

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GLEICE CRISTINA COLOMBARI

Otoproteção à lesão pelo ruído: Efeitos da Oxigenoterapia Hiperbárica e Corticoide.

Ribeirão Preto

2011

GLEICE CRISTINA COLOMBARI

Otoproteção à lesão pelo ruído: Efeitos da Oxigenoterapia Hiperbárica e Corticoide.

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 dos Sistemas Visual e Áudio-Vestibular.

Orientação: Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppolito.

Apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o processo de nº 2009/06760-1

Ribeirão Preto

2011

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 à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Colombari, Gleice Cristina

Otoproteção à lesão ao ruído: Efeitos da Oxigenoterapia Hiperbárica e Corticoide. Ribeirão Preto, 2011.

109 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos dos Sistemas Visual e Áudio-Vestibular.

Orientador: Hyppolito, Miguel Ângelo.

1. Otoproteção. 2. Trauma acústico. 3. Oxigenoterapia Hiperbárica. 4. Corticoterapia.

COLOMBARI, G. C. **Otoproteção à lesão pelo ruído: Efeitos da Oxigenoterapia Hiperbárica e Corticoide.** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em: ____ de _____ de 2011.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais **José Manoel Colombari**

e **Rosa Maria Clagnan Colombari**

...meus orientadores na Universidade da Vida...

Aos meus irmãos **Viviane Colombari Pedrazzini dos Santos**

e **José Manoel Colombari Filho**

...pelo amor e exemplo...

Ao **Marcos Aurélio Pedrazzini dos Santos**

e a **Elisângela A. Suzigan Colombari**

...pelo carinho e amizade.

DEDICO

A Deus,

...com imensa gratidão e compreensão do abrir e fechar portas em Seu tempo...

“Tudo tem o seu tempo determinado...” (Eclesiastes 3:1-8)

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppolito e ao Prof. Dr. Omar Feres, pela orientação, pelos ensinamentos e incentivo em todos os momentos.

Ao Dr. José Manoel Colombari Filho pela laboriosa colaboração e inestimável ensino.

À Maria Rossato e à Adriana de Andrade B. Murashima, pela convivência e valioso auxílio na condução dos experimentos.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço e à Marlene Lúcio Gonzalez do Serviço de Coloproctologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia.

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 Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudo.

Às amigas Carolina Kotchetkoff Henriques, Fga. Carolina Trebi Penatti, Fga. Isabel Cristina Sabatini Perez e Carolina Bortolatti Vaccari pela amizade e apoio.

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

O que me tranquiliza
É que tudo o que existe,
Existe com a precisão absoluta.
O que for do tamanho
De uma cabeça de alfinete
Não transborda nem uma
Fração de milímetro
Além do tamanho de uma
Cabeça de alfinete.

Tudo o que existe é de uma grande
Exatidão

Pena é que a maior parte
Do que existe
Com essa exatidão
Nos é tecnicamente invisível.

O bom é que a verdade
Chega a nós
Como um sentido secreto das coisas,
E nós terminamos adivinhando,
Confusos,
A perfeição.

Clarice Lispector

RESUMO

COLOMBARI, G. C. **Otoproteção à lesão pelo ruído: Efeitos da Oxigenoterapia Hiperbárica e Corticoide**. 2011. 80 f. - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

As investigações sobre os efeitos da oxigenoterapia hiperbárica (OHB) em lesão por ruído são escassas e apontam para diferentes efeitos em função do momento de intervenção. Dentre os trabalhos já descritos foi observado efeito lesivo da OHB quando aplicada imediatamente ao trauma acústico, contudo, efeito positivo foi observado quando aplicada após 2 e 6 horas. Com relação aos tratamentos usados para trauma acústico, alguns estudos descrevem o uso de corticoides como melhor alternativa, mas recentemente estudos apontam para a sua combinação com OHB como a terapêutica com maior benefício nas lesões por ruído. O presente estudo teve como objetivos avaliar o momento da intervenção pela OHB após 2, 4 e 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído e avaliar a associação terapêutica entre a OHB e corticoterapia (CT). Cobaias albinas foram expostas a um ruído branco na faixa de 4 kHz com intensidade igual a 110dB NPS por 72h e divididas em cinco grupos terapêuticos: OHB com início após 2, 4 e 6h de repouso auditivo após exposição ao ruído, CT isolada e OHB após 6 horas de repouso associada a CT. O tratamento durou 5 dias, sendo uma sessão terapêutica por dia. Todos os animais tiveram a função auditiva avaliada pelo Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) e pelas Emissões Otoacústicas Produtos de Distorção (EOAPD) em três momentos: pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento. Após a eutanásia dos animais e preparação dos espécimes cocleares, todas as cócleas foram analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Não houve diferença estatística significativa entre os momentos de intervenção pela OHB após 2, 4 e 6 horas, contudo, os dados de MEV demonstraram que uma maior otoproteção ocorreu quando a intervenção foi realizada após um maior repouso auditivo. Apesar da não diferença estatística significativa, os achados anatômicos e funcionais permitiram concluir que a associação terapêutica entre a OHB e a corticoterapia desempenhou um melhor efeito otoprotetor e terapêutico se comparada a essas mesmas terapias isoladas.

PALAVRAS CHAVE: Trauma acústico, Otoproteção, Corticoterapia e Oxigenoterapia Hiperbárica

ABSTRACT

COLOMBARI, G. C. **Otoprotection against acoustic trauma: Effects of hyperbaric oxygen therapy and corticoid.** 2011. 80 f. - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Investigations on the effects of hyperbaric oxygen therapy (HBOT) in noise injury are scarce and point to different effects depending on the time of intervention. Among the work already described has been observed damaging effect of HBOT when applied immediately after the acoustic trauma, however, positive effect was observed when applied after 2 and 6 hours of rest after the trauma. Studies describe the use of corticosteroids as the best alternative to treat acoustic trauma, but recent studies point to their combination with HBOT as the major benefit in lesions by noise. This study aimed to evaluate the time of intervention by HBOT after 2, 4 and 6 hours of rest after hearing noise exposure and to evaluate the association between HBOT and corticoid. Female guinea pigs were exposed to a white noise on 4kHz at 110dB SPL during 72 hours and divided into five treatment groups: HBOT after 2, 4 and 6 hours of rest after the noise exposure, corticosteroid therapy and HBOT combined with corticoid.

The treatment lasted five days, being a therapy session per day. All animals were exposed to Distortion Product Otoacoustic Emissions (DPOAE) and Auditory Brainstem evoked Response (ABR) in three moments: before and after exposure to the noise and after the treatment. All cochleae were examined by scanning electron microscopy (SEM). There was no statistically significant difference between the moments of intervention by HBOT after 2, 4 and 6 hours, however, the SEM data showed that a greater otoprotection occurred when the intervention was performed after a higher auditory rest. Although not statistically significant, the anatomical and functional findings concluded that the association between HBOT and corticosteroid therapy played a better otoprotective and therapeutic effect compared to those same therapies alone.

KEY WORDS: acoustic trauma, otoprotection and hyperbaric oxygen therapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagens dos equipamentos utilizados para a realização dos exames de Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico e Emissões Otoacústicas Evocadas Produto Distorção (A) e Caixa acústica com a sonda das Emissões Otoacústicas Evocadas Produto Distorção (B).....52
- Figura 2 - Representação esquemática da condução dos experimentos realizados.55
- Figura 3 - Imagens da Caixa de Isolamento Acústico (A) e do Gerador de Sinais de Áudio (B, Grupo Insight®) utilizados neste trabalho.....56
- Figura 4 - Imagem da Câmara Hiperbárica Experimental.....58
- Figura 5 - Imagem do Microscópio Eletrônico JEOL SCANNING MICROSCOPE - JSM 5200.....59
- Figura 6 - Médias da variável relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção para cada frequência (kHz) para os momentos de avaliação pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento em cada uma das respectivas situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído).....67
- Figura 7 - Médias da amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, para as situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído), para cada frequência (kHz).....70
- Figura 8 - Médias da variável limiar eletrofisiológico para os momentos de avaliação pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento em cada uma das respectivas situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído).....72
- Figura 9 - Médias da variável relação entre sinal e ruído (SR) das emissões otoacústicas produto de distorção para cada frequência (kHz) para os momentos de avaliação pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento em cada uma das respectivas situações (corticoide, OHB e OHB + corticoide, sendo OHB oxigenoterapia hiperbárica).....78

- Figura 10 - Médias da amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, para as situações (corticoide, OHB e OHB + corticoide, sendo OHB oxigenoterapia hiperbárica), em cada frequência (kHz).....80
- Figura 11 - Médias da variável limiar eletrofisiológico para os momentos de avaliação pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento em cada uma das respectivas situações (corticoide, OHB e OHB + corticoide, sendo OHB oxigenoterapia hiperbárica).....82
- Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de oxigenoterapia hiperbárica (1 sessão/dia) com início terapêutico após 4 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical.....88
- Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de oxigenoterapia hiperbárica (1 sessão/dia) com início terapêutico após 4 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical.....90
- Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de oxigenoterapia hiperbárica (1 sessão/dia) com início terapêutico após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical.....91
- Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de corticoterapia (10mg/kg/dia) com início terapêutico 2 horas após exposição ao ruído. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical.....97

Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de corticoterapia (10mg/kg/dia) associada a oxigenoterapia hiperbárica (1 sessão/dia) com início terapêutico 6 horas após exposição ao ruído.. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical.....100

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Esquema da análise de variância com fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e teste F.....60
- Tabela 2 - Valores adequados da estatística de F de Snedecor, para os efeitos de tratamentos, visando atingir determinada acurácia (Ac), e as categorias de previsão requerida (Resende e Duarte, 2007).....63
- Tabela 3 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para as variáveis: relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR) e limiar auditivo eletrofisiológico (Limiar, em dB). Médias para os momentos de avaliação pré-ruído e pós-ruído.....64
- Tabela 4 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para a variável relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), em cada frequência (kHz) e em cada uma das respectivas situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído).....66
- Tabela 5 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), entre pós-tratamento e pré-ruído, para as situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído), para cada frequência (kHz).....68

- Tabela 6 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), entre pós-tratamento e pós-ruído, para as situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído), para cada frequência (kHz).....69
- Tabela 7 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para a variável limiar eletrofisiológico (Limiar, em dB) em cada uma das respectivas situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído).....71
- Tabela 8 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude do limiar auditivo eletrofisiológico (em dB), de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, para as situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído) e as suas respectivas médias de amplitude....73
- Tabela 9 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para a variável relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), em cada frequência (kHz) e em cada uma das respectivas situações (corticoide, OHB e OHB + corticoide).....76
- Tabela 10 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), entre pós-tratamento e pré-ruído, para as situações (corticoide, oxigenoterapia hiperbárica e oxigenoterapia hiperbárica+corticoide), em cada frequência (kHz).....78

- Tabela 11 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), entre pós-tratamento e pós-ruído, para as situações (corticoide, oxigenoterapia hiperbárica e oxigenoterapia hiperbárica+corticoide), em cada frequência (kHz).....79
- Tabela 12 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para a variável limiar eletrofisiológico (Limiar, em dB) em cada uma das respectivas situações (corticoide, OHB e OHB+corticoide).....81
- Tabela 13 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude do limiar auditivo eletrofisiológico (em dB), de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, para as situações (corticoide, OHB e OHB+corticoide) e as suas respectivas médias de amplitude.....83

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Caracterização do padrão ciliar coclear dos espécimes observados pela microscopia eletrônica de varredura das situações de tratamento após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído.....92
- Quadro 2 - Caracterização do padrão ciliar coclear dos espécimes observados pela microscopia eletrônica de varredura das situações de tratamento pela oxigenoterapia hiperbárica, corticoterapia e associação da oxigenoterapia hiperbárica com a corticoterapia.....100

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	37
2 OBJETIVOS.....	40
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 Material.....	50
4.2 Obtenção das variáveis dependentes.....	51
4.2.1 Emissões Otoacústicas Evocadas Produto Distorção.....	52
4.2.2 Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico.....	53
4.3 Condução dos experimentos e variáveis independentes.....	54
4.3.1 Trauma Acústico.....	56
4.3.2 Oxigenoterapia Hiperbárica e Corticoterapia.....	57
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	58
4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Oxigenoterapia hiperbárica (Experimento 1).....	66
5.2 Corticoterapia e Oxigenoterapia Hiperbárica (Experimento 2).....	76
5.3 Análises descritivas da microscopia eletrônica de varredura.....	87
5.3.1 Espécimes cocleares do experimento 1.....	87
5.3.2 Espécimes cocleares do experimento 2.....	96
6 CONCLUSÕES.....	103
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

1 INTRODUÇÃO

O trauma acústico (TA) é uma súbita deficiência auditiva neurosensorial pela exposição do órgão auditivo a uma superestimulação acústica, tipicamente por intenso impulso sonoro (YLIKOSKI et al., 2008). Um TA resulta em alterações estruturais, como por exemplo, a ruptura das membranas celulares, redução do fluxo coclear sanguíneo e a destruição de células ciliadas (CCs) da cóclea e/ou dendritos dos neurônios auditivos primários (CHAN; SUNESON; ULFENDAHL, 1998; D'ALDIN et al., 1999; KUOKKANEM; AARNISALO; YLIKOSKI, 2000; ENDO et al., 2005; ÇAKIR et al., 2006).

A biogênese mitocondrial está envolvida na resposta celular à lesão, regulando a capacidade de sobrevivência celular após um dano metabólico (HYDE; RUBEL, 1995). A redução do fluxo coclear sanguíneo acarreta uma diminuição do oxigênio nos fluidos da orelha interna, reduzindo as diversas atividades celulares dependentes do mesmo (KUOKKANEM; AARNISALO; YLIKOSKI, 2000).

Uma sucessão de eventos patológicos é pouco compreendida e pode variar segundo os parâmetros sonoros do trauma. No entanto, a alteração na oxigenação e o decréscimo do fluxo coclear sanguíneo parecem acontecer primeiro, induzindo a um acúmulo de radicais livres na cóclea levando a disfunção celular e morte (THORNE; NUTTALL, 1989; YAMANE et al., 1995; LAMM; ARNOLD, 1996; YAMASHITA et al., 2005).

Uma reversibilidade da perda auditiva tem sido descrita em animais e humanos. Alguns estudos demonstram melhora nas medidas eletrofisiológicas dos

potenciais de ação, de somação e microfônico coclear, assim como a formação de novas células ciliadas externas (CCEs) e/ou reparo das mesmas, apontando para a capacidade de recuperação espontânea, o que sugere um mecanismo de autodefesa. Um reparo sináptico pode acontecer em poucos dias, mas os danos às CCs, com perda da acuidade auditiva, podem persistir (STENGES et al.,1997; D'ALDIN et al.,1999; CARDINAAL et al., 2000a; ÇAKIR et al., 2006).

Por muitos anos, vários tratamentos para o trauma acústico têm objetivado a redução da inflamação e a promoção de oxigenação coclear. Existem muitas drogas aplicadas ao tratamento de trauma acústico. Algumas das atualmente utilizadas são: *hydroxiethyl starch* (H6382), pentoxifilina, betaistina, ginkgo biloba e naftoidrufureno; anti-inflamatórios como a prednisona, diclofenaco de sódio, histamina e receptor antagonista de H1. Algumas terapias podem ser usadas, isoladas ou associadas, para o reparo da microcirculação, como a terapia carbônica, a terapia com oxigênio isobárico e a oxigenoterapia hiperbárica (OHB) (D'ALDIN et al., 1999; LAMM; ARNOLD, 1999, ÇAKIR et al., 2006).

O uso de corticóides demonstrou alguns benefícios em experimentos animais e estudos mais recentes estabeleceram a indicação formal para o uso de glicocorticoides em TA (TAKAHASHI et al., 1996; LAMM; ARNOLD, 1998; TAHERA et al., 2006).

A OHB é uma modalidade terapêutica que consiste na inalação de oxigênio puro, estando o indivíduo submetido a uma pressão maior do que a atmosférica, no interior de uma câmara hiperbárica (FAKHRY; ROSTAIN; CAZALS, 2007). Ela é a forma mais eficiente de aumentar os níveis de oxigênio e favorece o reparo à microcirculação, sendo utilizada para o tratamento de diversas doenças, incluindo a perda auditiva neurossensorial (BAKKER, 1992; TIBBLES; EDELSBERG, 1996).

Estudos apontam a OHB potencializando a corticoterapia (CT) (D'ALDIN et al., 1999; LAMM; ARNOLD, 1999; FAKHRY; ROSTAIN; CAZALS, 2007).

Kuokkanem, Aarnisalo e Ylikoski (2000) e Ylikoski et al. (2008) mostraram que o equilíbrio iônico quando restaurado auxilia as CCs danificadas a sobreviverem ao não suprimento de oxigênio perilinfático. A OHB consiste justamente em prover um suprimento adequado de oxigênio, evitando um estresse oxidativo secundário ao quadro de hipóxia coclear, com eventual morte celular de células inicialmente não lesadas.

Apesar de alguns estudos mostrarem um possível efeito lesivo às CCs cocleares e perigo quanto a aplicação da OHB em TA, existem poucos trabalhos investigando tais efeitos (D'ALDIN et al., 1999; ÇAKIR et al., 2006).

Nas últimas décadas, apesar de ser rotineiramente utilizada no tratamento de TA em militares dos países da União Européia, o efeito da OHB para tal fim ainda é pouco estudado, necessitando maiores investigações científicas (BAKKER, 1992; D'ALDIN et al., 1999; LAMM; ARNOLD, 1999; ÇAKIR et al., 2006; YLIKOSKI et al., 2008).

Çakir et al. (2006) realizaram um estudo, em experimentação animal, mais apurado sobre a importância do início da intervenção pela OHB. Os pesquisadores concluíram que a exposição à OHB uma hora após a exposição ao ruído pode ser lesiva e que após 2 horas pode-se notar certo benefício, mesmo que uma reversibilidade total não ocorra. De 2 até 6 horas após exposição ao ruído há um intervalo de 4 horas que deve ser considerado na determinação do momento em que a OHB pode atuar de forma mais efetiva.

2 OBJETIVOS

Essa pesquisa tem por objetivos:

- Avaliar funcional e anatomicamente o momento de intervenção pela OHB após 2, 4 e 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído e;
- Avaliar funcional e anatomicamente a associação terapêutica entre a oxigenoterapia hiperbárica e corticoterapia.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Lamm e Arnold (1998) relatam que a justificativa para a administração de anti-inflamatórios em alterações cocleares induzidas por ruído é baseada no fato de alterações teciduais inflamatórias não serem provocadas apenas por bactérias, vírus ou outros processos imunopatológicos, mas também por danos celulares, hipóxia e isquemia tecidual. Este estudo teve por objetivo avaliar a possível influência dos glicocorticoides, como prednisona, ou agentes não esteróides anti-inflamatórios, como diclofenaco de sódio e receptor antagonista - H1 histamínico, em hipóxia coclear e isquemia progressiva pós-traumática. Os resultados, desta experimentação animal, demonstraram que a perda auditiva induzida por ruído (PAIR) aguda é efetivamente tratada com agentes anti-inflamatórios como glicocorticoide sintético (prednisona) e diclofenaco de sódio.

Lamm e Arnold (1999) tiveram por objetivo estudar o fluxo coclear sanguíneo, a pressão parcial do oxigênio perilinfático, a microfonia coclear, o potencial de ação composto do nervo auditivo e os potenciais evocados auditivo de tronco encefálico (PEATE), antes e depois de realizados os seguintes tratamentos em cobaias expostas a ruído: infusão salina isotônica intravenosa (placebo); drogas promotoras de fluxo sanguíneo (*hydroxiethyl starch* (H6382), pentoxifilina, betaistina, ginko biloba, naftoidrufureno); antiinflamatórios (prednisona, diclofenaco sódico, antagonista histaminérgico H1); oxigenação isobárica e OHB com ou sem suplementos (simultânea infusão solução isotônica, pentoxifilina, prednisona, ou

H6382). Para esse estudo, foram utilizadas cobaias pigmentadas de ambos os sexos, pesando entre 250-350 g, com Reflexo de Preyer normal.

