UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ADRIANA DE ANDRADE BATISTA MURASHIMA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL, ELETROFISIOLÓGICA E
MICROANATÔMICA COCLEAR DE ANIMAIS COM SENSIBILIDADE
AUDIOGÊNICA DA CEPA *WISTAR AUDIOGENIC RATS* (WAR).**

RIBEIRÃO PRETO
2013

ADRIANA DE ANDRADE BATISTA MURASHIMA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL, ELETROFISIOLÓGICA E
MICROANATÔMICA COCLEAR DE ANIMAIS COM SENSIBILIDADE
AUDIOGÊNICA DA CEPA *WISTAR AUDIOGENIC RATS* (WAR).**

Dissertação Apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas.

Área de concentração: Mecanismos
Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-
Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppólito

**Ribeirão Preto
2013**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Murashima, Adriana de Andrade Batista

Título: Caracterização funcional, eletrofisiológica e microanatômica coclear de animais com sensibilidade audiogênica da cepa wistar audiogenic rats (war).
Ribeirão Preto, 2013.

62p.:1il.; 30 cm

Dissertação Apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.
Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular

Orientador: Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppólito

1. Avaliação auditiva; 2. Células ciliadas; 3. Cóclea; 4. Epilepsia audiogênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Adriana de Andrade Batista Murashima

Título: Caracterização funcional, eletrofisiológica e microanatômica coclear de animais com sensibilidade audiogênica da cepa Wistar audiogenic rats (WAR).

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Áudio-Vestibular.

Aprovado em: / / 2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppólito
Julgamento: _____

Instituição: FMRP - USP
Assinatura: _____

Prof. Dr.
Julgamento: _____

Instituição: FMRP - USP
Assinatura: _____

Prof. Dr.
Julgamento: _____

Instituição:
Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido **Carlos Eduardo Hideke Murashima**, a paz quando me abraça, a
emoção quando me olha, o meu porto seguro,
que sempre está ao meu lado me apoiando.*

*Ao meu filho **Gustavo de Andrade Murashima**, a minha dedicação,
a minha oração, a minha gratidão, o meu amor mais puro e bonito,
perdoe os meus momentos de ausência.*

*A doce lembrança de minha mãe forte e guerreira, minha inspiração e
minha poesia, **Rosicler de Andrade Batista (in memorian)**,
que me ensinou que conhecimento é a nossa maior herança.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppólito** por ser um profissional exemplar, com ética, serenidade, sabedoria e pela confiança que depositou em mim, pelos ensinamentos e pelo incentivo em todos os momentos.

À **Maria Rossato** que prepara todas as amostras como uma obra de arte, de valor imensurável.

Ao amigo **José Antonio Cortes de Oliveira**, profissional exemplar, obrigada pelos momentos de reflexão, de explicações, de paciência e de serenidade.

Aos **funcionários do Biotério Central da USP** - Campus Ribeirão Preto e do **Biotério de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patógenos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP: **Tuca, José Augusto e Teresa**.

Aos amigos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto especialmente a **Rita Amancio, Denny Marcos Garcia, Vani Maria Alves, Roberta Rosales, Elizabete Rosa Milani, Izilda Rodrigues, Mara Costa**, como é bom tê-los por perto.

Às minhas amigas **Carla Wolkers, Monica Serra, Nidiane Sousa, Adriana Silveira, Maria Natalia Guindalini**, amo todas, momentos de descontração embora raros.

Aos meus irmãos **Marcia, Mauri, Maurilio, Marcio e Marcelo**, pelos momentos em família.

A minha doce e querida afilhada **Carolina Módulo** pelo empenho, torcida e ajuda na formatação deste trabalho, muito obrigada!

E a todos que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao **Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco**, pela co-orientação na realização deste trabalho, pela determinação e pelo dinamismo que motiva a todos ao seu redor.*

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”
Cora Coralina*

RESUMO

Murashima, Adriana de Andrade Batista. Caracterização funcional, eletrofisiológica e microanatômica coclear de animais com sensibilidade audiogênica da cepa *Wistar Audiogenic rats (WAR)* Ribeirão Preto, 2013.

Os animais com sensibilidade audiogênica, *Wistar Audiogenic Rats (WAR)* são modelos experimentais utilizados em pesquisas sobre audição, integração sensório-motora e epilepsias, entre elas as crises audiogênicas. O modelo de estimulação sonora repetida conhecido como *kindling* ou abrasamento audiogênico mimetiza um tipo de epilepsia parcial com envolvimento de estruturas límbicas. É também um modelo genético de grande importância para o estudo das epilepsias porque retrata crises em animais com seleção genética controlada. O objetivo desse estudo foi investigar as alterações morfológicas e funcionais em células ciliadas internas e externas da orelha interna em animais da cepa WAR submetidos ao abrasamento audiogênico comparando-os com animais controle. Foram utilizados 40 animais com idade de 80 a 120 dias. Os animais selecionados foram divididos em quatro grupos de estudo. Foram utilizados os animais que apresentaram função coclear normal, avaliada através do reflexo de Preyer, emissões otoacústicas por produtos de distorção (EOAPD) e limiar eletrofisiológico medido pelos potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE). A avaliação funcional foi realizada antes do primeiro estímulo acústico e imediatamente após o último estímulo acústico. Em seguida foi realizada perfusão intracardiaca, os animais tiveram suas bulas removidas e as cócleas processadas para microscopia eletrônica de varredura. Em relação às EOAPD, os animais do grupo WAR-*kindling* apresentaram diferença significativa na relação sinal-ruído, sendo que animais WAR pré-*kindling* possuem valores significativamente superiores aos do pós-*kindling*. Em relação ao PEATE houve uma diferença significativa, o grupo WAR-*kindling* apresentou limiares com valores significativamente superiores aos do grupo Wistar *kindling*. Por microscopia eletrônica de varredura nos animais da cepa WAR observou-se uma estrutura irregular nos feixes de estereocílios das células ciliadas internas (CCI) e células ciliadas externas (CCE). Os exames para avaliação auditiva funcional (EOAPD), eletrofisiológica (PEATE) associados à microscopia eletrônica de varredura permitiram caracterizar as alterações morfológicas e funcionais em CCI e CCE da orelha interna em animais com sensibilidade audiogênica da cepa WAR como potenciais sequelas do abrasamento audiogênico. Os presentes dados confirmam a hipótese de que o abrasamento audiogênico na cepa WAR provoca impacto funcional e morfológico da orelha interna.

Palavras Chave: Avaliação auditiva, Células ciliadas, Cóclea, Epilepsia audiogênica.

ABSTRACT.

Murashima, Adriana de Andrade Batista

Functional, electrophysiological and microanatomic cochlear characterization of animals of the *Wistar Audiogenic Rat* (WAR) strain.

Animals of the *Wistar Audiogenic Rat* (WAR) strain are used as experimental models in research of auditory function, sensorimotor integration and epilepsy studies, including audiogenic seizures. The model of repeated acoustic stimulation mimics temporal lobe partial epilepsy with involvement of limbic structures and is of great importance to the study of epilepsy because it portrays a genetically selected strain. The objective of this study was to investigate the morphological and functional changes in inner and outer hair cells of the inner ear in the WAR strain after exposure to repeated acoustic stimulation and compared to control animals. 40 animals from 80 to 120 days old were included. The animals were divided into four groups of study. The animals used were those with normal cochlear function, evaluated through the Preyer Reflex, otoacoustic emissions by distortion product (DPOAE) and electrophysiological threshold measured by brainstem auditory evoked potentials (ABR). The functional assessment was performed before the first acoustic stimulus and immediately after the last acoustic stimulus. Then was performed intracardiac perfusion, the animals had their bullae removed and cochleas were processed for scanning electron microscopy. In relation to the DPOAE, the animals of the group WAR-kindling showed a significant difference in the signal-to-noise ratio, with WAR *pre-kindling* animals having values significantly higher than those of the *post-kindling* group. In relation to ABR there was a significant difference, the WAR-kindling group presented values significantly higher than those in the Wistar kindling group. By scanning electron microscopy in WAR they were observed irregular structural bundles of stereocilia of Outer Hair Cells (OHC) and Inner Hair Cells (IHC). The tests for assessing auditory function by means of DPOAE and electrophysiology (ABR) associated with the scanning electron microscopy allowed to characterize the morphological and functional changes in internal and external hair cells of the inner ear in animals with acoustic stimulation in WAR after audiogenic kindling. The present data confirm the hypothesis that *kindling* in WAR causes functional impact and morphological alterations in the inner ear.

Key words: Hearing evaluation, audiogenic epilepsy, hair cells, cochlea.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índices de Crises Mesencefálicas.....	19
Tabela 2 - Médias da amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR) e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais Wistar controle	38
Tabela 3 - Médias da amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais WAR controle	39
Tabela 4 - Médias da amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR) e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais Wistar <i>Kindling</i>	40
Tabela 5 - Médias da amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR) e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais WAR <i>kindling</i>	41
Tabela 6 - Médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais WAR controle	42
Tabela 7 - Médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais Wistar controle.....	42
Tabela 8 - Médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais WAR <i>kindling</i>	43
Tabela 9 - Médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais WISTAR <i>kindling</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático orelha interna.....	21
Figura 2 - Comparação do tamanho corporal de uma rata albina Wistar (A) e uma rata albina da cepa WAR (B).....	31
Figura 3 - Gaiola para estimulação acústica.....	32
Figura 4 - Animal da cepa WAR, anestesiado e sendo preparado para o exame de EOAPD em caixa com isolamento acústico.....	33
Figura 5 - Animal WAR com eletrodos posicionados durante exame de PEATE.....	34
Figura 6 - Fotomicrografia eletrônica de varredura da cóclea de um animal Wistar controle com magnificação de 50x.....	44
Figura 7 - Fotomicrografia eletrônica de Varredura, grupo controle animal Wistar A: espiral basal magnificação de 750x; B: espira E2 com magnificação de 750x; C: espira apical com magnificação de 750x; D: citoarquitetura de cílios da CCE na espira E2 com magnificação de 3500x.....	45
Figura 8 - Fotomicrografia eletrônica de Varredura, grupo experimental animal Wistar A: espira basal com magnificação de 750x; B: transição da espira basal para espira E2 com magnificação de 750x; C: espira apical com magnificação de 750x; D: detalhes da ultraestrutura de cílios na CCE na espira E2 com magnificação de 1500x.....	46
Figura 9 - Fotomicrografia Eletrônica de Varredura, grupo controle animal WAR: A: espiral basal com magnificação de 1500 x; B: espira E2 com magnificação de 1500x; C: espira apical com magnificação de 1500x; D: tamanho dos cílios da CCI com magnificação de 5000x.....	47
Figura 10 - Fotomicrografia eletrônica de Varredura, grupo experimental animal WAR A: espiral basal com magnificação de 1500x; B: espira E2 com magnificação de 1500x, C: fileira de CCI com magnificação de 3500x, D: detalhes do feixe de cílios balonizados em CCE na espira E2 com magnificação de 3500x.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABR - *Auditory brainstem response*

