of mice treated with 1-nitropropane, 2-nitropropane and cisplatin. *Mutat Res Lett* 1987;192:181–4. doi:10.1016/0165-7992(87)90053-4.
- [61] Kang SH, Kwon JY, Lee JK, Seo YR. Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. *J Cancer Prev* 2013;18:277–88. doi:10.15430/jcp.2013.18.4.277.
- [62] Adler ID, El-Tarras A. Clastogenic effects of cis-diamminedichloroplatinum. I. Induction of chromosomal aberrations in somatic and germinal cells of mice. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 1989. doi:10.1016/0027-5107(89)90113-9.
- [63] Attia SM. Influence of resveratrol on oxidative damage in genomic DNA and apoptosis induced by cisplatin. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2012. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.10.008.
- [64] Sanderson BJS, Ferguson LR, Denny WA. Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 1996;355:59–70. doi:10.1016/0027-5107(96)00022-X.
- [65] Hyppolito MA, de Oliveira JAA, Rossato M. Cisplatin ototoxicity and otoprotection with sodium salicylate. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006;263:798–803. doi:10.1007/s00405-006-0070-6.
- [66] Du B, Zhang Y, Tang Y, Wang P. Minocycline attenuates ototoxicity and

- enhances antitumor activity of cisplatin treatment in vitro. *Otolaryngol - Head Neck Surg* 2011;144:719–25. doi:10.1177/0194599810395090.
- [67] Choi SJ, Kim SW, Lee JB, Lim HJ, Kim YJ, Tian C, et al. Ginkgo biloba extracts protect auditory hair cells from cisplatin-induced ototoxicity by inhibiting perturbation of gap junctional intercellular communication. *Neuroscience* 2013;244:49–61. doi:S0306-4522(13)00319-9 [pii];10.1016/j.neuroscience.2013.04.001 [doi].
- [68] Choi J, Im GJ, Chang J, Chae SW, Lee SH, Kwon SY, et al. Protective effects of apocynin on cisplatin-induced ototoxicity in an auditory cell line and in zebrafish. *J Appl Toxicol* 2013;33:125–33. doi:10.1002/jat.1729.
- [69] Celebi S, Gurdal MM, Ozkul MH, Yasar H, Balikci HH. The effect of intratympanic vitamin C administration on cisplatin-induced ototoxicity. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2013;270:1293–7. doi:10.1007/s00405-012-2140-2.
- [70] Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 2010;181:127–51. doi:10.1016/S0079-6123(08)81008-4.
- [71] Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ, Koppisepi S. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci* 2007;52:11–28.
- [72] Metabologia SB de E e. POSICIONAMENTO DA SBEM SOBRE A MELATONINA. 2015.
- [73] Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011;51:1–16. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x.
- [74] Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres : conceito , doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Medicina (B Aires)* 1997;43:61–8.
- [75] Rani V, Chand U, Yadav S. *Free Radicals in Human Health and Disease*. Noida 2015. doi:10.1007/978-81-322-2035-0.
- [76] León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005;38:1–9. doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00181.x.
- [77] Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell Death: The Significance of Apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251–306. doi:10.1016/S0074-7696(08)62312-8.
- [78] Kerr JFR, Winterford CM, Harmon B V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer* 1994;73:2013–26. doi:10.1002/1097-

0142(19940415)73:8<2013::AID-CNCR2820730802>3.0.CO;2-J.

- [79] Espino J, Pariente JA, Rodríguez AB. Oxidative stress and immunosenescence: Therapeutic effects of melatonin. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:1–9. doi:10.1155/2012/670294.
- [80] Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuna-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000;14:1677–9. doi:10.1096/fj.99-0865fje.
- [81] Tiong YL, Ng KY, Koh RY, Ponnudurai G, Chye SM. Melatonin Prevents Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in High Glucose-Treated Schwann Cells via Upregulation of Bcl2, NF- $\kappa$ B, mTOR, Wnt Signalling Pathways. *Antioxidants* 2019;8:1–15.
- [82] Keskin-Aktan A, Akbulut KG, Yazici-Mutlu Ç, Sonugur G, Ocal M, Akbulut H. The effects of melatonin and curcumin on the expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats. *Brain Res Bull* 2018;137:306–10. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.01.006.
- [83] Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Ozercan IH, Yilmaz O, et al. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab (Lond)* 2013;10:1–7. doi:10.1186/1743-7075-10-7.
- [84] Hara M, Yoshida M, Nishijima H, Yokosuka M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R, et al. Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 2001;30:129–38. doi:10.1034/j.1600-079X.2001.300301.x.
- [85] Mercantepe F, Mercantepe T, Topcu A, Yilmaz A, Tumkaya L. Protective effects of amifostine, curcumin, and melatonin against cisplatin-induced acute kidney injury. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2018;391:915–31. doi:10.1007/s00210-018-1514-4.
- [86] Parlakpınar H, Sahna E, Ozer MK, Ozugurlu F, Vardi N, Acet A. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury. *J Pineal Res* 2002;33:161–6. doi:20910 [pii].
- [87] Sener G, Satiroglu H, Kabasakal L, Arbak S, Oner S, Ercan F, et al. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 2000;14:553–60. doi:S0767398100010872 [pii].
- [88] Vijayalaxmi, Meltz ML, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin and protection from genetic damage in blood and bone marrow: Whole-body irradiation studies in mice. *J Pineal Res* 1999;27:221–5.

