

MAURA REGINA LAUREANO



**Efeito do estímulo sonoro definido na plasticidade neuroquímica
da via auditiva do rato. Análise das modificações na
imunorreatividade de neurotransmissores.**

São Paulo

2006

MAURA REGINA LAUREANO

**Efeito do estímulo sonoro definido na plasticidade neuroquímica
da via auditiva do rato. Análise das modificações na
imunorreatividade de neurotransmissores.**



Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Psicologia.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

São Paulo

2006

T
QP361
L378e
e.2

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catologação na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Laureano, Maura Regina.

Efeito do estímulo sonoro definido na plasticidade neuroquímica da via auditiva do rato. Análise das modificações na imonorreatividade de neurotransmissores / Maura Regina Laureano; orientador Gerson Chadi. -- São Paulo, 2006.

95 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Estimulação auditiva 2. Vias auditivas 3. Plasticidade neuronal
4. Neurotensina 5. Ácido glutâmico 6. Neuropeptídeo Y 7. GABA
8. Cóclea Título.

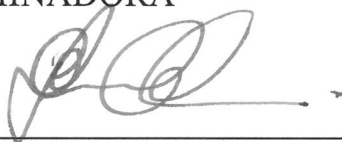
QP361

MAURA REGINA LAUREANO

Efeito do estímulo sonoro definido na plasticidade neuroquímica da via auditiva do rato. Análise das modificações na imunorreatividade de neurotransmissores.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Psicologia.

BANCA EXAMINADORA



(nome e assinatura)

Eliane Schodak

(nome e assinatura)



(nome e assinatura)

(nome e assinatura)

(nome e assinatura)

Dissertação defendida e aprovada em: 06 / 12 / 06

“A riqueza da experiência humana perderia uma certa alegria
recompensadora se não houvesse limites a superar”.

(Hellen Keller)

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

À Fonoaudiologia, nobre ciência, que tive a felicidade de escolher como profissão, e a todos os que dela participam e necessitam. Aos fonoaudiólogos, que ao consultarem estas páginas, tão timidamente, mas cuidadosamente escritas, recebam alguma contribuição, e para todos os pacientes, que são a causa maior da nossa luta, especialmente aos meus pacientes, que me instigam na busca incessante por novos conhecimentos e que também me fazem aprender cada dia mais.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou até aqui, deu-me forças para seguir nesta trajetória e permitiu que eu concluísse mais essa etapa de minha vida. Sem fé e otimismo eu não teria conseguido. Sem Ele nada posso fazer.

Ao Prof. Dr. Gerson Chadi, orientador criterioso e zeloso, que muito me ajudou a crescer na ciência com seu profundo e notório saber científico, pela oportunidade e rica convivência em seu laboratório.

Aos meus pais, Regina e José Carlos, meus primeiros e eternos mestres, exemplos na arte de viver, que com dedicação e amor deram-me a educação sem a qual eu não chegaria a lugar algum. Por todo o empenho e esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui, o meu reconhecimento; por todo o apoio e amor nesta e em outras caminhadas, o meu mais profundo agradecimento.

A todos os meus irmãos (José Carlos (Zé Carlinhos), Eliana, Renato e Rafael), cunhados (Karen, Fábio, Adriane e Gislaine) e lindos sobrinhos (Netinho, Felipe, João Pedro, Vinícius e Izabella), pelo incentivo, amor e pela torcida; especialmente ao meu irmão Renato, pela ajuda nos momentos difíceis e quase intermináveis com os problemas de informática e pela atenção que me dedicava sempre que a ele eu recorria.

A Eduardo G. Bittar, pela marcante presença durante todo o desenvolvimento deste projeto e pela assessoria com o adobe photoshop e pela elaboração da capa.

À fonoaudióloga Anna Carolina de Francisco, companheira de todas as horas nesta trajetória, pelo apoio e colaborações indispensáveis e inestimáveis na realização deste trabalho e por ter se mostrado e se tornado uma grande amiga para toda a vida.

À Gilcélio A. Silveira, Juliana P. de C. Pedroso, Michele Schultz e Tatiana de P. Oliveira, pós-graduandos do laboratório que vieram antes de mim e que acima de tudo se tornaram pessoas muito queridas e amigas. Obrigada pelas significativas orientações, pela prestatividade em me auxiliar e pela amizade.

À fonoaudióloga Alessandra Samelli pela valiosa ajuda na produção do estímulo auditivo, pela importante participação em várias fases deste projeto, pelo apoio e amizade.

À Carolina Colin, que mesmo ainda quando estagiava no laboratório, cursando o 2º ano de Fonoaudiologia, muito me ajudou nas fases experimentais, exercendo suas tarefas com grande seriedade e competência, já se revelando uma profissional de valor.