CA - Convulsões audiogênicas

CCE - Células ciliadas externas

CCI - Células ciliadas internas

CETEA - Comissão de Ética em Experimentação Animal

CO₂ - Gás carbônico

cm - Centímetro

CI - Colículo inferior

dB - Decibel

EOA - Emissões otoacústicas

EOAPD - Emissões otoacústicas produto de distorção

FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

f₁ - Frequência primária 1

f₂ - Frequência primária 2

kg - Quilograma

GEPR - *Genetic Epilepsy Prone Rats*

GPG / Vall - *Genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall)*

Hz – *Hertz*

IHC – *Inner Hair Cells*

M - Molaridade

LNNE - Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

mg - Miligrama

ms - Milissegundos

NA - Nível de audição

nHL - *Hearing level*

NPS - Nível de pressão sonora

OD - Orelha direita

OE - Orelha esquerda

OHC – *Outer Hair Cells*

PEA - Potencial evocado auditivo

PEATE - Potencial evocado auditivo de tronco encefálico

s - Segundo

SPL - *Sound pressure level*

USP - Universidade de São Paulo

WAR - *Wistar audiogenic rat*

μV - Microvolt

μm - Micrômetro

μs - Microsegundos

°C - Graus Celsius

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Considerações gerais.....	16
1.2 Epilepsia audiogênica.....	17
1.3 Anatomofisiologia da orelha interna.....	20
1.4 Emissões otoacústicas por produto de distorção	24
1.5 Potencial evocado auditivo do tronco encefálico.....	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Tipo de estudo	30
3.2 Seleção dos animais experimentais	30
3.3 Grupos de estudo.....	31
3.4 Geração do Ruído	31
3.5 Avaliação funcional e eletrofisiológica da audição	32
3.6 Perfusão dos animais.....	35
3.7 Avaliação Anatômica.....	35
4. RESULTADOS	38
4.1 Emissões otoacústicas por produto de distorção	38
4.2 Potencial evocado auditivo do tronco encefálico	41
4.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	44
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERENCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Os animais com sensibilidade audiogênica, *Wistar Audiogenic Rat (WAR)* são modelos experimentais utilizados em pesquisas sobre audição, integração sensório-motora e epilepsias, entre elas as crises audiogênicas.

A epilepsia é uma condição neurológica que apresenta uma prevalência de 1-3% da população mundial. Caracteriza-se pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes resultantes da hiperatividade e do hipersinconismo neuronal do cérebro (ENGEL, 2001; PEREIRA et al. ,2010).

Há mais de 20 anos, estudos de Fisher (1989) ressaltam a importância do uso de modelos experimentais em pesquisas sobre o mecanismo das epilepsias em que três pontos devem ser considerados: a busca pelo entendimento dos processos básicos que levam à epilepsia, permitindo assim criar terapias de prevenção em pacientes de risco, a busca pelo entendimento dos processos biológicos de resistência a fármacos, possibilitando o desenvolvimento de medicamentos para a reversão ou para a prevenção da mesma, e o processamento de terapias viáveis que possam retardar a progressão da epilepsia. Neste sentido, é de fundamental importância a escolha correta de modelos animais para os diferentes tipos de epilepsia.

Brooks-Kayal, Raol e Russek (2009) estabelecem a relevância dos modelos experimentais em epilepsia que tem grande contribuição na compreensão dos mecanismos de epileptogênese bem como o da geração de crise epilética, os modelos já utilizados buscam reproduzir algumas das características da epilepsia humana. Cada modelo apresenta suas vantagens e desvantagens, cabendo ao pesquisador avaliar estes parâmetros ao escolher um modelo específico para seu projeto de pesquisa.

Carvalho (2007) considera que o estudo das epilepsias, por motivos éticos, depende da utilização de modelos animais, devido à sua diversidade, muitos modelos são desenvolvidos buscando mimetizar características específicas de cada tipo de epilepsia humana, com o objetivo de desvendar os mecanismos envolvidos na epileptogênese e fornecer substratos para propor tratamentos mais eficientes e desta forma, promover melhora na qualidade de vida desta população.

1.2 Epilepsia audiogênica

Em 1924, Studentsov realizou os primeiros estudos sobre a epilepsia audiogênica. A epilepsia audiogênica é um modelo experimental no qual as crises são induzidas por estímulo sonoro de alta intensidade. Além de ser induzida por manipulações sobre o sistema auditivo periférico, pode também depender de uma característica geneticamente herdada, com linhagens bem conhecidas de animais audiogênicos, principalmente em ratos e camundongos (FERES; GARCIA-CAIRASCO, 2001).

De acordo com Goddard (1967), o termo “abrasamento” ou “*kindling*”, na sua concepção original, refere-se à indução de crises límbicas em animais normais, mediante o uso de estímulos elétricos sub-límbicos, administrados repetidamente por um período determinado de tempo, através de eletrodos implantados cronicamente em áreas cerebrais de baixo limiar epilético, como a amígdala e o hipocampo.

Os diferentes estágios de progressão do “abrasamento” ou “*kindling*” foram descritos por Racine (1972). A classificação foi baseada em características comportamentais e clínicas: 1) clônus facial ; 2) movimentos de flexão e extensão da cabeça; 3) clônus de patas dianteiras; 4) resposta de orientação, na qual o animal permanece de pé apenas sobre as patas traseiras “*rearing*”; 5) “*rearing*” seguido de queda.

O modelo de estimulação sonora repetida conhecido como *kindling* ou abrasamento audiogênico mimetiza um tipo de epilepsia parcial com envolvimento de estruturas límbicas. É também um modelo genético de grande importância para o estudo das epilepsias porque retrata crises em animais com seleção genética controlada. Na realidade, o abrasamento ou *kindling* audiogênico difere um pouco da definição original de Goddard, pois no caso do abrasamento audiogênico, os animais são portadores de susceptibilidade epilética e os estímulos são supralímbicos, ou seja, o estímulo sonoro aplicado é indutor de crises. Após estímulos repetidos, o padrão original de crise tônico-clônica generalizada é gradativamente substituído por crises cuja expressão motora se assemelha a crises do lobo temporal (crises límbicas) observadas em seres humanos (MARESCAUX et al., 1987; GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; MORAES et al., 2000).

A primeira observação de crise audiogênica foi realizada em 1924 por pesquisadores soviéticos que desenvolveram a partir de ratos Wistar a linhagem Krushinsky-Molodkina (KRUSHINSKY et al., 1970) que é amplamente utilizado em

estudos comportamentais, eletrofisiológicos e neuroquímicos (ROSS; COLEMAN, 2000; KRUSHINSKY, 1963). Outra linhagem audiogênica derivada de progenitores da linhagem Wistar e geneticamente selecionado encontra-se em Estrasburgo, França (MARESCAUX et al., 1987).

Uma terceira linhagem, derivada de ratos Sprague-Dawley foi desenvolvida inicialmente na Universidade do Arizona (EUA), os GEPRs - *Genetic Epilepsy Prone Rats* (DAILEY et al., 1989). No processo de seleção genética foram selecionados dois fenótipos: os GEPRs-3, apresentando crises moderadas e os GEPRs-9, apresentando crises severas. Estas duas linhagens foram mantidas até recentemente na Universidade de Illinois, nos Estados Unidos e atualmente na Universidade do Sul do Illinois nos Estados Unidos (CARVALHO, 2007). Estes animais foram objeto de estudo de Penny et al., (1983) que caracterizou a cepa GEPR apontando para um comprometimento na acuidade auditiva, inclusive com mudanças e aberrações nos estereocílios e nas células ciliadas do órgão de Corti.

Por fim, a cepa Wistar Audiogenic Rat (WAR), também derivada de ratos Wistar (GARCIA-CAIRASCO et al., 1990; DORETTO et al., 2003) desenvolvida e mantida até hoje no Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental (LNNE) do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Desde a década de oitenta estes animais WAR têm sido estudados com as primeiras cepas de ratos audiogênicos selecionados fenotipicamente, observando-se a resposta comportamental dos mesmos a estímulos acústicos de alta intensidade. No protocolo inicial os animais foram classificados em animais suscetíveis (S) que apresentam crises generalizadas tônico-clônicas induzidas por estimulação acústica de alta intensidade (117 a 120 dB) e resistentes (R) que são os animais que não respondem ao som com qualquer comportamento referente à crise epilética, mas eles exibem automatismo facial e realizam autolimpeza (GARCIA-CAIRASCO; TERRA; DORRETO, 1993).

Esta linhagem de ratos Wistar selecionados geneticamente, Wistar Audiogenic Rat (WAR), apresenta uma susceptibilidade epilética audiogênica. Estes animais, quando submetidos a um estímulo sonoro de alta intensidade (117 a 120 dB SPL) desenvolvem crises convulsivas do tipo tônico-clônica generalizada seguida por espasmos clônicos (KIESMANN et al., 1988, DORETTO et al., 2003). Atualmente a cepa encontra-se na sua geração 48^a. a 50^a. da sua seleção genética.

A progressão da crise audiogênica caracteriza-se por eventos procursivos descritos por corrida, pulos e quedas atônicas, e eventos convulsivos denominada crise tônico-clônica (VILELA, 2012). Independentemente do nível de gravidade da crise, a corrida é um componente sempre presente que pode ocorrer em um ou dois episódios distintos. De acordo com a tabela 1, o componente tônico, considerado a manifestação mais grave da crise ocorre logo após a fase de corrida e caracteriza-se pela flexão do dorso, pescoço, membros anteriores, membros posteriores, acompanhado de espasmos por todo o corpo (GARCIA-CAIRASCO et. al., 1996).

Tabela 1. Índices de crises Mesencefálicas (Garcia-Cairasco et. al., 1996, modificado por Rossetti et. al., 2006).