- [89] Haghi-Aminjan H, Asghari MH, Farhood B, Rahimifard M, Hashemi Goradel N, Abdollahi M. The role of melatonin on chemotherapy-induced reproductive toxicity. *J Pharm Pharmacol* 2018;70:291–306. doi:10.1111/jphp.12855.
- [90] Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Otunctemur A, Cekmen M, Somay A. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertil Steril* 2009;92:1124–32.
- [91] Erdem T, Ozturan O, Iraz M, Miman MC, Olmez E. Dose-dependent dual effect of melatonin on ototoxicity induced by amikacin in adult rats. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2005;262:314–21. doi:10.1007/s00405-004-0793-1.
- [92] Ye L-F, TAO Z-Z, HUA Q-Q, Xiao B-K, Zhou X-H, Li J, et al. Protective effect of melatonin against gentamicin ototoxicity. *J Laryngol Otol* 2009;123:598–602. doi:10.1017/S002221510800385X.
- [93] Gonzalez A, del Castillo-Vaquero A, Miro-Moran A, Tapia J a, Salido GM. Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology. *J Pineal Res* 2011;50:250–60. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00834.x.
- [94] García-Santos G, Antolín I, Herrera F, Martín V, Rodriguez-Blanco J, Carrera MDP, et al. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *J Pineal Res* 2006;41:130–5. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00342.x.
- [95] Lissoni P, Ardizzoia A, Barni S, Paolorossi F, Tancini G, Meregalli S, et al. A randomized study of tamoxifen alone versus tamoxifen plus melatonin in estrogen receptor-negative heavily pretreated metastatic breast cancer patients. *Oncol Rep* 1995;2:871–3. doi:10.3892/or.2.5.871.
- [96] Martín V, Herrera F, Carrera-Gonzalez P, García-Santos G, Antolín I, Rodriguez-Blanco J, et al. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Res* 2006;66:1081–8.
- [97] Rubio S, Estévez F, Cabrera J, Reiter RJ, Loro J, Quintana J. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2007;42:131–8. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00392.x.
- [98] Sockalingam R, Freeman S, Cherny L, Sohmer H. Effect of high-dose cisplatin on auditory brainstem responses and otoacoustic emissions in laboratory animals. *Am J Otol* 2000;21:521–7.
- [99] Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, Pizzicannella J, Caputi S, Di Primio R. Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation. *J Pineal Res* 2005;39:425–31. doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00270.x.

- [100] Wang Y, Jin B, Ai F, Duan C, Lu Y, Dong T, et al. The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;69:1213–20. doi:10.1007/s00280-012-1828-8.
- [101] Wang J, Hao H, Yao L, Zhang X, Zhao S, Ling EA, et al. Melatonin suppresses migration and invasion via inhibition of oxidative stress pathway in glioma cells. *J Pineal Res* 2012;53:180–7.
- [102] Lissoni P, Barni S, Mandalà M, Ardizzoia a., Paolorossi F, Vaghi M, et al. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer* 1999;35:1688–92. doi:10.1016/S0959-8049(99)00159-8.
- [103] Lissoni P, Chilelli M, Villa S, Cerizza L, Tancini G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. *J Pineal Res* 2003;35:12–5. doi:032 [pii].
- [104] Mills E, Wu P, Seely D, Guyatt G. Melatonin in the treatment of cancer: A systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res* 2005;39:360–6. doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00258.x.
- [105] Casado-Zapico S, Rodriguez-Blanco J, García-Santos G, Martín V, Sánchez-Sánchez AM, Antolín I, et al. Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway. *J Pineal Res* 2010;48:72–80. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00727.x.
- [106] Sánchez-Sánchez AM, Martín V, García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Suarez-Garnacho S, et al. Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs cytotoxic effects in cancer cells. *Free Radic Res* 2011;45:1333–41. doi:10.3109/10715762.2011.623700.
- [107] Kubatka P, Zubor P, Busselberg D, Kwon TK, Adamek M, Petrovic D, et al. Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018;122:133–43. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.12.018.
- [108] Lissoni P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol Biol* 2007;55:201–4. doi:10.1016/j.patbio.2006.12.025.
- [109] Martínez-Campa C, Menéndez-Menéndez J, Alonso-González C, González A, Álvarez-García V, Cos S. What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer. *Oncol Lett* 2017;13:2003–14. doi:10.3892/ol.2017.5712.

- [110] Rodriguez C, Martín V, Herrera F, García-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, et al. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. *Int J Mol Sci* 2013;14:6597–613. doi:10.3390/ijms14046597.
- [111] Hill SM, Frasca T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther* 2009;8:337–46. doi:10.1177/1534735409353332.
- [112] Martín V, García-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Sanchez-Sanchez A, Antolín I, et al. Melatonin sensitizes human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death. *Cancer Lett* 2010;287:216–23. doi:10.1016/j.canlet.2009.06.016.
- [113] Kim JH, Jeong SJ, Kim B, Yun SM, Choi DY, Kim SH. Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells. *J Pineal Res* 2012;52:244–52. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00935.x.
- [114] Sookprasert A, Johns NP, Phunmanee A, Pongthai P, Cheawchanwattana A, Johns J, et al. Melatonin in Patients with Cancer Receiving Chemotherapy: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Anticancer Res* 2014;34:7327–38.
- [115] Ortega-Gutierrez S, Lopez-Vicente M, Lostale F, Fuentes-Broto L, Martinez-Ballarín E, J.J.Garcia. Protective effect of melatonin against mitomycin c-induced genotoxic damage in peripheral blood of rats. *J Biomed Biotechnol* 2009;2009:1–6. doi:10.1155/2009/791432.
- [116] Ateşşahin A, Şanna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, et al. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 2006;41:21–7. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00327.x.
- [117] Lopez-Gonzalez M a, Guerrero JM, Torronteras R, Osuna C, Delgado F. Ototoxicity caused by aminoglycosides is ameliorated by melatonin without interfering with the antibiotic capacity of the drugs. *J Pineal Res* 2000;28:26–33. doi:10.1034/j.1600-079X.2000.280104.x.
- [118] Atalik KE, Keleş B, Uyar Y, DüNDAR M a., Öz M, Esen HH. Vasoprotection by melatonin and quercetin in rats treated with cisplatin. *Indian J Exp Biol* 2010;48:1188–93.
- [119] Kaya H, Delibas N, Serteser M, Ulukaya E, Ozkaya O. The Effect of Melatonin on Lipid Peroxidation during Radiotherapy in Female Rats. *Strahlentherapie Und Onkol* 1999;175:285–8.
- [120] Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. Maternal and

Developmental Toxicity Evaluation of Melatonin Administered Orally to Pregnant Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Sci* 1999;50:271–9.

