

Efeitos das variações de polaridades nos potenciais evocados auditivos de ratos durante o desenvolvimento

Effects of stimulus polarity on the auditory evoked potentials of the rats during development

Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos¹, Luiz Marcellino de Oliveira^{2†}, Renata Alessandra Evangelista³, José Fernando Colafêmina^{4*}

RESUMO

Foram estudados os efeitos dos estímulos de polaridades (condensação (+), rarefação (-) e alternados) nos potenciais evocados auditivos (BERA) de ratos durante o período de lactação e pós-lactação com o objetivo de detectar possíveis alterações eletrofisiológicas durante o período crítico de desenvolvimento do sistema auditivo do rato. Os dados observados mostram que há um aumento das latências das ondas em decorrência da faixa etária em todos os grupos, sugerindo um desenvolvimento progressivo da cito-arquitetura tonotópica normal das vias e integrações sinápticas auditivas centrais e periféricas. Conclui-se que as respostas de curtas latências produzidas pelos “clicks” positivos, negativos e alternados em todos os grupos utilizados não produziram diferenças significativas sobre o BERA de ratos em crescimento e desenvolvimento normal.

PALAVRAS-CHAVE: Potenciais evocados auditivos de tronco cerebral (BERA); Polaridade; Sistema auditivo, Lactação e Pós-lactação; Idade; Ratos.

¹Presente endereço: Departamento de Neuropsiquiatria. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE. Setor de Microscopia Eletrônica.

²Departamento de Psicologia e Educação da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Laboratório de Nutrição e Comportamento.

³Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP.

⁴Professor Cirurgião do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Hospital das Clínicas - 12^o andar - Av. dos Bandeirantes, 3.900, Monte Alegre - 14.049-901 - Ribeirão Preto/SP. *Autor Correspondente.

† Este artigo é dedicado a memória do Professor Doutor **Luiz Marcellino de Oliveira**, acima de tudo um grande amigo que nos deixou repentinamente em 8 de maio deste ano.

ABSTRACT

Were studied the effects of stimulus polarity (condensation, rarefaction, or alternating-polarity clicks) on the brainstem auditory evoked potentials (BAEPs) in the period of lactation and post-lactation with objective of detect possible electrophysiological changes during of the critical period of development of the auditory system of young rats. The results showed an increase in latency of waves due to age in all groups, suggesting a progressive development of normal tonotopic architecture of the central and peripheral auditory nervous system. Concluded that the responses of short latencies produced by "clicks" positive, negative and alternating in all groups used do not produce significant differences on the BAEPs of the rats with normal growth and development.

KEYWORDS: Brainstem Auditory Evoked Potentials (BAEPs); Polarity; Auditory system; Lactation and Post-lactation; Age; Rats.

INTRODUÇÃO

O sentido da audição é essencial na vida humana. Juntas, a audição e a fala constituem os meios de comunicação mais importantes entre as pessoas, formando a base das interações sociais complexas. Não é de estranhar, pois, que a perda da audição possa produzir sérios distúrbios do comportamento (Schmidt, R.F. 1980).

Os Potenciais Evocados (PEs) são respostas elétricas do sistema nervoso em decorrência de uma estimulação motora ou sensorial, importante na clínica otoneurológica, e pode envolver o sistema visual, auditivo e somato-sensorial. Consistem em seqüências de ondas com padrões específicos de latências, amplitudes e polaridade. Os estudos em ratos dos Potenciais Evocados Auditivos (PEAs), produzidos geralmente estímulos acústicos de curtas latências (10 msec), podem ser úteis para analisar a sincronização neural das vias auditivas centrais e periféricas nos grupos de neurônios do nervo auditivo (onda I), núcleos cocleares (onda II), complexo olivar superior (onda III) e colículo inferior (onda IV) e suas integrações sinápticas (Shaw, N.A. 1988). Dentre os diagnósticos e avaliações do sistema nervoso em humanos, os potenciais evocados são relevantes e excelentes indicadores na monitorização cirúrgica, no coma, tumores e lesões, desordens tóxicas e metabólicas, acidente vascular

cerebral (AVC), infecções, perda e diminuição da audição, enxaqueca, esclerose múltipla entre outros sinais e sintomas clínicos (Chiappa, 1997).

Em 1988, N.A. Shaw em Auckland/NZ, também demonstrou no rato a capacidade de vários fatores alterarem os padrões dos PEAs, entre eles: Os efeitos das drogas, a temperatura, atividades epiléticas, o sono, o etanol, a idade e envelhecimento, os modelos experimentais de doenças otoneurológicas, bem como o papel da mielinização e a influência severa da desnutrição, já que a maturação do SNC do rato é pós-natal ele é considerado um modelo experimental ideal para demonstrar as alterações no formato das ondas e diminuição das latências na resposta auditiva do tronco cerebral como avaliação neurofisiológica do sistema nervoso.