COMPORTAMENTOS	ÍNDICE CATEGORIZADO
Nenhuma corrida	0
Uma corrida e giro	1
Uma corrida e giro, seguido por pulos e quedas atônicas	2
Duas corridas e giros, seguidos por pulos e quedas atônicas	3
Todos anteriores mais convulsão tônica com arqueamento do dorso	4
Anteriores seguidos por convulsões clônicas parciais e generalizadas	5
Anteriores seguidos por ventroflexão da cabeça	6
Anteriores seguidos por hiperextensão das patas anteriores	7
Anteriores seguidos por hiperextensão das patas posteriores	8

A crise audiogênica inicia-se com a ativação da via auditiva do tronco encefálico envolvendo o colículo inferior, camadas profundas do colículo superior, formação reticular, substância negra e a substância cinzenta periaquedutal (ROSSETTI et al., 2011; DORETTO et al., 2009; GARCIA-CAIRASCO, 2002; ROSS; COLEMAN, 2000), tendo o colículo inferior como uma das áreas mais críticas do mesencéfalo envolvidas na gênese da crise (GARCIA-CAIRASCO et al., 1993, 1996; FAINGOLD, 1999; GARCIA-CAIRASCO, 2002).

Após estímulos repetidos, o padrão original de crise tônico-clônica generalizada é gradativamente substituído por crises cuja expressão motora se assemelha a crises do lobo temporal (crises límbicas) que ocorrem pelo

recrutamento através de estimulações repetitivas (abrasamento audiogênico) de novos substratos neurais, tais como a amígdala, hipocampo e córtex (VERGNES et al., 1987; NARITOKU et al., 1992; GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; GARCIA-CAIRASCO, 2002; MORAES et al. 2000).

Este recrutamento límbico permanece mesmo após um intervalo de tempo sem estímulo, com o animal ressubmetido a um novo estímulo sonoro, por rearranjos que ocorrem na amígdala, córtex piriforme e perirrinal (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; GALVIS-ALONSO et al, 2004; MORAES et al., 2000).

Os animais WARs são utilizados em estudos para caracterização de sequências de comportamento das convulsões agudas audiogênicas (GARCIA-CAIRASCO; TERRA, 1992; TSUTSUI et al., 1992, GARCIA-CAIRASCO et al., 1993), em estudos audiogênicos relacionados ao *kindling* (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996a; MORAES et al., 2000; GALVIS-ALONSO et al., 2004), na avaliação de novos agentes anti-convulsivantes (DORETTO et al., 1998), e na pesquisa neuroquímica de convulsões audiogênicas (RIBEIRO-SANTOS et al., 2001).

1.3 Anatomofisiologia da orelha interna

Bonaldi et al. (1998) descrevem o órgão de Corti humano sendo composto por uma membrana tectória, células de sustentação e células ciliadas. Sob a forma de uma cúpula gelatinosa acima das células ciliadas, a membrana tectória é presa à lâmina espiral óssea do modíolo e entra em contato com os cílios das células externas durante as vibrações da membrana basilar (Figura 1).

Podem-se destacar com relação às células de sustentação as células de Boettcher, células de Hensen (delimitam o túnel externo); células de Deiters, células pilares internas e externas.

Morata e Santos (1994) registram que as bases e os lados das células ciliadas estão incluídos numa rede de terminações do nervo coclear.

As células ciliadas são células sensoriais e se distinguem em células ciliadas internas (CCI) e células ciliadas externas (CCE). São observadas várias diferenças entre elas, tais como: anatômicas, numéricas e funcionais.

As CCI encontram-se dispostas em uma única fileira, em torno de 4.000 células, com aproximadamente 50 a 70 cílios sensoriais por célula, em posição linear e seus cílios não alcançam a membrana tectória e em sua superfície ciliar são banhadas por endolinfa. Cerca de 95% das fibras do nervo auditivo fazem sinapse

com as células ciliadas internas. São responsáveis pela transdução sensorial, ou seja, produzem uma mensagem elétrica codificada que é enviada através de toda a via auditiva até as vias nervosas o córtex específico no lobo temporal; apresentam seletividade de frequência fina e estão relacionadas a sons mais intensos. As CCI atuam como transdutores mecânicos-neurais, quantificando o deslocamento da membrana basilar em informação para o sistema auditivo (PARKINS, 1983).

As CCE têm a forma de um tubo de ensaio e em número aproximado de 12.000 células, dispostas em três fileiras ao longo das espiras cocleares cada uma tem de 100 a 300 estereocílios com disposição de “V” ou “W”. São menores na base e maiores no ápice, encontram-se fixadas à membrana basilar, banhadas por endolinfa no pólo ciliar e perilinfa nas partes laterais. Apresentam alturas diferentes em seus cílios, os mais internos são mais curtos e os mais externos são mais longos e encontram-se introduzidos na membrana tectória. O ligamento de elastina mantém os estereocílios ligados entre si, constituindo uma unidade (BONALDI et al., 1998).

Figura 1. Desenho esquemático orelha interna. (Fonte:

<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/sentido6.php>)

As CCE apresentam contrações rápidas e lentas, constituindo-se em efetores cocleares ativos e que funcionam como um sistema amplificador coclear,

aumentando em até 50 dB a intensidade de um estímulo, com capacidade de seletividade de frequências.

Morata e Santos (1994) propõem que as CCI têm uma função sensorial, transmitindo informações sobre o estímulo auditivo ao sistema nervoso central, enquanto as CCE desempenham uma função motora, através de mudanças em sua forma que alterariam o padrão de movimentação das membranas basilar e tectória.

Kelly (1991) define a membrana basilar como analisador mecânico de espectro com a propriedade tonotópica, ou seja, a população neuronal é distribuída de acordo com a frequência. A tonotopia baseia-se na premissa de que para cada frequência de onda sonora, existe uma estrutura específica que decodifica o sinal. Esta característica está presente ao longo da membrana basilar na cóclea, assim como nos núcleos cocleares, no complexo olivar superior, no colículo inferior, no núcleo geniculado medial do tálamo e finalmente, no córtex auditivo. Pode-se afirmar então, que ao longo da via auditiva há uma distribuição espacial segundo as diferentes frequências sonoras (KELLY, 1991). Os sons agudos são decodificados na base, enquanto os sons graves são processados no ápice.

Praticamente toda a informação sensorial auditiva que segue para o sistema nervoso central humano provém das células ciliadas internas. Sabe-se que a quase totalidade das 30.000 a 50.000 fibras nervosas que se distribuem da cóclea para o sistema nervoso central fazem contato com as células ciliadas internas, mas somente uma pequena parte das fibras auditivas (5-10%) faz sinapse com as células ciliadas externas. Embora existam aproximadamente três vezes mais CCE do que CCI, parece que as células externas transmitem pouca informação sensorial para o sistema nervoso central através de fibras aferentes.

Estudos têm demonstrado que CCE são móveis e podem alongar-se ou encurtar-se de forma lenta e sustentada ou oscilar rapidamente em frequências altas como 8 KHz (BROWNELL, 1990). Assim, acredita-se que estas células ajam primariamente como um sistema motor mais do que como transmissor de entrada sensorial para a via auditiva central, com a sua motilidade contribuindo para a sensibilidade do órgão auditivo e para o mecanismo preciso de sintonia da membrana basilar. Este fenômeno é chamado de cóclea ativa (DALLOS, 1992).

Com relação às vias auditivas aferentes, estas se iniciam nas sinapses da parte basal das células ciliadas internas, com os dendritos das células cujos somas se situam no gânglio espiral. Os axônios do gânglio espiral, conjuntamente com as

fibras advindas do sistema vestibular, compõem o nervo auditivo, correspondente ao VIII nervo craniano.

No sistema nervoso central (SNC), os neurônios aferentes do nervo auditivo entram no tronco encefálico na altura dos núcleos cocleares dorsal e ventral, ipsilaterais à cóclea na qual os axônios originaram-se, estabelecendo sinapses entre estes núcleos, que constituem a primeira região relevante da via auditiva (LORENTE DE NÓ, 1933). Cerca de 80% das fibras procedentes dos neurônios dos núcleos cocleares fazem sinapse no complexo olivar superior em ambos os lados do tronco cerebral, enquanto outras passam pelo complexo olivar superior, atravessam a linha média e fazem sinapse no colículo inferior (CI) contralateral. Enquanto algumas sinapses ipsilaterais acontecem no lemnisco lateral e no CI, um grande número de neurônios do núcleo coclear se estende contralateralmente ao lemnisco lateral. Portanto, há uma representação bilateral paralela ao CI (WEBSTER et al., 1985).

Além disso, qualquer que seja a via percorrida pelas fibras auditivas, todas as vias aferentes convergem no CI e, deste ponto, prosseguem tanto ipsi como contralateralmente, enviando axônios ao núcleo geniculado medial do tálamo, que através da radiação auditiva os projeta ao córtex auditivo, localizado no lobo temporal superior (MALMIERCA, 2003).

O córtex auditivo primário apresenta-se organizado com uma distribuição tonotópica, na qual as frequências sonoras sucessivas são representadas em regiões adjacentes (HUDSPETH, 2000).

Investigações recentes têm indicado que o sistema nervoso central tem importante função nas mudanças que ocorrem no trauma acústico causado pela exposição ao ruído. Estas investigações indicaram que o colículo inferior pode ser o local principal da via auditiva ascendente onde o ruído induz a ocorrência da plasticidade neuronal, resultando assim em alterações no processamento neuronal de informação auditiva (BROOKS-KAYAL; RAOL; RUSSEK, 2009).

Snyder-Keller e Pierson (1992) relataram que manipulações nas vias auditivas de roedores, quando realizadas em um período crítico do desenvolvimento auditivo causam uma perda auditiva parcial, podendo resultar em uma alteração intensa no sistema nervoso central, manifestada através de um quadro de resposta motora ao som, conhecida como epilepsia audiogênica. Nesse tipo de epilepsia reflexa, a exposição do animal a um ruído de grande intensidade leva à ocorrência de uma convulsão tônico-clônica generalizada.

Henry (1967) trabalhou com a sensibilização de camundongos a convulsões audiogênicas (CA), através da exposição a ruído intenso, mesmo se o som for aplicado sob anestesia, o que mostra que o processo não depende da formação reticular do tronco cerebral, nem de mecanismos conscientes.

Um estudo de Penny (1983), em animais da cepa GEPR descreve a ultraestrutura da orelha interna destes animais e sugere que os estereocílios alongados poderiam refletir eventos compensatórios para contactar a membrana tectorial durante o desenvolvimento. Estas alterações nas células ciliadas poderiam representar uma falha de mecanismos compensatórios. Deste modo as anormalidades cocleares podem desempenhar um papel tanto na susceptibilidade quanto na intensidade das convulsões audiogênicas.

1.4 Emissões otoacústicas evocadas por produtos de distorção

As emissões otoacústicas referem-se aos sons que podem ser medidos no canal auditivo externo, após a apresentação de um estímulo acústico. Estes sons são gerados pelas células sensoriais do ouvido interno, ou seja, as células ciliadas externas.