Na OHB, 16 cobaias foram expostas a 2,6 ATA com fluxo de O₂ 100% por 60 minutos. O tratamento começou 60 minutos depois de encerrada a exposição ao ruído e foi estudado por mais 60 minutos. A pressão parcial do oxigênio perilinfático declina de forma simultânea à deterioração da microfonia coclear, do potencial composto do nervo auditivo, e das amplitudes do PEATE depois da exposição ao ruído de banda larga.

O fluxo coclear sanguíneo decresce somente 30 minutos após a exposição ao ruído e diminui com a hipóxia coclear, enquanto que a perda auditiva não mostra sinal de deterioração e não regenera 3 horas depois da exposição.

A hipóxia coclear induzida pelo ruído foi compensada pela oxigenoterapia isobárica e mais efetivamente pela OHB com e sem suplementos, enquanto que os demais tratamentos não tiveram efeito sustentável.

O melhor efeito terapêutico na PAIR foi encontrado na combinação da OHB com prednisona (glicocorticoide), seguido de monoterapia com prednisona ou H6382 com um resultado que não somente regeneraram completamente os potenciais compostos do nervo auditivo, os PEATE, e as microfônias cocleares, mas também mostraram significantes melhora, mesmo que uma regeneração completa não tenha ocorrido.

D'Aldin et al. (1999) propuseram avaliar a eficiência dos tratamentos atualmente utilizados em casos de TA, a saber: Terapia Carbônica, Terapia com Oxigênio Isobárico, OHB e CT, sendo essas terapias usadas isoladamente ou associadas.

Já é sabido que a exposição a um som intenso induz dois tipos de dano: alteração estrutural das CCEs da cóclea e a destruição dos dendritos dos neurônios auditivos primários. Após 5 dias pode ocorrer um reparo sináptico, mas as células lesadas permanecem.

Os efeitos do trauma acústico foram avaliados através de eletrococleografia e as alterações anatômicas das CCEs e células ciliadas internas (CCIs) foram observadas por microscopia eletrônica.

Foram montados grupos com 10 animais. Cada terapia foi realizada por 5 dias e iniciada uma hora após o fim da exposição ao som.

A OHB foi aplicada por 1 hora, 2 vezes por dia, sendo que um grupo com 10 animais foi submetido a 2.5 ATA e um outro grupo com 5 animais foi submetido a 1.5 ATA. Ambos tiveram 2 minutos para estabilizar a pressão antes da terapia e 10 minutos de descompressão.

A CT foi realizada através da administração do medicamento intramuscular uma vez ao dia, e a associação de OHB com CT ocorreu através da aplicação de 20mg/kg de corticóide e OHB com 2.5 ATA.

Na OHB (1.5 e 2.5 ATA), os danos cocleares foram maiores que no grupo controle. A orelha e as três fileiras de CCEs estavam seriamente lesadas.

Quando aplicada somente a CT, foram obtidas significativas melhoras na função e regeneração morfológica e, quando associada à OHB, pode-se concluir que a mesma aperfeiçoou a CT.

Portanto, a terapia com oxigênio ou gás carbônico em ambiente pressurizado não causa benefício à regeneração morfológica e funcional. A OHB quando aplicada

sozinha pode ter um efeito negativo, e a combinação de OHB com CT auxilia na regeneração morfológica e funcional em casos de TA.

Kuokkanem, Aarnisalo e Ylikoski (2000), realizaram um estudo para verificar a possibilidade de limitar o dano morfológico permanente do órgão de Corti e subsequente alteração do limiar, através da OHB em ratos expostos ao intenso ruído de uma arma de fogo.

A exposição excessiva a um som de alta intensidade provoca ruptura das membranas celulares e decresce o fluxo coclear sanguíneo acarretando na diminuição do oxigênio nos fluidos da orelha interna, reduzindo as diversas atividades celulares dependentes do mesmo.

O uso da OHB no tratamento de um TA agudo consiste em prover um suprimento adequado de oxigênio para reduzir a hipóxia, restaurando o equilíbrio iônico e auxiliando as CCs danificadas a sobreviverem ao intervalo de não suprimento perilinfático.

Foram utilizados 48 ratos machos. 38 animais foram expostos a 60 impulsos de 162 dB NPS pelo disparo de uma espingarda. Desses 38 ratos, 15 foram submetidos à OHB por 90 minutos diários durante 10 dias consecutivos a 2.5 ATA. 24 machos foram usados como grupo controle de exposição ao ruído e outros 10 animais não foram expostos ao ruído, sendo, portanto, o grupo controle normal. Após 4 semanas foram realizados exames de PEATE e após eutanasiados tiveram suas cócleas retiradas para análise microscópica.

Após a exposição, houve danos permanentes na cóclea dos animais, sendo grande parte das lesões localizadas na espira basal. Um número significativamente menor de CCs foi perdido no grupo submetido à OHB, e o dano morfológico se

refletiu na função, o que foi demonstrado através dos resultados do PEATE que mostraram grandes alterações em 6, 8 e 10 kHz.

Çakir et al. (2006) avaliaram desde o primeiro instante, através de emissões otoacústicas produtos de distorção (EOAPD), o efeito da OHB na cóclea.

Um TA gera vários danos estruturais que afetam a função auditiva. Devido a uma intensa estimulação sonora da cóclea, dois tipos de danos têm sido propostos: (a) lesões atingindo as CCEs da primeira fileira e lesões das CCIs seguidas de lesões da segunda e da terceira fileiras de CCEs; e (b) destruição massiva dos dendritos dos neurônios auditivos primários. Um reparo sináptico pode acontecer em poucos dias, mas os danos nas CCs, que causa a perda da acuidade auditiva, podem persistir.

Existem muitas drogas para o tratamento de TA, mas todas as terapias existentes visam reparar a microcirculação. A OHB tem sido utilizada para reparar danos à microcirculação e tem sido muito importante no tratamento de muitas doenças.

Vinte e quatro ratos albinos foram divididos em 6 grupos e tiveram suas orelhas direita diretamente expostas a um ruído branco com intensidade igual a 110dBNPS e frequência de 1-12 kHz durante 25 minutos.

O primeiro grupo foi considerado como grupo controle. Em um segundo grupo, a OHB foi iniciada 1 hora após a exposição ao ruído, 2 horas pós-exposição no terceiro grupo, 6 horas pós-exposição no quarto grupo, 24 horas pós-exposição no quinto grupo e 48 horas pós-exposição ao ruído no sexto grupo. Os animais

expostos ao ruído foram avaliados antes da exposição ao ruído, imediatamente depois e no terceiro, sétimo e décimo dia pós-exposição.

Os animais expostos ao ruído tiveram significativo decréscimo em 6 e 8 kHz depois do TA. A avaliação no terceiro dia pós-exposição mostrou o início de certa regeneração em todos os grupos exceto no segundo grupo. Os animais do grupo controle de exposição e o grupo de OHB retornaram aos níveis de pré-exposição no décimo dia pós-exposição, exceto o segundo e o terceiro grupo. E o segundo grupo, teve EOAPD perdidas exceto em 4 kHz. A regeneração dos animais do terceiro grupo foi quase completa no décimo dia pós-exposição. Sendo assim, Çakir et al. (2006) concluíram que o tratamento com OHB imediatamente após o trauma acústico não é necessário, pelo contrário, tem um efeito contrário ao esperado.

Entre as possíveis terapias após um TA, a OHB combinada à corticóides foi efetiva em diversos estudos feitos em animais. Tal evidência foi obtida em perdas moderadas entre 20-25 dB. Por isso, Fakhry, Rostain e Cazals (2007) tiveram por objetivo testar as perdas auditivas com limiares ao redor de 40 dB.

Nesse estudo foram utilizadas 65 orelhas de 36 cobaias adultas. Respostas evocadas auditivamente advindas de eletrodos intracranianos implantados bilateralmente nos núcleos cocleares ventrais das cobaias foram utilizadas para avaliar as alterações acústicas sensitivas.

O trauma sonoro utilizado foi igual a três oitavos de uma faixa de ruído ao redor de 8 kHz presente bilateralmente a 115 dB NPS por 45 minutos.

Os limiares auditivos foram mensurados entre o sexto e o décimo sexto dia pós-trauma acústico.

Um grupo controle não recebeu tratamento, um grupo foi tratado somente com OHB e outro somente com corticóides, ambos tendo o tratamento iniciado um dia após o trauma acústico, dois grupos foram tratados com OHB e corticóides, sendo que um grupo iniciou o tratamento um dia após o trauma e o outro grupo seis dias pós-trauma.

Os animais tratados somente com a OHB ou somente com os corticóides não diferiram dos animais do grupo controle, já a combinação terapêutica entre OHB e corticóides promoveu uma significativa proteção, especialmente quando iniciada um dia pós-exposição ao ruído.

A redução da perda auditiva induzida pela terapêutica de OHB combinada a corticóides foi de similar magnitude (entre 10-15 dB) como nos estudos anteriores, embora a perda auditiva induzida tenha sido consideravelmente maior (valor médio de 40 dB ao invés de 20 dB).

A OHB por ter uma importante atividade antioxidante tem sido amplamente utilizada. Ela consiste na inalação de oxigênio puro, estando o indivíduo submetido a uma pressão maior do que a atmosférica, no interior de uma câmara hiperbárica. É precisamente indicada como um estimulante para a cicatrização e crescimento celular.

Ylikoski et al. (2008) tiveram por objetivo investigar a eficiência da OHB em pacientes com TA, já que a mesma tem sido recentemente indicada para estes casos baseando-se em estudos experimentais que mostraram uma hipóxia coclear secundária a exposição ao ruído, hipóxia esta que poderia ser compensada pela OHB. Vale ressaltar que tais autores, por questões éticas, compararam um grupo de

pacientes submetidos à OHB a um grupo submetido a uma oxigenoterapia isobárica e não a um grupo controle, ou seja, utilizando placebo ou até mesmo sem sequer o uso do mesmo.

Segundo tais autores, o trauma acústico agudo é uma súbita deficiência auditiva neurossensorial devido à uma exposição do órgão auditivo a uma superestimulação acústica, tipicamente por intenso impulso sonoro. Somado a perda auditiva aguda, o trauma acústico agudo é caracterizado pelo aparecimento de zumbido na orelha afetada. Um grande número de indivíduos passa por uma perda auditiva temporária e zumbido em discotecas, eventos esportivos, *shows pop*. Felizmente essa mudança temporária do limiar auditivo (TTS) e zumbido normalmente desaparecem após algumas horas ou dias. Após exposições prolongadas ou apenas uma exposição muito intensa e, portanto, ruído mais nocivo, uma permanente perda auditiva e também um prolongado ou persistente zumbido podem emergir.

Portanto, a exposição a sons ou ruídos fortes deve ser evitada o quanto possível, por exemplo, através do uso de protetores auriculares. No entanto, caso ocorra um trauma acústico agudo, nenhuma droga terapêutica específica tem sido documentada como eficiente tanto contra zumbido como contra a perda auditiva.

Estudos de experimentação animal têm demonstrado que um trauma acústico agudo advindo de uma exposição coclear a ruído intenso provoca uma lesão mecânica com prejuízos principalmente para as CCEs do Órgão de Corti. Além de provocar um dano mecânico, o estresse advindo desta exposição causa uma lesão metabólica nas CCEs e no suprimento dos vasos sanguíneos, o que reduz o teor de oxigênio perilinfático. Contudo, sendo a perilinfa responsável por suprir a necessidade de oxigênio do Órgão de Corti, um quadro de hipóxia no órgão auditivo

ocorre visto que com o trauma há um aumento significativo da demanda de oxigênio perilinfático. Secundária a esta situação, um estresse oxidativo pode ocorrer e até eventuais mortes celulares de células inicialmente não lesadas.

Colombari et al. (2011) avaliaram os efeitos da OHB (2 horas diárias, por 5 dias, à 2.0 ATA) em cobaias submetidas a um TA de 72 horas por um ruído branco na faixa de 4 kHz com intensidade igual a 110 dB NPS). Não foi observada efetividade no tratamento após TA, no entanto, os dados de microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstraram que o tratamento com OHB melhorou o padrão anatômico da lesão reduzindo significativamente o número de CCEs cocleares lesadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para realização deste trabalho, foram utilizadas trinta e três cobaias albinas fêmeas, *Cavia porcellus*, com peso entre 350 e 500 g. Elegeram-se como animal experimental as cobaias fêmeas albinas cicladas em diestro devido à facilidade para o manejo, para a dissecação e manipulação coclear e para a administração de drogas anestésicas pela via intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea.

Todos os procedimentos seguiram as normas para cuidados com animais experimentais, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) (nº 072/2009).

A seleção dos animais ocorreu no biotério central da Universidade de São Paulo - Campus Ribeirão Preto, através da pesquisa do reflexo de Preyer (PREYER, 1882 e JERO; COLING; LALWANI, 2001). Após a seleção as cobaias foram transportadas e mantidas no biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Após 24 horas de repouso auditivo os animais foram reavaliados através de otoscopia manual. Foram descartadas as cobaias com sinais de otite externa ou média aguda, cerume de difícil remoção, alterações inflamatórias do conduto auditivo externo ou mesmo conduto auditivo muito estreito para acomodar adequadamente a sonda do equipamento de Emissões Otoacústicas.

Cada animal foi considerado como portador de 02 cócleas, portanto alterações em pelo menos uma das orelhas foi motivo de descarte.

4.2 Obtenção das variáveis dependentes

As variáveis dependentes avaliadas foram as seguintes:

- **Relação entre sinal e ruído (SR)** das EOAPD, calculada pela diferença, em decibel, entre a resposta das EOAPD e o ruído (ruído ambiental produzido na sala de teste e/ou ruído oriundo de atividades fisiológicas do indivíduo avaliado) e;

- **Limiar auditivo eletrofisiológico (Limiar)**, medido pela estimativa da sensibilidade auditiva determinada pela menor intensidade em que a onda II do PEATE é identificada.

Essas variáveis foram obtidas por meio de dois exames de diagnóstico audiológico: as Emissões Otoacústicas Evocadas Produto Distorção (EOAPD) e os Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE), Figura 1. Estes exames foram realizados no equipamento Smart EP e Smart DPOEA da *Intelligent Hearing Systems* - Miami-Flórida (E.U.A.).

Para as EOAPD foram utilizados dois tons puros simultâneos (F1 e F2), em que $F1 < F2$, nas frequências de 1, 1.5, 2, 3 e 4 kHz com resolução de 3 pontos por oitava, na intensidade de 70 dB NPS. E, para o PEATE foram utilizados eletrodos de superfície. A aquisição foi ipsilateral, com tempo de análise de 12 ms e amostra de 1000 promediações, com replicação. Os filtros utilizados foram passa-alto de 50 Hz e passa-baixo de 3 kHz. O estímulo utilizado foi o *click* de 27.7/s emitido por fones

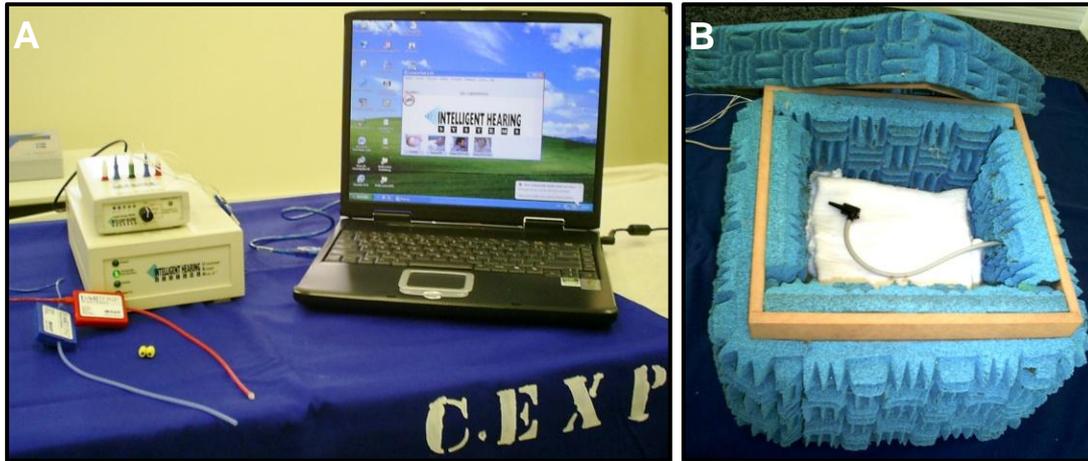


Figura 1 - Imagens dos equipamentos utilizados para a realização dos exames de Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico e Emissões Otoacústicas Evocadas Produto Distorção (A) e Caixa acústica com a sonda das Emissões Otoacústicas Evocadas Produto Distorção (B)

de inserção modelo Ear Tone 3 A, na polaridade rarefação.

4.2.1 Emissões Otoacústicas Evocadas Produto Distorção (EOAPD)

As EOAPD são respostas acústicas de fraca intensidade a um estímulo sonoro que quando presentes e registradas indicam função normal das células ciliadas externas (KEMP, 1978 e GORGA; NEELY; DORN, 2001).

Segundo Lonsbury-Martin e Martin (2001), as EOAPD resultam de uma distorção intermodulada produzida pela orelha interna em resposta à estimulação simultânea de dois tons puros com frequências próximas.

As amplitudes das EOAPD e do ruído de fundo são medidas em dB NPS e utilizadas para estimar a relação entre sinal e ruído (SR), que pode ser definida como a diferença, em decibel, entre a resposta e o ruído.

As EOAPD podem ser encontradas tanto em orelhas sem perdas auditivas como em orelhas com perdas leves ou moderadas. Por isso, é importante poder diferenciar respostas provenientes de orelhas com e sem alterações cocleares.

Considera-se que há EOAPD presente quando se verifica a diferença de 3 dBNPS entre o nível de ruído e a resposta encontrada, ou seja, quando há uma relação entre sinal e ruído (SR) de 3 dBNPS (Hall, 2000 b).

De acordo com Lonsbury-Martin e Martin (2001) e Gorga, Neely e Dorn, 2001 (2002), as EOAPD estão presentes em orelhas com audição normal e são reduzidas em orelhas com perdas auditivas. Podendo-se assim caracterizar uma perda auditiva coclear quando as respostas da orelha testada estão abaixo daquelas encontradas em uma população de indivíduos com audição dentro da normalidade.

As EOAPD testam as regiões de frequências específicas da cóclea e, por se tratar de um método de avaliação simples e rápido de lesões nas células ciliadas externas, pode ser particularmente bem adaptado para a monitorização do dano coclear por ototoxicidade (OZTURAN et al. 1996; SIE; NORTON, 1997; HAREL et al., 1997; ALLEN, 1998; RESS et al., 1999; CEVETTE et al., 2000; SOCKALINGAM et al., 2000).

4.2.2 Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE)

Potencial Evocado Auditivo é o sinal elétrico gerado pelo sistema nervoso em resposta a estimulação acústica. Para que esta resposta ocorra, é necessário que o estímulo tenha intensidade suficiente para atingir o limiar de excitabilidade do grupo de células nervosas sensoriais. Isto provocará várias alterações bioelétricas nas mesmas, gerando o potencial de ação que conduzirá o sinal elétrico ao sistema nervoso central (LIMA, 1998).

O PEATE, também denominado de curta latência, foi primeiramente descrito por Jewett e Willinston (1971) é composto por sete ondas que se formam em torno dos 10 ms.

As formas de se estudar os efeitos da toxicidade coclear têm se dirigido às alterações eletrofisiológicas detectadas pelo PEATE (STADNICK et al., 1975; SIE; NORTON, 1987; SHAW, 1988; STENGES et al., 1998; SOCKALINGAM et al., 2000).