Fatores bem definidos podem modificar os valores das latências, amplitudes e a morfologia, devidos a taxa de estimulação positiva ou negativa, filtros, intensidades e o local de colocação do eletrodo de referência (Shaw, N.A. 1988; Chiappa, 1997).

Variações de fase influenciando os BAEPs são conhecidas desde as pesquisas de Kiang et al., 1965; Gobllick; Pfeiffer, 1969, Salomon; Elberling, 1971; Coste, R.L; Pflingst, B.E. 1996, demonstrando que os estímulos de rarefação (negativos) causam picos de ondas precoces modificando a carac-

terística da forma da onda, como também foram encontrados valores de latências menores para ondas I (Kevanishvili; Aphonchenko, 1981), bem como para ondas I e V (Ornitz; Walter, 1975). Sand; Sulg (1984) demonstraram que são devidos a picos precoces que aparecem como ondas cortadas após estímulo de condensação. Estímulos de polaridades alternadas são utilizados para evitar problemas com as estimulações e anular os potenciais microfônicos cocleares, evidenciando com maior nitidez a onda I (Tackmann; Vogel, 1987).

Estímulos de polaridade alternadas podem evidenciar um grande número de patologias não observadas nas outras polaridades (Tackmann; Vogel, 1987).

As pesquisas atuais são de grande relevância para a prevenção de danos e melhor compreensão do sistema nervoso central, já que o sistema auditivo está envolvido com funções complexas bem diversificadas, importantes para o ser humano (Chiappa, 1997). Os trabalhos envolvendo os potenciais evocados auditivos do tronco cerebral e de acordo com as referências aqui citadas, investigou-se a avaliação eletrofisiológica dos efeitos das variações de polaridades de condensação (+), rarefação (-) e alternadas sobre as latências das ondas I, II, III, IV em ratos da linhagem Wistar no período de lactação entre 14 e 18 dias e pós-lactação de 22, 32 e 42 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 100 filhotes de rato da linhagem Wistar - Lactação-Grupo 1 (14 dias de idade-n=20), Grupo 2 (18 dias-n=20) - Pós-lactação-Grupo 3 (22 dias-n=20), Grupo 4 (32 dias-n=20) e Grupo 5 (42 dias-n=20). No dia do nascimento os filhotes foram retirados ao acaso e colocados com uma rata mãe em uma gaiola de lactação, reduzindo assim possíveis interferências genéticas na formação dos grupos experimentais.

Foram utilizadas gaiolas de acrílico (40 x 30 x 20cm), com túnel para adaptação do comedouro

de aço inoxidável e água em bebedouro de plástico, piso coberto por serragem e tampa de aço inoxidável.

Foi utilizado um microcomputador da ATI NAUTILUS[®] computadorizado e 3 eletrodos em 2 canais para o registro dos PEAs do tronco cerebral, nas estimulações sonora foram utilizados alto-falantes ipsi e contralateralmente, do tipo TDH-39. Foram avaliados os potenciais com taxa de estimulação de 10 pps, utilizando-se polaridades positiva (condensação), negativa (rarefação) e alternada.

No período de lactação e pós-lactação todos os animais receberam dieta isocalórica. e água *ad libitum*.

Os animais foram avaliados eletrofisiologicamente pelo BAEPs no período de lactação entre 14 e 18 dias de idade, enquanto na fase de pós-lactação esta avaliação foi realizada em grupos independentes nos dias 22, 32 e 42 de idade. Cada animal foi previamente anestesiado com injeção intra-peritoneal (ip) e/ou sub-cutânea (sc) de pentobarbital (Nembutal), utilizando a dosagem de 30 mg/kg de peso corporal.

Os registros dos PEAs foram realizados numa sala isolada elétrica e acusticamente. Os pêlos da região do vértex do crânio e das orelhas foram raspados e a região limpada para melhor contato dos eletrodos e diminuição da oleosidade.

Os eletrodos para registro dos PEAs foram dispostos na região do vértex do crânio (Cz) positivo, pavilhão auditivo esquerdo (A1) e pavilhão auditivo direito (Fpz).

