

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE TRONCO ENCEFÁLICO (PEATE) EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO RUÍDO¹

AUDITORY BRAINSTEM RESPONSE (ABR) IN WISTAR RATS EXPOSED TO NOISE

Samara Nicole Friske², Letícia Compagnon³, Kassandra Cristina Gaklik⁴, Maicon Machado Sulzbacher⁵, Marcos Soares⁶, Thiago Gomes Heck⁷

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida-UNIJUÍ

² Acadêmica de Medicina Veterinária da UNIJUÍ. Bolsista PIBITI-UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

³ Acadêmica de Fisioterapia da UNIJUÍ. Bolsista PIBITI-CNPQ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

⁴ Acadêmica de Biomedicina da UNIJUÍ. Bolsista PIBITI-UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

⁵ Doutorando em Farmacologia pela UFSM. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

⁶ Docente do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUÍ, Doutorando em Distúrbios da Comunicação Humana pela UFSM. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

⁷ Professor do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUÍ (PPGAIS). Docente do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF (Orientador)

INTRODUÇÃO

A exposição contínua a ruído em alta intensidade promove efeitos nocivos a saúde, como a Perda Auditiva Induzida pelo Ruído (PAIR), hipertensão arterial, aumento da tensão muscular, dificuldades do sono, transtornos neurológicos, problemas digestivos, transtornos comportamentais, cansaço, falta de atenção e concentração (SELIGMAN *et al.*, 2002). Estudos de Kujawa e Liberman (2009) demonstraram, em camundongos, que uma exposição de 2 horas ao ruído de 8-16 kHz, no nível de pressão sonora (NPS) de 100 dB levou a uma perda irreversível de cerca de 50 % de fitas sinápticas das células ciliadas externas, demonstrando que mesmo uma moderada frequência e um período curto de tempo de exposição ao ruído podem levar a danos auditivos.

O Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE) é um dos testes mais comuns usados para avaliar a função auditiva no tronco cerebral. Possibilita avaliar populações que não tenham capacidade de cooperar com o exame, como crianças que ainda não desenvolveram a fala, indivíduos com deficiência intelectual e animais (SANZ FERNÁNDEZ *et al.*, 2015).

Os estudos experimentais que utilizam o PEATE são importantes, pois em laboratório diminui-se as interferências nas variáveis e, assim, pode-se entender melhor os mecanismos e os resultados encontrados (SEELING, 2007). Nesse sentido roedores tem sido ótimos modelos na pesquisa auditiva (JAUMANN *et al.*, 2012).

Assim o objetivo deste trabalho é realizar um estudo piloto para pesquisar a perda auditiva pelo o teste PEATE, a partir de um modelo experimental com ratos.

Palavras-chave: Ruído; Ratos Wistar; Perda Auditiva.

Keywords: Noise; Wistar Rats; Hearing Loss.

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

METODOLOGIA

Animais: Para esse projeto foram utilizados 8 ratos *Wistar (Rattus Norvegicus Albinus)* machos, provenientes do biotério da Unijuí, os quais foram mantidas em condições ideais para animais de laboratório, em ciclo claro/escuro de 12h, temperatura controlada de 22 +/- 2 C°, recebendo água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ) com protocolo nº 058/15. Esses animais foram divididos em 2 grupos:

- Grupo Controle: 4 animais. Esse grupo não foi exposto a nenhuma intervenção.

- Grupo Ruído: 4 animais, que foram exposto aos ruído.

Exposição ao Ruído: Para exposição ao ruído os animais foram colocados em uma caixa e submetidos a ruído branco (*white noise*), de amplo espectro de frequência, com o pico de intensidade centralizada em 8000Hz, contínuo com nível de 124 dB Nível de Pressão Sonora (NPS), por 2 horas. O ruído branco foi produzido por um gerador de sinal de áudio (EP125, Insight®) e exposto em auto-falantes no centro da caixa. O nível de ruído foi medido com um decibelímetro (Decibelímetro digital TDEC100, Incoterm®) dentro da caixa no início, e após completar a exposição do ruído.

Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico: Após 6 horas da exposição ao ruído, dos animais do Grupo Ruído, foi realizado o teste PEATE em todos os animais dos dois grupos. Para o exame de PEATE os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg).

Foram inseridos eletrodos subcutâneos (tipo agulha) na região posterior da orelha (eletrodo ativo), no vertex (eletrodo referência) e orelha contralateral (eletrodo terra). Os estímulos sonoros foram cliques (*rise/fall time*, 2 ms; duração total, 2 ms; taxa de repetição, 21/s). As respostas foram filtradas (100-3000Hz), e reproduzidas pela média de 1000 amostras.

O estímulo de clique tem uma alta reprodutibilidade e estabilidade no formato das ondas, sendo um dos estímulos mais comuns. Em ratos, a avaliação auditiva com cliques, corresponde ao espectro de frequência de 8000-10000 Hz.