Dentre as propriedades clínicas do PEATE em humanos encontra-se a onda V que pode ser observada em níveis muito próximos dos limiares comportamentais, sendo assim, o limiar auditivo eletrofisiológico determinado pela menor intensidade em que a onda V é identificada (HALL, 1992; STACH, 1997; LIMA, 1998). Porém, em roedores, a onda II apresenta maior robustez sendo por isso utilizada para determinar o limiar auditivo (FREITAS et al., 2009).

4.3 Condução dos experimentos e variáveis independentes

Foram conduzidos dois experimentos (Figura 2), sendo o primeiro (experimento 1) para atender o objetivo de avaliar o momento da intervenção pela OHB após 2, 4 e 6 horas do trauma acústico e o segundo (experimento 2), para avaliar a associação terapêutica entre a oxigenoterapia hiperbárica (OHB) e corticoterapia (CT).

No experimento 1 foram definidas três situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído) conforme início da primeira sessão de OHB seguida por mais 4 sessões, sendo uma sessão ao dia durante o período de 5 dias. Para cada situação houve três momentos de avaliação

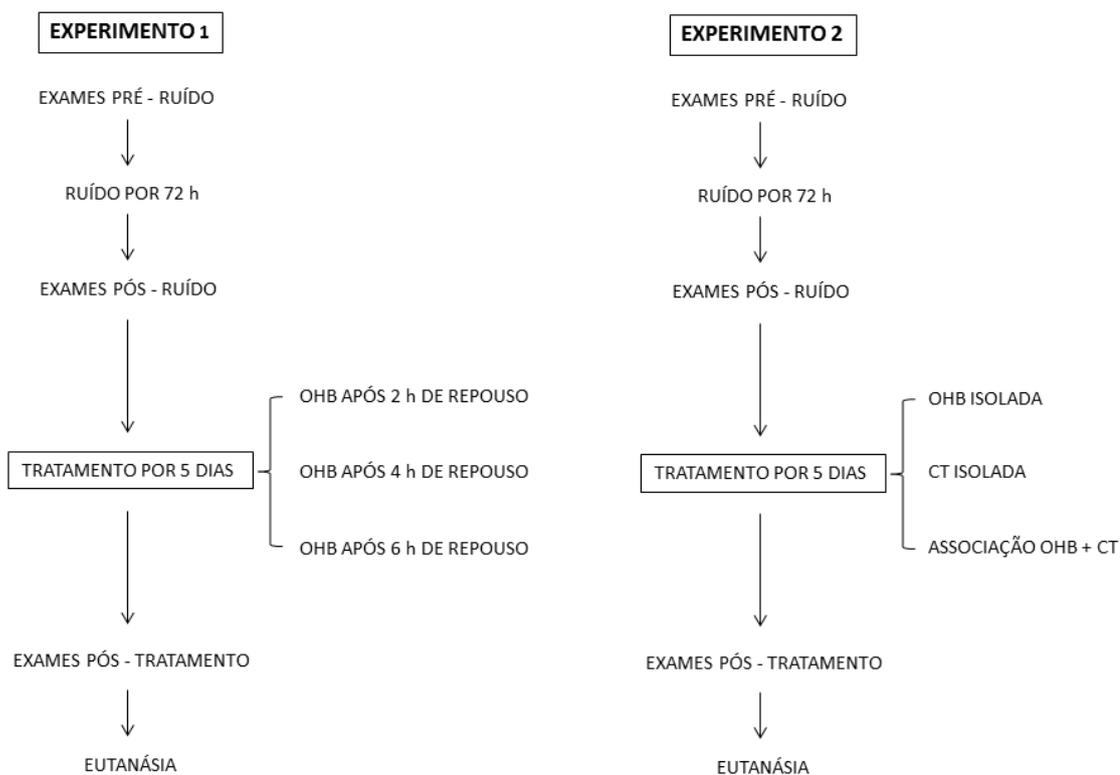


Figura 2 - Representação esquemática da condução dos experimentos realizados.

audiológica como variáveis independentes (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento). O momento pré-ruído referiu-se aos exames (PEATE e EOAPD) realizados antes da exposição ao ruído, o pós-ruído, aqueles realizados após o trauma acústico obtido pela exposição ao ruído branco na faixa de 4 kHz e intensidade de 110 dB por 72 h e, pós-tratamento, aqueles realizados após a intervenção pela OHB.

No experimento 2 foram definidas três situações (corticoterapia, oxigenoterapia hiperbárica e associação de corticóide com oxigenoterapia hiperbárica) conforme método terapêutico utilizado por 5 dias consecutivos. Para cada situação houve três momentos de avaliação audiológica como variáveis independentes (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento). O momento pré-ruído referiu-se aos exames (PEATE e

EOAPD) realizados antes da exposição ao ruído, o pós-ruído, aqueles realizados após o trauma acústico obtido pela exposição ao ruído branco na faixa de 4 kHz e intensidade de 110 dB por 72 horas e, pós-tratamento, aqueles realizados após a respectiva intervenção terapêutica.

4.3.1 Trauma acústico (TA)

Para gerar um TA as cobaias foram expostas a um ruído branco na faixa de 4 kHz com intensidade igual a 110 dB NPS por 72 horas (COLOMBARI et al., 2011) em um equipamento do Grupo Insight[®] (Figura 3) caracterizado como uma caixa de isolamento acústico, produzida em madeira, forrada em fórmica e placas de isolamento acústico interno. A caixa possui um ventilador para exaustão e circulação de ar interno e porta frontal com janela de vidro, para visualização do interior, com opção de fechamento. As dimensões (Altura x Largura x Profundidade) do equipamento, em milímetros, são iguais a 760 x 485 x 705; o ruído interno da caixa com exaustor ligado é igual a 61 dB, sendo a atenuação de ruído igual a mais ou

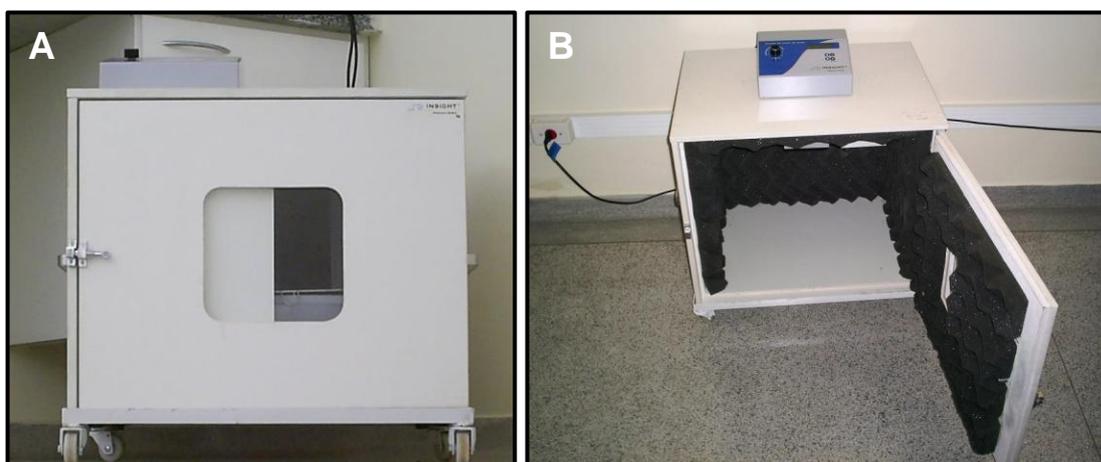


Figura 3 - Imagens da Caixa de Isolamento Acústico (A) e do Gerador de Sinais de Áudio (B, Grupo Insight[®]) utilizados neste trabalho

menos 22 dB. Esta caixa de isolamento acústico foi ligada a um Gerador de Sinais de Áudio modelo EP – 125 também do Grupo Insight® - Ribeirão Preto, São Paulo (Brasil).

Dentro da caixa acústica os animais foram dispostos em uma gaiola com três sessões iguais, confeccionada especificamente para estes experimentos, de forma que, por vez, três animais eram expostos ao ruído por 72 horas em ciclos de 12 horas “*on - off*”, claro e escuro, com oferta espontânea de água e comida. A cada 24 horas um breve intervalo (5 minutos) foi realizado para troca de água, ração e limpeza da gaiola.

Os níveis sonoros foram mensurados em todos os extremos da caixa acústica com a gaiola e os animais dentro da caixa, por meio de um decibelímetro, verificando-se uma variação da intensidade do ruído menor que 2 dB entre os pontos.

4.3.2 Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB) e Corticoterapia (CT)

Para a realização das sessões de OHB foi utilizada uma câmara hiperbárica experimental (Figura 4), pressurizada diretamente com oxigênio (O₂). Por cinco dias consecutivos, três animais por vez foram submetidos a sessões terapêuticas diárias de OHB que consistiram em 15 minutos de compressão até 2.0 ATA, uma hora em condições estáveis de 100% de O₂ pressurizado e pressão de 2.0 ATA e 15 minutos de descompressão.



Figura 4 - Imagem da Câmara Hiperbárica Experimental

A CT consistiu na administração sistêmica de dexametasona (10 mg/Kg/dia) por cinco dias consecutivos com início 2 h pós-exposição ao ruído branco na faixa de 4 kHz e intensidade de 110 dB por 72 h.

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Todas as cobaias foram eutanasiadas em tempo programado após anestesia com Cloridrato de Ketamina (65 mg/kg) e Xilazina (6,5 mg/kg). Foram então decapitadas e suas cócleas removidas da bula.

Com dissecação microscópica, as cócleas foram perfundidas com solução de fixação com glutaraldeído 3% a 4°C e mantidas na solução por 24 horas para a fixação.

Os passos seguintes foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Morfologia da FMRP-USP.

Através da janela redonda foi injetado para fixação uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1 M, pH de 7,4, por 4 horas a 4°C, as cócleas foram lavadas três vezes por 5 minutos com o mesmo tampão, depois



Figura 5 - Imagem do Microscópio Eletrônico JEOL SCANNING MICROSCOPE - JSM 5200

fixadas com tetróxido de Ósmio 1% por 2 horas a 4°C e submetidas a uma desidratação à temperatura ambiente em uma bateria crescente de etanol (50%, 70%, 90% e 95% - uma vez por 10 minutos em cada concentração) e etanol absoluto três vezes por 15 minutos. Terminada a desidratação passou-se para a fase de secagem pelo método do ponto crítico em CO₂ em que o material é desprovido de água. Após ser fixado em porta espécime adequado o material foi revestido, em câmara de vácuo, com vapor de ouro e examinado em microscópio eletrônico de varredura (SAITO et al., 1995; CARDINAAL et al., 2000a; DEMARCO, 2001 e OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002).

Para a análise e fotografia dos espécimes em MEV foi utilizado o Microscópio Eletrônico JEOL SCANNING MICROSCOPE - JSM 5200 (Figura 5).

4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental adotado neste trabalho foi o inteiramente ao acaso com número de repetições variável para cada situação. Cada orelha foi

definida como uma unidade experimental, ou seja, a parcela experimental. Para a realização da análise de variância utilizou-se o software estatístico SAS[®] para Windows versão 9.2 (Statistical Analysis System - SAS Institute, 2011). Assim, a análise de variância (esquema apresentado na Tabela 1) foi realizada com base no modelo matemático a seguir (eq. 1), em que todos os efeitos, exceto a média, foram considerados aleatórios (COCHRAN; COX, 1966):

em que:

- y_{ij} é o valor observado do tratamento i na repetição j ;
- μ é a média geral (constante inerente a todas as observações);
- t_i é o efeito aleatório do tratamento i ($i = 1, 2, \dots, I$); e
- ε_{ij} é o erro experimental associado ao i -ésimo tratamento na j -ésima repetição, em que $\varepsilon_{ij} \cap NID(0, \sigma^2)$.

Assim, as hipóteses testadas neste trabalho foram:

- $H_0: t_1 = t_2 = \dots = t_i$; e
- $H_1: t_i \neq t_{i'}$ para pelo menos um contraste (par), com $i \neq i'$.

Assim, ao rejeitar a hipótese de nulidade H_0 , conclui-se que pelo menos um contraste foi significativo entre as médias de tratamentos. Com isso, foi utilizado o teste de Tukey para a identificação de qual ou quais tratamentos diferiram significativamente entre si (COCHRAN; COX, 1966).

Tabela 1 - Esquema da análise de variância com fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e teste F

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	$I - 1$	SQ_t	QM_t^*	QM_t/QM_r
Resíduo	$I(J - 1)$	SQ_r	QM_r^{**}	
Total	$IJ - 1$			

* $QM_t = SQ_t / (I - 1)$; e ** $QM_r = SQ_r / [I(J - 1)]$.

O teste de Tukey baseia-se na diferença mínima significativa (*dms*), de modo que essa estatística é dada pela seguinte equação (eq. 2):

$$dms = q \sqrt{\frac{QM_r}{b}} \quad (2)$$

em que:

- *dms* é a amplitude total *studentizada*, cujo o valor é tabelado, em função do número de tratamentos e do número de grau de liberdade do resíduo, ao nível α de probabilidade (neste caso igual a 5%);
- QM_r é o quadrado médio do resíduo; e
- *b* é o número de repetições.

Como o teste de Tukey é, de certa forma, independente do teste F, é possível que, mesmo sendo significativo o valor de F, não encontrar diferenças significativas entre contrastes de médias.

Outro ponto importante refere-se à qualidade experimental, a qual foi avaliada através de alguns parâmetros estatísticos como o coeficiente de variação experimental (*CV%*) que é o mais adotado historicamente e acurácia (*Ac*). O nível adequado de *CV%* é variável em função da espécie que está trabalhando, da variável dependente avaliada, do tipo de parcela, entre outros, uma vez que seu valor depende apenas da variação residual como proporção da média do experimento (eq. 3). Assim, o *CV%* serve tão somente para a classificação de experimentos com médias semelhantes e conduzidos nas mesmas condições experimentais.

$$CV\% = \left(\frac{\sqrt{QM_r}}{\mu} \right) 100 \quad (3)$$

em que:

- QM_r é o quadrado médio do erro experimental; e
- μ é a média geral.

A utilização somente desse parâmetro seria questionável, perante o não conhecimento prévio dos níveis aceitáveis para cada uma das variáveis dependentes utilizadas neste estudo (SR e Limiar). Nesse sentido, utilizou-se também a acurácia (Ac) para avaliar a qualidade experimental, preconizada por Resende e Duarte (2007), uma vez que considera as variações de tratamentos (coeficiente de variação de tratamentos, CV_t) e residual (coeficiente de variação experimental, CV) associados a variável dependente, além do número de repetições (b), por meio da expressão (eq. 4):

$$Ac = \sqrt{\frac{1}{1 + \frac{(CV/CV_t)^2}{b}}} \quad (4)$$

O parâmetro Ac permite assim comparar experimentos com médias diferentes e, também, saber o correto nível de qualidade experimental, uma vez que o mesmo possui os limites de valores que variam de 0 a 1, sendo 1 o valor para a mais alta qualidade experimental.

Também, Ac contempla, concomitantemente, os mesmos parâmetros da estatística de \mathcal{F} de *Snedecor* através da equação (eq. 5), sendo possível correlacionar os valores de \mathcal{F} de *Snedecor* com Ac (eq. 6):

$$\mathcal{F} = 1 + \left[b \left(\frac{CV_t}{CV} \right)^2 \right] \quad (5)$$

$$\mathcal{F} = \frac{1}{1 - (Ac)^2} \quad (6)$$

Por fim, conforme estão classificados na Tabela 2, verifica-se que para obter uma precisão experimental alta, deve-se atingir Ac de 70%, o que equivale a um valor de \mathcal{F} igual a 1,96.

Tabela 2 - Valores adequados da estatística de \mathcal{F} de *Snedecor*, para os efeitos de tratamentos, visando atingir determinada acurácia (Ac), e as categorias de previsão requerida (RESENDE E DUARTE, 2007)

Classes de precisão	Valores de Ac	Valores de \mathcal{F}
muito alta	0,990	50,2513
muito alta	0,975	20,2532
muito alta	0,950	10,2564
muito alta	0,900	5,2632
Alta	0,850	3,6036
Alta	0,800	2,7778
Alta	0,750	2,2857
Alta	0,700	1,9606
Moderada	0,650	1,7316
Moderada	0,600	1,5625
Moderada	0,550	1,4337
Moderada	0,500	1,3333
Baixa	0,400	1,1905
Baixa	0,300	1,0989
Baixa	0,200	1,0417
Baixa	0,100	1,0101

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3, estão apresentados os graus de liberdade, os quadrados médios com as significâncias pelo teste F, as médias gerais, os coeficientes de variação (CV%) e as acurácias (Ac) obtidos nas análises de variâncias para as relações entre sinal e ruído das EOAPD (SR), em todas as frequências (1, 1.5, 2, 3 e 4kHz), e limiar auditivo eletrofisiológico (Limiar, em dB). Essas análises individuais envolveram 108 repetições para cada momento de avaliação (pré-ruído e pós-ruído) e frequência (em kHz).

Notou-se que a qualidade experimental foi satisfatória em ambas as análises conforme revelado pelos valores de coeficiente de variação (CV%) e/ou de acurácia (Ac).

Observou-se que houve diferenças altamente significativas ($p \leq 0,01$) nas médias das duas variáveis entre os momentos de avaliação pré-ruído (letra “a”, pelo

Tabela 3 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para as variáveis: relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR) e limiar auditivo eletrofisiológico (Limiar, em dB). Médias para os momentos de avaliação pré-ruído e pós-ruído

FV	SR		Limiar	
	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	1	10.991,0 **	1	83.492,8 **
Resíduo	148	135,0	154	103,9
CV%		59,15		27,19
Ac		0,9999		1,0000
MG		19,64		37,49
Pré-ruído		28,20 ^a		14,36 ^b
Pós-ruído		11,08 ^b		60,63 ^a

*, ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente; e

^a e ^b: teste de Tukey - médias seguidas de letras distintas são diferentes ao nível de 5%.

teste de Tukey) e pós-ruído (letra “b”). A média da SR na situação pós-ruído reduziu significativamente 17.12 da situação pré-ruído e a média do Limiar aumentou, com significância estatística, 46,27 dB após exposição ao ruído (letra “a”, pelo teste de Tukey).

De acordo com Hall (2000 a), Lonsbury-Martin e Martin (2001) e Gorga; Neely e Dorn, 2001, as EOAPD estão presentes em orelhas com audição normal e são presentes, apesar de reduzidas, em orelhas com perdas auditivas leves ou moderadas. Podendo-se assim caracterizar uma perda auditiva coclear quando as respostas da orelha testada estão abaixo daquelas encontradas em indivíduos com audição dentro da normalidade.

Os momentos de avaliação pré-ruído e pós-ruído permitem a consideração de cada cobaia como controle de si. Portanto, perante redução da SR após exposição ao ruído constatou-se que foi efetiva a metodologia utilizada para gerar o dano auditivo.

Essa efetividade também foi confirmada pelo aumento do limiar auditivo eletrofisiológico determinado pela menor intensidade em que a onda V do PEATE foi identificada, como descrito por Lima (1998). Os limiares pré-ruído com média geral de 14,36 foram considerados dentro dos padrões de normalidade de 0 a 25 dB e após a exposição ao ruído (MG = 60,63) foram caracterizados entre o intervalo de perda auditiva de grau moderado (40 - 70 dB).

5.1 Oxigenoterapia hiperbárica (experimento 1)

Na Tabela 4, estão apresentados os graus de liberdade, os quadrados médios com as significâncias pelo teste F, as médias gerais, os coeficientes de variação (CV%) e as acurácias (Ac) obtidos nas análises de variâncias para a variável relação entre sinal e ruído (SR) das emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) em cada uma das situações: após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas. Essas análises individuais envolveram 18 repetições para cada momento de avaliação (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento) e frequência (em kHz).