O que torna as emissões otoacústicas úteis para a avaliação da função auditiva é que elas são reduzidas ou ausentes quando as CCE são danificadas através da exposição ao excesso de ruído ou drogas ototóxicas. Desta maneira EOAs fornece um meio eficiente e não invasivo para avaliar o estado funcional das CCE.

A descoberta das EOA por Kemp (1978), e o conhecimento de que as respostas acústicas subsequentes foram emitidas provavelmente pela contração gerada pelas CCEs de funcionamento normal sugere que as EOAs seriam detectores úteis de lesão coclear induzida pelo ruído (MOUNTAIN-1980; SIEGEL; KIM, 1982; SCHROTT et al 1991).

As respostas não lineares do produto de distorção das emissões otoacústicas (EOAPD) quando medido no canal auditivo externo, são extremamente lábeis: isto é, elas são suprimidas por manipulações que reduzem a sensibilidade da cóclea (MOUNTAIN, 1980; SIEGEL; KIM, 1982). Por essa razão, elas são utilizadas como um ensaio não invasivo na avaliação da função coclear (LONSBURY-MARTIN et al., 1990).

As CCE têm a propriedade única de ser móveis, de modo que, em resposta a um estímulo acústico, esta motilidade amplifica as vibrações da membrana basilar, o que representa uma grande parte da sensibilidade auditiva humana e de animais ao som.

Quando dois tons são apresentados ao canal auditivo externo, uma emissão de produto por distorção (EOAPD) é produzida. Esta emissão surge devido aos aspectos não lineares de transdução de CCEs em que são geradas novas frequências que não estão presentes no sinal de entrada. Embora as famílias de EOAPD sejam evocadas por um estímulo de dois tons, a emissão maior e mais proeminente ocorre na frequência $2f_1-f_2$, onde f_1 é o tom de menor frequência e f_2 é o tom de maior frequência (MARTIN; STAGNER; LONSBURY-MARTIN, 2006).

A vantagem de EOAPD é que o par de tons pode ser selecionado para testar praticamente qualquer frequência de interesse dentro do alcance de uma espécie de animal. Além disso, essas emissões são significativas em animais de laboratório. Estes fatores fazem a medição EOAPD particularmente atraente para avaliar a função auditiva em animais de laboratório, como ratos (WHITEHEAD et al., 1992).

1.5 Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico

A avaliação auditiva por meio do exame EOAPD e por meio de PEATE (potencial auditivo evocado de tronco encefálico) pode auxiliar na caracterização da morfologia funcional e eletrofisiológica da cóclea, pois as EOA permitem uma medida do *feed-back* de energia biomecânica quando ocorre a contração das CCE (FREITAS et al., 2009).

O PEATE é um exame objetivo de audição que avalia a integridade da via auditiva. É uma técnica de avaliação eletrofisiológica, onde um sinal acústico caracterizado por um rápido início e breve duração, provoca eventos neurológicos sincronizados, os quais são mensurados, resultando em ondas originárias da via auditiva até o colículo inferior. São potenciais de curta latência gerados pela ativação sequencial e sincrônica das fibras nervosas ao longo da via auditiva, refletindo a integridade neurológica das vias auditivas. O fato destes potenciais serem captados de maneira não invasiva e com eletrodos de superfície, aumenta sua aplicabilidade clínica (VASCONCELOS et al., 2008).

Em roedores, os prováveis geradores das ondas são: onda I, nervo auditivo; onda II, núcleos cocleares; onda III, complexo olivar superior; onda IV, lemnisco

lateral e colículo inferior; onda V, corpo geniculado medial e radiações talamocorticais. À medida que se diminui a intensidade do estímulo, as ondas vão progressivamente aumentando em latência e diminuindo em amplitude até seu completo desaparecimento. Deste modo pode-se ainda estabelecer a presença ou ausência de lesões da via auditiva ao nível do tronco encefálico pela análise do tempo de condução do estímulo entre locais mais proximais e distais da via auditiva retrococlear (FREITAS et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo desse estudo foi investigar as alterações morfológicas e funcionais em CCI e CCE da orelha interna em animais da cepa WAR submetidos ao abrasamento audiogênico comparando-os com animais Wistar do mesmo sexo e idade.

2.2 Específicos

A. Caracterizar a cepa WAR quanto a seus limiares auditivos através do potencial evocado auditivo de tronco encefálico, antes e depois do *kindling* audiogênico.

B. Caracterizar o comportamento funcional das emissões otoacústicas por produtos de distorção de ratos da cepa WAR antes e depois do *kindling* audiogênico.

C. Caracterizar a citoarquitetura das CCI e CCE do órgão de Corti na cepa WAR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo do tipo experimental.

Os protocolos do estudo experimental foram conduzidos com aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Processo nº 169/2010).

3.2 Seleção dos animais experimentais

Como animal de experimentação, foram utilizadas ratas albinas (*Rattus norvegicus*) fêmeas da linha Wistar e da cepa WAR. Foram empregados o total de 40 animais com idade de 90 a 120 dias. Sendo 22 animais da cepa WAR, fêmeas com ciclo estral controlado (estro – diestro). Estes animais foram fornecidos pelo Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por demanda espontânea. Os animais Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP-Ribeirão Preto.

Os animais foram mantidos durante os experimentos, no Biotério de Manutenção e Experimentação do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em condições normais de iluminação de 12 horas e temperatura constante. Os animais tiveram livre acesso a comida e água. Foram condicionados 4 animais por caixa.

Foram avaliados, após repouso auditivo de 24 horas, por meio da otoscopia manual. Os animais com sinais de otite externa ou média aguda, cerume de difícil remoção, alterações inflamatórias do conduto auditivo externo, ou conduto auditivo estreito que não possibilitasse a inserção correta da sonda para realização das EOAPD e do PEATE, foram descartados do experimento. A Figura 2 estabelece a comparação entre uma rata albina da cepa WAR e uma rata albina Wistar.

Figura 2. Comparação do tamanho corporal de uma rata albina Wistar (A) e uma rata albina da cepa WAR (B).

3.3 Grupos de estudo

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

Grupo 1: Animais Wistar Controle (n = 9): grupo controle no qual não foi aplicada a estimulação acústica.

Grupo 2: Animais WAR Controle (n = 8): grupo controle no qual não foi aplicada a estimulação acústica.

Grupo 3: Animais Wistar *kindling* (n = 9): grupo experimental no qual houve a estimulação acústica, ou seja, submetidos ao abrasamento audiogênico.

Grupo 4: Animais WAR *kindling* (n = 14): grupo experimental no qual houve a estimulação acústica, ou seja, submetidos ao abrasamento audiogênico.

3.4 Geração do Ruído

Para estimulação acústica cada animal foi colocado em uma caixa cilíndrica de acrílico transparente medindo 30 cm de altura e 16 cm de raio de modo a não interferir na expressão motora da crise, mas permitir uma nítida observação da resposta comportamental (Figura 3). O cilindro, por sua vez, é colocado dentro de

uma caixa de madeira acusticamente isolada, medindo 41x41x46cm com a parede frontal de acrílico transparente para permitir a visualização do animal. O som de uma campainha, com frequência de 60 Hz foi gravada em fita cassete, foi amplificada para uma intensidade de 117 a 120 dB SPL (*Sound Pressure Level*). Cada estimulação teve a duração máxima de 60 segundos ou até o instante de apresentação de uma convulsão tônica, na qual determinou o término antecipado da estimulação sonora. Sobre as imagens gravadas da totalidade das crises, realizaram-se as análises comportamentais em três intervalos de observação ao redor do estímulo acústico 1min antes, 1 min durante e 1 min depois do estímulo sonoro.

Figura 3. Animal da cepa WAR na caixa cilíndrica antes da estimulação acústica

O abasamento audiogênico foi realizado com 30 estímulos, 2 vezes por dia, sendo que antes do início e após 24 horas do último estímulo, foram realizados os exames de PEATE, EOAPD.

Durante a execução de todo o experimento, as fêmeas tiveram acompanhamento prévio do ciclo estral por um período de 08 dias, mantendo-se este acompanhado durante todo o período do abasamento (15 dias).

A avaliação comportamental da progressão do *kindling* audiogênico dos animais do presente estudo faz parte da Dissertação de Mestrado do aluno Teddy

Talbot, do Programa de Pós-Graduação de Fisiologia da FMRP e orientando do Prof. Norberto Garcia-Cairasco.

3.5 Avaliação funcional e eletrofisiológica da audição

Para a avaliação funcional e eletrofisiológica auditiva os animais foram submetidos ao exame das EOAPD e do PEATE sob anestesia com a associação de cloridrato de cetamina, 40 mg/kg e xilazina, 10 mg/kg, pela via intramuscular. Foi utilizado o programa Smart DPOEA do equipamento fabricado pela Intelligent Hearing Systems (Miami, FL, USA), calibrado pelo fabricante (Figura 4).

Figura 4. Animal da cepa WAR, anestesiado e sendo preparado para o exame de EOAPD em caixa com isolamento acústico.

A análise das EOAPD foi realizada seguindo a relação de frequências de $2f_1 - f_2$ com $f_1:f_2=1,22$, resolução de dois pontos por oitava. Foram consideradas as EOAs a partir de 1,4 KHz, pois as dimensões do conduto auditivo externo de roedores fazem com que haja uma dificuldade das mesmas abaixo desta frequência, obtendo respostas que coincidem com as respostas do ruído. As otoemissões resultantes costumam ser em torno de 55 dB NPS (nível de pressão sonora) menos intensas que o estímulo provocante. Utilizando um estímulo de 70dB NPS, provavelmente será encontrada uma EOAPD, com variabilidade de mais ou menos 10 ou 15dB NPS (HYPPÓLITO et al., 2005).

Foi analisado, o chamado “DPGRAM”, que fornece a função das CCE da cóclea responsáveis pelas frequências analisadas. Neste estudo foram consideradas

como mais importante as EOAPD nas frequências altas, sendo possível avaliar qualitativamente o estado funcional das CCE localizadas na espira basal da cóclea, sendo consideradas como presentes ou ausentes.

Para avaliação do limiar auditivo foi realizado o PEATE, logo após a realização das EOAPD, com o animal ainda sob anestesia.

O animal foi preparado para receber os eletrodos, realizou-se a tricotomia na região do vértex, na região entre as órbitas. Também a região posterior do pavilhão auricular foi submetida à limpeza local com álcool 70% para a remoção da oleosidade e com auxílio de esponja de aço para retirar a descamação local, com o objetivo de melhorar o contato do eletrodo com a pele. Os eletrodos de superfície foram dispostos da seguinte maneira: um eletrodo positivo no vértex craniano, dois eletrodos negativos na porção posterior do pavilhão auricular e um eletrodo referência (terra) na fronte, entre as órbitas. Os mesmos foram colocados com interposição de pasta eletrolítica, para melhor condutibilidade do sinal elétrico e redução de artefatos (Figura 5).