Aos amigos do Laboratório de Neurologia Experimental da FMUSP, Fausto Guzén, Bianca de Luca, Beatriz Levy, Jinger do Carmo, Camila Silva e Vânia C. Gomide, pelo trabalho em equipe e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Neurotransmissão e Modulação Neural da Pressão Arterial, Jessica R. Maximino, Merari de Fátima R. Ferrari, Regiane X. Moraes, Andreas Betz e Daniel C. Carrettiero, pela amizade e sabedoria compartilhadas. Ao Andreas, também pela cooperação durante os meses de seccionamento, quando sempre me deixava o criostato pronto para o uso e à Profª. Dra. Débora R Fior Chadi, pela disponibilização de seu laboratório.

À empresa CTEA (Centro Técnico de Equipamentos Auditológicos) – Comércio e Serviços, que disponibilizou os equipamentos necessários para a realização da aferição acústica, e a seu funcionário Silvio Rogério de Oliveira, acústico profissional, que tão gentilmente fez a aferição do ruído ambiente e do estímulo sonoro utilizado neste trabalho, contribuindo em muito no nosso estudo.

A todos os docentes do curso de Mestrado que contribuíram para minha formação científica.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, especialmente à Ana Paula R. Silva, que durante todos esses anos sempre se mostrou impecável em seu ofício e com disposição para prontamente atender às minhas solicitações.

A todos os funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas III da USP, pela atenção e presteza constantes. Aos porteiros, pelo cuidado com a “aluna viajante”, como fui por eles carinhosamente batizada, e à equipe da marcenaria, sempre disponíveis em me auxiliar quando eu precisava de seus serviços, principalmente ao sr. Cinésio, por ter feito com tanta dedicação a adaptação necessária na sala da estimulação auditiva.

À Matilde, Milton Rocha e seus familiares, que carinhosamente me acolheram durante parte desta jornada e que me proporcionaram momentos de descontração e amizade.

À querida amiga Suzane M. Lara, pelos nossos risos, tão necessários, mesmo diante do cansaço, pelos bons momentos compartilhados, por toda ajuda e pela amizade solidificada com a nossa convivência na república, muito obrigada.

À Gisele Braga, companheira de disciplinas e principalmente do alojamento, que também dividiu comigo as alegrias e tristezas desta fase e que se tornou uma querida amiga. Obrigada por todo o apoio e amizade.

À Maria Teresa Nastri de Carvalho, prima querida e amiga, por ter feito tão gentilmente e cuidadosamente a revisão do português, por também ter me recebido em sua casa e por sempre me estimular a crescer, a minha gratidão.

Aos tios Carlos e Sônia, às primas Vivi, Fernanda e Helena Laureano e à amiga Patrícia Soares, pela acolhida e bons momentos compartilhados em São Paulo.

À Laura Cyrineu Munhoz, amiga de profissão e de coração, pelo incentivo constante, pelas palavras sempre tão pertinentes, pela torcida e pela amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os meus familiares, tantos tios e primos e a todos os meus amigos e conhecidos que sei que torcem por mim, o meu muito obrigada.

A realização deste trabalho contou com os auxílios concedidos:

FAPESP (98/13122-5)

FAPESP (99/01319-1)

ÍNDICE

SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
INTRODUÇÃO.....	01
<i>Aspectos anátomo-funcionais do sistema auditivo</i>	01
<i>Plasticidade do sistema auditivo</i>	08
OBJETIVOS.....	15
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	30
<i>Análise da Imunorreatividade da Proteína FOS</i>	30
<i>Análise da Imunorreatividade do Glutamato</i>	30
<i>Análise da Imunorreatividade do GAD</i>	39
<i>Análise da Imunorreatividade da Neurotensina</i>	39
<i>Análise da Imunorreatividade do NPY</i>	43
DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXOS.....	83

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

A estimulação auditiva é capaz de interferir na plasticidade neuroquímica e estrutural do sistema nervoso por meio da ativação neuronal, modificando os níveis endógenos de fatores neurotróficos e de neurotransmissores. Neste estudo analisamos as alterações químicas na via auditiva aferente de animais estimulados acusticamente. Ratos Wistar de 60 dias de idade foram submetidos ou não a um estímulo sonoro definido durante 1 hora por um período de 1 ou de 7 dias seguidos. Após a estimulação auditiva, os animais foram sacrificados e seus encéfalos e cócleas processados para imunohistoquímica para a visualização da imunorreatividade da proteína FOS e do ácido glutâmico descarboxilase (GAD) nos núcleos cocleares e da imunorreatividade do glutamato, da neurotensina e do neuropeptídeo Y nos órgãos de Corti, nos neurônios dos gânglios espirais e também nos núcleos cocleares. O estímulo sonoro consistiu de um tom puro intermitente, na frequência de 8KHz e na intensidade de 80 dB NPS, apresentado em caixas acústicas posicionadas acima da gaiola de cada animal. A estimulação auditiva promoveu aumento significativo na área de imunorreatividade da proteína FOS e do glutamato na região rostral do núcleo coclear dorsal. Não houve diferenças estatísticas na imunomarcagem do GAD no núcleo coclear. Na cóclea, mais especificamente nas células ciliadas internas, foi observado aumento da imunorreatividade do glutamato no giro basal e diminuição da neurotensina no giro apical diante do estímulo sonoro. A análise da intensidade da imunomarcagem nos neurônios do gânglio espiral revelou maior número de neurônios tipo II com forte imunorreatividade ao neuropeptídeo Y exclusivamente no giro apical da cóclea dos animais estimulados. A via auditiva periférica e o núcleo coclear respondem de forma plástica a estímulos sonoros. A estimulação auditiva específica, não prejudicial, pode ser uma estratégia para maximizar o potencial plástico das vias neurais relacionadas.