As estimulações sonoras foram realizadas com "clicks" de condensação, rarefação e alternados com 0,1 ms de duração, taxa de frequência de 10 pps e com intensidades decrescentes de 80, 70 e 60 dB. Taxa de estimulação de com cercade 200 promediações. As curvas do PEAs foram captados e analisados pelo sistema computadorizado, que forneceu através de suas promediações os registros das latências e amplitudes das ondas I, II, III e IV. As amplitudes não foram incluídas.

RESULTADOS

No grupo de ratos de 14 dias de idade os dados demonstraram que não houve diferenças significativas nas latências das ondas de I a IV, o mesmo tendo ocorrido no grupo de ratos com 18 dias de idade, bem como no grupo pós-lactação de 22 dias de idade. **Figura 1.**

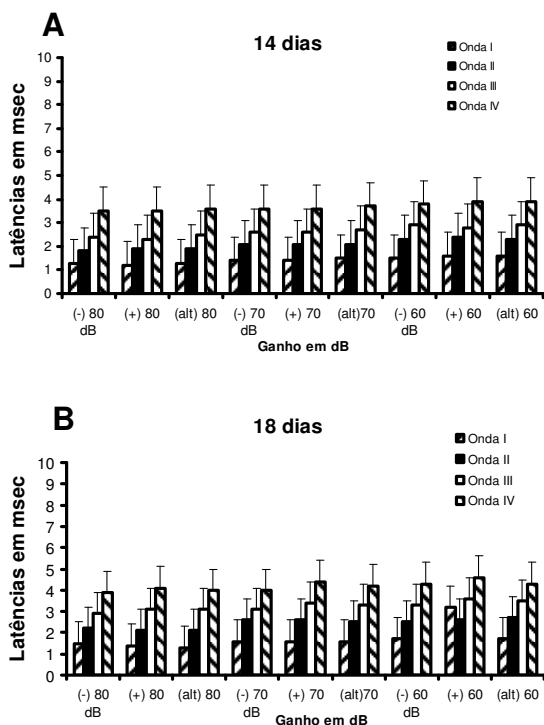


Figura 1. Efeitos dos clicks positivos, negativos e alternados na resposta auditiva do tronco cerebral de ratos durante a lactação com 14 (A) e 18 (B) dias de idade. Os estímulos foram apresentados em ordem decrescente de intensidades de 80, 70 e 60 dB. A promediação dos estímulos acústicos de curtas latências (10 msec) avaliaram a trajetória das ondas I, II, III, IV e suas integrações sinápticas (Média ± DP – ANOVA, $p \leq 0,001$).

Nos grupos de ratos de 22, 32 e 42 dias a única alteração perceptível não significativa foi o igual aumento das latências com estímulos empregados nas três polaridades em todas as intensidades, entre os grupos, nos estímulos das ondas II e III (respectivamente nos núcleos cocleares e no complexo olivar superior). **Figura 2.** Não foram observadas diferenças significativas das ondas de la

IV, quando são comparados os animais de 14 (grupo 1); 18 (grupo 2) e 22 (grupo 3) dias de idade. **Figuras 1 e 2.**