Figura 5: Animal da cepa WAR, anestesiado mostrando o posicionamento dos eletrodos para a realização do exame de PEATE.

Para a estimulação sonora foram posicionados os fones de inserção no conduto auditivo externo. O estímulo utilizado foi o clique alternado, com 27,7 estímulos por segundo e duração de 0,1 ms. Frequência fundamental de 1.000 Hz,

utilizando a intensidade de 90 dB nHL. O sinal captado pelos eletrodos foi submetido a filtros passa - alta e passa - baixa de 150 e 3.000 Hz, respectivamente. O sinal filtrado e amplificado foi submetido à promediação de 1.024 varreduras dos registros dos potenciais auditivos PEA, com janela de 12 ms. O resultado final foi fornecido na forma de ondas de potencial elétrico. A pesquisa do limiar auditivo foi realizado por meio de estímulo sonoro de maneira decrescente de 10 em 10 dB até o limiar aproximado. O limiar será considerado como a menor intensidade na qual seja visível a primeira onda do potencial auditivo reproduzida.

Para a realização do PEATE foi utilizado o programa Smart EP do equipamento fabricado pela *Intelligent Hearing Systems* (Miami, FL, USA), calibrado pelo fabricante.

3.6 Perfusão dos animais

A perfusão dos animais foi realizada um dia após o último estímulo auditivo. Para a perfusão de cada animal, foi aplicada anestesia na dose de 69 mg/kg de tiopental sódico (Abbott). Os animais foram perfundidos transcardialmente com 150 ml de solução tampão fosfato 0,1 M e 300 ml de solução de paraformaldeído 4% em solução tampão fosfato 0,1M e pH= 7,4 com o auxílio de uma bomba de perfusão Masterflex ® (Cole Parmer), com velocidade controlada. Em seguida foi realizada a craniotomia com retirada do encéfalo e da bula timpânica. As cócleas, com dissecação microscópica, foram reperfundidas em solução de paraformaldeído 4% e foram mantidas nesta solução por 4 horas para a melhor fixação. Os processos seguintes foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Morfologia da FMRP-USP.

3.7 Avaliação Anatômica

Dando continuidade ao processamento das amostras para microscopia eletrônica de varredura, as cócleas foram lavadas três vezes por 5 minutos com solução tampão fosfato 0,1M e pH= 7,4. Após esses procedimentos, as cócleas foram refixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M e pH= 7,4 por 2 horas a 4°C, lavadas em seguida com solução tampão fosfato 0,1M e pH= 7,4 e submetidas a uma desidratação à temperatura ambiente em uma bateria crescente de etanol (50%, 70%, 90% e 95% - uma vez por 10 minutos em cada concentração) e etanol absoluto três vezes por 15 minutos.

Terminada a desidratação, foi realizada a secagem pelo método do ponto crítico em CO₂, o equipamento utilizado foi o BAL-TEC CPD 030® (*Critical Point Dryer*), onde através de sucessivos banhos com dióxido de carbono líquido a 4°C, o etanol foi eliminado e então o material foi submetido a um aumento de temperatura até 40°C para que o dióxido de carbono passasse do estado líquido para o estado gasoso, o que ocorre a 31°C quando o material fica desprovido de água.

O material foi fixado em porta espécime metálico, sendo revestidos em câmara de vácuo BAL-TEC SCD 050 com vapores de ouro. Com esta preparação as cócleas ficaram eletricamente condutivas.

Para a observação e análise das células ciliadas cocleares foi utilizado o Microscópio Eletrônico JEOL SCANNING MICROSCOPE – JSM 5200.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise para a variável EOAPD

A grande maioria dos animais apresentaram respostas ao exame das EOAPD. Durante a captação das respostas e a formação do traçado “DP GRAM” observou-se uma redução na amplitude de resposta a partir de 2,0 KHz até a frequência de 4,0 KHz e, a partir deste notável aumento para a frequência de 5KHz. Os valores das amplitudes para a relação sinal-ruído (1º desvio padrão) foram positivos para todos os exames, ou seja, as respostas obtidas estiveram presentes e acima do ruído de fundo. Na frequência de 1,4 KHz foi encontrada a maior amplitude de resposta para todos os animais avaliados.

Para a análise estatística foi utilizado teste não paramétrico nas análises, pois a variável EOAPD rejeitou a hipótese de normalidade em todos os grupos e tempo de acordo com o teste de Shapiro-Wilks. Foi adotado como nível de significância $p \leq 0,05$. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann Whitney U, devido ao pequeno número de animais por grupo e a não normalidade nas distribuições dos valores.

Para os animais Wistar controle na frequência de 3,0 KHz houve diferença significativa $p = 0,03^*$, o grupo controle possui valores significativamente superiores aos do grupo experimental. Os dados descritivos com as médias da relação sinal ruído e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais Wistar controle estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Médias da relação sinal ruído e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais Wistar controle.

Wistar controle	Nº. animais	Médias	Desvio Padrão
V2_OD_PRE1,4	9	58,00	21,26
V2_OD_PRE2,0	9	31,88	2,36
V2_OD_PRE3,0	9	18,33	6,61
V2_OD_PRE4,0	9	26,00	13,92
V2_OE_PRE1,4	9	56,00	23,74
V2_OE_PRE2,0	9	31,88	2,66
V2_OE_PRE3,0	9	19,44	4,95
V2_OE_PRE4,0	9	25,22	15,51

Na comparação entre os grupos controles de animais WAR e de animais Wistar foi utilizado o Teste de Mann-Whitney no qual não houve diferença estatística ($p>0,05$). Os dados descritivos com as médias da relação sinal ruído e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais WAR controle estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Médias da relação sinal ruído e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais WAR controle.

WAR controle	Nº. animais	Médias	Desvio Padrão
V2_OD_PRE1,4	8	55,50	28,53
V2_OD_PRE2,0	8	25,70	10,28
V2_OD_PRE3,0	8	15,60	5,44
V2_OD_PRE4,0	8	27,00	9,31
V2_OE_PRE1,4	8	55,30	27,39
V2_OE_PRE2,0	8	29,20	8,95
V2_OE_PRE3,0	8	14,50	8,04
V2_OE_PRE4,0	8	21,90	13,50

Na comparação entre os grupos experimentais de animais WAR e de animais Wistar foi utilizado o Teste de Mann-Whitney no qual não houve diferença estatística ($p>0,05$). Os dados descritivos com as médias da relação sinal ruído e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais Wistar *Kindling* estão descritos na Tabela 4.

Comparando-se os grupos de animais WAR controle x WAR *Kindling* foi utilizado o Teste de Mann-Whitney WAR, não houve diferença significativa.

A comparação entre os grupos experimentais pré-*kindling* e pós-*kindling* foi utilizado o Teste de Wilcoxon para amostras pareadas, sendo que em animais Wistar não houve diferença significativa.

Tabela 4. Médias da relação sinal ruído e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais *Wistar kindling*.

Wistar kindling	Nº. animais	Médias	Desvio Padrão
V2_OD_PRE1,4	10	49,70	27,30
V2_OD_PRE2,0	10	33,00	10,11
V2_OD_PRE3,0	10	16,40	6,53
V2_OD_PRE4,0	10	19,50	10,71
V2_OE_PRE1,4	10	51,40	25,54
V2_OE_PRE2,0	10	28,30	9,92
V2_OE_PRE3,0	10	14,50	5,06
V2_OE_PRE4,0	10	22,70	10,00
V2_OD_POS1,4	9	44,55	32,70
V2_OD_POS2,0	9	26,77	11,95
V2_OD_POS3,0	9	18,88	10,27
V2_OD_POS4,0	9	20,11	6,91
V2_OE_POS1,4	8	42,25	27,44
V2_OE_POS2,0	8	24,87	8,85
V2_OE_POS3,0	8	13,25	6,77
V2_OE_POS4,0	8	20,87	6,42

A comparação entre os grupos experimentais *pré-kindling* e *pós-kindling* foi utilizado o Teste de Wilcoxon para amostras pareadas, sendo que em animais WAR na frequência de 3,0 KHz da OE $p = 0,05^*$, houve diferença significativa, o *pré-kindling* possui valores significativamente superiores aos do *pós-kindling*. Os dados descritivos com as Médias da relação sinal ruído e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais WAR *kindling* estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Médias da relação sinal ruído e desvio padrão nas frequências de 1,4 KHz, 2,0 KHz, 3,0 KHz e 4,0 KHz dos animais **WAR kindling**.

WAR kindling	Nº. animais	Médias	Desvio Padrão
V2_OD_PRE1,4	14	48,50	24,35
V2_OD_PRE2,0	14	29,35	10,44
V2_OD_PRE3,0	14	15,14	3,57
V2_OD_PRE4,0	14	26,07	11,40
V2_OE_PRE1,4	14	44,00	25,89
V2_OE_PRE2,0	14	30,85	9,65
V2_OE_PRE3,0	14	15,07	8,04
V2_OE_PRE4,0	14	24,64	14,37
V2_OD_POS1,4	14	43,35	22,89
V2_OD_POS2,0	14	26,21	9,84
V2_OD_POS3,0	14	10,35	9,61
V2_OD_POS4,0	14	21,50	10,53
V2_OE_POS1,4	14	39,42	21,43
V2_OE_POS2,0	14	26,92	11,93
V2_OE_POS3,0	14	10,71	7,11
V2_OE_POS4,0	14	22,35	8,68

4.2 Análise para a variável PEATE

No traçado obtido das respostas ao PEATE foi possível identificar 5 ondas em sequência, nomeadas como ondas I, II, III, IV e V. Sendo que estas ondas apresentaram características morfológicas semelhantes às encontradas em outros animais de experimentação.

A amplitude das ondas identificadas no traçado variou de acordo com a intensidade do estímulo. Na intensidade de 90 dB NA foram encontradas as maiores amplitudes de resposta para as intensidades de estímulo estudadas. A onda II foi a que apresentou maior amplitude de resposta em todas as intensidades avaliadas. O limiar auditivo eletrofisiológico estabelecido seguiu o critério de reprodutibilidade. Esse foi obtido a partir da identificação da onda II na menor intensidade de estímulo

que desencadeou um traçado de onda semelhante à observada para intensidades maiores de estímulo em decibéis.

Para a análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico nas análises, pois a variável PEATE rejeitou a hipótese de normalidade em todos os grupos e tempo de acordo com o teste de Shapiro-Wilks. Foi adotado como nível de significância $p \leq 0,05$. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann Whitney U, devido ao pequeno número de animais por grupo e a não normalidade nas distribuições dos valores.