- [121] Olcese JM, Cao C, Mori T, Mamcarz MB, Maxwell A, Runfeldt MJ, et al. Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res* 2009;47:82–96.
- [122] Fernandez-Gil B, Abdel Moneim AE, Ortiz F, Shen YQ, Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, et al. Melatonin protects rats from radiotherapy-induced small intestine toxicity. *PLoS One* 2017;12:1–21. doi:10.1371/journal.pone.0174474.
- [123] Costa SS da, Cruz OLM, Oliveira JAA de. *Otorrinolaringologia Princípios e Prática*. 2ª Edição. São Paulo: Artmed; 2006.
- [124] Wong BJB, de Boer JF, Park BH, Chen Z, Nelson JS. Optical coherence tomography of the rat cochlea. *J Biomed Opt* 2002;5:367. doi:10.1117/1.1310165.
- [125] Reis A dos, Dalmolin SP, Dallegrave E. Modelos animais para avaliação auditiva: revisão de literatura. *Rev CEFAC* 2017;19:417–28. doi:10.1590/1982-021620171932117.
- [126] Santos BF. *Criação e Manejo de Ratos*. 2002.
- [127] Albuquerque AAS, Rossato M, de Oliveira JAA, Hyppolito MA. Understanding the anatomy of ears from guinea pigs and rats and its use in basic otologic research. *Braz J Otorhinolaryngol* 2015;75:43–9. doi:10.1016/s1808-8694(15)30830-2.
- [128] Silva RC. Emissões Otoacústicas. *Eletrofisiologia - Vias Audit. e Vestibulares*, 2020, p. 39–45.
- [129] Reavis KM, McMillan G, Austin D, Gallun F, Fausti SA, Gordon JS, et al. Distortion-product otoacoustic emission test performance for ototoxicity monitoring. *Ear Hear* 2011;32:61–74. doi:10.1097/AUD.0b013e3181e8b6a7.
- [130] Siddik ZH. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265–79. doi:10.1038/sj.onc.1206933.
- [131] Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9–23.
- [132] Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36:1–9.

- [133] Tan D-X, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007;42:28–42. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x.
- [134] Vijayalaxmi, Meltz ML, Reiter RJ, Herman TS, K SK. Melatonin and protection from whole-body irradiation : survival studies in mice. *Fundam Mol Mech Mutagen* 1999;425:21–7.
- [135] Tsuyoshi H, Orisaka M, Fukuda S, Hattori K, Tsang BK, Yoshida Y. Protective effect of dienogest on chemotherapy-induced reduced fertility in female rats. *Steroids* 2015;93:1–7. doi:10.1016/j.steroids.2014.10.010.
- [136] Schaefer SD, Wright CG, Post JD, Frenkel EP. Cis-platinum vestibular toxicity. *Cancer* 1981;47:857–9. doi:10.1002/1097-0142(19810301)47:5<857::AID-CNCR2820470508>3.0.CO;2-M.
- [137] Myers SF, Blakley BW, Schwan S. Is cis-platinum vestibulotoxic? *Otolaryngol Neck Surg* 1993;108:322–8. doi:10.1177/019459989310800403.

## APÊNDICE

ANTICANCER RESEARCH 39: 2453-2458 (2019)  
doi:10.21873/anticancer.13364

### Protective Effect of Melatonin on Cisplatin-induced Ototoxicity in Rats

JULIANA GUSMÃO DE ARAUJO<sup>1#</sup>, LUCIENY SILVA MARTINS SERRA<sup>1#</sup>, LUCAS LAUAND<sup>2#</sup>,  
SELMA APARECIDA SOUZA KÜCKELHAUS<sup>2#</sup> and ANDRÉ LUIZ LOPES SAMPAIO<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil;  
<sup>2</sup>Area of Morphology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil

**Abstract.** *Background/Aim:* Cisplatin is a highly effective chemotherapeutic agent that is used to treat solid tumors; however, its severe side effects remain a limitation. In particular, the high incidence of cisplatin-induced ototoxicity has attracted interest. Melatonin has been shown to decrease the toxic effects of cisplatin due to its antioxidant activity, and could increase the efficacy of cancer chemotherapy. The aim of this study was to determine the effect of melatonin against ototoxicity in rats treated with cisplatin. *Materials and Methods:* Rats were randomly divided into four groups (saline, melatonin, cisplatin+saline, and melatonin+cisplatin). Distortion-product otoacoustic emission (DPOAE) measurements were carried out on days 1 and 8. *Results:* There was a decrease in DPOAE amplitudes in the animals that received cisplatin (10 mg/kg); however, the group treated with cisplatin+melatonin presented DPOAE amplitudes comparable to those of the control groups. *Conclusion:* Melatonin can be used as an adjuvant tumor treatment due to its ability to decrease cisplatin-induced ototoxicity.

Cancer is currently a leading cause of death in both economically developed and less developed countries (1). Moreover, the global trend toward a shift in lifestyle habits that are known to increase the risk of cancer in less economically developed countries, comprising 82% of the world's population, is expected to lead to an increase in the number of new cancer cases in the next few years along with population growth and aging (1).

#Current address: Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brazil.

*Correspondence to:* André Luiz Lopes Sampaio, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Faculdade de Medicina, Distrito Federal, 70910-900 Brasília, Brazil. Tel: +55 6120285580, e-mail: andremarjy@uol.com.br Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7611-1303>

*Key Words:* Ototoxicity, cisplatin, melatonin, otoacoustic emissions.