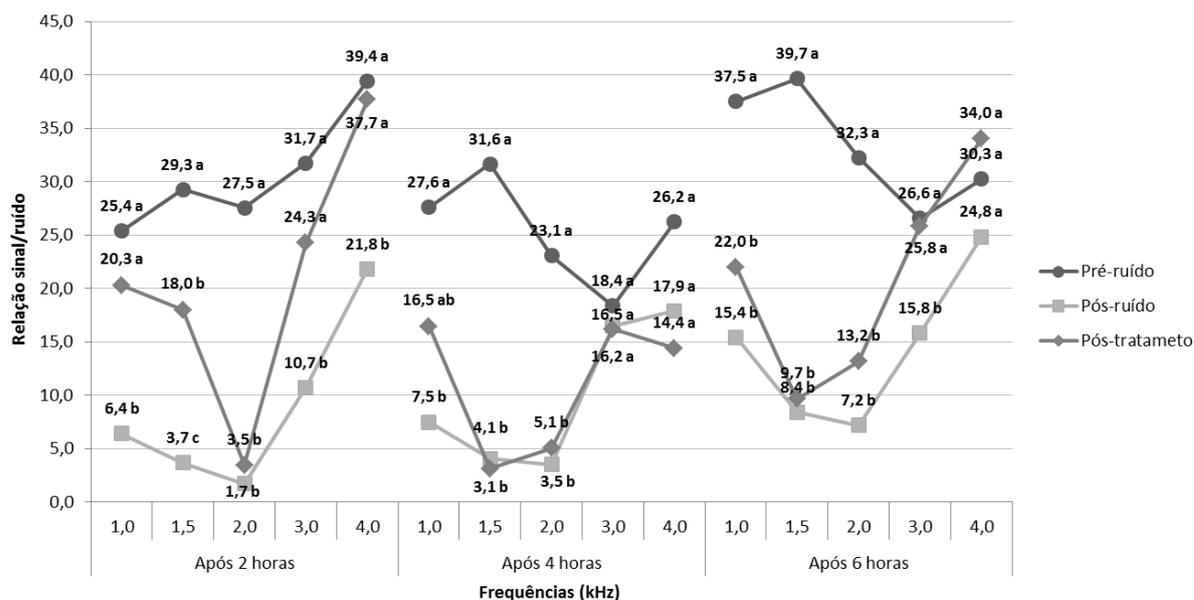
Verificou-se através dos valores de coeficiente de variação (CV%) e de acurácia (Ac) que a qualidade experimental foi satisfatória em todas as situações e frequências.

Tabela 4 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para a variável relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), em cada frequência (kHz) e em cada uma das respectivas situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído)

Situação	FV	Freq. 1,0 kHz		Freq. 1,5 kHz		Freq. 2,0 kHz		Freq. 3,0 kHz		Freq. 4,0 kHz	
		GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Após 2 horas	Trat. ^[1]	2	967,0 **	2	1.973,0 **	2	2.291,5 **	2	1.246,8 **	2	1.125,9 **
	Res.	27	151,7	33	86,6	30	114,4	30	72,3	33	63,1
	CV%		70,91		54,82		98,04		38,22		24,09
	Ac		0,9957		0,9988		0,9986		0,9984		0,9984
	MG		17,37		16,97		10,91		22,24		32,97
Após 4 horas	Trat.	2	1.825,8 **	2	4.465,1 **	2	2.005,3 **	2	22,4 ^{ns}	2	665,2 ^{ns}
	Res.	46	246,0	48	106,5	48	142,3	45	196,0	51	277,1
	CV%		90,85		79,73		113,10		82,24		85,37
	Ac		0,9963		0,9993		0,9980		0,8203		0,9886
	MG		17,27		12,94		10,55		17,02		19,50
Após 6 horas	Trat.	2	1.542,5 **	2	3.756,3 **	2	2.058,7 **	2	432,3 **	2	254,9 ^{ns}
	Res.	33	60,3	33	88,6	33	54,0	33	48,8	33	100,0
	CV%		31,10		48,88		41,94		30,70		33,68
	Ac		0,9989		0,9993		0,9993		0,9969		0,9893
	MG		24,97		19,25		17,53		22,75		29,69

*, ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente; e

[1] Trat.: Fator de variação tratamentos referente aos momentos de avaliação (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento).



^{a, b e c}: teste de Tukey - médias seguidas de letras distintas são diferentes ao nível de significância 5%.

Figura 6 - Médias da variável relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção para cada frequência (kHz) para os momentos de avaliação pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento em cada uma das respectivas situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído)

Ocorreram diferenças altamente significativas ($p \leq 0,01$) para o efeito entre momentos de avaliação, exceto para a frequência 3,0 kHz na situação após 4 horas e na frequência 4,0 kHz nas situações após 4 horas e após 6 horas de exposição ao ruído. Assim, pelo menos um contraste entre as médias dos momentos de avaliação foi significativo para cada situação e frequência.

Através do teste de Tukey foram avaliados os contrastes entre médias conforme apresentado na Figura 6. Na situação após 2 horas de exposição ao ruído, o momento de avaliação pré-ruído (letra "a") diferiu estatisticamente do pós-ruído (letra "b" ou "c") e o momento pós-tratamento localizou-se com médias intermediárias aproximando-se em três frequências (1,0; 3,0 e 4,0 kHz) do momento pré-ruído. Na situação após 4 horas de exposição ao ruído foram observadas as maiores relações SR em todas as frequências no momento pré-ruído (letra "a"),

porém, houve ocorrência de diferenças significativas com os demais momentos nas frequências 1,0; 1,5 e 2,0 kHz.

Ocorreu uma maior proximidade dos valores médios da SR entre os momentos pós-ruído e pós-tratamento, os quais não diferiram significativamente em nenhuma frequência. Já na situação após 6 horas de exposição ao ruído, os momentos pré-ruído e pós-ruído diferiram significativamente em todas as frequências, exceto na de 4,0 kHz. O momento pós-tratamento apresentou médias mais próximas do momento pós-ruído ao invés do pré-ruído, em três frequências (1,0; 1,5 e 2,0 kHz), ou seja, uma menor resposta das EOAPD em relação à situação anterior à exposição ao ruído.

Com o objetivo de comparar as diferentes situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de exposição ao ruído), na Tabela 5 são apresentados os graus de liberdade, os quadrados médios com as significâncias pelo teste F, as médias gerais, os coeficientes de variação (CV%) e as acurácias (Ac) obtidos nas análises de variâncias para a amplitude das relações entre sinal e ruído das EOAPD, entre os momentos pós-tratamento e pré-ruído, sendo que essas análises individuais envolveram 18 repetições para cada frequência (em kHz).

Tabela 5 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), entre pós-tratamento e pré-ruído, para as situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído), para cada frequência (kHz)

FV	Freq. 1,0 kHz		Freq. 1,5 kHz		Freq. 2,0 kHz		Freq. 3,0 kHz		Freq. 4,0 kHz	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Trat. ^[1]	2	68,35 ^{ns}	2	1.420,91 ^{**}	2	183,17 ^{ns}	2	210,06 ^{ns}	2	890,89 ^{**}
Res.	51	149,83	51	219,32	51	219,37	51	94,53	51	108,49
CV%		120,18		76,31		94,54		101,75		84,84
Ac		0,9442		0,9957		0,9683		0,9877		0,9966
MG		10,19		19,41		15,67		9,56		12,28

*, ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente; e ^[1] Trat.: Fator de variação tratamentos referente às situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas).

Tabela 6 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), entre pós-tratamento e pós-ruído, para as situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído), para cada frequência (kHz)

FV	Freq. 1,0 kHz		Freq. 1,5 kHz		Freq. 2,0 kHz		Freq. 3,0 kHz		Freq. 4,0 kHz	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Trat. ^[1]	2	40,22 ^{ns}	2	177,57 *	2	11,80 ^{ns}	2	41,91 ^{ns}	2	18,50 ^{ns}
Res.	51	113,62	51	46,44	51	42,02	51	77,61	51	96,86
CV%		123,78		91,31		109,73		98,69		94,73
Ac		0,9297		0,9928		0,9137		0,9522		0,8802
MG		8,61		7,46		5,91		8,93		10,39

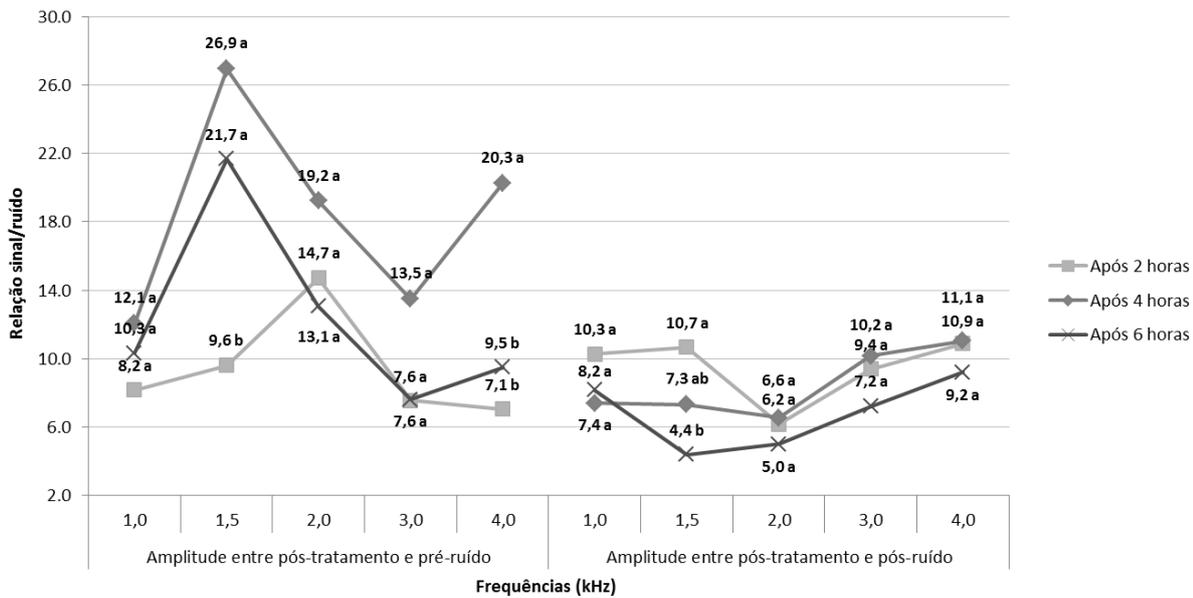
*, ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente; e ^[1] Trat.: Fator de variação tratamentos referente às situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas).

Igualmente a essa última tabela, na Tabela 6 são apresentados os resultados referentes às análises de variâncias para a amplitude das relações entre sinal e ruído das EOAPD, entre os momentos pós-tratamento e pós-ruído, também envolvendo 18 repetições para cada frequência (em kHz).

Nessas análises de variância a qualidade experimental foi igualmente satisfatória em todas as frequências conforme revelado pelos valores de coeficiente de variação (CV%) e/ou os de acurácia (Ac) presentes nas Tabelas 5 e 6.

Para ambas as amplitudes, o teste F não foi significativo para o efeito entre situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído) em quase todas as frequências. Houve diferenças altamente significativas ($p \leq 0,01$) nas frequências 1,5 e 4,0 kHz para a amplitude pós-tratamento com pré-ruído (Tabelas 5) e diferença significativa ($p \leq 0,05$) na frequência 1,5 kHz para a amplitude pós-tratamento com pós-ruído (Tabelas 6).

Na Figura 7, são demonstradas as médias da amplitude da SR de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído para as três situações em cada frequência (kHz). Nota-se, apesar da não significância estatística, que o momento



^a, ^b e ^c: teste de Tukey - médias seguidas de letras distintas são diferentes ao nível de 5%.

Figura 7 - Médias da amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, para as situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído), para cada frequência (kHz)

pós-tratamento da situação após 2 horas foi que mais se aproximou do momento pré-ruído e o que mais se distanciou do momento pós-ruído, evidenciando um desempenho brevemente melhor da oxigenoterapia hiperbárica quando a intervenção ocorreu mais precocemente.

Quanto as avaliações realizadas para a variável limiar auditivo eletrofisiológico (Limiar), estão apresentados na Tabela 7, os graus de liberdade, os quadrados médios com as significâncias pelo teste F, as médias gerais, os coeficientes de variação (CV%) e as acurácias (A_c) obtidos nas análises de variâncias para cada uma das situações: após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo pós ruído. Do mesmo modo, essas análises individuais envolveram 18 repetições para cada momento de avaliação (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento).

A qualidade experimental foi satisfatória para todas as situações conforme verificado através dos valores de coeficiente de variação (CV%) e/ou de acurácia

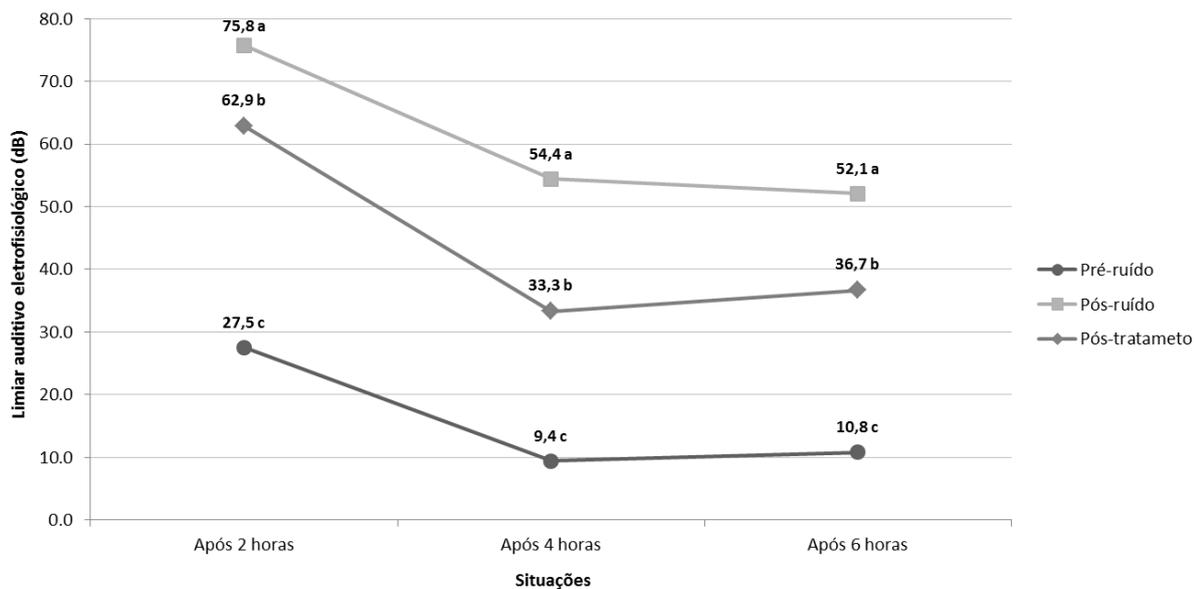
Tabela 7 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para a variável limiar eletrofisiológico (Limiar, em dB) em cada uma das respectivas situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído)

FV	Após 2 horas		Após 4 horas		Após 6 horas	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamentos ^[1]	2	7.494,2 **	2	9.124,1 **	2	5.213,2 **
Resíduo	33	111,9	51	104,7	33	29,7
CV%		19,10		31,57		16,43
Ac		0,9996		0,9997		0,9998
MG		55,39		32,41		33,19

* ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente; e ^[1] Tratamentos: Fator de variação tratamentos referente aos momentos de avaliação (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento).

efeito entre momentos de avaliação, em todas as situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo pós ruído). Assim, pelo menos um contraste entre as médias dos momentos de avaliação foi significativo para cada situação.

Pelo teste de Tukey foram avaliados os contrastes entre as médias, descritos na Figura 8. Independentemente da situação, o momento pós-ruído caracterizou-se como aquele de perda auditiva de maior grau evidenciado pelas maiores médias de limiar, significativamente diferentes das demais (letra “a”). O momento pós-tratamento caracterizou-se por médias de limiar significativamente menores, portanto com uma perda auditiva de menor grau em relação ao pós-ruído (letra “b”), porém não significativamente igual ao momento pré-ruído (letra “c”), o que representaria a recuperação total do dano auditivo provocado. Mesmo perante a diferença significativa entre os momentos pós-tratamento e pré-ruído, houve uma melhora constatada pela diferença entre os momentos pós-tratamento e pós-ruído, ou seja, através dessas significâncias pôde-se constatar que uma recuperação ocorreu independente do momento de intervenção.



^{a, b e c}: teste de Tukey - médias seguidas de letras distintas são diferentes ao nível de 5%.

Figura 8 - Médias da variável limiar eletrofisiológico para os momentos de avaliação pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento em cada uma das respectivas situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído)

Para comparar as diferentes situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo pós ruído), estão apresentados na Tabela 8, os graus de liberdade, os quadrados médios com as significâncias pelo teste F, as médias gerais, os coeficientes de variação (CV%) e as acurácias (Ac) obtidos nas análises de variâncias para a amplitude do limiar auditivo eletrofisiológico, entre os momentos de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, de modo que as análises individuais envolveram 18 repetições para cada uma das três situações.

Pelos valores de coeficiente de variação (CV%) e/ou de acurácia (Ac), pôde-se constatar que a qualidade experimental foi satisfatória para todas as situações.

O teste F não foi significativo para as amplitudes do Limiar do momento pós-tratamento com pré-ruído, isto é, não houve diferença significativa dessas amplitudes entre as três situações.

Tabela 8 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude do limiar auditivo eletrofisiológico (em dB), de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, para as situações (após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído) e as suas respectivas médias de amplitude

FV	Amplitude entre pós-tratamento e pré-ruído		Amplitude entre pós-tratamento e pós-ruído	
	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	2	256,0 ^{ns}	2	615,0 *
Resíduo	51	293,7	51	107,9
CV%		79,44		72,01
Ac		0,9696		0,9952
MG		21,57		14,43
Após 2 horas		23,61 ^a		11,89 ^b
Após 4 horas		23,89 ^a		21,11 ^a
Após 6 horas		17,22 ^a		10,28 ^b

*, ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente; e

^a e ^b: teste de Tukey - médias seguidas de letras distintas são diferentes ao nível de 5%.

Quanto às amplitudes do Limiar do momento pós-tratamento com pós-ruído, houve médias das amplitudes foi significativo entre as situações. Pelo teste de Tukey foram avaliados os contrastes entre as médias (Tabela 8) e verificou-se que a situação após 4 horas (letra “a”) diferiu das situações após 2 e após 6 horas (letra “b”), ou seja, o momento pós-tratamento da situação após 4 horas distanciou-se mais do pós-ruído, evidenciando uma maior redução do limiar auditivo eletrofisiológico.

Para Oliveira, Canedo e Rossato (2002), os radicais livres são produzidos em cada célula como subproduto de eventos bioquímicos normais, principalmente na respiração celular por meio das mitocôndrias, e em processos anormais no organismo.

A exposição ao ruído de alta intensidade é seguida por uma intensa atividade metabólica, devido à superestimulação. Crescem as evidências de que as espécies radicais reativas a oxigênio (ERRO) têm um importante papel no dano celular devido ao ruído intenso. O aumento dos níveis do ânion superóxido, radical hidroxila e

espécies reativas de nitrogênio (ERN) são facilmente gerados na orelha interna após exposição ao ruído (ENDO et al., 2005 e POIRRIER et al., 2010).

A biogênese mitocondrial está envolvida na resposta celular à lesão, podendo regular a probabilidade de sobrevivência celular após desafios metabólicos à integridade das células ciliadas (HYDE; RUBEL, 1995).

Segundo Kuokkanen, Aarnisalo e Ylikoski (2000) e Ylikoski et al. (2008) o equilíbrio iônico quando restaurado visa auxiliar as células ciliadas danificadas a sobreviverem ao intervalo de não suprimento perilinfático. A OHB consiste justamente em prover um suprimento adequado de oxigênio evitando um estresse oxidativo, secundário ao quadro de hipóxia coclear, seguido até de eventuais mortes celulares de células inicialmente não lesadas.