O PEATE do rato é composto de 4 componentes (P1 a P4) ocorrendo dentro de 6 ms do início do estímulo. Eles refletem a atividade neural do nervo auditivo (P1), do núcleo coclear (P2), complexo olivar superior (P3) e lemnisco lateral e/ou colículo inferior (P4). Os limiares auditivos são determinados pelo decréscimo da intensidade do som, a cada 5 dB, partindo de 100 dB até 0 dB. Em roedores, a onda P2 é mais larga e geralmente a última onda a desaparecer com o decréscimo do estímulo, por conta disso os limiares foram definidos como a menor intensidade capaz de detectar a onda P2. Assim, os dados do PEATE serão expressos em Limiares Auditivos (LA) e Diferença de Limiar Auditivo (DLA) que representa a diferença dos limiares entre os grupos (FETONI *et al.*, 2013). Portanto, o LA e DLA são os dois marcadores auditivos avaliados.

Posteriormente ao exame os animais foram eutanasiados por decaptação.

Análise Estatística: Foi realizada através do teste T *student* pareado, sendo considerado nível de significância de 5%. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão.

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo buscamos avaliar se o teste PEATE poderia detectar efeitos na perda auditiva de animais expostos ao ruído, e observamos na figura 1, como já descrito por Alvarado *et al.* (2012), que a onda mais evidente encontrada no PEATE de ratos foi a onda P2, próxima à 2 ms.

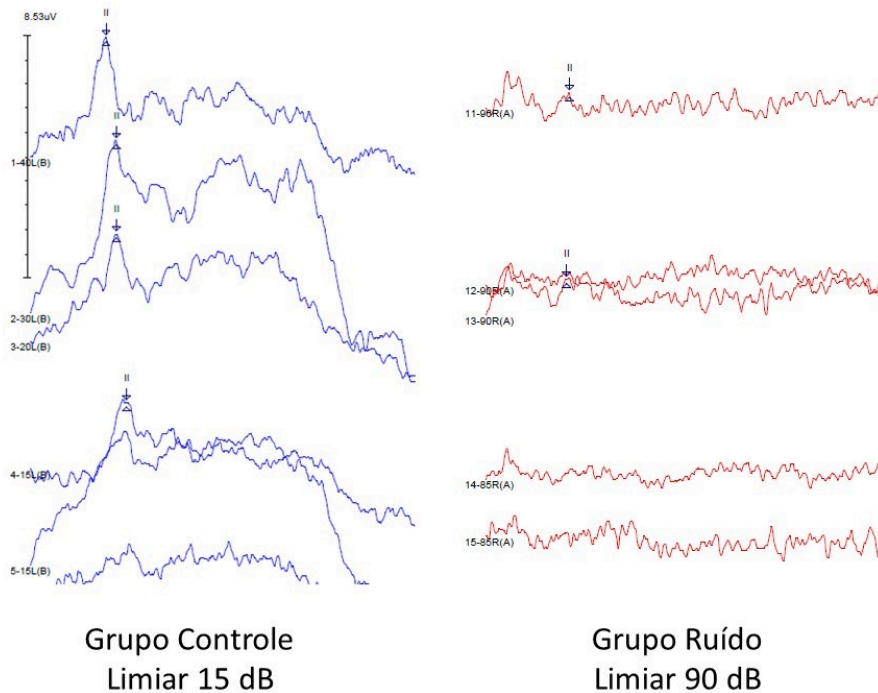


Figura 1 – Exemplo de PEATE demonstrando a detecção do limiar eletrofisiológico em ratos. Para o Grupo Controle o limiar eletrofisiológico foi de 15 dB NA e o do Grupo Ruído de 90 dB NA.

II : Onda P2.
 A : Onda P2.

Quando comparadas as médias de limiar auditivo, o Grupo Controle, teve a média de limiar auditivo de 35 Db Nível de Audição (NA), e no grupo Ruído foi de 87,5 dB NA. Assim a diferença de limiar auditivo foi de 52,5 dB NA entre os dois grupos ($p < 0,0001$).

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

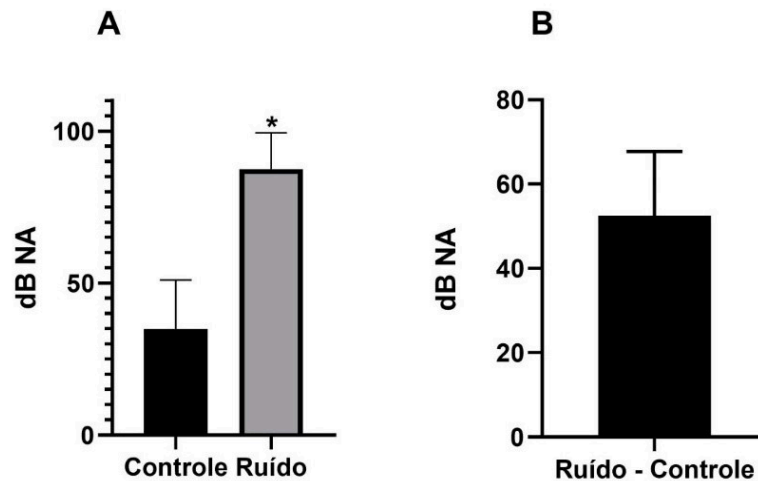


Figura 2 – Limiares eletrofisiológicos do PEATE 6 horas após exposição ao ruído e diferença de limiar entre os grupos. (A) médias dos limiares auditivos e o desvio padrão entre os grupos, mostrando diferença (* $p < 0,001$). (B) diferença de médias de limiar auditivo entre os grupos Ruído e Controle. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste T *student* pareado.