ABSTRACT

Acoustic stimulation can modify the neurochemistry and also the morphological and functional plasticity of the nervous system, changing the endogenous levels of neurotrophic factors and neurotransmitters. It was analysed by this study the chemical changes in auditory pathway of animals acoustically stimulated. Young male Wistar healthy rats (8 weeks) received or not a specific sound stimulation during 1 hour for a period of one or seven days running. After acoustic stimulation the rats were sacrificed and their brains and cochleas were processed for immunohistochemistry for visualization of: i) FOS protein and glutamic acid decarboxylase (GAD) on cochlear nucleus; ii) glutamate, neurotensin and neuropeptide Y on organ of the Corti, spiral ganglion and cochlear nucleus. The stimulus consisted of a pure 8 KHz tone burst (50 ms duration presented at a rate of 2 per second) with intensity of 80 dB SPL. The rats received the stimulus from acoustic sound boxes, positioned above the cage of each animal. The acoustic stimulation promoted a significant increase in the areas of FOS protein and glutamate immunoreactivities in rostral region of the dorsal cochlear nucleus. There was no difference in the immunostaining of GAD on cochlear nucleus. In the inner hair cells of cochlea it was observed an increase of glutamate immunoreactivity in the basal turn and a decrease of neurotensin in the apical turn after the sound stimulus. The analysis of the immunostaining intensity on spiral ganglion neurons revealed a greater number of type II neurons with strong NPY immunoreaction especially in the apical turn of the cochlea in acoustically stimulated group. The peripheral auditory pathway and the cochlear nucleus react to sound stimuli in a plastic way. The specific and unlesioned acoustic stimulation may be one strategy to maximize the plastic potential of the related neural pathway.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Aspectos anátomo-funcionais do sistema auditivo

A audição é, provavelmente, a sensação mais relevante para o ser humano, uma vez que ela está diretamente relacionada com a linguagem, principal característica que define a espécie humana.

A audição inicia-se quando as células ciliadas, os receptores auditivos localizados na cóclea da orelha interna, promovem a transdução da energia sonora em sinais elétricos e os direciona para o sistema nervoso central (HUDSPETH, 2000).

A cóclea consiste de um canal espiral de duas voltas e meia, inserida no osso temporal; seu interior é formado por três compartimentos preenchidos por fluídos: a escala vestibular, superior; a escala timpânica, inferior, e entre elas, a escala média ou ducto coclear. A escala média é separada da escala vestibular pela membrana basilar. Apoiado sobre essa membrana e recoberto pela membrana tectória está o órgão de Corti, em que se encontram as duas classes de receptores sensoriais: as células ciliadas externas e as células ciliadas internas, de acordo com sua posição no espiral coclear, além de células de suporte (BROWN, 1999). A extremidade de cada célula receptora possui estereocílios interconectados; apenas os cílios mais longos das células ciliadas externas estão em contato com a membrana tectória. Enquanto as células ciliadas internas perfazem cerca de 3.500 e estão dispostas em uma única fileira, os receptores externos estão dispostos em 3 fileiras e são em número de 14.000 aproximadamente (BROWN, 1999).

A vibração sonora vinda da orelha média é transmitida para o fluido coclear provocando um deslocamento nas membranas tectória e basilar e, conseqüentemente, do órgão de Corti. A membrana tectória encarrega-se da deflexão passiva dos estereocílios das células sensoriais, permitindo a transdução da energia mecânica da onda sonora em mensagem neural (GIL-LOYZAGA, 1997). Tal deslocamento, quando ocorre em direção aos cílios mais altos, provoca uma deformação mecânica nos estereocílios que despolariza as células, abrindo e fechando os canais iônicos no topo dos estereocílios para a entrada de potássio, o que dá início a uma cascata de eventos intracelulares, envolvendo íons de cálcio e liberação de transmissores químicos para ativar as fibras aferentes (FUCHS, 1996; STEEL e KROS, 2001; GILLESPIE e WALKER, 2001; GÉLÉOC e HOLT, 2003; RICCI

et al., 2005). O movimento dos estereocílios na direção oposta hiperpolariza as células interrompendo a liberação de neurotransmissores. Na posição de descanso dos estereocílios os canais de transdução são parcialmente abertos, levando a pequena liberação de transmissor, que gera uma atividade espontânea na via auditiva ascendente até na ausência do som. A frequência do movimento dos estereocílios está relacionada com a frequência do estímulo sonoro (RAPHAEL e ALTSCHULER, 2003).