Os cálculos foram realizados com o programa v. 5.0 (San Diego, CA, USA), apresentados como média $\pm$ desvio padrão e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados descritivos com as médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais WAR controle estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais WAR controle.

WAR controle	Nº. animais	Médias	Desvio Padrão
WAR controle PRE_OD	9	20,00	8,66
WAR controle PRE_OE	9	20,55	6,82
Wistar controle PRE_OD	8	20,62	5,62
Wistar controle PRE_OE	8	23,75	4,43

Na comparação entre os grupos controles de animais WAR e de animais Wistar foi utilizado o Teste de Mann-Whitney. Para o grupo WAR controle OD: (20,00 $\pm$ 8,66 - n=9) OE: (20,55 $\pm$ 6,82 - n=9) e para o grupo Wistar OD: (20,62 $\pm$ 5,62 - n=9) OE: (23,75 $\pm$ 4,43 - n=9). Os valores de p não foram significativos OD: z=0,16; p=0,42 e OE: z=0,81; p=0,42. Os dados descritivos com as médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais WISTAR controle estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais Wistar controle.

Wistar controle	Nº. animais	Médias	Desvio Padrão
V1_PRE_OD	9	25,55	10,18
V1_PRE_OE	9	23,33	8,66
V1_POS_OD	9	24,44	5,27
V1_POS_OE	9	18,88	3,33

Na comparação entre os grupos experimentais de animais WAR e de animais Wistar foi utilizado o Teste de Mann-Whitney. Para o grupo WAR: **pré-kindling** OD: (19,23±6,40 - n=13) OE: (20,76±7,59 - n=13) e **pós-kindling** OD: (21,66±7,17 - n=12) OE: (24,61±7,76 - n=13). Os dados descritivos com as médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais WAR *kindling* estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais WAR *kindling*.

WAR <i>kindling</i>	Nº. animais	Médias	Desvio Padrão
V1_PRE_OD	13	19,23	6,40
V1_PRE_OE	13	20,76	7,59
V1_POS_OD	12	21,66	7,17
V1_POS_OE	13	24,61	7,76

Para o grupo Wistar: **pré-kindling** OD: (25,55±10,13 - n=9) OE: (23,33±8,66 - n=9) e **pós-kindling** OD: (24,44±5,27 - n=9) OE: (18,88±3,33 - n=9) Os valores de p não foram significativos OD: z=0,16; p=0,42 e OE: z=0,81; p=0,42. Somente o exame pós-*kindling* na OE dos animais apresentaram diferença significativa **z = 2,03 e p = 0,04***. Houve uma diferença significativa, o grupo WAR-*kindling* apresentou valores significativamente superiores aos do grupo Wistar *kindling*. Os dados descritivos com as médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais Wistar *kindling* estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Médias dos limiares auditivos e desvio padrão dos animais Wistar *kindling*.

Wistar <i>kindling</i>	Nº animais	Médias	Desvio Padrão
V1_PRE_OD	9	25,55	10,13
V1_PRE_OE	9	23,33	8,66
V1_POS_OD	9	24,44	5,27
V1_POS_OE	9	18,88	3,33

Comparando-se os grupos de animais WAR controle x WAR *kindling*, utilizando o Teste de Mann-Whitney, para o grupo WAR OD: $z=0,22$ e $p=0,83$ OE: $z=0,55$ e $p=0,58$, não houve diferença significativa. Para a comparação dos grupos de animais Wistar controle x Wistar *kindling* OD: $z=0,90$ e $p=0,37$ OE: $z=0,42$ e $p=0,67$, também não houve diferença significativa.

Para a comparação entre os grupos experimentais pré-*kindling* e pós-*kindling*, utilizando-se o Teste de Wilcoxon para amostras pareadas, em animais WAR: OD: $z=1,41$ e $p=0,16$ / OE: $z=1,39$ e $p=0,17$; não havendo diferença significativa. Para os animais Wistar OD: $z=0,45$ e $p=0,66$ / OE: $z=1,41$ e $p=0,16$; também não houve diferença significativa.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os animais submetidos à avaliação auditiva eletrofisiológica e funcional tiveram a ultraestrutura da orelha interna analisadas por MEV. A cóclea de rato Wistar apresenta uma estrutura em espiral formada por duas e meia espiras sendo elas denominadas espira basal (1 volta), espira 2 (1 volta), e espira apical (1/2 volta) (Figura 6).

Figura 6. Fotomicrografia eletrônica de varredura da cóclea de um animal Wistar controle com magnificação de 50x.

As células sensoriais da cóclea estão dispostas em 3 fileiras de células ciliadas externas (CCE) e 1 fileira de células ciliadas internas (CCI). A arquitetura dos cílios segue o padrão V/W para as CCE e uma fileira contínua na vertical para as CCI, o mesmo que ocorre em outras espécies animais. (Figura 7A e 7B). A região da cóclea que apresenta maior regularidade no padrão ciliar é a espira basal.

Nos animais Wistar controle é perceptível intensa organização de fileiras de cílios, regularidade na disposição de feixes (Figura 7B), homogeneidade do tamanho de cílios. Também é observada quantidade e formato uniforme dos cílios nos animais Wistar controle.

Figura 7. Fotomicrografia eletrônica de Varredura, **grupo controle animal Wistar**: **A:** organização de fileiras de cílios na espiral basal magnificação de 750x; **B:** regularidade na disposição de feixes na espira E2 com magnificação de 750x; **C:** espira Apical com magnificação de 750x; **D:** detalhes da citoarquitetura de cílios da CCE na espira E2 com magnificação de 3500x.

Nos animais Wistar *kindling* é mantido o padrão de completa organização de fileiras de cílios, regularidade na disposição de feixes (Figura 8), homogeneidade do tamanho de cílios. Também é observada quantidade e forma homogênea nos

animais Wistar. Enquanto que as CCI mantêm um padrão mais desorganizado, com expressiva quantidade de cílios (Figura 8C).

Figura 8. Fotomicrografia eletrônica de Varredura, grupo experimental animais Wistar: **A:** organização linear, padrão V/W, CCI sem agrupamentos na espira basal com magnificação de 750x; **B:** com padrão V/W, uniformidade de CCE na transição da espira basal para espira E2 com magnificação de 750x; **C:** cílios sem deflexão na espira apical com magnificação de 750x; **D:** detalhes da ultraestrutura de cílios na CCE na espira E2 com magnificação de 1500x.

Os animais da cepa WAR controle apresentam interrupções na disposição dos cílios da fileira de CCI, na espira basal e na espira E2, os feixes de células ciliadas estão dispostas regularmente, porém a citoarquitetura dos cílios apresentam um espaçamento maior no padrão V/W. (Figura 9)

Na espira apical os feixes de cílios das CCE se fecham concentricamente, com irregularidade na disposição dos feixes de cílios (Figura 9C). As CCI apresentam falhas no padrão de agrupamento dos cílios, com feixes irregulares, além de apresentarem heterogeneidade no tamanho dos cílios.

Figura 9. Fotomicrografia Eletrônica de Varredura, **grupo controle animal WAR:** **A:** a seta indica falha na fileira CCI em uma espiral basal com magnificação de 1500x; **B:** a seta indica falhas no padrão de agrupamento dos cílios na fileira CCI em uma espira E2 com magnificação de 1500x; **C:** a seta indica tufos de cílios das CCE se fecham concentricamente, com irregularidade na disposição dos feixes de cílios em uma espira apical com magnificação de 1500x; **D:** a seta indica heterogeneidade no tamanho dos cílios da CCI com magnificação de 5000x.

No grupo WAR *kindling* foram observadas falhas na disposição das CCI presença de extranumerárias na espiral basal (Figura 10A), ausência de alguns feixes de CCE irregularidades no padrão de agrupamento ciliar (Figura 10B). Os feixes de CCI apresentavam diferentes tamanhos de cílios (Figura 10C), e visualmente os cílios da E2 se apresentavam balonizados, fechando-se concentricamente (Figura 10D).

Figura 10: Fotomicrografia eletrônica de Varredura, **grupo experimental animal WAR** **A:** a seta indica falhas na disposição das CCI, presença de extranumerárias na espiral basal com magnificação de 1500x; **B:** a seta indica cílios balonizados fechando-se concentricamente na espira E2 com magnificação de 1500x, **C:** a seta indica detalhes de ausência de cílios na fileira de CCI com magnificação de 3500x; **D:** a seta indica detalhes do feixe de cílios balonizados em CCE na espira E2 com magnificação de 3500x.

Por microscopia eletrônica de varredura nos grupos de animais da cepa WAR observou-se uma estrutura irregular nos feixes estereocílios das CCE e as CCI. Os feixes CCE foram ligeiramente desorientados e menores, com bordas laterais dobradas e um pólo apical arredondado (Figura 10D). A fileira de CCI aparentava ser descontínua, menos rígida e mais esparsa.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo é o resultado inicial da interação entre o Laboratório de Neuroetologia e Neurofisiologia do Departamento de Fisiologia e do Laboratório de Neurobiologia da Audição do Departamento de Otorrinolaringologia, em uma colaboração entre pesquisa básica experimental e clínica na tentativa de elucidar o papel da via auditiva periférica no mecanismo de desenvolvimento da epilepsia audiogênica. Ainda não existem relatos na literatura sobre a caracterização da ultraestrutura da orelha interna em animais da cepa audiogênica WAR.

Diferentes modelos de epilepsia audiogênica em ratos demonstraram alterações na ultraestrutura das células ciliadas. Estes animais são úteis para estudo translacional (potencial clínico e patológico, correlações e abordagens terapêuticas), pois apresentam aberrações em suas células ciliadas externas e internas, na superfície da membrana tectória e na membrana basilar.

Uma possível relação foi descrita Christopher e Smith (2003) no qual mecanismo patológico da epilepsia audiogênica poderia estar relacionado aos detalhes de transdução de sinal e da participação de mecanismos de propagação do som na sensibilidade do órgão acústico periférico.

De acordo com estudo de Freitas et al., (2009) a avaliação funcional e eletrofisiológica da audição de animais de laboratório pode ser feita utilizando método bem simples como o reflexo de Preyer e também métodos mais sofisticados como EOAPD e PEATE.

Neste sentido Freitas et al., (2009) define a EOAPD como um método de avaliação auditiva que representam a função das células ciliadas externas.

A relação entre alterações de orelha média a redução nas respostas das EOAPD dos animais da cepa WAR foi verificada com o decréscimo da amplitude em todas as frequências e alterações nas células ciliadas internas e externas da cóclea visualizadas por meio da MEV. As EOAs destes animais apresentaram redução de amplitude de resposta em todas as frequências analisadas e a configuração do “DP GRAM” foi de entalhe entre 3,0 KHz e 4,0 KHz.