Contrapondo este provável efeito terapêutico, estudos demonstram que a OHB influi no aumento de espécies reativas de oxigênio como superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, que podem causar danos celulares como oxidação do DNA, de lipídeos e de proteínas (OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002).

Tanto D'Aldin et al. (1999) quanto Çakir et al. (2006) apontaram um efeito negativo da OHB quando administrada logo após a exposição ao ruído. Isso pode ser explicado devido ao aumento de metabólitos reativos ao oxigênio com a aplicação da OHB que somados aos quais já haviam sido produzidos na cóclea devido à superestimulação auditiva provocam uma redução na capacidade de defesa antioxidativa coclear. Isso, devido à diminuição do nível de antioxidantes ou antirradicais livres que seriam responsáveis pelo processo biológico de autodefesa (OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002).

Para Çakir et al. (2006) é necessário um certo tempo para que as enzimas responsáveis pela defesa antioxidativa sejam ativadas, como por exemplo a glutathione peroxidase que atinge seu nível máximo após 30 minutos da exposição a OHB. Isso explicaria o efeito adverso da OHB quando utilizada na primeira hora pós trauma. Tal explicação é reforçada por achados em pesquisa como os de Kuokkanem, Aarnisalo e Ylikoski (2000) e Colombari et al. (2011) que demonstraram efeito benéfico da OHB quando iniciada pelo menos 2h após a exposição ao ruído.

Çakir et al. (2006) realizaram um estudo mais apurado sobre o quão crucial o início da intervenção através da OHB pode ser. Os pesquisadores concluíram que a exposição à OHB uma hora após a exposição ao ruído pode ser lesiva, quando iniciada após 2 horas da lesão pode-se notar um breve benefício e quando iniciada após 6 horas um efeito positivo mais efetivo pode ser evidenciado.

Os achados da presente pesquisa demonstraram que independente do momento de intervenção (após 2, 4 ou 6 horas), a OHB promoveu redução do limiar auditivo eletrofisiológico e breve recuperação do amplificador coclear perante aumento da relação entre sinal e ruído das EOAPD. Sendo assim, é possível afirmar que existe um efeito terapêutico ao dano auditivo decorrente da exposição ao ruído e que não ocorreu um efeito lesivo da OHB quando usada pelo menos após 2 horas de repouso auditivo após o trauma acústico, como demonstrado em outros estudos (KUOKKANEM; AARNISALO; YLIKOSKI, 2000; ÇAKIR et al., 2006; FAKHRY; ROSTAIN; CAZALS, 2007; YLIKOSKI et al., 2008 e COLOMBARI et al., 2011).

É válido considerar o quão determinante o momento de intervenção pode ou não ser realizada e qual o momento mais precoce em que a OHB pode desempenhar seu melhor papel. Apesar de maior redução do limiar auditivo

eletrofisiológico após 4 horas e uma resposta das EOAPD brevemente melhor após a terapia com início 2 horas após o fim da exposição ao ruído, os resultados das avaliações funcionais demonstram não haver benefício ou malefício que justifique restrições no momento de intervenção pela OHB neste intervalo de 2 a 6 horas após o trauma acústico.

5.2 Corticoterapia e Oxigenoterapia Hiperbárica (experimento 2)

Na Tabela 9, são apresentados os graus de liberdade, os quadrados médios com as significâncias pelo teste F, as médias gerais, os coeficientes de variação (CV%) e as acurácias (Ac) obtidos nas análises de variâncias para a variável relação

Tabela 9 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para a variável relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), em cada frequência (kHz) e em cada uma das respectivas situações (corticóide, OHB e OHB+corticóide)

Situação	FV	Freq. 1,0 kHz		Freq. 1,5 kHz		Freq. 2,0 kHz		Freq. 3,0 kHz		Freq. 4,0 kHz	
		GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Corticóide	Trat. ^[2]	2	768,4 **	2	1.271,1 **	2	2.141,5 **	2	582,3 **	2	842,2 **
	Erro	33	66,2	30	57,2	30	56,3	33	57,8	33	67,3
	CV%		52,70		54,87		76,44		64,71		36,28
	Ac		0,9976		0,9988		0,9993		0,9973		0,9978
	MG		15,44		13,79		9,82		11,75		22,61
OHB ^[1]	Trat.	2	1.542,5 **	2	3.756,3 **	2	2.058,7 **	2	432,3 **	2	254,9 ^{ns}
	Erro	33	60,3	33	88,6	33	54,0	33	48,8	33	100,0
	CV%		31,10		48,88		41,94		30,70		33,68
	Ac		0,9989		0,9993		0,9993		0,9969		0,9893
	MG		24,97		19,25		17,53		22,75		29,69
OHB + Corticóide	Trat.	2	1.221,4 **	2	2.008,9 **	2	1.859,2 **	2	564,2 **	2	489,3 **
	Erro	33	76,9	33	118,0	33	73,9	33	55,1	33	76,5
	CV%		44,85		60,82		51,92		40,81		34,08
	Ac		0,9983		0,9984		0,9989		0,9973		0,9957
	MG		19,56		17,86		16,56		18,19		25,67

* ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente;

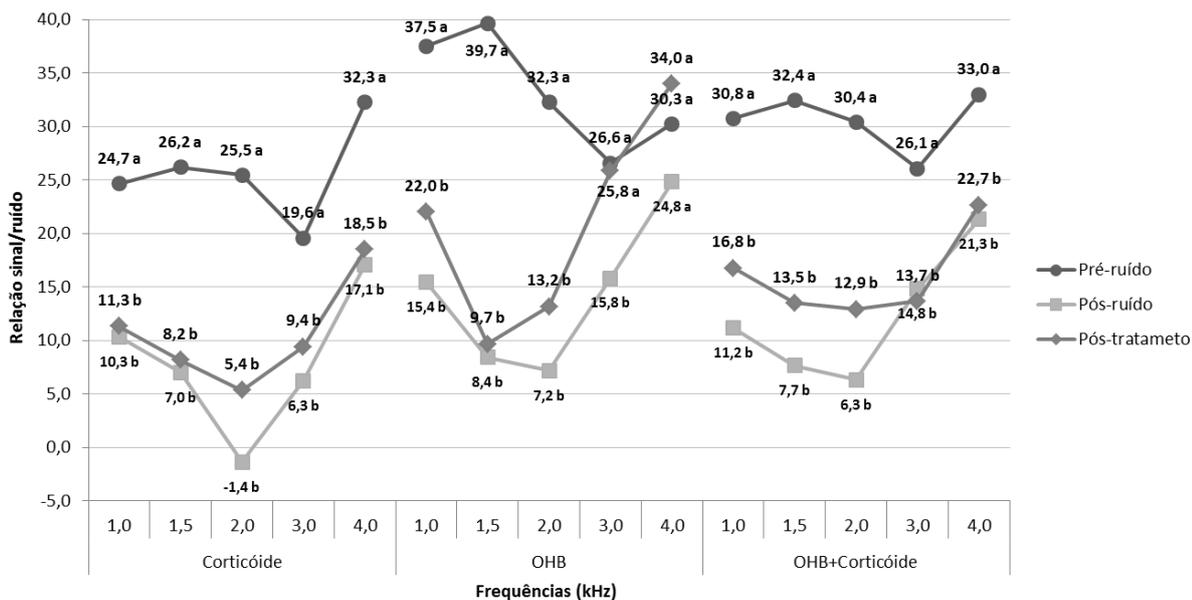
^[1] OHB: Oxigenoterapia hiperbárica; e ^[2] Trat.: Fator de variação tratamentos referente aos momentos de avaliação (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento).

entre sinal e ruído (SR) das emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) em cada uma das situações: corticoide (CT), oxigenoterapia hiperbárica (OHB) e associação entre OHB e CT (OHBCT). As análises individuais envolveram 18 repetições para cada momento de avaliação (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento) e frequência (em kHz).

A qualidade experimental foi satisfatória em todas as situações e frequências conforme revelado pelos valores de coeficiente de variação (CV%) e, principalmente, os de acurácia (Ac).

Em todas as situações houve diferença altamente significativa ($p \leq 0,01$) para o efeito entre momentos de avaliação, para todas as frequências, exceto na frequência 4,0 kHz na situação OHB. Assim, pelo menos um contraste entre as médias dos momentos de avaliação foi significativo para cada situação e frequência.

Pelo teste de Tukey avaliaram-se os contrastes entre médias conforme apresentado na Figura 9. Assim, independentemente da situação e da frequência, pôde-se verificar que o momento pré-ruído diferiu significativamente dos demais momentos de avaliação, caracterizando dois grupos distintos, sendo o primeiro definido pelo momento de pré-ruído (letra “a”) e o segundo, os momentos de pós-ruído e pós-tratamento (letra “b”). No entanto, apesar dos momentos pós-ruído e pós-tratamento não terem diferido significativamente, notou-se uma melhora da relação entre sinal e ruído (SR) após o tratamento para todos os métodos terapêuticos utilizados.



^a, ^b e ^c: teste de Tukey - médias seguidas de letras distintas são diferentes ao nível de 5%.

Figura 9 - Médias da variável relação entre sinal e ruído (SR) das emissões otoacústicas produto de distorção para cada frequência (kHz) para os momentos de avaliação pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento em cada uma das respectivas situações (corticóide, OHB e OHB+corticóide, sendo OHB oxigenoterapia hiperbárica).

Com o objetivo de comparar as diferentes situações (CT, OHB e OHBCT), são apresentados na Tabela 10, os graus de liberdade, os quadrados médios com as significâncias pelo teste F, as médias gerais, os coeficientes de variação (CV%) e as acurácias (Ac) obtidos nas análises de variâncias para a amplitude das relações entre sinal e ruído das EOAPD, entre os momentos pós-tratamento e pré-ruído. As análises individuais envolveram 18 repetições para cada frequência (em kHz).

Tabela 10 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), entre pós-tratamento e pré-ruído, para as situações (corticóide, oxigenoterapia hiperbárica e oxigenoterapia hiperbárica+corticóide), em cada frequência (kHz)

FV	Freq. 1,0 kHz		Freq. 1,5 kHz		Freq. 2,0 kHz		Freq. 3,0 kHz		Freq. 4,0 kHz	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Trat. ^[1]	2	0,96 ^{ns}	2	494,06 ^{ns}	2	7,46 ^{ns}	2	5,57 ^{ns}	2	8,39 ^{ns}
Res.	51	169,47	51	255,03	51	154,19	51	74,22	51	97,11
CV%		122,90		101,57		100,38		105,25		106,85
Ac		0,3046		0,9860		0,6823		0,7582		0,7801
MG		10,59		15,72		12,37		8,19		9,22

*, ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente; e ^[1] Trat.: Fator de variação tratamentos referente às situações (corticóide, oxigenoterapia hiperbárica e oxigenoterapia hiperbárica+corticóide).

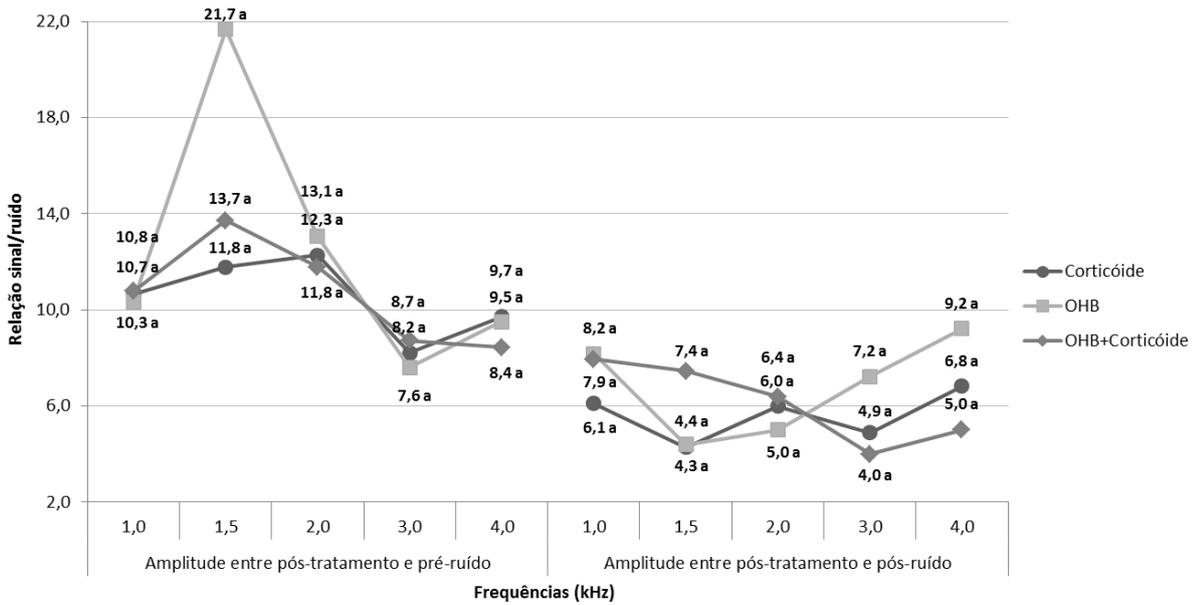
Tabela 11 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), entre pós-tratamento e pós-ruído, para as situações (corticóide, oxigenoterapia hiperbárica e oxigenoterapia hiperbárica+corticóide), em cada frequência (kHz)

FV	Freq. 1,0 kHz		Freq. 1,5 kHz		Freq. 2,0 kHz		Freq. 3,0 kHz		Freq. 4,0 kHz	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Trat. ^[1]	2	22,91 ^{ns}	2	58,13 ^{ns}	2	9,24 ^{ns}	2	49,85 ^{ns}	2	80,69 ^{ns}
Res.	51	69,32	51	49,61	51	66,01	51	34,25	51	68,03
CV%		112,40		131,16		140,16		108,98		117,52
Ac		0,9252		0,9771		0,8461		0,9814		0,9774
MG		7,41		5,37		5,80		5,37		7,02

*, ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente; e ^[1] Trat.: Fator de variação tratamentos referente às situações (corticóide, oxigenoterapia hiperbárica e oxigenoterapia hiperbárica+corticóide).

Na Tabela 11 são apresentados os resultados referentes às análises de variâncias para a amplitude das relações entre sinal e ruído das EOAPD, entre os momentos pós-tratamento e pós-ruído, também envolvendo 18 repetições para cada frequência (em kHz).

Nessas análises de variância a qualidade experimental foi satisfatória para todas as frequências conforme revelado pelos valores de coeficiente de variação (CV%) e/ou os de acurácia (Ac) apresentados nas Tabelas 10 e 11. Nas análises referentes à amplitude das relações entre sinal e ruído das EOAPD, entre os momentos pós-tratamento e pré-ruído (Tabela 10) mostrou-se a importância de se utilizar dois parâmetros estatísticos para a avaliação da qualidade experimental, uma vez que houve uma pequena variação dos valores de CV%, de 100,38 a 122,90, porém uma maior variação dos valores de Ac (de 0,3046 a 0,9860). No entanto, notou-se que os valores mais baixos de Ac ocorreram devido a uma menor variância entre as três situações, ou seja, menor valor do quadrado médio (QM) de tratamentos, principalmente na frequência de 1,0 kHz, em que o QM foi o menor ocorrido (0,96).



^a, ^b e ^c: teste de Tukey - médias seguidas de letras distintas são diferentes ao nível de 5%.

Figura 10 - Médias da amplitude da relação entre sinal e ruído das emissões otoacústicas produto de distorção (SR), de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, para as situações (corticóide, OHB e OHB+corticóide, sendo OHB oxigenoterapia hiperbárica), em cada frequência (kHz)

Para ambas as amplitudes o teste F em todas as situações não foi significativo para o efeito entre situações (CT, OHB e OHBCT), para todas as frequências e, portanto, os contrastes entre as médias não diferiram de zero, não havendo diferença entre as médias das amplitudes da SR entre pós-tratamento tanto com pré-ruído como com pós-ruído, nas diferentes as situações (Tabelas 10 e 11).

Apesar de não haver ocorrido diferenças significativas entre essas situações, na Figura 10 são apresentadas as médias da amplitude da SR do momento pós-tratamento com o pré-ruído e com o pós-ruído, para as três situações e em cada frequência (kHz) isolada.

Quanto as avaliações realizadas para a variável limiar auditivo eletrofisiológico (Limiar), são apresentados na Tabela 12, os graus de liberdade, os quadrados médios com as significâncias pelo teste F, as médias gerais, os coeficientes de variação (CV%) e as acurácias (Ac) obtidos nas análises de variâncias em cada uma das situações: corticoide (CT), oxigenoterapia hiperbárica (OHB) e associação entre

Tabela 12 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para a variável limiar eletrofisiológico (Limiar, em dB) em cada uma das respectivas situações (corticóide, OHB e OHB+corticóide)

FV	Corticóide		OHB ^[1]		OHB+Corticóide	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamentos ^[2]	2	6.327,1 **	2	5.213,2 **	2	5.639,6 **
Resíduo	33	76,4	33	29,7	33	51,2
CV%		24,39		16,43		20,20
Ac		0,9997		0,9998		0,9997
MG		35,83		33,19		35,42

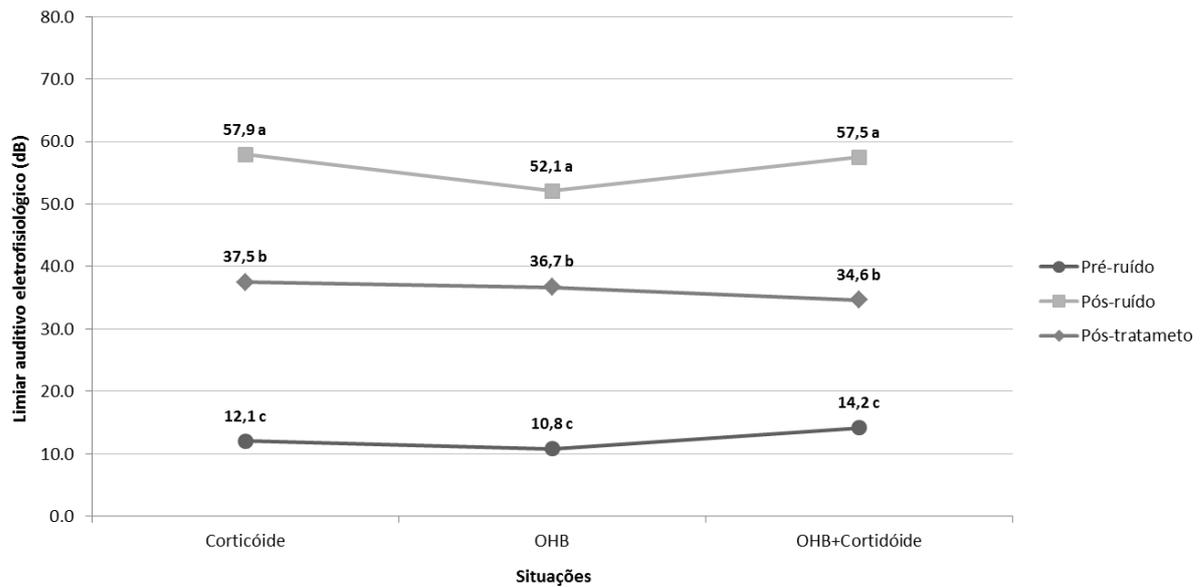
* ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente;

^[1] OHB: Oxigenoterapia hiperbárica; e ^[2] Tratamentos: Fator de variação tratamentos referente aos momentos de avaliação (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento).

OHB e CT (OHBCT). As análises individuais envolveram 18 repetições para cada momento de avaliação (pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento).

A qualidade experimental foi satisfatória para todas as situações conforme verificado através dos valores de coeficiente de variação (CV%) e/ou de acurácia (Ac). Em todas as situações houve diferença altamente significativa ($p \leq 0,01$) para o efeito entre momentos de avaliação, em todas as situações (CT, OHB e OHBCT). Assim, pelo menos um contraste entre as médias dos momentos de avaliação foi significativo para cada situação.