O movimento da membrana basilar é extremamente sensível, haja vista responder a níveis de pressão sonora (NPS) muito baixos e ser altamente regulado pela frequência do som (BROWN, 1999), de modo que cada local da membrana responde a uma determinada frequência (NILSEN e RUSSEL, 1999). Dessa forma, as células localizadas no giro basal da cóclea respondem aos sons de alta frequência, enquanto aquelas mais próximas do ápice respondem aos sons de baixa frequência (NILSEN e RUSSEL, 1999). A cóclea, portanto, não é simplesmente um detector passivo; é nela que se inicia a capacidade para reconhecer pequenas diferenças no som, sendo responsável pelos primeiros estágios da análise de frequência e suas amplitudes. Essa característica tonotópica também é verdadeira para as fibras auditivas que, do mesmo modo, são distribuídas tonotopicamente na cóclea (BROWN, 1999). A organização tonotópica é mantida por toda a via auditiva, até o córtex cerebral. Muller (1991a; 1991b), por meio da injeção de um traçador retrógrado, fez o mapeamento do local das frequências entre 1,2 e 54 kHz na membrana basilar da cóclea de ratos, entre elas a frequência de 7,70 kHz, cuja marcação foi localizada à 65% de sua base, com um limiar aproximado de 40 dB NPS em animais de 36 dias de idade ou mais.

As células ciliadas externas contribuem para o movimento da membrana basilar, uma vez que modificam sua forma e comprimento rapidamente quando são estimuladas, amplificando a vibração da membrana e sendo por isso conhecidas como “amplificadores cocleares”, sua principal função (GALE e ASHMORE, 1997; MARTIN e HUDSPETH, 1999; BROWN, 1999; ASHMORE *et al.*, 2000). Porque influenciam conseqüentemente na vibração de todo o órgão de Corti, as células ciliadas externas estimulam indiretamente, pela movimentação do fluido, os feixes ciliares das células ciliadas internas (HUDSPETH, 1997; KROS, 2005). Segundo Gil-Loyzaga (1997)* as células ciliadas externas são moduladoras que se encarregam de regular a intensidade do sinal que alcança as células ciliadas internas, incrementando-o se for um sinal fraco ou abolindo-o se puder ser lesivo.

SANTOS-SACCHI (2003) considera que ambos os tipos de células transduzem o estímulo mecânico em sinais elétricos pela modulação da corrente catiônica em resposta ao deslocamento dos estereocílios, promovendo a liberação de neurotransmissor, mas enfatiza que a interação entre esses dois tipos de células ainda permanece obscura.

As células ciliadas fazem sinapse com as terminações periféricas dos neurônios do gânglio espiral. Neurônios tipo I, bipolares, grandes e mielinizados, estabelecem contato com as células ciliadas internas; embora estes neurônios inervem apenas uma única célula, eles representam de 90 a 95% dos neurônios espirais, sendo que cada célula ciliada interna recebe conexões de vários neurônios tipo I; por outro lado, uma pequena população de neurônios tipo II, células pequenas, pseudounipolares e com fibras amielínicas, inervam as células ciliadas externas, projetando-se simultaneamente para várias delas (SPOENDLIN, 1979).

Neurônios tipo I e tipo II possuem características eletrofisiológicas especializadas, mais evidentes no giro basal da cóclea, exercendo diferentes papéis no processamento do sinal auditivo (REID *et al.*, 2004). A informação acústica é transmitida primariamente via células ciliadas internas e suas sinapses nos neurônios aferentes tipo I, enquanto as células ciliadas externas propiciam o feedback eletromecânico do estímulo (KENNEDY *et al.*; 2005). Apesar da escassez de informação sobre os neurônios tipo II, está claro que eles podem ter um papel significativo no processamento do som, já que inervam um grande número de células ciliadas externas que são imprescindíveis para a manutenção das respostas normais ao estímulo (REID *et al.*, 2004). Kim (1984) propôs a hipótese de que os neurônios tipo II transmitem a informação sobre o ponto de operação do funcionamento motor das células ciliadas externas. Desse modo, a conexão central das células ciliadas externas pode contribuir para o feedback eferente, uma vez que elas são o alvo do sistema eferente que se projeta do complexo olivar superior (RAPHAEL e ALTSCHULER, 2003; KENNEDY *et al.*, 2005).

O padrão de inervação eferente das células ciliadas cocleares é complementar ao da inervação aferente (HUDSPETH, 2000); enquanto cada célula ciliada externa faz contato com diversos terminais eferentes em sua base, oriundos da oliva superior medial contralateral principalmente, as células ciliadas internas recebem apenas uma esparsa

inervação eferente provenientes da oliva superior lateral nas terminações de suas fibras nervosas aferentes ipsilaterais (MALMIERCA, 2003).