Cancer chemotherapy was introduced in the 1940s when nitrogen mustard was first used in clinical practice. In 1969, Rosenberg *et al.* (2) first demonstrated the cytotoxic effect of cisplatin, and a new class of antitumor agents emerged (2). Although additional platinum analogues are clinically applied, cisplatin is still considered the most useful of these agents based on its versatility, long research history, and supportive literature (3). Indeed, cisplatin remains a highly effective chemotherapeutic agent that is widely used to treat solid tumors, including tumors of the ovary, testis, bladder, lung, and head and neck (4-6). In particular, cisplatin is one of the most effective chemotherapeutic agents for pediatric cancer patients, with an average cure rate of 85% (7, 8).

The mechanism of cisplatin's antitumor activity essentially involves the binding of the drug to DNA and non-DNA targets. The damage induced by the binding of cisplatin to DNA inhibits DNA replication mechanisms, leading to cell death through apoptosis and necrosis of tumor cells (9).

In clinical practice, the dose of cisplatin may be limited owing to its toxic side-effects such as nephrotoxicity, genotoxicity, neurotoxicity, and ototoxicity, often leading to a worse prognosis. Moreover, cancer patients, especially children, have a higher incidence of development of secondary tumors after cisplatin-based treatments, particularly in the proliferative organs. This is due to the genotoxic effects of the drug, which can affect all types of cells in the body and enhance cancer occurrence, particularly leukemia (10).

Ototoxicity has attracted substantial interest due to its higher incidence compared to the other side-effects, being considered the most common dose-limiting side-effect of cisplatin treatment (4, 6, 7, 11). There is still no proven effective treatment to prevent, or at least reduce cisplatin-induced ototoxicity. Although increasing saline hydration and mannitol diuresis can ameliorate cisplatin nephrotoxicity, these measures do not have the same effects on ototoxicity (12).

Audiometric studies have indicated an elevation of the hearing threshold in 75-100% of patients treated with cisplatin (8). This cisplatin-induced ototoxicity risk can be increased by certain factors such as younger age in children, larger

cumulative doses, renal disease, previous hearing loss, and irradiation of the skull base (13, 14). Although the ototoxicity usually occurs within hours to days after drug administration, delayed ototoxicity from cisplatin has also been reported in children (4). The severity of the ototoxic effect is also positively correlated to the cumulative dose of cisplatin (15, 16).

Cisplatin-induced ototoxicity begins with damage to the outer hair cells at the base of the cochlea, resulting in a predominantly high-frequency hearing loss even at low doses. As the treatment continues or the dose increases, the cochlear lesion spreads apically, resulting in additional hearing loss in the mid-to-high-frequencies (17). In addition, cisplatin may affect other regions of the cochlea such as the stria vascularis, spiral ligament, and spiral ganglion (18, 19).

Cochlear tissues from animals receiving ototoxic doses of cisplatin are depleted of glutathione and antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase). Malondialdehyde levels increase, which is an indicator of lipid peroxidation (13, 20). In 2007, Rybak *et al.* (21) reviewed research findings that provide insights into the mechanism underlying cisplatin ototoxicity. In particular, they described that the depletion of cochlear antioxidant enzyme activities may be a result of the direct binding of cisplatin to essential sulfhydryl groups within the enzymes (21).

Some drugs have been reported to show potential protective effects against cisplatin ototoxicity. However, some of these failed in safety assessments and could eventually reduce the anti-neoplastic activity of cisplatin, which would lead to disastrous effects for the patient's prognosis. Thus, there is an urgent need to identify substances capable of protecting against the ototoxicity of cisplatin, since this side effect causes significant morbidity to patients.

Melatonin is widely distributed in animals and has an uncommonly wide range of functions (22). The production of melatonin increases during the absence of light and is maintained at minimal levels in the presence of light, giving rise to a circadian rhythm imposed by the light/dark cycle (23). Accordingly, melatonin is also a sleep promoter and regulator of photoperiod-dependent seasonal reproduction in some vertebrates (24). In addition, melatonin has direct free radical-scavenging activity and also regulates gene transcription of antioxidative enzymes (25). Melatonin also seems to decrease the toxicity and increase the efficacy of cancer chemotherapy (26-28).

Although melatonin has already been shown to be effective against cisplatin-induced nephrotoxicity, testicular toxicity, oxidative stress, and genotoxicity (29-32), its protective effect against ototoxicity remains unclear. Considering the antioxidant effect of melatonin, in this study, we examined its ability to protect against the ototoxicity in rats treated with a single dose of cisplatin. To our knowledge, this is the first assessment of the protective effect of melatonin alone, by systemic administration, against cisplatin-induced ototoxicity.

## Materials and Methods

**Animals and study groups.** Female Wistar rats (3 months old) obtained from the University of Goiás were used in this study. The rats were maintained in the biotery, during the experimental phase under a controlled room temperature of  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  with a 12-h light/dark cycle, were fed a balanced diet and provided water *ad libitum*. All experiments were performed according to the protocol approved by the Ethics Committee on Animal Use on 02/24/2015 (UnBDOc no. 7117/2015).

Before collecting the data, all the animals underwent otoscopy to verify the presence of external and middle ear disorders. Only animals confirmed to have no alterations in the exam were included in the study. These rats were then randomly divided into four groups: control saline (n=5), control melatonin (n=5), cisplatin+saline (n=12), and cisplatin+melatonin (n=10). The saline and melatonin (1 mg/kg) solutions were administered daily, whereas the cisplatin solution (10 mg/kg) was administered only on the fourth day (D4). All solutions were injected intraperitoneally.

**Ototoxicity evaluation.** Distortion-product otoacoustic emissions (DPOAE) measurements were carried out for each group on day 1 (D1, *i.e.*, the day of administration) and day 8 (D8) of the trial. Prior to the assessment, the rats were anesthetized (30 mg/kg of ketamine hydrochloride and 7 mg/kg of xylazine) and placed in a soundproof box allocated in a silent room.