Para Brown e Abbas (1987) a avaliação eletrofisiológica mensurada pelos potenciais evocados auditivos tem demonstrado ser suficientemente sensível para as alterações periféricas, com destaque a utilização deste exame como uma ferramenta para estudar a seletividade de frequência auditiva.

O PEATE é um procedimento não invasivo e indispensável no auxílio da avaliação otoneurológica, tanto nos modelos animais como no homem. (VASCONCELOS et al., 2008)

O uso do PEATE tem sido largamente empregado para estudo da ototoxicidade por cisplatina em roedores, não havendo uma padronização da técnica de exame entre os autores. No estudo de Freitas et al., (2009) foi elucidado um traçado de PEATE em ratos Wistar com identificação de 5 a 7 ondas, considerando que a onda II teve a maior amplitude.

Na avaliação dos animais do nosso experimento foi possível verificar a formação de 5 ondas ao longo da via auditiva em um intervalo de 10 ms. Assim como em outros roedores, a onda V não foi constante em todos os animais avaliados, além de ser a primeira onda a desaparecer com o decréscimo na intensidade do estímulo.

Shaw (1988) considera que existe uma diferença significativa no traçado das ondas quando comparado a morfologia do PEATE em humanos e em animais de laboratório como o rato. Contudo existe equivalência do local de origem das 4 ondas encontradas no PEATE dos modelos animais existentes e a dos humanos: onda I gerada no nervo auditivo, onda II próxima ao núcleo coclear, onda III no complexo olivar superior e a onda IV no colículo inferior e suas integrações sinápticas.

Deste modo a avaliação eletrofisiológica com o uso do PEATE em ratos podem ser úteis para a determinação a sincronização neural das vias auditivas central e periférica. Para a obtenção do limiar foi utilizado o critério da reprodutibilidade, ou seja, a mínima intensidade na qual foi possível identificar o traçado das ondas. Os resultados obtidos na avaliação eletrofisiológica e funcional dos animais da cepa WAR por meio do PEATE, EOAPD mostraram correlação com os dados da MEV, uma vez que foi possível relacionar as alterações auditivas com a ultraestrutura anatômica das células cocleares, referentes às CCEs responsáveis pela amplificação coclear e também, sobretudo nas CCI que atuam como transdutores mecânico-neurais, sendo responsáveis pela transdução sensorial, produzem uma mensagem elétrica codificada que é enviada através de toda a via auditiva até as vias nervosas o córtex específico no lobo temporal.

De acordo com Poletaeva, I.I. et al. (2011) a integridade funcional e morfológica do órgão acústico periférico parece ser muito importante para o

desenvolvimento de epilepsia audiogênica. A estrutura de mamíferos proporciona à cóclea alta sensibilidade auditiva na faixa de frequência alta (DALLOS, 1992).

Estudos de Fuentes et al., (2005) em animais hamsters audiogênicos da cepa GPG / Vall sugerem a existência de anormalidades cocleares com base na avaliação da morfologia do órgão de Corti, incluindo a presença de células ciliadas interna e externas. O estudo revela que os animais hamsters audiogênicos da cepa GPG / Vall apresentavam falhas nas CCE, mas não em CCI, sugerindo a presença de uma cóclea alterada nos animais epiléticos.

Alterações morfológicas e funcionais na periferia da via auditiva estão relacionadas à epilepsia audiogênica em roedores, embora esta relação não seja simples (ROSS; COLEMAN, 2000). Poderia ser mencionado, por exemplo, que o IGF-1 (insulin-like growth factor-1 ou somatomedina C) que desempenha um papel importante na cóclea intra-uterina e início de desenvolvimento pós-natal, embora houvessem indicações de que os defeitos de desenvolvimento da cóclea de IGF-1 nocautes são acompanhados por convulsões audiogênicas (CAMARERO et al., 2001).

Em camundongos mutantes - Bronx waltzer (BV / BV) - a perda de 75% das CCI causa somente a elevação moderada de limiar auditivo (SCHROTT et al., 1989). Esses fatos poderiam significar que o gene nocaute específico atua seletivamente dentro das células da cóclea poupando os elementos neurais e, assim, suas consequências não interferem nas conexões das CCE com a realimentação do núcleo olivar.

Ao mesmo tempo, os processos que iniciam os danos cocleares presumivelmente envolvendo deficiências de inervação também foram acompanhados por epilepsia audiogênica. O desenvolvimento da epilepsia audiogênica após a exposição precoce ao som alto, injeções de canamicina ensurdecedoras ou tóxicas, idade pós-natal precoce não induziram ao dano coclear. Assim, o condicionamento é necessário e suficiente para alterar a atividade da rede neuronal acústica (PIERSON; LI, 1996).

Penny et al. (1983) descreveram a cepa de GEPRs que são geneticamente suscetíveis a ataques, sendo que as anormalidades cocleares anteriores são, provavelmente, defeitos de desenvolvimento geneticamente induzidos. É provável que o alongamento irregular de estereocílios e falhas nos feixes de células ciliadas podem ser ocasionados por distorções nas espiras e representam uma falha de

mecanismos compensatórios. Com isso, pode-se especular que as anormalidades cocleares participem tanto na susceptibilidade como na intensidade de convulsões audiogênicas.

Faingold et al. (1990), observaram déficits auditivos em animais susceptíveis a crises audiogênicas na cepa GEPR. A crise audiogênica pode ser induzida em animais normais por tratamentos que lesam a cóclea. Os autores ainda relacionam o déficit auditivo e a severidade da crise, ou seja, a elevação nos limiares auditivos ao aumento da gravidade da crise, porém quando ocorre um déficit auditivo em um determinado nível, ocorre uma redução na gravidade da crise.

Por microscopia eletrônica de varredura observou-se uma estrutura irregular nos feixes de estereocílios das CCE e CCI. Os tufo ciliares das CCE foram ligeiramente desorientados e menores, com bordas laterais dobradas e um pólo apical arredondado. A fileira de CCI aparentavam menor rigidez e organização mais esparsa. As observações mais marcantes na estrutura das células ciliadas em nível de microscopia eletrônica de varredura foram as alterações no tamanho, organização, forma e número reduzido de tufo ciliares, sendo estes achados descritos em outras cepas de animais audiogênicos e potencialmente envolvidos na epilepsia audiogênica como no estudo de CHARIZOPOULOU, N. et al. (2011).

Através deste estudo, podemos sugerir que anomalias em células ciliadas de animais da cepa WAR podem estar relacionadas ao déficit auditivo observado em animais de cepas audiogênicas e com a severidade da crise. Por outro lado, as alterações nas CCE podem interferir nos mecanismos de modulação inibitória estabelecido pelo sistema eferente medial que termina sobre estas células (LIBERMAN, 1989), ainda sendo influenciado pela exposição ao estímulo acústico no qual estes animais são submetidos. Sendo essas células parte integrante de um órgão auditivo periférico, inferimos que na avaliação auditiva destes animais ocorre uma deficiência funcional e qualitativa na ultraestrutura coclear em animais propensos à epilepsia audiogênica. Não obstante, é necessário realizar estudos sobre o sistema eferente para comprovar esta hipótese.

Os mecanismos de transdução podem estar prejudicados em animais WAR, o que pode ajudar a explicar as alterações na relação sinal-ruído observadas no registro das EOAPD, já que as CCI e CCE que recebem eferências de estruturas centrais como o complexo olivar superior e o colículo inferior, reduzindo as contrações rápidas das mesmas. O simples aumento no limiar auditivo detectado

pelo PEATE, a alteração na atividade das CCE pela distorção ciliar e a perda dos mecanismos de defesa representados pela redução na amplitude das OEAPD (relação sinal ruído), indicam que a perda auditiva nos animais audiogênicos causada pelo estímulo sonoro intenso contribuem para a redução no número de crises com o passar dos dias de *kindling* audiogênico, mantendo as crises límbicas que estariam relacionadas a alterações centrais próprias da cepa WAR e que merecem ser investigados.

Estes achados podem auxiliar a desvendar os mecanismos envolvidos em crises epiléticas audiogênicas e permitir o estudo de novas medidas terapêuticas às crises epiléticas relacionadas a alterações auditivas. De forma mais específica, eles abrem a possibilidade para interferir diretamente nos elementos envolvidos no mecanismo de transdução ou ainda monitorar o efeito de potenciais eletrofisiológicos na expressão desses elementos.

Futuros estudos permitirão correlacionar os mecanismos aqui descritos com alterações em outras doenças que podem desencadear crises epiléticas.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As alterações morfológicas e funcionais encontradas na CCI e CCE da orelha interna em animais da cepa WAR sugerir que anomalias em células ciliadas de animais da cepa WAR podem estar relacionadas ao déficit auditivo observado em animais de cepas audiogênicas e com a severidade da crise. Sendo essas células parte integrante de um órgão auditivo periférico, inferimos que na avaliação auditiva destes animais ocorre uma deficiência funcional e qualitativa na ultraestrutura coclear em animais propensos a epilepsia audiogênica quando comparados aos controles.

A) O limiar auditivo detectado pelo PEATE dos animais da cepa WAR foram maiores quando comparados aos seus respectivos controles. Houve um aumento no limiar auditivo dos animais da cepa WAR após o período de abasamento audiogênico.

B) Houve redução significativa na amplitude das EOAPD (relação sinal ruído) no grupo de animais da cepa WAR quando comparados aos controles que não receberam o estímulo acústico; houve uma alteração na atividade das células ciliadas externas pela distorção ciliar e a perda dos mecanismos de defesa representados pela redução na amplitude das EOAPD (relação sinal ruído).