Existem evidências de que as células de suporte, além da sustentação estrutural, também recebam conexões sinápticas (RAPHAEL e ALTSCHULER, 2003) e participem da regulação do ambiente iônico dentro e em volta do órgão de Corti (KIKUCHI *et al.*, 2000). Fechner e colaboradores (2001) mostraram que células Deiters e células Hensen recebem uma significativa inervação, predominantemente derivada de colaterais aferentes das células tipo II do gânglio espiral, com uma pequena contribuição adicional do sistema eferente. Porém, a função de tal inervação permanece desconhecida (RAPHAEL e ALTSCHULER, 2003).

Fibras simpáticas também inervam a cóclea, embora não entrem no órgão de Corti. A estria vascular e o ligamento espiral são regiões cocleares ricamente vascularizadas (EYBALIN, 1993). O suprimento vascular advém do gânglio estrelado e do gânglio cervical superior (EYBALIN, 1993; FRITZSCH *et al.*, 2004).

Os axônios dos neurônios espirais formam o nervo coclear e por meio dele adentram no tronco encefálico, fazendo sinapses no núcleo coclear, primeiro núcleo do sistema nervoso central a processar a informação auditiva oriunda da periferia; a partir daí essa informação é enviada até o córtex auditivo no lobo temporal, passando por uma série de núcleos interconectados ipsi e contralateralmente, além de núcleos relés. Localizados na ponte estes núcleos são: o núcleo coclear, o complexo olivar superior e os núcleos do lemnisco lateral; a partir daí, as fibras auditivas fazem sinapse no nível do mesencéfalo no colículo inferior, seguindo para o corpo geniculado medial, no tálamo, até chegar no córtex auditivo (HUDSPETH, 2000, POLLAK, 2003).

O núcleo coclear é dividido em núcleos cocleares dorsal e ventral. Este último é subdividido pelo nervo coclear em uma região anterior e outra posterior (DOUCET e RYUGO, 1997; LOYZAGA, 1997). O núcleo coclear dorsal é formado por três camadas denominadas: camada molecular, mais externa, camada de células fusiformes, intermediária, e camada profunda, além de um grande número de interneurônios. No núcleo coclear ventral, além dos interneurônios, são reconhecidos cinco tipos principais de células: células esféricas, globulares, em forma de polvo, multipolares e células pequenas (MALMIERCA, 2003).

O ramo ascendente do nervo coclear dirige-se ao núcleo coclear ventral anterior enquanto o ramo descendente projeta-se à sua porção posterior, além de suprir o núcleo coclear dorsal. Fibras do giro basal da cóclea projetam-se dorsalmente dentro de cada divisão do núcleo coclear e fibras de setores mais apicais projetam-se progressivamente para porções mais ventrais (LEAKE *et al.*, 1992, 1993; SPIROU *et al.*, 1993; MALMIERCA, 2003). As fibras tipo II passam pelo núcleo coclear acompanhando as fibras tipo I e ambos os tipos bifurcam-se de uma maneira cocleotópica na região magnocelular do núcleo coclear, porém fibras tipo II enviam colaterais e terminais para a região de células granulares e para os limites dessas regiões que tipicamente não recebem entrada de fibras tipo I, delineando um mapeamento tonotópico menos distinto (BERGLUND e BROWN, 1994). Os neurônios dos núcleos cocleares ainda recebem contatos aferentes procedentes dos neurônios dos próprios núcleos, mediante fibras de associação interna (WICKESBERG e OERTEL, 1988; DOUCET e RYUGO, 1997; LOYZAGA, 1997).

Projeções ascendentes dos núcleos cocleares para centros cerebrais superiores são descritas no colículo inferior contralateral e no núcleo medial do corpo geniculado medial advindas da camada de células fusiformes do núcleo coclear dorsal, bem como no complexo olivar superior: oliva superior medial bilateral, oliva superior lateral ipsilateral, núcleos mediais e ventrais do corpo trapezóide, núcleo periolivar, núcleo ventral do lemnisco lateral e colículo inferior contralateral, provenientes do núcleo coclear ventral (SUNEJA *et al.*, 1995; ALBERNAZ, 2003; MALMIERCA, 2003).

Além de fibras aferentes, os núcleos cocleares também recebem fibras do sistema auditivo descendente, originárias de núcleos cerebrais superiores, sendo as projeções olivococleares suas principais constituintes. Embora neurônios da oliva superior lateral não enviem axônios para o núcleo coclear ventral, a maioria e possivelmente todos os neurônios olivococleares do núcleo ventral do corpo trapezóide enviam colaterais para esse núcleo, que também recebe algumas projeções não auditivas do locus ceruleus, núcleo da rafe dorsal, núcleo da coluna dorsal e núcleo trigeminal espinhal (HORVÁTH *et al.*, 2000).