DPOAEs were assessed with an ILO292 II (Otodynamics Ltd, Hatfield, UK). An infant hearing-screening probe was attached to the external auditory canal. The stimulus consisted of two pure tones (F1 and F2; F1/F2 ratio=1.22) at 70 dB SPL. In total, a thousand acquisitions were analyzed. The resulting otoacoustic emissions were evaluated at 2.8, 4, 6 and 8 kHz. After data collection, all animals were euthanized with CO<sub>2</sub> under anesthesia after conclusion of the experiments.

**Statistical analysis.** The normality of variables was analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test, and the variance homogeneity was analyzed by the Bartlett test. Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc test was used to compare non-parametric samples of each group on D1 and D8. The Wilcoxon test was used to compare two dependent non-normal samples to pinpoint the significant differences between D1 and D8. The paired *t*-test (two-tailed) was used to compare two dependent normal samples to pinpoint the significant differences between D1 and D8. The Prism® Software Package program (GraphPad, USA, 2005) was used for statistical analyses and for graphical representations; values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

There were no differences in DPOAE amplitudes evaluated on day 1 among the four groups, for all frequencies (Kruskal-Wallis/Dunn method; 2.8 kHz,  $p=0.194$ ; 4.0 kHz,  $p=0.212$ ; 6.0 kHz,  $p=0.114$ ; 8.0 kHz,  $p=0.414$ ). In addition, at the second evaluation (D8), the DPOAE amplitude values were lower in the cisplatin+saline treatment group compared to that of the saline group at all frequencies (Kruskal-Wallis/Dunn method; 2.8 kHz,  $p=0.011$ ; 4.0 kHz,  $p=0.049$ ; 6.0 kHz,  $p=0.047$ ; 8.0 kHz,  $p=0.030$ ). However, the DPOAE

Table I. Distortion-product otoacoustic emissions (DPOAE, dB SPL) evaluated on the first (D1) and eighth (D8) days in all groups studied.

Evoked frequencies (→)	2.8 kHz		4.0 kHz		6.0 kHz		8.0 kHz	
	D1	D8	D1	D8	D1	D8	D1	D8
Saline	11.9	11.7	22.8	23.7	35.5	32.8	33.1	33.2
Melatonin	11.3	11.0	20.1	19.8	31.2	32.0	30.9	32.8
Cisplatin+saline	11.8	8.1*	22.8	16.8*	33.8	25.6*	33.1	28.6*
Cisplatin+melatonin	11.4	11.7	20.0	20.4	31.9	29.5	33.8	29.3

Data are expressed as median values. \*Values that significantly differ ( $p < 0.05$ ) from those of the saline group.

amplitude values did not differ between the saline and melatonin or cisplatin+melatonin groups (Table I).

In the pairwise analyses, the means±SD of DPOAE did not differ between D1 and D8 in either the saline (2.8 kHz  $p=0.600$ ; 4.0 kHz  $p=0.528$ ; 6.0 kHz  $p=0.132$ ; 8 kHz  $p=0.688$ ) or melatonin (2.8 kHz  $p=0.990$ ; 4.0 kHz  $p=0.825$ ; 6.0 kHz  $p=0.260$ ; 8 kHz  $p=0.240$ ) groups in all frequencies tested (Figure 1).

Moreover, there were no differences in DPOAE amplitudes obtained on D1 and D8 of treatment at 2.8, 4.0, 6.0 and 8.0 kHz in the cisplatin+melatonin group (2.8 kHz  $p=0.495$ ; 4.0 kHz  $p=0.292$ ; 6.0 kHz  $p=0.223$ ; 8 kHz  $p=0.087$ ) (Figure 1).

However, in the cisplatin+saline group, the DPOAE amplitudes were significantly higher on day 1 than on day 8, for all frequencies (2.8 kHz  $p=0.009$ ; 4.0 kHz  $p=0.006$ ; 6.0 kHz  $p=0.003$ ; 8 kHz  $p=0.010$ ) (Figure 1).

## Discussion

The prevention of cisplatin side-effects remains a major clinical problem to improve, affection the therapeutic efficacy and quality of life of cancer patients under treatment. In particular, cisplatin-induced ototoxicity is the key side-effect contributing to chemotherapy dose reduction that can compromise the effectiveness of the treatment.

Herein, we confirmed that a single dose of cisplatin (10 mg/kg) to rats decreased the DPOAE amplitudes; however, early and concomitant treatment with melatonin resulted in comparable DPOAE amplitudes to those of the control groups (saline and melatonin alone) at all frequencies, demonstrating its ability to protect against cisplatin-induced ototoxicity.

Other antioxidant agents administered in combination with cisplatin have been also suggested; however, none of these agents has become part of routine clinical use owing to the time required to carry out careful safety evaluations of any drug that is deemed to be potentially useful in reducing chemotherapy-related side-effects. First, it is essential to assess the candidate drug's toxicity and analyze its effects on cancer treatment. Second, the effects of the drug on tumor remission and patient survival must be carefully tested.

Melatonin has already been widely tested in different animal species over a wide range of doses from physiological to high pharmacologic concentrations to determine its potential toxicity, and no major unfavorable effects have been reported, even at high doses. In general, the doses of melatonin administered *in vivo* reach up to 100 mg/kg body weight in rats (33) and 250 mg/kg body weight in mice (34). Even when administered at massive doses (up to 200 mg/kg body weight) during pregnancy, melatonin did not induce significant embryo/fetal toxicity (35). Consistently, we did not observe any side effects of the use of melatonin at the proposed dose in the present study.

In a study of advance non-small cell lung cancer, patients treated with melatonin had better health-related quality of life scores. A great amount of DNA damage marker was observed in the placebo-treated group, implying the protective effect of melatonin in healthy cells. However, melatonin in combination with chemotherapy did not affect survival and adverse events, maybe because the study has a limited sample size and a population with potentially poor prognosis (36). Furthermore, melatonin co-treatment may be an effective strategy for patients with drug-resistant colorectal cancer (37).