O PEATE pode ser utilizado em diferentes espécies de animais, como cães (PALUMBO *et al.*, 2014), macacos (ENGLE *et al.*, 2013), pacas (SILVA *et al.*, 2012) e peixe-zebra (PHILLIP *et al.*, 2013). Contudo os roedores são os animais mais utilizados na pesquisa audiológica (DOS REIS; DALMOLIN; DALLEGRAVE, 2017).

Dentre os métodos específicos para avaliação auditiva, adequados para modelos animais e para prever possíveis efeitos da exposição de agentes ototóxicos em humanos, o potencial evocado auditivo é um dos testes mais utilizados (DOS REIS; DALMOLIN; DALLEGRAVE, 2017).

Em estudos de Freitas, *et al* (2009) foi constatado que o exame PEATE foi mais sensível do que as Emissões Otoacústicas Produto de Distorção (EOAPD), outro tipo de exame, na detecção de ototoxicidade induzida por cisplatina em ratos em diferentes doses e meios de administração.

O tipo de estímulo mais utilizado para a obtenção das ondas no PEATE é o clique, o mesmo que foi utilizado no nosso estudo, por ter um espectro amplo de frequências, suficiente para estimular uma quantidade maior de fibras e provocar uma resposta sincrônica (HALL, 1990).

Com o PEATE os limiares auditivos podem ser captados de forma objetiva e não invasiva (LIMA, 1998) o que torna a sua utilização uma opção para a pesquisa auditiva experimental, gerando menos estresse aos animais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O exame PEATE foi capaz de demonstrar e diagnosticar a Perda Auditiva Induzida por Ruído em modelo experimental com ratos.

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARADO, J. C. et al. Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: A study in wistar rats. **Neuroscience Research**, v. 73, n. 4, p. 302–311, 2012.

dos Reis, A., Dalmolin S. P., Dallegrave E. Modelos de animais para avaliação auditiva: revisão de literatura. **Revista CEFAC**. 2017, 19 (3), 417-428.

DIAS, Adriano. Associação entre perda auditiva induzida pelo ruído e zumbido/**Adriano Dias**, 2004.

Engle JR, Tinling S, Recanzone GH. Age-Related Hearing Loss in Rhesus Monkeys Is Correlated with Cochlear Histopathologies. **Snyder J**, ed. PLoSONE. 2013;8(2):e55092.

FETONI, A. R. et al. Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 9, 2013.

Freitas, M. R., Silva, V. C., Brito, G. A. C., Júnior, V. C., Júnior, R. M. G., Ribeiro, R. A. Distortion-product otoacoustic emissions and auditory brainstem responses sensitivity assessment in cisplatin-induced ototoxicity in rats. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. Volume 75, Edição 4, 2009, páginas 476-484.

PHILLIP M. Aminoglycoside-Induced Hair Cell Death of Inner Ear Organs Causes Functional Deficits in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **PLoS ONE**, 2013.

Hall JW. **Handbook of Auditory Evoked Responses**. Effect of nonpathologic subject characteristics. Effect of stimulus factors, 1990.

Jaumann M, Dettling J, Gubelt M, Zimmermann U, Gerling A, Paquet-Durand F, et al. cGMP-Prkg1 signaling and Pde5 inhibition shelter cochlear hair cells and hearing function. **Nat Med** 2012;18:252–9.

Kujawa, S.G., Liberman, M. Adding insult to injury: Cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. **The Journal of Neuroscience** 29, 2009.

Lima MAMT. Potencial evocado auditivo: eletrococleografia e audiometria de tronco e encefálico. In: Frota S, editor. **Fundamentos em fonoaudiologia: audiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1998;147-60.

Palumbo MIP, Resende LAL, Pantoja JCF, Mayhew IG, Borges AS. Brainstem auditory evoked potential in Boxer dogs. **Pesq. Vet. Bras**. 2014a;34(10): 1007-10.

Sanz-Fernández R, Sánchez-Rodríguez C, Granizo JJ, Durio-Calero E, Martín-Sanz E. Utility of auditory steady-state and brainstem responses in age-related hearing loss in rats. **Acta Otolaryngol**.

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

2015;135(1):35-41. doi:10.3109/00016489.2014.953203.

Seelig VC. Questões atuais relacionadas ao uso de modelos animais em pesquisa científica [monografia]. Porto Alegre: **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**; 2007.

Seligman J, Ibañez RN, Costa EA, Nudelmann AA. Perda auditiva induzida pelo ruído. In: Campos CA, Costa HO. **Tratado de otorrinolaringologia**. Vol. 2, São Paulo: Roca; 2002.p.119-125.

Silva IA. Caracterização eletrofisiológica, funcional e ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura da orelha interna da Cuniculus paca: um novo modelo experimental [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): **Universidade Federal de São Paulo**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2012.

Parecer CEUA: 058/15