A neuroquímica da comunicação intercelular envolvida em toda a circuitaria neuronal auditiva é objeto de estudo nos dias atuais. Os mecanismos básicos já descritos revelam que o glutamato, principal transmissor excitatório do sistema nervoso central

(COTMAN *et al.*, 1986), também é o mais notável neurotransmissor encontrado na via auditiva aferente (EYBALIN, 1993; OESTREICHER *et al.*, 2002).

O glutamato está presente no citoplasma das células ciliadas internas e externas, nesta última em menor quantidade (EYBALIN, 1993), e dos neurônios espirais (ALTSCHULER *et al.*, 1989; EYBALIN e ALTSCHULER, 1990; USAMI *et al.*, 1992), além de ser demonstrado em todos os perfis gliais e neuronais do núcleo coclear dorsal (RUBIO e JUIZ, 1998) e no núcleo coclear ventral, bem como em regiões contendo corpos celulares, axônios e terminais de células granulares próximas a esse núcleo (GODFREY *et al.*, 2000). A presença do glutamato em terminais do núcleo coclear dorsal também foi demonstrada por meio de estudos imunocitoquímicos (RUBIO, 2004). Receptores glutamatérgicos foram descritos no órgão de Corti, no gânglio espiral (PUEL, 1995), e diferencialmente distribuídos nas populações neuronais e nos astrócitos do núcleo coclear (PETRALIA *et al.*, 1996).

Eybalin (1993) mostrou evidências de que, além do glutamato, outras substâncias aminoacidérgicas ou peptidérgicas participam da neurotransmissão pelas células ciliadas do órgão de Corti enfatizando que, provavelmente, nas células ciliadas internas, uma substância (ou várias) modula os efeitos do neurotransmissor principal, que é o glutamato ou uma substância relacionada a ele. Sugere-se que as células ciliadas externas somente usam o glutamato como um metabólito intermediário e não como um neurotransmissor (EYBALIN, 1993).

Recentemente, por método imunohistoquímico, foi descoberta a presença da neurotensina no citoplasma das células ciliadas internas e das células Deiters, bem como nos neurônios e fibras do gânglio espiral e nas células ciliadas externas, porém nestas últimas em quantidade extremamente menor (GOMIDE *et al.*, 2005). Já no núcleo coclear a imunorreatividade da neurotensina só foi descrita apenas esparsamente em fibras e terminais de sua porção dorsal (UHL *et al.*, 1979).

Juntamente com o glutamato, dois transmissores inibitórios, o ácido γ -aminobutírico (GABA) e a glicina, são considerados os principais neurotransmissores do núcleo coclear (RUBIO e JUIZ, 2004). O GABA foi encontrado nos pericários, fibras e terminais do núcleo coclear dorsal e ventral (THOMPSON *et al.*, 1985). Marcação imunohistoquímica do ácido glutâmico descarboxilase (GAD), a enzima conversora do GABA, também foi

notada em fibras e terminais do núcleo coclear do rato (SHIRAISHI *et al.*, 1985). Terminais axonais imunorreativos ao GAD observados por microscopia eletrônica apresentaram-se mais numerosos na camada molecular e de células fusiformes e mais esparsos na camada profunda do núcleo coclear dorsal (MUGNAINI, 1985). Uma densa distribuição de terminais também é vista na região de células granulares de ambas as divisões no núcleo coclear (MOORE e MOORE, 1987). A concentração da glicina mostrou-se relativamente alta em muitos neurônios com soma no núcleo coclear dorsal, sendo observada também na porção ventral do núcleo, com maior expressão na região anterior (GODFREY *et al.*, 2000). Do mesmo modo, a imunorreatividade da substância P foi descrita em fibras e terminais do núcleo coclear ventral anterior e na região dorsomedial do núcleo coclear dorsal, enquanto a imunorreatividade a somatostatina foi observada apenas no soma neuronal do núcleo coclear ventral (WYNNE e ROBERTSON, 1997).

Já na via auditiva eferente é a acetilcolina reconhecida como o principal neurotransmissor. Ela está localizada tanto nos terminais das fibras do sistema eferente lateral, quanto do sistema eferente medial (RAPHAEL e ALTSCHULER, 2003). Porém, a via auditiva eferente do rato caracteriza-se pela heterogeneidade química, em que se identifica a coexistência de vários neurotransmissores, já demonstrada por vários autores (TOHYAMA *et al.*, 1990; VETTER e MUGNAINI, 1990; SAFIEDDINE *et al.*, 1997; EYBALIN, 1993).

Dados imunocitoquímicos, farmacológicos e bioquímicos mostraram que o sistema lateral eferente pode usar, além da acetilcolina (ACh), o GABA, a dopamina e vários neuropeptídeos como a encefalina, a dinorfina, serotonina e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) para modular a mensagem auditiva enviada para a cóclea (PUEL, 1995; LOYZAGA, 1997; PUEL *et al.*, 2002).

Nas fibras eferentes mediais também já foi comprovada a imunorreatividade ao GABA (MATSUBARA *et al.*, 1996), entretanto existem evidências conflitantes para a presença do CGRP nessas fibras (RAPHAEL e ALTSCHULER, 2003).