A meta-analysis published in 2005 demonstrated consistent improvement in the 1-year survival rate with melatonin adjunct therapy in a variety of patients with advanced-stage cancers, with low numbers of serious adverse events and low cost (38). In 2012, Wang *et al.* (39) published an updated meta-analysis of randomized controlled trials that evaluated the efficacy and safety of melatonin used concurrently with chemotherapy or radiotherapy for solid tumors. In most of the included studies, melatonin therapy led to higher tumor remission; better 1-year survival, and less radiochemotherapy-related side effects such as thrombocytopenia, neurotoxicity, and fatigue.

Our favorable results demonstrating the prevention of cisplatin-induced ototoxicity with melatonin administration, along with its established safety during treatment and beneficial effect on prognosis, collectively suggest that melatonin may be an excellent option for the prevention of ototoxicity under

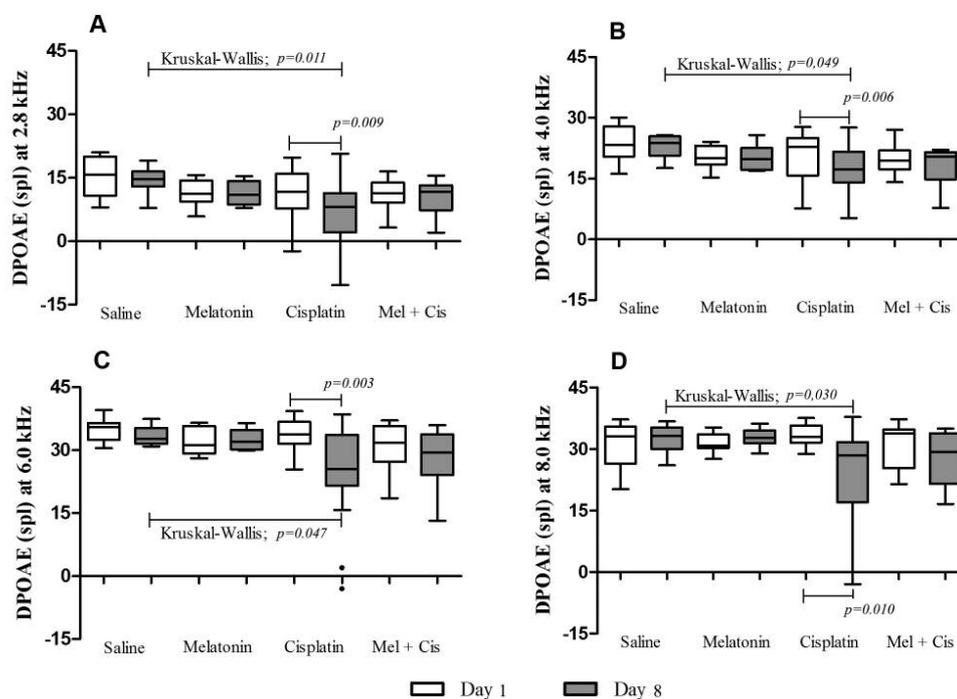


Figure 1. Distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) amplitudes on day 1 (D1) and day 8 (D8).

cisplatin-based regimes. Although the precise mechanism of these beneficial effects requires further study, it is likely related to the antioxidant activities of melatonin. It is well known that cisplatin imposes severe oxidative stress to the renal tissue, and melatonin has been suggested to protect against this oxidative damage (40, 41) potentially *via* its radical scavenging activity, glutathione peroxidase-activating property, and regulatory activity of renal function (21, 31, 42). Moreover, Kilic *et al.* (43) suggested that melatonin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity possibly by modulating Nrf2/HO-1 signaling.

The reproductive system is particularly vulnerable to chemotherapy, as many drugs can cause infertility, changes in organ structure or function, as well as sexual hormones dysfunction (44). Melatonin has cytoprotective effects on the reproductive system (45). In addition to the free radicals scavenging and antioxidant enzymes modulation, melatonin ameliorates reproductive injury through modulating sexual hormones (45). In particular, combined treatment with melatonin has been shown to greatly prevent the marked impairment of testicular function caused by cisplatin in rats (32). In addition, melatonin could significantly improve the

decrease in body and testicular weight; epididymal sperm count, motility, and morphology; glutathione peroxidase activity; and glutathione levels in rats under cisplatin treatment (29).

Furthermore, melatonin has been reported to show a protective effect against gentamicin and tobramycin-induced ototoxicity, which did not interfere with the antibiotic capacity of these antibiotics (46, 47).

In the present study, 10 mg/kg cisplatin clearly triggered ototoxicity, as determined by the decrease in DPOAE amplitudes measured at different frequencies, which was prevented by co-administration with melatonin. In addition, administration of melatonin alone did not affect the DPOAE amplitudes measurements of the animals, confirming its safety.

Although the protective effect of melatonin against cisplatin-induced ototoxicity in rats was detected at all frequencies studied, the effect was more evident at the lower frequencies of 2.8, 4, and 6 kHz than that observed at 8 kHz, although the effect was still statistically significant. This may be due to the stronger ototoxic effect that is classically described at higher frequencies. Thus, it is possible that

increasing the melatonin dose could help to maximize its effect, particularly at higher frequencies.

Our results point to the applicability of melatonin as an adjuvant in carcinoma treatment, since it may decrease the ototoxicity caused by cisplatin. In addition, our results should motivate further research to identify the cochlear structural changes caused by cisplatin and its possible reversal with different doses of melatonin. The use of melatonin as an adjuvant in humans to avoid undesirable side-effects of cisplatin is an important goal for the future.

### Conflicts of Interest

There are no conflicts of interest to declare regarding this study.