Pelo teste de Tukey foram avaliados os contrastes entre médias como apresentado na Figura 11. Independentemente da situação, o momento pós-ruído caracterizou-se como aquele de perda auditiva de maior grau evidenciado pelas maiores médias significativamente diferentes das demais (letra “a”). O momento pós-tratamento caracterizou-se por perda auditiva significativa de menor grau em relação ao pós-ruído (letra “b”), porém não significativa ao pré-ruído (letra “c”), o que representaria a recuperação total do dano auditivo provocado. Portanto, mesmo os



^a, ^b e ^c: teste de Tukey - médias seguidas de letras distintas são diferentes ao nível de 5%.

Figura 11 - Médias da variável limiar eletrofisiológico para os momentos de avaliação pré-ruído, pós-ruído e pós-tratamento em cada uma das respectivas situações (corticóide, OHB e OHB+corticóide, sendo OHB oxigenoterapia hiperbárica)

momentos pós-tratamento e pré-ruído diferindo significativamente, houve uma melhora constatada pela diferença entre os momentos pós-tratamento e pós-ruído, ou seja, através dessas significâncias pôde-se constatar que uma recuperação parcial ocorreu em todos os métodos terapêuticos.

Para comparar as diferentes situações (CT, OHB e OHBCT), são apresentados na Tabela 13, os graus de liberdade, os quadrados médios com as significâncias pelo teste F, as médias gerais, os coeficientes de variação (CV%) e as acurácias (Ac) obtidos nas análises de variâncias para a amplitude do limiar auditivo eletrofisiológico, entre os momentos de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, de modo que as análises individuais envolveram 18 repetições para cada uma das três situações.

Através dos valores do coeficiente de variação (CV%) e/ou de acurácia (Ac), pôde-se notar que a qualidade experimental foi satisfatória para todas as situações.

Tabela 13 - Fatores de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrados médios (QM) com as significâncias pelo teste F, coeficiente de variação (CV%), acurácia experimental (Ac) e média geral (MG), provenientes das análises de variâncias individuais para amplitude do limiar auditivo eletrofisiológico (em dB), de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído, para as situações (corticóide, OHB e OHB+corticóide) e as suas respectivas médias de amplitude

FV	Amplitude entre pós-tratamento e pré-ruído		Amplitude entre pós-tratamento e pós-ruído	
	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	2	72,7 ^{ns}	2	116,7 ^{ns}
Resíduo	51	202,1	51	185,0
CV%		89,27		104,20
Ac		0,9307		0,9587
MG		15,93		13,06
Corticóide		16,94 ^a		13,61 ^a
OHB ^[1]		17,22 ^a		10,28 ^a
OHB+Corticóide		13,61 ^a		15,28 ^a

*, ** e ^{ns}: teste F significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente;

^a: teste de Tukey - médias seguidas de letras iguais não diferem ao nível de 5%; e ^[1] OHB: Oxigenoterapia hiperbárica.

Para ambas as amplitudes do Limiar do pós-tratamento, tanto com pré-ruído quanto com pós-ruído, o teste F não foi significativo em todas as situações (CT, OHB e OHBCT), isto é, não houve diferença dessas amplitudes entre as três situações (Tabela 13).

O trauma acústico (TA) é uma súbita deficiência auditiva neurossensorial pela exposição do órgão auditivo a uma superestimulação acústica, tipicamente por intenso impulso sonoro (YLIKOSKI et al., 2008). Um TA resulta em alterações estruturais, como por exemplo, a ruptura das membranas celulares, redução do fluxo coclear sanguíneo e a destruição de células ciliadas da cóclea e/ou dendritos dos neurônios auditivos primários (CHAN; SUNESON; ULFENDAHL, 1998; D'ALDIN et al., 1999; KUOKKANEM; AARNISALO; YLIKOSKI, 2000; ENDO et al., 2005; ÇAKIR et al., 2006).

Alterações na oxigenação e o decréscimo do fluxo coclear sanguíneo parecem acontecer primeiro, induzindo a um acúmulo de radicais livres na cóclea que

desencadeia processos de disfunção e morte celular (THORNE; NUTTALL, 1989; YAMANE et al., 1995; LAMM; ARNOLD, 1996; YAMASHITA et al., 2005).

Os diversos tratamentos propostos para o trauma acústico têm objetivado a redução da inflamação e a promoção da oxigenação coclear. Para Lamm e Arnold (1998), a administração de drogas anti-inflamatórias em alterações cocleares induzidas por ruído é baseada no fato de alterações teciduais inflamatórias não serem apenas provocadas por bactérias, vírus ou outros processos imunopatológicos, mas também por danos celulares, hipóxia e isquemia tecidual.

Corticóides são as mais potentes drogas anti-inflamatórias e seu uso foi efetivo para o tratamento de trauma acústico (TAKAHASHI et al., 1996; LAMM; ARNOLD, 1998; D'ALDIN et al., 1999; TAHERA et al., 2006).

O grupo submetido à corticoterapia, apesar de não diferir com significância quanto a variável SR, teve uma redução média significativa do Limiar de 20,4 dB, diferindo 25,4 dB da situação pré-ruído. Portanto, os dados desta pesquisa corroboram a efetividade da corticoterapia quando aplicada a trauma acústico concordando com estudos anteriores (TAKAHASHI et al., 1996; LAMM; ARNOLD, 1998; D'ALDIN et al., 1999; TAHERA et al., 2006).

Na literatura é possível encontrar diferentes dosagens de corticóide aplicadas em trauma acústico, variando de 2 mg/kg a 200 mg/kg (D'ALDIN et al., 1999; LAMM; ARNOLD, 1999; FAKHRY; ROSTAIN; CAZALS, 2007). Apesar de d'Aldin et al. (1999) concluírem em seu estudo que apenas a dosagem de 20 mg/Kg de corticóide apresentou uma melhora significativa nos limiões, a dose de 10 mg/kg/dia eleita para esta pesquisa foi baseada no trabalho de Fakhry, Rostain e Cazals (2007) que demonstraram redução dos limiões auditivos com a mesma dosagem.

Vale ressaltar que na pesquisa de d'Aldin et al. (1999) foram estudadas as dosagens 2, 20, 40, 100 e 200 mg/kg, o que não descarta a possibilidade de efetividade da dosagem 10 mg/Kg. Porém, não se pode deixar de questionar a possibilidade de uma melhora mais expressiva com dosagens maiores do que a utilizada nesta pesquisa.

Como já discutido no experimento 1, o qual somente envolveu situações diferentes para oxigenoterapia hiperbárica, a OHB trata-se da maneira mais eficiente de aumentar os níveis de oxigênio (TIBBLES; EDELSBERG, 1996), favorecendo também o reparo à microcirculação, permitindo sua utilização no tratamento de diversas doenças, incluindo a perda auditiva neurosensorial (BAKKER, 1992).

O uso da OHB em trauma acústico consiste em prover um suprimento adequado de oxigênio evitando um estresse oxidativo, secundário ao quadro de hipóxia coclear, seguido até de eventuais mortes celulares de células inicialmente não lesadas (KUOKKANEM; AARNISALO; YLIKOSKI, 2000 e YLIKOSKI et al., 2008).

No grupo submetido somente a oxigenoterapia hiperbárica, as médias das SR também não diferiram significativamente entre os momentos de avaliação pós-ruído e pós-tratamento. Contudo, o Limiar reduziu significativamente 15,4 dB no pós-tratamento, diferindo 25,9 dB do momento pré-ruído. Esses achados corroboram a existência do efeito terapêutico da OHB isoladamente (COLOMBARI et al., 2011).

Estudos apontam a OHB potencializando a corticoterapia e essa associação como tendo o melhor efeito terapêutico entre os tratamentos utilizados na perda auditiva induzida por ruído (D'ALDIN et al., 1999; LAMM; ARNOLD, 1999 e FAKHRY; ROSTAIN; CAZALS, 2007).

A efetividade dessa combinação terapêutica foi evidenciada em perdas leves entre 20 e 25 dB (D'ALDIN et al., 1999 e LAMM; ARNOLD, 1999) e em perdas auditivas moderadas ao redor de 40 dB (FAKHRY, ROSTAIN E CAZALS, 2007).

A redução dos limiares auditivos na pesquisa de Fakhry, Rostain e Cazals (2007) foi similar à demonstrada por Lamm e Arnold (1999) e d'Aldin et al. (1999), o que levou os primeiros a questionarem um efeito constante e limitado da associação OHB e corticóide, independente do grau da perda auditiva.

Perante aumento médio do Limiar pós-ruído de 45,6 dB, a situação OHBCT apresentou uma redução média do Limiar de 22,9 dB, diferindo 20,4 dB da situação inicial. Essa redução foi maior do que a apresentada por Fakhry, Rostain e Cazals (2007), entre 10 e 15 dB, para perdas auditivas em 40 dB. Sendo assim, os achados da presente pesquisa contrapõem o efeito constante e limitado dessa associação terapêutica conforme previam tais autores. Tal argumento é ainda reforçado pelo tempo de terapia utilizado no presente estudo se comparado ao deste estudo de 2007, respectivamente, 5 e 10 dias.

A análise das amplitudes de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído permitiu a afirmação de que quanto menor a amplitude entre pós-tratamento e pré-ruído e maior a amplitude entre pós-tratamento e pós-ruído, mais expressiva foi a melhora relacionada ao tratamento.

Na Tabela 13 verificou-se que apesar de não diferirem significativamente, a menor amplitude pós-tratamento e pré-ruído foi a da situação OHBCT, seguido por CT e com maior amplitude em OHB ($OHBCT < CT < OHB$). Quanto à amplitude pós-tratamento e pós-ruído, a maior amplitude foi a da situação OHBCT, seguido respectivamente por CT e OHB ($OHBCT > CT > OHB$). Por isso, apesar de não ser

constatada diferença significativa entre essas situações, pôde-se afirmar uma tendência de melhor desempenho terapêutico na associação OHBCT.

Conseqüentemente, os dados aqui apresentados corroboram aos achados de Fakhry, Rostain e Cazals (2007) que em condições experimentais demonstraram que a associação da oxigenoterapia hiperbárica com corticoterapia, se comparada a cada tratamento isoladamente, conduziu a uma maior recuperação coclear após trauma acústico.

Portanto, cabe reiterar que os valores das amplitudes de pós-tratamento com pré-ruído e com pós-ruído da SR não diferiram significativamente e, por se tratarem de valores muito próximos, não foi possível constatar uma tendência característica.

5.3 Análises descritivas da microscopia eletrônica de varredura

5.3.1 Espécimes cocleares do experimento 1

Após 2 horas

A espira basal (EB) teve seu primeiro terço um padrão de alteração leve com distorções e/ou ausência de estereocílios assistemáticas na primeira fileira de CCEs (F1); Já o terço médio (Figura 12 A) apresentou perda ciliar mais expressiva na F1 e distorção ciliar nas fileiras dois (F2) e três (F3); No terço final houve uma maior perda ciliar na F1, principalmente nas duas extremidades superiores do característico “V” das CCEs e em alguns pontos isolados ocorreu ausência total dos cílios.

Na Segunda Espira (E2) o terço inicial apresentou na F1 um grande número de perdas ciliares, na F3 presença de desarranjos e perda de cílios e na F2 presença de alterações ciliares muito assistemáticas assim como ausência de CCEs; No terço médio (Figura 12 B) o padrão encontrado na F3 no terço inicial foi acentuado com mais alterações e ausências; No terço distal ocorreram algumas ausências na F1 e na F2, maiores alterações e ausências mais frequentes do que nos demais terços de E2.

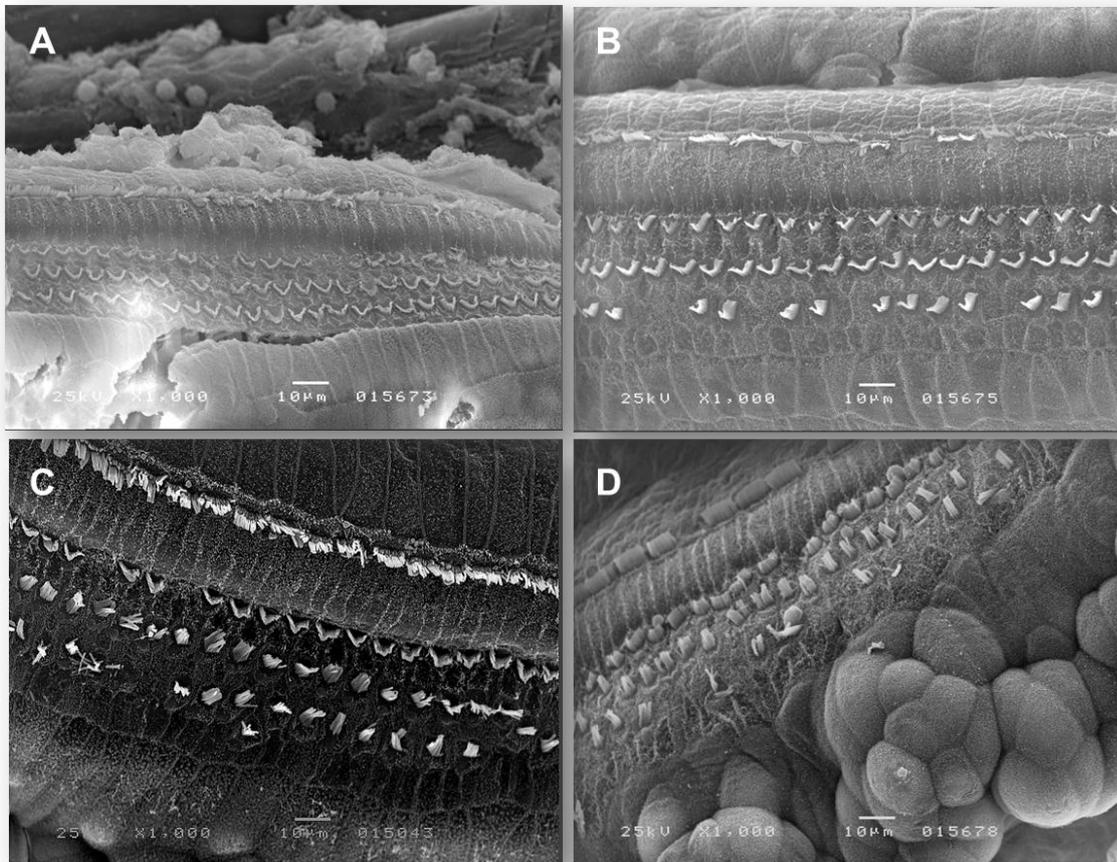


Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de oxigenoterapia hiperbárica (1 sessão/dia) com início terapêutico após 2 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical

Na Terceira Espira (E3) ocorreram mais alterações e ausências, caracterizando um terço inicial com muitas ausências na F2 e na F3 e as CCEs presentes com desarranjos dos cílios nas três fileiras; No terço médio (Figura 12 C) houve grande alteração por toda a F3, com perda de estereocílios e desarranjos; No terço distal esse padrão se manteve bom com breve melhora no padrão de ausência ciliar. Uma melhora progressiva ocorreu na extensão da espira apical (Figura 12 D).

Após 4 horas

A EB teve seu primeiro terço caracterizado por um padrão ciliar pouco alterado, apenas com perdas isoladas de estereocílios na F1; Já o terço médio (Figura 13 A) apresentou perda ciliar mais expressiva na F1 e distorção ciliar nas F2 e F3; No terço final houve uma maior perda ciliar na F1, principalmente nas duas extremidades superiores do característico “V” das CCEs e em alguns pontos isolados ocorreu ausência total dos cílios.

A E2 em seu terço inicial apresentou um padrão similar ao terço final da EB na F1, porém, com maior ocorrência de perda celular presente nas três fileiras (F1>F3>F2); O terço médio (Figura 13 B) caracterizou-se por distorções ciliares de maior amplitude e severidade de perda celular na F1; O terço final apresentou perda celular nas três fileiras, contudo mais intensa na F1 e na F3, a F2 apesar de moderada perda celular, apresentou severa distorção ciliar.

Na E3 observou-se uma maior diversidade de dados, mas no terço inicial foi mais presente a perda celular severa na F1, seguindo o padrão do último terço da E2; No terço médio alguns espécimes apresentaram um padrão semelhante ao terço

inicial, porém, com menor severidade, mas a maioria dos espécimes foi caracterizada com uma frequência muito menor de perda celular, assim como menor perda de estereocílios nas três fileiras (Figura 13 C), esse padrão se estendeu pelo terço final, apenas com perdas celulares progressivamente menos frequentes. No extremo da E3, transição para a Apical, notou-se uma boa melhora no padrão ciliar (Figura 13 D).

Uma característica a ser destacada nos espécimes Após 4 horas foi a maior ocorrência de vacuolizações concentradas nas CCI em todas as espiras.

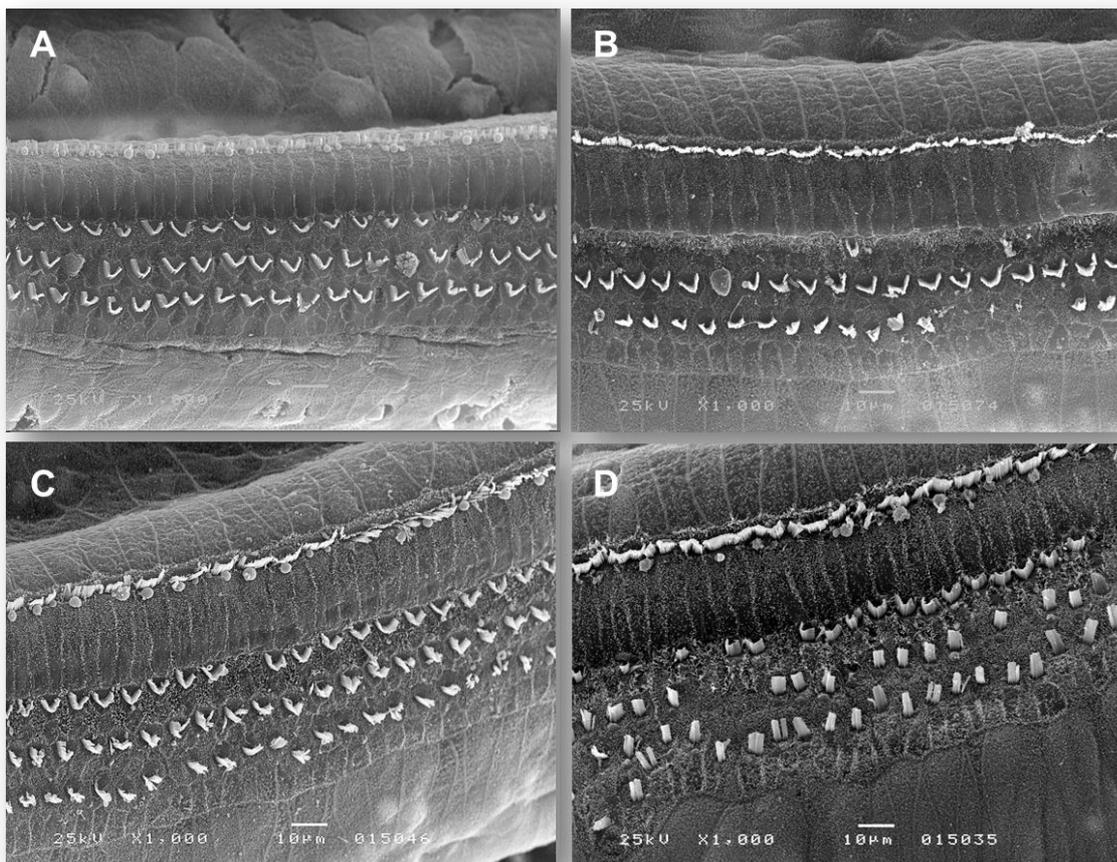


Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de oxigenoterapia hiperbárica (1 sessão/dia) com início terapêutico após 4 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical

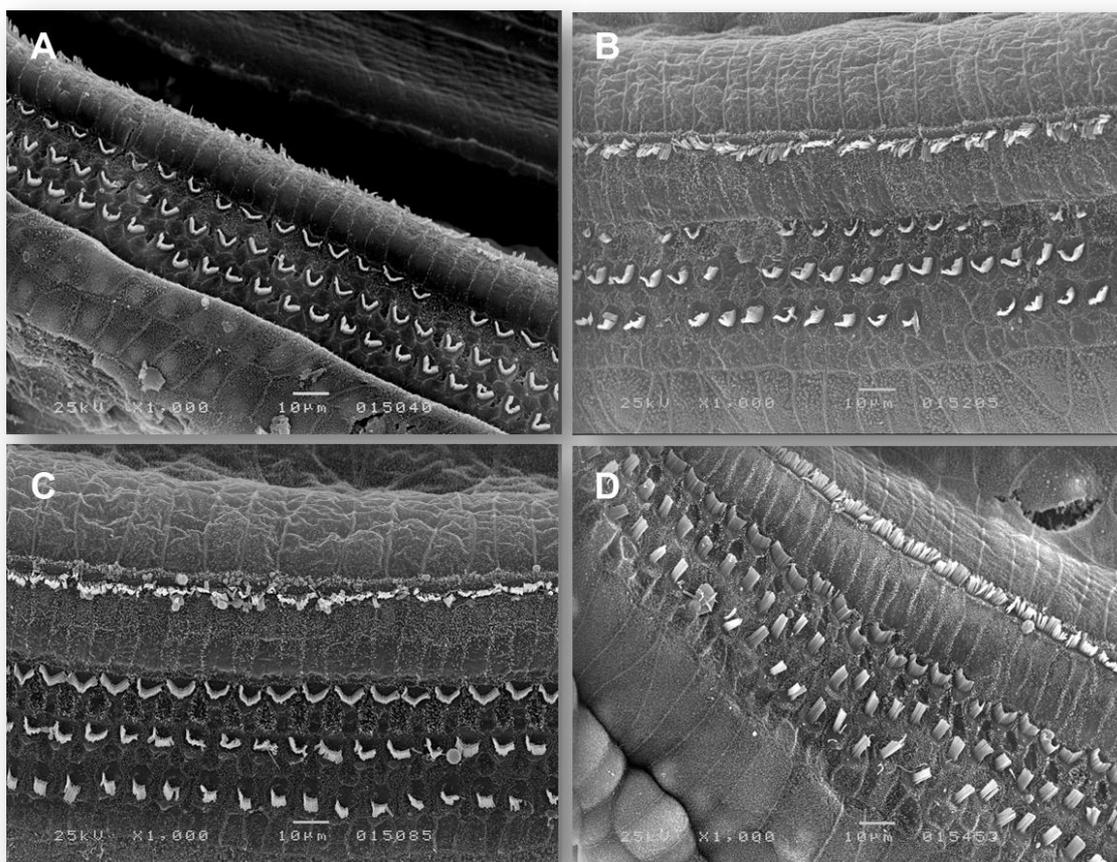


Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de oxigenoterapia hiperbárica (1 sessão/dia) com início terapêutico após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical

Após 6 horas/ OHB isolada

A EB em seu primeiro terço apresentou-se em seu padrão anatômico habitual, sem distorção ciliar e/ou ausência de células ciliadas; Progressivamente, do terço médio (Figura 14 A) ao final verificou-se um perfil com distorção ciliar e perda ciliar, de leve a moderado, apenas na F1 em que as perdas ciliares ocorreram nas duas extremidades superiores do característico “V” das CCEs.

A E2 no terço inicial caracterizou-se com um padrão similar ao terço final da basal na F1 quanto a distorções ciliares, porém ocorreram perdas celulares isoladas nas três fileiras; O terço médio (Figura 14 B) caracterizou-se por distorções ciliares de maior amplitude na F1 e por perdas celulares nas três fileiras, porém com maior frequência na F1 se comparada às demais; Observou-se no terço final um maior comprometimento do padrão “V/W”, com alterações ciliares e intensa perda celular na F1, moderada na F2 e na F3.

No terço inicial da E3 observou-se o mesmo padrão do terço final de E2; No terço médio (Figura 14 C) verificou-se apenas distorções ciliares nas três fileiras; A partir do terço final de E3 (+) até a Apical (Figura 14 D), houve uma melhora progressiva do padrão, aproximando-se do padrão anatômico habitual.

Um resumo dos achados em MEV para as situações após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas está demonstrado no Quadro 1. Nota-se que as situações após 2 horas e 4 horas não diferiram em seu aspecto geral, somente pela maior ocorrência de perda celular no terço inicial da E3 e a maior presença de vacuolizações nos espécimes da situação após 4 horas se comparada a da situação após 2 horas Já a

Quadro 1 - Caracterização do padrão ciliar coclear dos espécimes observados pela Microscopia eletrônica de varredura das situações de tratamento após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído

		Após 2h	Após 4h	Após 6h
Espira Basal	Terço Inicial	+	+	nl
	Terço Médio	++	++	+
	Terço Final	++v	++v	++
Segunda Espira	Terço Inicial	++vv	++vv	++v
	Terço Médio	+++vv	+++vvv	+++vv
	Terço Final	+++vvv	+++vvv	+++vvv
Terceira Espira	Terço Inicial	+++vv	+++vvv	+++vv
	Terço Médio	++vv	++vv	++v
	Terço Final	++vv	++v	+v

+, ++, +++: distorção ciliar e perda de estereocílios leve, moderada e severa, respectivamente; e v, vv, vvv: perda ciliar leve, moderada e severa, respectivamente.

situação após 6 horas diferiu em quatro terços dos demais, caracterizando um padrão geral menos alterado.

A organização precisa da actina e fibrina com os cílios sensoriais proporcionam enorme rigidez aos estereocílios, e permite que tais atuem como estruturas acessórias de alta eficiência para transferir energia vibracional às células ciliadas. A exposição a um ruído intenso pode provocar a quebra desses filamentos, gerando um desarranjo ciliar como estereocílios tombados. Esse desarranjo ciliar reduz significativamente a função do amplificador coclear (CCEs) (SAUNDERS; DEAR; SCHNEIDER,1985; CHAN; SUNESON; ULFENDAHL,1998 e ZUO et al., 2008).

A recuperação dos estereocílios após danos estruturais os deixam menos rígidos e, a redução da rigidez observada nas CCs parece ser a causa para os descendentes turnos de frequências caracterizados após o trauma acústico (SAUNDERS; DEAR; SCHNEIDER,1985; CHAN; SUNESON; ULFENDAHL,1998)

Através da avaliação funcional por meio das EOAPD, foi possível comprovar a significativa redução de resposta após a exposição ao ruído (Tabela 3), caracterizando a consequência funcional das distorções ciliares encontradas nos espécimes cocleares analisados.

Quando as CCs são severamente afetadas por uma grande estimulação, os retículos endoplasmáticos das CCEs podem apresentar vacuolizações, e pode ocorrer um aumento do tamanho das mitocôndrias de maneira a alterar até mesmo a forma celular (SAUNDERS; DEAR; SCHNEIDER,1985).

As alterações morfológicas no sistema do retículo endoplasmático e da mitocôndria sugerem déficits no abastecimento celular, nas sínteses protéicas e

produção de energia. Quando esses déficits são severos o suficiente, a célula pode não mais se manter, acontecendo sua degeneração (SAUNDERS; DEAR; SCHNEIDER, 1985).

Segundo Oliveira, Canedo e Rossato (2002), os radicais livres são produzidos em cada célula como um subproduto de eventos bioquímicos normais, principalmente na respiração celular ao nível das mitocôndrias e em processos anormais no organismo. De acordo com Endo et al. (2005) e Poirrier et al. (2010), o superóxido é facilmente gerado na orelha interna depois de uma superestimulação acústica. Através de uma reação de Fenton catalizada pelo íon ferro, o superóxido forma destrutivos radicais hidroxila (OH) ou pode combinar com os radicais do óxido nítrico formando peroxinitrito, altamente tóxico. Portanto, a regulação dos níveis de superóxido é uma importante degeneração causada pelas espécies reativas de oxigênio.

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que converte superóxido em peróxido de hidrogênio e em três subtipos. Endo et al., (2005) afirmam que a ausência de cobre/zinco-superóxido dismutase (SOD1), o subtipo mais presente na cóclea, está relacionada com o aumento da perda auditiva devido a um TA. Além disso, a disfunção auditiva devido à exposição ao ruído é atenuada pela aplicação de SOD1. Um dos efeitos fisiológicos do oxigênio hiperbárico citado por Hammarlund (2002) é justamente a estimulação da produção de SOD.

A OHB quando utilizada em um trauma acústico, consiste principalmente em prover um suprimento adequado de oxigênio evitando um estresse oxidativo secundário ao quadro de hipóxia coclear, seguido até de eventuais mortes celulares de células inicialmente não lesadas (KUOKKANEM; AARNISALO; YLIKOSKI, 2000 e YLIKOSKI et al., 2008).

Estudos apontam um efeito negativo da OHB quando administrada na primeira hora após exposição ao ruído visto que a mesma lida com o aumento de radicais livres como superóxido, OH e peróxido de hidrogênio, o que pode causar danos celulares como oxidação do DNA, de lipídeos e de proteínas (D'ALDIN et al., 1999 e ÇAKIR et al., 2006).

Os achados em pesquisa de D'Aldin et al. (1999) demonstraram um efeito lesivo da OHB administrada na primeira hora pós trauma. Para Çakir et al. (2006) é necessário um certo tempo para que as enzimas responsáveis pela defesa antioxidativa sejam ativadas e o aumento de metabólitos reativos ao oxigênio com a aplicação da OHB, na primeira hora após a exposição, somados aos quais já haviam sido produzidos na cóclea após o TA, suprime ainda mais a capacidade de defesa antioxidativa do sistema.

Apesar dos dados da presente pesquisa não permitirem afirmar que realmente ocorreu um pico de supressão da capacidade de defesa antioxidativa, é possível considerar uma otoproteção menos eficaz das situações após 2 e 4 horas, visto que os espécimes cocleares dessas situações apresentaram maior ocorrência de vacuolizações, caracterizando um maior sofrimento celular, do que a situação após 6 horas.

Kuokkanem, Aarnisalo e Ylikoski (2000) e Çakir et al. (2006) concluíram que os primeiros benefícios terapêuticos da OHB têm início quando a mesma é aplicada 2 horas após a exposição ao ruído e quando após 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído, um efeito terapêutico mais efetivo pode ser evidenciado. Os achados em MEV apresentaram concordância com esses achados, visto que houve uma maior preservação morfológica das CCs nos espécimes da intervenção após 6

horas, demonstrando que uma maior otoproteção aos danos metabólicos ocorreu quando a intervenção foi realizada após um maior repouso auditivo.

5.3.2 Espécimes cocleares do experimento 2

Após 6 horas/ OHB isolada

A EB em seu primeiro terço apresentou-se em seu padrão anatômico habitual, sem distorção ciliar e/ou ausência de células ciliadas; Progressivamente, do terço médio (Figura 13 A) ao final verificou-se um perfil com distorção ciliar e perda ciliar, de leve a moderado, apenas na F1 em que as perdas ciliares ocorreram nas duas extremidades superiores do característico “V” das CCEs.

A E2 no terço inicial caracterizou-se com um padrão similar ao terço final da basal na F1 quanto a distorções ciliares, porém ocorreram perdas celulares isoladas nas três fileiras; O terço médio (Figura 13 B) caracterizou-se por distorções ciliares de maior amplitude na F1 e por perdas celulares nas três fileiras, porém com maior frequência na F1 se comparada às demais; Observou-se no terço final um maior comprometimento do padrão “VW”, com alterações ciliares e perda celular severa na F1, moderada na F2 e na F3.

No terço inicial da E3 observou-se o mesmo padrão do terço final de E2; No terço médio (Figura 13 C) verificou-se apenas distorções ciliares nas três fileiras; A partir do terço final de E3 (+) até a Apical (Figura 13 D), houve uma melhora progressiva do padrão, aproximando-se do padrão anatômico habitual.

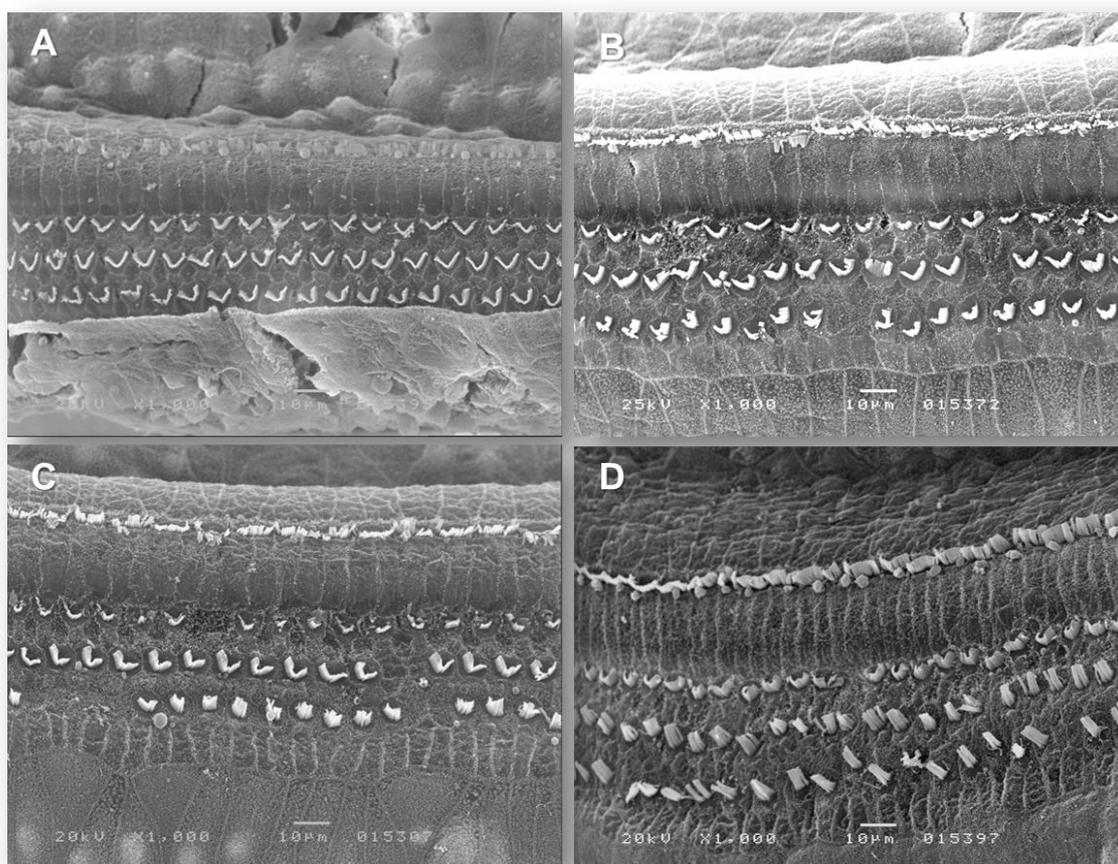


Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de corticoterapia (10mg/kg/dia) com início terapêutico 2 horas após exposição ao ruído. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical

Corticoterapia (CT)

A EB em seu primeiro terço apresentou um padrão de normalidade, sem distorção ciliar e/ou ausência de células ciliadas; Os terços médio (Figura 15 A) e final apresentaram um perfil com distorção ciliar e perda ciliar muito leve, apenas na F1.

A E2 no seu terço inicial apresentou distorções e perdas ciliares na F1, mais acentuadas que na EB, com perdas celulares isoladas nas três fileiras; O terço

médio (Figura 15 B) caracterizou-se por distorções ciliares nas três fileiras, mais evidenciadas na F1, e por perdas celulares isoladas nas três fileiras com maior frequência na F1 se comparada às demais; Observou-se no terço final uma continuidade do padrão do terço médio com piora apenas na transição para E3.

No terço inicial da E3 houve um maior comprometimento do padrão habitual, com maior ausência de CCEs na F1; No terço médio (Figura 14 C) ocorreram maiores alterações ciliares e perda celular na F1, alterações e perdas celulares moderadas ocorreram na F2 e na F3; A partir do terço final de E3 até a Apical (Figura 15 D), houve uma melhora progressiva do padrão, aproximando-se do padrão anatômico habitual.

Associação entre oxigenoterapia hiperbárica e corticóide (OHBCT)

A EB em seu primeiro terço apresentou um padrão anatômico habitual, sem distorção ciliar e/ou ausência de células ciliadas; O terço médio (Figura 16 A) e final apresentou distorção e perda ciliar leve, concentrada na F1.

A E2 no seu terço inicial apresentou distorções e algumas perdas ciliares na F1, mais acentuadas que no terço final da EB; O terço médio (Figura 16 B) caracterizou-se por distorções ciliares nas três fileiras, mais evidentes na F1, e por perdas celulares isoladas nas três fileiras, porém com maior frequência na F1 se comparada às demais; O terço final apresentou um padrão muito semelhante ao terço médio.

No terço inicial da E3 houve uma continuidade do padrão de E2, porém com uma F1 menos comprometida; No terço médio (Figura 16 C) as distorções ciliares foram mantidas, porém com um padrão com frequência bem menor de perda ciliar;

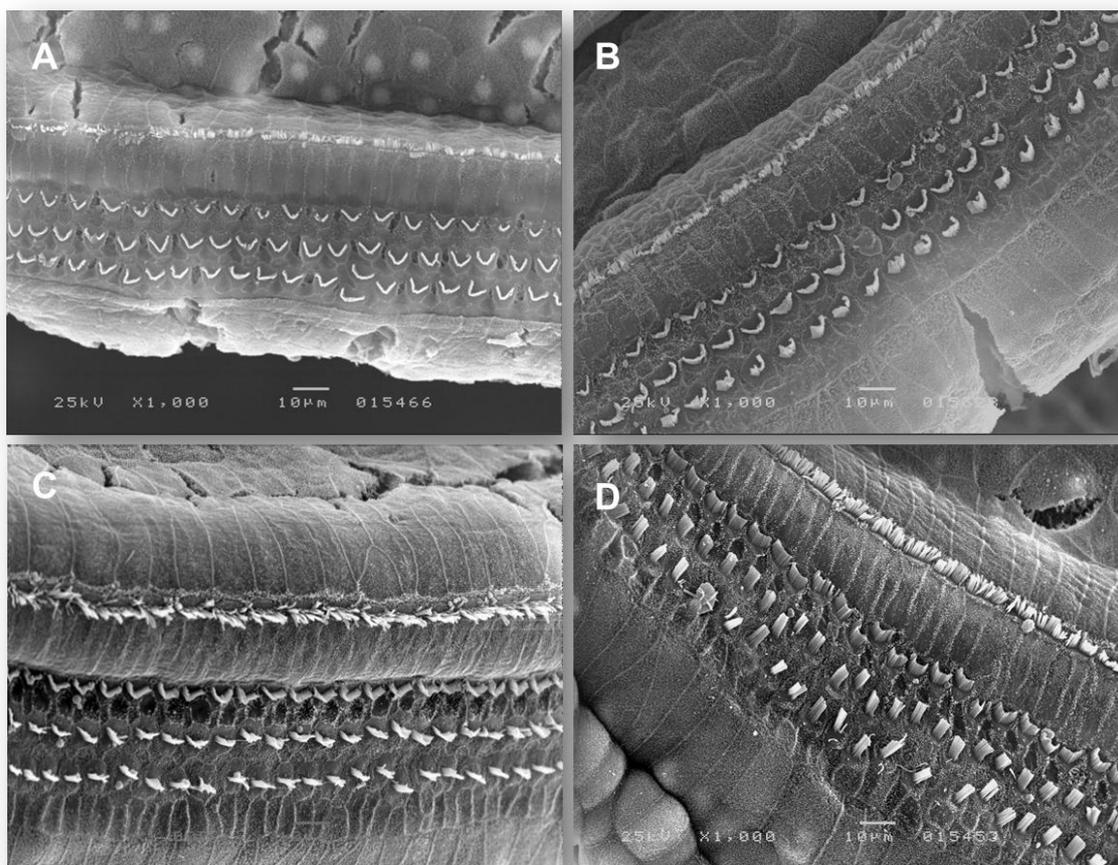


Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura, com ampliação de 1000 vezes, de espécimes cocleares de cobaias submetidas a cinco dias de corticoterapia (10mg/kg/dia) associada a oxigenoterapia hiperbárica (1 sessão/dia) com início terapêutico 6 horas após exposição ao ruído.. A, refere-se ao terço médio da espira basal; B, terço médio da segunda espira; C, terço médio da terceira espira e D, terço médio da apical

A partir do terço final de E3 até a Apical (Figura 16 D), a melhora foi progressiva, aproximando-se do padrão anatômico habitual.