Nas projeções eferentes oriundas do complexo olivar superior, particularmente do núcleo periolivar, para o núcleo coclear, são encontradas um grande número de células que utilizam os neurotransmissores inibitórios GABA ou glicina (THOMPSON e SCHOFIELD, 2000).

A imunorreatividade do GAD foi visualizada em neurônios e terminais do núcleo ventral do corpo trapezóide e do núcleo olivar superior lateral do rato, sendo que neste último a maioria das células imunopositivas foi observada em sua região medial (VETTER *et al.*, 1991). A mesma distribuição do GAD foi também descrita para a imunomarcagem da colina acetiltransferase (ChAT), enzima conversora da acetilcolina, e para o CGRP (VETTER *et al.*, 1991; YAO e GODFREY, 1998). Os neurônios olivococleares no núcleo olivar superior lateral do rato são, ainda, imunorreativos a encefalina (KUNDEL e FRIAU, 1995). Finalmente, fibras e terminais contendo a imunorreatividade da substância P e da somatostatina foram observadas próximas ao núcleo olivar superior lateral e ao núcleo ventral do corpo trapezóide (WYNNE e ROBERTSON, 1997).

Plasticidade do sistema auditivo

A habilidade para se adaptar a constantes modificações ambientais é baseada na impressionante capacidade do sistema nervoso central para mudanças plásticas.

A plasticidade cerebral é a capacidade do cérebro de alterar sua estrutura e funcionamento em resposta a experiências, drogas, hormônios ou lesões (KOLB e WISHAW, 2002). Assim, as propriedades plásticas não se expressam apenas por respostas estruturais, mas diferentes estímulos podem mudar também a bioquímica neuronal.

Já em 1988, uma série abrangente de estudos feitos por Sirevaag e Greenough demonstrou que animais com experiência enriquecedora possuem, além de mais sinapses por neurônios, mais material astrocítico, mais capilares sanguíneos e maior atividade metabólica. Desse modo, diferentes experiências podem alterar não só a extensão dos dendritos, mas também os processos gliais, vasculares e metabólicos em diferentes sistemas neurais (KOLB e WISHAW, 2002).

No sistema auditivo, o estudo da plasticidade concentra-se especialmente no córtex auditivo, haja vista a capacidade cortical de sofrer reorganizações das representações topográficas dos receptores quando estes são estimulados ou privados de informação sensorial, o que é demonstrado por vasta literatura, à luz do que acontece com os sistemas visual e somatosensorial, mais extensivamente estudados.

Experimentos conduzidos há 20 anos documentam que a representação cortical é continuamente formada pela experiência (BUONOMANO E MERZENICH, 1998). A atividade neural pode ser induzida por experiência geral ou específica. Uma vez que animais criados em ambientes complexos demonstram que grandes áreas do cérebro podem ser alteradas com tal experiência, experiências específicas também podem produzir alterações sinápticas em regiões cerebrais específicas (KOLB e WHISHAW, 2002; BAYONA *et al.*, 2005).

Embora os estudos mostrem que a modulação das entradas sensoriais pode causar uma reorganização de estruturas localizadas em níveis superiores do sistema nervoso central, focando-se principalmente nas alterações da função e organização tonotópica do córtex sensorial, algumas evidências sugerem que as mudanças plásticas também podem ocorrer em núcleos subcorticais específicos dos sistemas sensoriais em respostas a essa modulação, sendo parcialmente responsáveis pelas mudanças que se refletem ao nível do córtex (WILLOTT e TURNER, 2000; BURAS *et al.*, 2006). Szczepaniak e Moller (1995) demonstraram que a exposição a um ruído intenso (4kHz de tom contínuo, apresentado a 104dB por 30 minutos) causou mudanças no processamento da informação auditiva pelos neurônios do colículo inferior, indicando que o estímulo sonoro gerou alterações na circuitaria auditiva neuronal subcortical. Porém, segundo Irvine e colaboradores (2001) a natureza dos mecanismos envolvidos e a contribuição de mudanças nos núcleos subcorticais auditivos para a reorganização observada no córtex ainda são questões que permanecem em aberto.

Rearranjos na organização da frequência do córtex auditivo, bem como outras mudanças plásticas do sistema auditivo, são demonstrados em modelos que provocam lesões bioquímicas das células ciliadas com drogas ototóxicas (SALVI *et al.*, 2000; ASAKO *et al.*, 2005; BURAS *et al.*, 2006), lesão mecânica na cóclea (ILLING *et al.*, 2005; TONG *et al.*, 2005), estimulação elétrica (KILGARD *et al.*, 2001; TALWAR *et al.*, 2001; BAO, 2003; MOUCHA *et al.*, 2005) ou como consequência de exposição ao ruído (SZCZEPANIAK e MOLLER, 1996; SALVI *et al.*, 2000; MICHLER e ILLING, 2002; CHANG e MERZENICK, 2003). Poucos são os trabalhos que mostram a plasticidade do sistema auditivo, especialmente em regiões subcorticais, diante de um estímulo não prejudicial. Porém as propriedades plásticas do SNC estão relacionadas não só às suas

respostas após a lesão, mas também ao seu funcionamento normal (CHEN *et al.*, 2002). Observações clínicas e experimentais indicam que, assim como outras regiões do sistema nervoso central, o sistema auditivo possui o fenômeno de plasticidade do tipo atividade-dependente. Para Irvine e colaboradores (2001), plasticidade análoga à organização e seletividade de frequência cortical também é vista depois de treinamento comportamental, o que aumenta a significância de um estímulo acústico particular.