### Authors' Contributions

Juliana Gusmão de Araujo, Lucieny Silva Martins Serra, Selma Aparecida Souza Kuckelhaus and André Luiz Lopes Sampaio conceived and planned the experiments. Juliana Gusmão de Araujo, Lucieny Silva Martins Serra and Lucas Lauand carried out the experiments for acquisition of data. Juliana Gusmão de Araujo, Lucieny Silva Martins Serra, Selma Aparecida Souza Kuckelhaus, Lucas Lauand and André Luiz Lopes Sampaio contributed to sample preparation. Juliana Gusmão de Araujo and Selma Aparecida Souza Kuckelhaus carried out the statistical analysis. Juliana Gusmão de Araujo, Lucieny Silva Martins Serra, Selma Aparecida Souza Kuckelhaus and André Luiz Lopes Sampaio contributed to the interpretation of the results. Juliana Gusmão de Araujo took the lead in writing the manuscript. All Authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript. All Authors approved the article.

### References

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J and Jemal A: Global Cancer Statistics, 2012. *CA a Cancer J Clin* 65: 87-108, 2015. PMID: 25651787. DOI: 10.3322/caac.21262
- Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE and Mansour VH: Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222: 385-386, 1969. PMID: 5782119. DOI: 10.1038/222385a0
- Vijayalaxmi, Thomas CR, Reiter RJ and Herman TS: Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 20: 2575-2601, 2002. PMID: 12011138. DOI: 10.1200/JCO.2002.11.004
- Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S and Ramkumar V: Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med* 219: 177-186, 2009. PMID: 19851045. DOI: 0.1620/tjem.219.177
- Callejo A, Sedó-Cabezón L, Juan I and Llorens J: Cisplatin-induced ototoxicity: effects, mechanisms and protection strategies. *Toxics* 3: 268-293, 2015. PMID: 29051464. DOI: 10.3390/toxics3030268
- Ekborn A: Cisplatin-induced ototoxicity. Pharmacokinetics, prediction and prevention, Stockholm, Sweden, 2003. Available from: <https://openarchive.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/38208/thesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mukherjea D and Rybak LP: Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity. *Pharmacogenomics* 12: 1039-1050, 2011. PMID: 21787192. DOI: 10.2217/pgs.11.48
- McKeage MJ: Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. *Drug Saf* 13: 228-244, 1995. PMID: 8573296. DOI: 10.2165/00002018-199513040-00003
- Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C and Pérez JM: Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 7: 3-18, 2007. PMID: 17266502. DOI: 10.2174/187152007779314044
- Choudhury RC, Jagdale MB and Misra S: Cytogenetic toxicity of cisplatin in bone marrow cells of Swiss mice. *J Chemother* 12: 173-182, 2000. PMID: 10789558. DOI: 10.1179/joc.2000.12.2.173
- Rybak LP: Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 15: 364-369, 2007. PMID: 17823555. DOI: 10.1097/MOO.0b013e3282ee452
- Araujo JG De, Luiz A, Sampaio L, Venosa AR and Oliveira CACP: The potential use of melatonin for preventing cisplatin ototoxicity: an insight for a clinical approach. *Adv Otolaryngol* 2014: 1-7, 2014. DOI: 10.1155/2014/18561.
- Tabuchi K, Nishimura B, Nakamagoe M, Hayashi K, Nakayama M and Hara A: Ototoxicity: Mechanisms of cochlear impairment and its prevention. *Curr Med Chem* 18: 4866-4871, 2011. PMID: 21919841. DOI: 10.2174/092986711797535254
- Li Y, Womer RB and Silber JH: Predicting cisplatin ototoxicity in children: The influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer* 40: 2445-2451, 2004. PMID: 15519518. DOI: 10.1016/j.ejca.2003.08.009
- Choi SJ, Kim SW, Lee JB, Lim HJ, Kim YJ, Tian C, So HS, Park R and Choung YH: Gingko biloba extracts protect auditory hair cells from cisplatin-induced ototoxicity by inhibiting perturbation of gap junctional intercellular communication. *Neuroscience* 244: 49-61, 2013. PMID: 23583760. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.001
- Reddel RR, Kefford RF, Grant JM, Coates AS, Fox RM and Tattersall MH: Ototoxicity in patients receiving cisplatin: importance of dose and method of drug administration. *Cancer Treat Rep* 66: 19-23, 1982. PMID: 7198012.
- Madasu R, Ruckenstein MJ, Leake F, Steere E and Robbins KT: Ototoxic effects of supradose cisplatin with sodium thiosulfate neutralization in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123: 978-981, 1997. PMID: 93055250. DOI: 10.1001/archotol.1997.01900090094014
- Sluyter S, Klis SF, de Groot JC and Smoorenburg GF: Alterations in the stria vascularis in relation to cisplatin ototoxicity and recovery. *Hear Res* 185: 49-56, 2003. PMID: 14599692. DOI: 10.1016/S0378-5955(03)00260-0
- Van Ruijven MW, de Groot JC, Klis SF and Smoorenburg GF: The cochlear targets of cisplatin: An electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hear Res* 205: 241-248, 2005. PMID: 15953532. DOI: 10.1016/j.heares.2005.03.023
- Ravi R, Somani SM and Rybak LP: Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol* 76: 386-394, 1995. PMID: 7479581. DOI: 10.1111/j.1600-0773.1995.tb00167.x
- Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D and Ramkumar V: Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 226: 157-167, 2007. PMID: 17113254. DOI: 10.1016/j.heares.2006.09.015
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ and Koppisepi S: Medical implications of melatonin: receptor-

- mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci* 52: 11-28, 2007. PMID: 18217386.
- 23 Galano A, Tan DX and Reiter RJ: Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 51: 1-16, 2011. PMID: 21752095. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x
- 24 Reiter RJ: Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 79: C153-C158, 1991. PMID: 1936532. DOI: 10.1016/0303-7207(91)90087-9
- 25 Reiter RJ, Tan DX and Fuentes-Broto L: Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 181: 127-151, 2010. PMID: 20478436. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)81008-4
- 26 Lissoni P, Barni S, Mandalà M, Ardizzioia A, Paolorossi F, Vaghi M, Longarini R, Malugani F and Tancini G: Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer* 35: 1688-1692, 1999. PMID: 10674014. DOI: 10.1016/S0959-8049(99)00159-8
- 27 Gonzalez A, del Castillo-Vaquero A, Miro-Moran A, Tapia JA and Salido GM: Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology. *J Pineal Res* 50: 250-260, 2011. PMID: 21118301. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2010.00834.x
- 28 Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T and Mao L: Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther* 8: 337-346, 2009. PMID: 20050373. DOI: 10.1177/1534735409353332
- 29 Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Otunctemur A, Cekmen M and Somay A: Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertil Steril* 92: 1124-1132, 2009. PMID: 18829000. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1758
- 30 Surendran D, Geetha CS and Mohanan PV: Amelioration of melatonin on oxidative stress and genotoxic effects induced by cisplatin *in vitro*. *Toxicol Mech Methods* 22: 631-637, 2012. PMID: 22889322. DOI: 10.3109/15376516.2012.714009
- 31 Sener G, Satiroglu H, Kabasakal L, Arbak S, Oner S, Ercan F and Keyer-Uysa M: The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 14: 553-560, 2000. PMID: 11206705. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2000.tb00440.x
- 32 Ateşşahin A, Şanna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A and Bulmuş O: Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 41: 21-27, 2006. PMID: 16842537. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2006.00327.x
- 33 Kaya H, Delibas N, Serteser M, Ulukaya E and Ozkaya O: The Effect of Melatonin on Lipid Peroxidation during Radiotherapy in Female Rats. *Strahlentherapie Und Onkol* 175: 285-288, 1999. PMID: 10392170. DOI: 10.1007/BF02743581
- 34 Vijayalaxmi, Meltz ML, Reiter RJ, Herman TS and Kumar SK: Melatonin and protection from whole-body irradiation: survival studies in mice. *Fundam Mol Mech Mutagen* 425: 21-27, 1999. PMID: 10082903. DOI: 10.1016/S0027-5107(98)00246-2
- 35 Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G and Price C: Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 50: 271-279, 1999. PMID: 10478864. DOI: 10.1093/toxsci/50.2.271
- 36 Sookprasert A, Johns NP, Phunmanee A, Pongthai P, Cheawchanwattana A, Johns J, Konsil J, Plaimee P, Porasuphatana S and Jitpimolmard S: Melatonin in patients with cancer receiving chemotherapy: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Anticancer Res* 34: 7327-7338, 2014. PMID: 25503168.
- 37 Lee JH, Yoon YM, Han YS, Yun CW and Lee SH: Melatonin promotes apoptosis of oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells through inhibition of cellular prion protein. *Anticancer Res* 38: 1993-2000, 2018. PMID: 29599315. DOI: 10.21873/anticancer.12437
- 38 Mills E, Wu P, Seely D and Guyatt G: Melatonin in the treatment of cancer: A systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res* 39: 360-366, 2005. PMID: 16207291. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2005.00258.x.
- 39 Wang YM, Jin BZ, Ai F, Duan CH, Lu YZ, Dong TF and Fu QL: The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol* 69: 1213-1220, 2012. PMID: 22271210. DOI: 10.1007/s00280-012-1828-8
- 40 Hara M, Yoshida M, Nishijima H, Yokosuka M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R and Shimada A: Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 30: 129-138, 2001. PMID: 11316323. DOI: 10.1034/j.1600-079X.2001.300301.x
- 41 Parlakpinar H, Sahna E, Ozer MK, Ozugurlu F, Vardi N and Acet A: Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury. *J Pineal Res* 33: 161-166, 2002. PMID: 12220331. DOI: 10.1034/j.1600-079X.2002.02910.x
- 42 Mercantepe F, Mercantepe T, Topcu A, Yılmaz A and Tunkaya L: Protective effects of amifostine, curcumin, and melatonin against cisplatin-induced acute kidney injury. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 391: 915-931, 2018. PMID: 29860655. DOI: 10.1007/s00210-018-1514-4
- 43 Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Ozercan IH, Yilmaz O, Sahin F and Sahin K: Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab (Lond)* 10: 1-8, 2013. PMID: 23311701. DOI: 10.1186/1743-7075-10-7
- 44 Tsuyoshi H, Orisaka M, Fukuda S, Hattori K, Tsang BK and Yoshida Y: Protective effect of diogenosin on chemotherapy-induced reduced fertility in female rats. *Steroids* 93: 1-7, 2015. PMID: 25449767. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.10.010
- 45 Haghi-Aminjan H, Asghari MH, Farhood B, Rahimifard M, Hashemi Goradel N and Abdollahi M: The role of melatonin on chemotherapy-induced reproductive toxicity. *J Pharm Pharmacol* 70: 291-306, 2018. PMID: 29168173. DOI: 10.1111/jphp.12855
- 46 Ye LF, TAO ZZ, HUA QQ, Xiao BK, Zhou XH, Li J and Yuan YL: Protective effect of melatonin against gentamicin ototoxicity. *J Laryngol Otol* 123: 598-602, 2009. PMID: 18957160. DOI: 10.1017/S002221510800385X
- 47 Lopez-Gonzalez M a, Guerrero JM, Torronteras R, Osuna C and Delgado F: Ototoxicity caused by aminoglycosides is ameliorated by melatonin without interfering with the antibiotic capacity of the drugs. *J Pineal Res* 28: 26-33, 2000. PMID: 10626598. DOI: 10.1034/j.1600-079X.2000.280104.x

Received February 24, 2019

Revised April 7, 2019

Accepted April 8, 2019