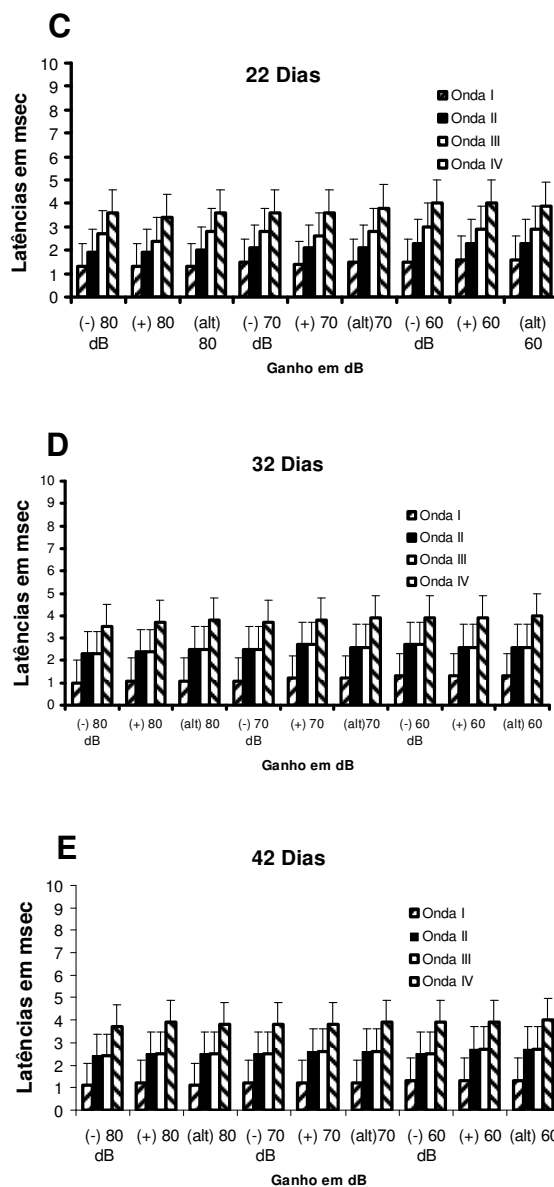


Figura 2. Efeitos dos clicks positivos, negativos e alternados na resposta auditiva do tronco cerebral de ratos durante a pós-lactação com 22 (C), 32 (D) e 42 (E) dias de idade. Os estímulos foram apresentados em ordem decrescente de intensidades de 80, 70 e 60 dB. A promediação dos estímulos acústicos de curtas latências (10 msec) avaliaram a trajetória das ondas I, II, III, IV e suas integrações sinápticas (Média ± DP - ANOVA, $p \leq 0,001$).

Na utilização dos clicks alternados ocorreram o desaparecimento do potencial microfônico e uma melhor nitidez da onda I, bem como um discreto aumento de latência das ondas não significativos nos testes estatísticos.

Os dados também mostram alterações visíveis morfométricas em todas as ondas nas diferentes faixas etárias e com as variações de polaridades em todos os grupos.

Foram comparados os cinco níveis de idade (14,18,22,32 e 42) para todas as variáveis (80, 70 e 60 dB), em todas as ondas (I, II, III e IV). Foi utilizado o conceito de grupos homogêneos, ou seja, se duas idades distintas não se encontram em nenhum grupo ao mesmo tempo, elas são significativamente diferentes. Os dados também foram analisados pela média \pm sd, e análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Kruskal-Wallis. Diferenças não foram consideradas significantes quando $P \leq 0,001$.

DISCUSSÃO

Foi mostrado com eficácia a capacidade dos clicks positivos, e negativos aumentarem as latências das ondas em pacientes com esclerose múltipla (Tackmann; Vogel, 1987).

Pelo menos nos mamíferos o crescimento em espessura da membrana basilar não parece interferir com a representação tonotópica durante o desenvolvimento. No nascimento os fatores de desenvolvimento podem interferir com a organização tonotópica coclear como um todo (Geal-Dor et al., 1993; Romand, R. 1997), bem como a modificação ontogenética das frequências nos neurônios do núcleo olivar superior com o progresso da maturação (Sanes, 1989; Salas M, et al., 1994). São necessários vários meses para o desenvolvimento dos colículos superiores (Withington et al., 1990) e conseqüentemente a formação de mecanismos mais complexos chamados de computação neural (Knudsen et al., 1987).

Os dados mostram que, com o aumento da faixa etária dos ratos em todos os grupos tendem a aumentar os valores das latências das ondas em decorrência da idade (N.A. Shaw, 1988). Em neonatos os potenciais evocados auditivos

estabelecem valores de referência na avaliação auditiva e no prognóstico neurológico, bem como no diagnóstico de crianças com disfunção auditiva (Guilhoto et al., 2003).

A representação de frequências na função coclear e suas subseqüentes mudanças durante a ontogênese são responsáveis pelas modificações da cito-arquitetura do sistema auditivo central (Romand, 1997; Xu, J. 1997).

O desenvolvimento e integração do sistema nervoso central e periférico auditivo do rato neste período de vulnerabilidade neural é de grande importância, porque ele é um animal de hábitos noturnos com capacidade de comunicação ultrasônica desempenhando uma sensibilidade auditiva com um audiograma bem definido para a espécie (N.A. Shaw, 1988). Pode ocorrer um "aperfeiçoamento" da capacidade auditiva com a maturação do sistema nervoso, já que os processos de hiperplasia e hipertrofia e integrações sinápticas são de maiores intensidades no período pós-natal, influenciando assim as alterações nas latências e amplitudes das ondas com o aumento progressivo da faixa etária (Saintonge et al., 1986; Shaw, N.A. 1988; Polli-Lopes et al., 1999). Os mecanismos de desenvolvimento e regeneração das células ciliadas internas são bastante complexos, envolvendo desde íons até expressão gênica (Kros, 2007).

CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que conforme a polaridade (+, - e alternadas) os estímulos podem gerar deflexões na membrana do fone da orelha interna, que induzem a atividades elétricas nos transdutores cocleares, ocasionando respostas diferentes conforme o estímulo empregado. Para as respostas de curtas latências os clicks de condensação, rarefação e alternados nos grupos de animais utilizados produziram discretas diferenças não-significativas, nos potenciais evocados auditivos do tronco cerebral. É um procedimento não invasivo e indispensável no auxílio da avaliação otoneurológica, tanto nos modelos animais, bem como no

homem. Num futuro não tão distante o manuseio de células tronco na cóclea poderá nos trazer certos benefícios à saúde auditiva.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq pelo apoio financeiro. Vasconcelos, C.A.C. foi bolsista de aperfeiçoamento/CNPq no período de março de 1997 a abril de 1999 do Dr. Luiz Marcellino e expressa aqui o seu imenso pesar, respeito e gratidão por tudo que ele fez. Deixa saudades de familiares, parentes e amigos, porém sua memória viva estará sempre presente.

REFERÊNCIAS

1. Schmidt RF. *Fisiologia Sensorial*, EPU/Springer, 1980, 219-248, EDUSP, São Paulo.
2. Shaw NA. The auditory evoked potential in the rat - a review. *Prog Neurobiol* 1988, 31:19-45.
3. Chiappa KH. *Evoked Potentials in Clinical Medicine*. Lippincott-Raven Publishers 3 ed., 1997, 157-249.
4. Kiang NYS, Watanabe T, Thomas, EC, Clark LF. *Discharge Patterns of Single Fibers in the Cat's Auditory Nerve*. MIT Res., Monogr. N.35, 1965, Cambridge, MA: MIT Technology Press.
5. Gobllick TJ Jr, Pfeiffer RR. Time-domain measurements of cochlear nonlinearities using combination click stimuli. *J Acoust Soc Am* 1969, 46:924-38.
6. Salomon G, Elberling C. Cochlear nerve potentials recorded from the ear canal in man. *Acta Otolaryngol* 1971, 71:319-25.
7. Coste RL, Pfingst BE. Stimulus features affecting psychophysical detection thresholds for electrical stimulation of the cochlea. III. Pulse polarity. *J Acoust Soc Am*. 1996, 99:3099-108.
8. Kevanishvili Z, Aphonchenko V. Click polarity inversion effects upon the human brainstem auditory evoked potential. *Scand Audiol* 1981, 10:141-7.
9. Ornitz EM, Walter DO. The effect of sound pressure waveform on human brain stem auditory evoked responses. *Brain Res* 1975, 92:490-8.
10. Sand T, Sulg I. The influence of click phase and rate upon latencies and latency distributions of the normal brain-stem auditory evoked potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1984, 57:561-70.
11. Tackmann W, Vogel P. Brainstem auditory evoked potentials evoked by clicks of different polarity in multiple sclerosis patients. *Eur Neurol* 1987, 26:193-8.
12. Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H. Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hearing Res* 1993, 69:236-42.
13. Romand R. Modification of tonotopic representation in the auditory system during development. *Prog Neurobiol* 1997, 51:1-17.
14. Sanes DH, Merickel M, Rubel EW. Evidence for an alteration of the tonotopic map in the gerbil cochlea during development. *J Comp Neurol*. 1989, 279:436-44.
15. Salas M, Torrero C, Regalado M, Martínez-Gómez M, Pacheco P. Dendritic arbor alterations in the medial superior olivary neurons of neonatally underfed rats. *Acta Anat (Basel)* 1994, 151:180-7.
16. Withington-Wray DJ, Binns KE, Keating MJ. The developmental emergence of a map of auditory space in the superior colliculus of the guinea pig. *Brain Res Dev Brain Res* 1990, 51:225-36.
17. Knudsen EI, du Lac S, Esterly SD. Computational maps in the brain. *Annu Rev Neurosci* 1987, 10:41-65.
18. Xu J, Shepherd RK, Millard RE, Clark GM. Chronic electrical stimulation of the auditory nerve at high stimulus rates: a physiological and

histopathological study. *Hearing Res* 1997, 105: 1-29.

19. Polli-Lopes AC, Casaletti Rosa L, Belebani RO, Pereira RNR; Vasconcelos CAC, Moreira JE. Aspectos moleculares da transmissão sináptica. *Medicina, Ribeirão Preto* 1999, 32:167-188.

20. Saintonge J, Lavoie A, Lachapelle J, Côté R. Brain maturity in regard to the auditory brainstem

response in small-for-date neonates. *Brain Dev* 1986, 8:1-5.

21. Guilhoto LM, Quintal VS, da Costa MT. Brainstem auditory evoked response in normal term neonates. *Arq Neuropsiquiatr* 2003, 61:906-8.

22. Kros, CJ. How to build an inner hair cell: Challenges for regeneration. *Hearing Res* 2007, 227: 3-10.