O Quadro 2 ilustra um resumo dos achados em MEV para as situações CT, OHB e OHBCT. Independente do método terapêutico aplicado, o terço inicial da EB não apresentou alterações e o terço médio dessa mesma espira teve apenas algumas distorções ciliares e ou perda de estereocílios classificadas como grau leve.

Quadro 2 - Caracterização do padrão ciliar coclear dos espécimes observados pela Microscopia eletrônica de varredura das situações de tratamento pela oxigenoterapia hiperbárica, corticoterapia e associação da oxigenoterapia hiperbárica com a corticoterapia

		Oxigenoterapia Hiperbárica	Corticoterapia	Oxigenoterapia Hiperbárica com Corticoterapia
Espira Basal	Terço Inicial	nl	nl	nl
	Terço Médio	+	+	+
	Terço Final	++	+	+
Segunda Espira	Terço Inicial	++v	++v	+
	Terço Médio	+++vv	++v	++v
	Terço Final	+++vvv	++v	++v
Terceira Espira	Terço Inicial	+++vv	+++vv	++v
	Terço Médio	++v	+++vv	+v
	Terço Final	+v	++v	+v

+, ++, +++: distorção ciliar e perda de estereocílios leve, moderada e severa, respectivamente; e v, vv, vvv: perda ciliar leve, moderada e severa, respectivamente.

Já o terço final da EB submetido ao tratamento por OHB diferiu dos demais grupos com um grau moderado de distorção e/ou perda ciliar.

O grupo submetido à associação OHBCT apresentou o terço inicial da E2 menos alterado quando comparado às terapias isoladas; Os terços médio e final dessa espira apresentaram um perfil muito similar entre CT e OHBCT, mas se comparado ao padrão de alteração de OHB, nota-se um padrão mais próximo do habitual.

A E3 em toda sua extensão teve um padrão muito melhor no grupo OHBCT quando comparado aos grupos OHB e CT. Toda a espira com um grau leve de perda celular e um terço inicial com distorção e/ou perda ciliar moderada e demais terços com um comprometimento leve.

A exposição a um ruído intenso pode provocar danos como desarranjos, colapsos, perdas, fusões, ou alongamento das células sensoriais auditivas. Tais autores referem ainda que as células ciliadas podem também mostrar uma porção ou todos os seus cílios sensoriais quebrados (SAUNDERS; DEAR; SCHNEIDER, 1985).

Em recente estudo realizado por Zuo et al. (2008), perda e desarranjos de estereocílios das CCs foram os danos morfológicos observados em cócleas expostas ao ruído.

O espectro de alterações anatômicas nos estereocílios das células sensoriais (CCEs) encontradas nos espécimes analisados esteve de acordo com o descrito em literatura.

Saunders, Dear e Schneider (1985) mostram que os danos induzidos mecanicamente, geralmente, têm rápida recuperação, já aqueles induzidos por exaustão metabólica têm uma recuperação mais gradual.

Stengs et al. (1997) sugeriram um mecanismo de autodefesa perante a recuperação espontânea das CCEs lesadas, contudo, Cardinaal et al. (2000b) afirmaram que esses mesmos achados não permitem uma conclusão quanto à questão da ocorrência de uma recuperação das células danificadas ou a formação de novas células.

Smooenburg et al. (1999) sugerem que a recuperação espontânea de lesão coclear pode ocorrer na cóclea madura de mamíferos, porém, ao contrário do sistema auditivo de aves, a cóclea dos mamíferos é incapaz de regenerar novas células ciliadas, resultando em uma perda auditiva irreversível (ENDO et al., 2005). Após 5 dias da lesão por ruído um reparo sináptico pode vir a ocorrer, mas as células lesadas permanecem (D'ALDIN et al., 1999 e COLOMBARI et al., 2011).

Cobaias expostas ao ruído não se recuperaram após cinco dias de repouso e, se comparadas a situação imediata pós-ruído, apresentaram um quadro de lesão ainda maior devido aos danos metabólicos presentes mesmo depois de cessado o estímulo lesivo (COLOMBARI et al., 2011).

Colombari et al. (2011) demonstraram significativa melhora anatômica apesar de não significância estatística nas avaliações funcionais pós OHB. Lamm e Arnold (1999) e D´Aldin et al. (1999) concluíram em seus trabalhos que apesar da não recuperação completa, a intervenção através da oxigenoterapia hiperbárica associada a corticoterapia resultou em significante recuperação morfológica.

Nota-se que apesar das situações CT, OHB e OHBCT não diferirem significativamente na avaliação auditiva funcional, a tendência de melhor eficácia terapêutica na situação OHBCT pode ser visualizada também na MEV perante maior preservação anatômica, em que uma maior recuperação e/ou maior otoproteção aos danos metabólicos ocorreu.

6 CONCLUSÕES

Os achados nas avaliações funcionais não demonstraram diferença significativa entre os momentos de intervenção pela OHB após 2, 4 e 6 horas de repouso auditivo após exposição ao ruído, contudo, os dados de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que uma maior otoproteção aos danos metabólicos ocorreu quando a intervenção foi realizada após um maior repouso auditivo.

Pelas observações funcionais e anatômicas pode-se concluir que a associação terapêutica entre a OHB e a corticoterapia desempenhou um melhor efeito otoprotetor e terapêutico do que quando essas mesmas terapias realizadas isoladamente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, G. C.; TIU, C.; KOIKE, K.; RITCHEY, A. K.; KURS-LASKY, M.; WAX, M. K. Transient-evoked otoacoustic emissions in children after cisplatin chemotherapy. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, Rochester, v. 118, n. 5, p. 584-588, may. 1998.

BAKKER, D. J. Hyperbaric oxygen therapy: Past, present and future indications. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v. 317, p. 95-105, 1992.

ÇAKIR, B. O.; ERGAN, I.; CIVELEK, S.; KÖRPINAR, S.; TOKLU, A. S.; GEDIK, O.; ISIK, G.; SAYIN, I.; TURGUT, S. Negative Effect of immediate hyperbaric oxygen therapy in acute trauma. *Otol. Neurotol.*, Hagerstown, v. 27, n. 4, p. 478-483, jun. 2006.

CARDINAAL, R. M.; GROOT, J. C. M. J.; HUIZING, E. H.; VELDMAN, J. E.; SMOORENBURG, G. F. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hear. Res.*, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 135-146, jun. 2000 a.

CARDINAAL, R. M.; GROOT, J. C. M. J.; HUIZING, E. H.; VELDMAN, J. E.; SMOORENBURG, G. F. Cisplatin-induced ototoxicity: morphological evidence of spontaneous outer hair cell recovery in albino guinea pigs? *Hear. Res.*, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 147-156, jun. 2000 b.

CEVETTE, M. J.; DREW, D.; WEBB, T. M.; MARION, M. S. Cisplatin ototoxicity, increased DPOAE amplitudes, and magnesium deficiency. Distortion product otoacoustic emissions. *J. Am. Acad. Audiol.*, Burlington, v. 11, n. 6, p. 323-329, jun. 2000.

CHAN, E.; SUNESON, A.; ULFENDAHL, M. Acoustic trauma causes reversible stiffness changes in auditory sensory cells. *Neuroscience*, Oxford, v. 83, n. 3, p. 961-968, apr. 1998.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental design**. 2 ed. New York: John Wiley, 1966. 611p.

COLOMBARI, G. C.; ROSSATO, M.; FERES, O.; HYPPOLITO, M. A. Effects of hyperbaric oxygen treatment on auditory hair cells after acute noise damage. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, Heidelberg, v. 268, n. 1, p. 49-56, jan. 2011

D'ALDIN, C.; CHERNY, L.; DEVRIÈRE, F.; DANCER, A. Treatment of Acoustic Trauma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 884, n. 28, p. 328-344, nov. 1999.

DEMARCO, R. C. *Uso da gentamicina intra-timpânica para induzir ablação vestibular unilateral em cobaias*. Tese de Dissertação de Mestrado - FMRP-USP. Ribeirão Preto, 2001.

ENDO, T.; NAKAGAWA, T.; IGUCHI, F.; KITA, T.; OKANO, T.; SHA, S. H.; SCHACHT, J.; SHIGA, A.; KIM, T. S.; ITO, J. Elevation of superoxide dismutase increases acoustic trauma from noise exposure. *Free Radical Biology & Medicine*, Tarrytown, v. 38, n. 4, p. 492-498, feb. 2005.

FAKHRY, N.; ROSTAIN, J. C.; CAZALS, Y. Hyperbaric oxygenation with corticoid in experimental acoustic trauma. *Hear. Res.*, Amsterdam, v. 230, n. 4, p. 88-92, aug. 2007.

FREITAS, M. R.; SILVA, V. C.; BRITO, G. A. C.; CARVALHO JUNIOR, J. V.; GOMES JUNIOR, R. M.; RIBEIRO, R. A. Avaliação da sensibilidade das emissões otoacústicas produtos de distorção e dos potenciais auditivos evocados de tronco encefálico na ototoxicidade por cisplatina em ratos. *Braz. j. otorhinolaryngol.*, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 476-484, jul.-ago. 2009.

GORGA, M. P.; NEELY, S. T.; DORN, P. A. Distortion product otoacoustic emissions in relation to hearing loss. In: ROBINETTE, M. S.; GLATTKE, T. J. *Otoacoustic Emissions: clinical applications*. 2. Ed. Ver. New York: Thieme, 2001. chap. 10, p. 243 - 272.

HALL III, J. W. **Handbook of Audiometry Evoked Responses**. Boston: Allyn and Bacon, 1992.

HALL, J. W. Otoacoustic Emissions: Then and Now. In: HALL, J. W. **Handbook of Otoacoustic Emissions**. Singular Publishing Group, San Diego, 2000 a, chap.1, p. 26 - 28.

HALL, J. W. Distortion Product and Transient Evoked OAEs: Measurement and Analysis. In: HALL, J. W. **Handbook of Otoacoustic Emissions**. Singular Publishing Group, San Diego, 2000 b, cap.4, p. 104-138.

HAREL, N.; KAKIGI, A.; HIRAKAWA, H.; MOUNT, R. J.; HARRISON, R. V. The Effects of Anesthesia on Otoacoustic Emissions. *Hear. Res.*, Amsterdam, v. 110, n. 1-2, p. 25-33, aug. 1997.

HAMMARLUND, C. The physiologic effects of hyperbaric oxygen. In: KINDWALL, E. P.; WHELAN, H. T. **Hyperbaric Medicine Practice**. Flagstaff: Best Publishing Company, 2002, 2^aed. revised, cap.2, p.17-32.

HYDE, G. E.; RUBEL, E. W. Mitochondrial role in hair cell survival after injury *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, Rochester, v. 113, n. 5, p. 530-540, nov. 1995.

JERO, J.; COLING D. E.; LALWANI, A. K. The use of Preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. *Acta Otolaryngol.*, Oslo, v. 121, n. 5, p. 585-589, jul. 2001.

JEWETT, D. L.; WILLINSTON, J. S. Auditory-evoked far fields averaged from scalp of humans. *Brain*. London, v. 94, n.4, p. 681 – 696, april 1971.

KEMP, D. T. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J. Acoustic. Soc. Am.*, Lancaster, v. 64, n. 5, p.1386 – 1391, nov. 1978.

KUOKKANEM, J.; AARNISALO, A. A.; YLIKOSKI, J. Efficiency of hyperbaric oxygen therapy in experimental acute acoustic trauma from firearms. *Acta. Otolaryngol. Suppl.*, Oslo, v. 120, n. 1, p.132-134, jan. 2000.

LAMM, K.; ARNOLD, W. Noise-induced cochlear hypoxia is intensity dependent, correlates with hearing loss and precedes reduction of cochlear blood flow. *Audiol. Neurootol.*, v. 1, n. 3, p.148-160, Basel, may-jun. 1996.

LAMM, K.; ARNOLD, W. The effect of prednisolone and non-steroidal anti-inflammatory agents on the normal and noise-damaged guinea pig inner ear. *Hear. Res.*, Amsterdam, v. 115, n.1-2, p. 149-161, jan.1998

LAMM, K.; ARNOLD, W. Successful Treatment of Noise-Induced Cochlear Ischemia, Hypoxia, and Hearing Loss. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, New York, v. 884, n. 28, p. 233-248, nov. 1999.

LIMA, M. A. M. T. Potencial Evocado Auditivo - Eletrococleografia e Audiometria de Tronco Encefálico. In: FROTA, S. **Fundamentos em Fonoaudiologia. Audiologia.** Editora Guanabara Koogan, 1998. cap.12, p. 147-160.

LONSBURY- MARTIN, B. L.; MARTIN, G. K. Distortion product otoacoustic emissions. In: ROBINETTE, M. S.; GLATTKE, T. J. *Otoacoustic Emissions: clinical applications*. 2. Ed. Ver. New York: Thieme, 2001. chap. 5, p. 116 - 142.

OLIVEIRA, J. A. A. O; CANEDO, D. M.; ROSSATO, M. Otoprotection of auditory hair cells against amikacin ototoxicity. *Rev. Bras.Otorrinolaringol.*, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 7-13, jan.- feb. 2002.

OZTURAN, O.; JERGER, J.; LEW, H.; LYNCH, G. R. Monitorinf of cisplatin ototoxicity by distortion-product otoacoustic emissions. *Auris Nasus. Larynx.*, Amsterdam, v.23, p.147-151, 1996.

POIRRIER, A. L.; PINCEMAIL, J.; VAN DEN ACKERVEKEN, P.; LEFEBVRE, P. P.; MALGRANGE, B. Oxidative Stress in the cochlea: an update. *Curr. Med. Chem.*, Schiphol, v. 17,n. 30, p. 3591-3604, oct. 2010.

PREYER, W. Die Seele des Kindes. Grieben – Verlag. Liepzig, 1882.

RESENDE, M.D.V.; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. *Pesq. Agrop. Trop.*, Goiânia, v.37, n.3, p.182-194, jul./set. 2007.

RESS, B. D.; SRIDHAR, K. S.; BALKANY, T. J.; WAXMAN, G. M.; STAGNER, B. B.; LONSBURY-MARTIN, B. L. Effects of cis-platinum chemotherapy on otoacoustic emissions: the development of an objective screening protocol. Third place Resident Clinical Science Award 1998. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, Rochester (St. Louis), v. 121, n. 6, p. 693-701, dec. 1999.

SAITO, T.; MANABE, Y.; HONDA, N.; YAMADA, T.; YAMAMOTO, T.; SAITO, H. Semiquantitative analysis by scanning electron microscopy of cochlear hair cell damage by ototoxic drugs. *Scanning Microsc.*, Chicago, v. 9, n. 1, p. 271-280, discussion 280-281, mar. 1995.

SAUNDERS, J. C.; DEAR, S. P.; SCHENEIDER, M. E. The anatomical consequences of acoustic injury: A review and tutorial. *J. Acoustic. Soc. Am*, Melville, v. 78, n. 3, p. 833-860, sept. 1985.

SHAW, N. A. The Auditory Evoked Potential in the Rat - a Review. *Prog. Neurobiol.*, New York, v. 31, n. 1, p.19-45, jan. 1988.

SIE, K. C.; NORTON, S. J. Changes in otoacoustic emissions and auditory brain stem response after cisplatin exposure in gerbils. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, Rochester, v. 116, n. 6, p. 585 - 92, jun. 1997.

SMOORENBURG, G. F.; DE GROOT, J. C.; HAMERS, F. P.; KLIS, S. F. Protection and spontaneous recovery from cisplatin-induced hearing loss. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, New York, v. 884, n. 28, p.192-210, nov.1999

SOCKALINGAM, R.; FREEMAN, S.; CHERNY, T. L.; SOHMER, H. Effect of high-dose cisplatin on auditory brainstem responses and otoacoustic emissions in laboratory animals. *Am. J. Otol.*, Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 521 - 527, jul. 2000.

SPOENDLIN, H. Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol.*, Oslo, v. 71, n. 2, p. 166-176, feb./mar. 1971.

STACH, B. A. **Comprehensive Dictionary of Audiology Illustrated**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997.

STADNICKI, S. W.; FLEISCHMAN, R. W.; SCHAEPPPI, U. Ototoxicity of Cis-dichlorodiammine Platinum (II) (NSC-119875): Hearing loss and Other Toxic Effects in Rhesus Monkeys. *Can. Chemother. Ver.*, Bethesda, v. 59, n. 3, p. 467-480, may-jun. 1975.

STENGES, C. H. M.; KLIS, S. F. L.; HUIZING, E. H.; SMOORENBURG, G. F. Cisplatin-induced ototoxicity; electrophysiological evidence of spontaneous recovery in the albino guinea pig. *Hear. Res.*, Amsterdam, v.111, n.1-2, p.103-113, sep. 1997

STENGES, C. H. M.; KLIS, S. F. L.; HUIZING, E. H.; SMOORENBURG, G. F. Protective Effects of a Neurotrophic ACTH (4-9) Analog on Cisplatin Ototoxicity in Relation to the Cisplatin Dose: An Electrocochleographic Study in Albino Guinea Pigs. *Hear. Res.*, Amsterdam, v.124, n. 1-2, p. 108-117, oct. 1998.

TAHERA, Y.; MELTSER, I.; JOHANSSON, P.; BIAN, Z.; STIERNA, P.; HANSSON, A. C.; CANLON, B. NF-kappaB mediated glucocorticoid response in the inner ear after acoustic trauma. *J. Neurosci. Res.*, New York, v.83, n. 6, p. 1066-1076, may 2006.

TAKAHASHI, K.; KUSAKARI, J.; KIMURA, S.; WADA, T.; HARA, A. The effect of methylprednisolone on acoustic trauma. *Acta Otolaryngol.*, Stockholm, v. 116, n. 2, p. 209–212, mar. 1996.

THORNE, P. R.; NUTTALL, A. L. Alterations in oxygenation of cochlear endolymph during loud sound exposure. *Acta Otolaryngol.*, Stockholm, v. 107, n. 1-2, p. 71 – 79, jan.-fev. 1989.

TIBBLES, P. M.; EDELSBERG, J. S. Hyperbaric-oxygen therapy. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 334, n. 25, p. 1642 – 1648, jun. 1996.

YAMANE, H.; IGUCHI, H.; KONISHI, K.; NAKAGAWA, T.; NAKAI, Y.; TAKAHASHI, K.; RASK-ANDERSEN, H. Natural killer cell response in the inner ear. *Acta Otolaryngol.*, Stockholm, v. 115, n. 6, p.738-741, nov. 1995.

YAMASHITA, D.; JIANG, H. Y.; LE PRELL, C. G.; SCHACHT, J.; MILLER, J. M. Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. *Neuroscience*, New York, v. 134, n. 2, p. 633 – 642, jan. 2005.

YLIKOSKI, J.; MRENA, R.; MÄKITIE, A.; KUOKKANEN, J.; PIRVOLA, U.; SAVOLAINEN, S. Hyperbaric oxygen therapy seems to enhance recovery from acute acoustic trauma. *Acta OtoLaryng.*, Stockholm, v. 128, n.10, p. 1110-1115, april, 2008.

ZUO, H.; CUI, B.; SHE, X.; WU, M. Changes in Guinea pig cochlear hair cells after sound conditioning and noise exposure. *J. Occup. Health.*, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 373 – 379, jul. 2008.