C) Por microscopia eletrônica de varredura observou-se uma estrutura irregular nos feixes de estereocílios das CCE e CCI. Os tufo ciliares das CCE foram ligeiramente desorientados e menores, com bordas laterais dobradas e um pólo apical arredondado. A fileira de CCI aparentavam menor rigidez e organização mais esparsa. As observações mais marcantes na estrutura das células ciliadas em nível de microscopia eletrônica de varredura foram as alterações no tamanho, organização, forma e número reduzido de tufo ciliares.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- BONALDI, L. V. et al. Anatomia Funcional do Sistema Vestibulococlear: In.: FROTA, S. Fundamentos em Fonoaudiologia – Audiologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1998. p. 1-17.
- BROOKS-KAYAL, A.R.; RAOL, Y.H.; RUSSEK, S.J. Alteration of epileptogenesis genes. **Neurotherapeutics**, v.6, p.312–318, 2009.
- BROWN, C.J., ABBAS, P.J. A comparison of AP and ABR tuning curves in the guinea pig. **Hearing Research**, v.25, n. 2-3, p. 193-204, 1987.
- BROWNELL, W. E. Outer hair cell electromotility and otoacoustic emissions. **Ear and Hearing**, v. 11. n.2, p. 82-92, 1990.
- CAMARERO, G. et al. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, vol.21, n.19, p. 7630–7641, 2001.
- CARVALHO, L.E.D. Participação dos receptores GABAA no potencial excitatório pós-sináptico em hipocampo e amígdala de ratos Wistar audiogênicos (WAR). 95 f. 2007. Dissertação em Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- CHARIZOPOULOU, N. et al. Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. **Nature Communications**, v.2, n.15, p. 2: 201, 2011.
- CHRISTOPHER, K. E.; SMITH, D.W. Protection from acoustic trauma is not a primary function of the medial olivocochlear efferent system. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v.4, p. 445-465, 2003.
- DAILEY, J.W. et al. Neurobiology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsy Research**, v.3 , p.3-17, 1989.
- DAILEY, J. W. et al. Serotonergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naïve genetically epilepsy-prone rats. **Life Sciences**, v.50, p. 319–326, 1992.
- DALLOS, P. The active cochlea. **Journal of Neuroscience**, v.12, p.4575–4585, 1992.
- DORETTO, M.C. et al. Dipyrone, a novel anticonvulsant agent? Insights from three experimental epilepsy models. **Neuroreport**. v.9, n.10, p.2415-21, 1998.
- DORETTO, M.C. et al. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar Audiogenic Rat strain (WARS). **Behavior Genetics**, v.33, p. 33-42, 2003.
- DORETTO, M.C. et al. Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats. **Epilepsia**, v.50, n.12, p. 2563-2574, Dec, 2009.

- ENGEL, J. Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology. **Epilepsia**, v.42, n.6, p.796-803, 2001.
- FAINGOLD, C.L. et al. Audiogenic seizure severity and hearing deficits in the genetically epilepsy-prone rat. **Experimental Neurology**, v.108, p. 55-60, 1990.
- FAINGOLD C.L. Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. **Advances in Neurology**, v.79, p.311-321, 1999.
- FERES, M.C. L. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Plasticidade do sistema auditivo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 67, n. 5, Set. 2001.
- FISHER, R. S. Animal model of epilepsies. **Brain Research Review**, v.14, p.247-248, 1989.
- FREITAS, M.R. et al. O papel da apoptose na ototoxicidade por cisplatina em ratos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.75, n.5, p.745-52, 2009.
- FUENTES-SANTAMARIA, V. et al. Morphologic and Neurochemical Abnormalities in the Auditory Brainstem of the Genetically Epilepsy-prone Hamster (GPG/Vall). **Epilepsia**, v.46, n.7, p.1027–1045, 2005.
- GALVIS-ALONSO, O.Y.; OLIVEIRA, J.A.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in Wistar Audiogenic Rats (WAR strain). **Neuroscience**; v.125, p.787–802, 2004.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M.C.; LOBO, R.B. Genetic selection of Wistar rats susceptible to audiogenic seizures: a quantitative analysis. **Epilepsia**, v.31, p.815, 1990.
- GARCIA-CAIRASCO, N. AND TERRA, V.C., Differential participation of inferior colliculus subnuclei in the NMDA-dependent audiogenic seizures elicitation, **Society for Neuroscience Abstract**, v.18 ,p.909, 1992.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; TERRA, V.C.; DORETTO, M.C. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. **Behavioral Brain Research**, v.58, p.57-67, 1993.
- GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Neuroethological and morphological (Neo –Tim staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, v.26, p.177-192, 1996.
- GARCIA-CAIRASCO, N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. **Hearing Research**, v.168, p.208-222, 2002.
- GODDARD, G.V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature** , Londres, v.214, p. 1020–1021, 1967.

- HYPPOLITO, M. A.; OLIVEIRA, J. A. A.; LESSA, R. M.; ROSSATO, M. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n.3, p.268-273, 2005.
- HENRY, K.R. Audiogenic seizure susceptibility induced in C57BL-6J mice by prior auditory exposure. **Science**, v.158, n.803, p.938-940, 1967.
- HUDSPETH, A.J.; CHOE, Y.; MEHTA, A.D.; MARTIN, P. Putting ion channels to work: Mechanoelectrical transduction, adaptation, and amplification by hair cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.11765–11772, 2000.
- KELLY, J.P.: HEARING. IN: KANDEL, R.E.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. (ED). Principles of Neural Science, Elsevier, New York, p.481-499, 1991.
- KEMP, D.T. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. **Journal of the Acoustical Society of America**, v.64, p.1386–1391, 1978.
- KIESMANN, M. et al. Audiogenic seizures in Wistar rats before and after repeated auditory stimuli: clinical, pharmacological, and electroencephalographic studies. **Journal of Neural Transmission**, v.72, p.235–244, 1988.
- KRUSHINSKI, L.V. Etude physiologique des differents types de crises convulsives de l'épilepsie audigene du rat. **Colloques Internationaux du CNRS**, no. 112, Psychophysiologie, Neuropharmacologie et Biochimie de la Crise Audigene. Editions du CNRS, Paris, pp. 71-92, 1963.
- KRUSHINSKY, L. V. et al. The functional state of the brain during sonic stimulation. In: WELCH, B.; WELCH, A. **Physiological effects of noise**. New York: Plenum Press, p. 151-148, 1970.
- LONSBURY-MARTIN, B.L. et al. Distortion product emissions in humans. In Basic properties in normally hearing subjects. **Annals of Otology, Rhinology and Laryngology**. v.99, p.3-14, 1990.
- LORENTE DE NÓ, R. Anatomy of the eighth nerve. The central projection of the nerve endings of the internal ear. **Laryngoscope**, v.43, p.1-38, 1933.
- MALMIERCA, M.S. The structure and physiology of the rat auditory system: an overview. **Int International Review of Neurobiology**, v.56, p.47-211, 2003.
- MARESCAUX, C. et al. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. **Experimental Neurology**. v.97, p.160-168, 1987.
- MARTIN, G. K., STAGNER, B. B. AND LONSBURY-MARTIN, B. L. Assessment of Cochlear Function in Mice: Distortion-Product Otoacoustic Emissions. **Current Protocols in Neuroscience**. 8.21C.1–8.21C.18, 2006.
- MORAES, M.F.D.; GALVIS-ALONSO, O.Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research**, v.39, n.3, p.251-9, 2000.

MORATA, T. C.; SANTOS, U. P. S. Anatomia e Fisiologia da Audição. In.: MATOS, M. P. et al. Ruído Riscos e Prevenção. São Paulo: Ed.Hucitec, p. 35, 1994.

MOUNTAIN, D.C. Changes in endolymphatic potential and crossed olivocochlear bundle stimulation alter cochlear mechanics. **Science**, v. 210, p.71–72, 1980.

NARITOKU, D.K. et al. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. **Experimental Neurology**, v.115, n.3., p.317-324, Mar,1992.

PARKINS, C. W. Cochlear Implant: A Sensory Prosthesis Frontier. **Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 2, n.2, p.18-27, 1983.

PENNY, J.E. et al. Cochlear morphology of the audiogenic-seizure susceptible (AGS) or genetically epilepsy prone rats (GEPR). **Acta Oto-Laryngologica**, v.95, p. 1-12, 1983.

PEREIRA, M.G. et al. Inhibition of the renin–angiotensin system prevents seizures in a rat model of epilepsy. **Clinical Science**, v.119, p. 477–582, 2010.

PIERSON, M.; LI, D. Cochlear integrity in rats with experimentally induced audiogenic seizure susceptibility. **Hearing Research**, v.101, n.1-2, p. 7-13,1996.

POLETAEVA, I.I. et al. Audiogenic Seizures-Biological Phenomenon and Experimental Model of Human Epilepsies. **Clinical and Genetic Aspects of Epilepsy**, p. 978-953, 2011.

RACINE, R.J. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizures. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**,v 32, n. 3, p.281-294, 1972.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. Dissertação (Mestrado). **Investigação neuroquímica em hipocampus de ratos com epilepsia audiogênica**. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ROSS, K. C.; COLEMAN, J. R. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p. 639-653, 2000.

ROSSETTI, F.et al. Behavioral and EEG effects of GABAEpilepsia audiogênicargic manipulation of nigrotectal pathway in the Wistar audiogenic rat strain. **Epilepsy and Behavior**, v. 242, p. 191-199, 2011.

SHAW, N.A. The Auditory Evoked Potential in the Rat - a Review. **Progress in Neurobiology**, v.31, p.19-45, 1988.

SCHROTT, A.; STEPHAN, K.; SPOENDLIN, H. Hearing with selective inner hair cell loss. **Hearing Research**, v.40, n.3, p. 213-219, 1989.

SCHROTT, A.; PUEL, J.L.; REBILLARD, G. Cochlear origin of 2f1,-f2, distortion products assessed by using two types of mutant mice. **Hearing Research**, v. 52, p.245–253, 1991.

SIEGEL, J.H.; KIM, D.O. Efferent neural control of cochlear mechanics? Olivocochlear bundle stimulation affects cochlear biomechanical nonlinearity. **Hearing Research**, v. 6, p.171–182, v. 1982.

SNYDER-KELLER, A. M.; PIERSON, M. G. Audiogenic seizures induce c-fos in a model of developmental epilepsy. **Neuroscience Letters**.v.135, p. 108–112. 1992.

TSUTSUI, J. et al. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus: I. Effects of midcollicular knife cuts. **Behavioural Brain Research**, v.52, p.7–17,1992.

VASCONCELOS, C.A.C. et al. Efeitos das variações de polaridades nos potenciais evocados auditivos de ratos durante o desenvolvimento. **Neurobiologia**, v.71, n.3, p.67-73, jul/set, 2008.

VERGNES, M. et al.Kindling of audiogenic seizures in the rat. **International Journal of Neuroscience**, v.36, p.167–76, 1987.

VILELA, M. R. S. P. Avaliação dos efeitos do peptídeo natriurético atrial sobre a susceptibilidade de crises audiogênica e induzida por pentilenotetrazol. Tese (Doutorado em Fisiologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2012.

WEBSTER, W. R. et al.Uncrossed and crossed inhibition in the inferior colliculus of the cat: a combined 2-deoxyglucose and electrophysiological study. **Journal of Neuroscience**, v. 5, n.7, p.1820-1832, 1985.

WHITEHEAD, M.L.; LONSBURY-MARTIN, B.L.; MARTIN, G.K. Evidence for two discrete sources of 2f1-f2 distortion-product otoacoustic emission in rabbit: I. Differential dependence on stimulus parameter. **Journal of the Acoustical Society of America**, v.91, n.3, p. 1587-607, 1992.