Segundo Ruben e Rapin (1980) a exposição a estímulos auditivos apropriados é um componente essencial do desenvolvimento normal da audição, que pode ser modificado pelas alterações anatômicas e variações do estímulo acústico. Mudanças comportamentais, fisiológicas e anatômicas dependem da qualidade do estímulo sonoro que o sistema auditivo experencia. A plasticidade neuronal do sistema auditivo permite a adaptação de sistemas cerebrais a fatores ambientais que não podem ser antecipados pela genética, tanto no curso do desenvolvimento quanto na idade adulta (KING e MOORE, 1991; KING, 1999; ASAKO *et al.*, 2005; BURAS *et al.*, 2006), embora nesta fase com menor extensão (RAUSCHECKER, 1999). A neuroplasticidade pode ser demonstrada tanto nos receptores auditivos como na via auditiva adulta (PHILLIPS, 1995; GIL-LOYZAGA, 2005).

Postula-se que um dos efeitos benéficos da estimulação acústica é proteger o sistema auditivo de traumas decorrentes de ruídos (CANLON *et al.*, 1988). Vários trabalhos sugerem que a susceptibilidade da orelha interna para o trauma pode ser reduzida por exposição anterior a um estímulo sonoro. Segundo Canlon e colaboradores (1988), a existência da resistência para o trauma foi proposta primeiramente por Miller e colaboradores, em 1963, baseada em seus experimentos com gatos. Evidências de que se consegue reduzir o efeito deletério do trauma acústico pelo condicionamento sonoro continuam se acumulando. Condicionamento sonoro é um processo induzido de exposição a um ruído não prejudicial, de baixa intensidade, antes da exposição traumática, que cria um efeito protetivo de longa duração para subseqüentes formas prejudiciais de trauma acústico (NIU e CANLON, 2002). Muitas hipóteses têm sido feitas para explicar o efeito protetivo do condicionamento sonoro, mas a vasta maioria dos estudos ainda é inconclusiva. Conjectura-se que, se o sistema protetivo endógeno da cóclea estiver aumentado poderá fornecer proteção contra o trauma subseqüente. Sistemas endógenos da cóclea incluem mecanismos antioxidantes endógenos ou captadores de radicais livres,

sistemas de bomba de cálcio, proteínas ligadas ao estresse, receptores glutamatérgicos e fatores neurotróficos (NIU e CANLON, 2002). Estudos em chinchilas têm demonstrado mudanças na expressão dos radicais livres endógenos com o condicionamento sonoro, sugerindo que a modulação desse sistema pode ser uma das contribuições do condicionamento (JACONO, 1998). Além disso, é mostrado que a perda auditiva relacionada à idade também é reduzida pela estimulação acústica ao longo da vida (WILLOT e BROSS, 2004). A estimulação acústica de baixa intensidade pode lentificar, mas não prevenir, a perda auditiva determinada geneticamente em camundongos (WILLOT *et al.*, 2000). O condicionamento sonoro, portanto, é um meio não só para proteger contra o trauma por ruído, mas também contra o estresse e perda auditiva hereditária. Nesse contexto, é possível que a plasticidade proporcionada pela estimulação auditiva possa influenciar na proteção neuronal. Experimentos futuros são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes a esse fenômeno, para que intervenções terapêuticas e talvez estratégias farmacológicas possam ser desenvolvidas. É concebível que o condicionamento sonoro seja benéfico para sujeitos humanos e forneça um tratamento para a perda auditiva induzida por ruído (NIU e CANLON, 2002).

Por outro lado, tendo em vista os benefícios promovidos pela prática da estimulação auditiva previamente a um trauma, têm-se investigado agora os efeitos de sua realização posterior a ele. No recente estudo de Norenã e Eggermont (2005), gatos que foram expostos a um ruído traumatizante e imediatamente depois colocados em um ambiente enriquecido acusticamente, com estímulo sonoro apresentado numa faixa de frequência entre 0,625 e 20 kHz, na intensidade do 80dB NPS, em que foram mantidos por poucas semanas, mostraram uma perda auditiva mais restrita quando comparados a outro grupo de animais que permaneceram em ambiente silencioso após o mesmo ruído, o que sugere que a estimulação acústica realizada prontamente após o trauma acústico pode reduzir a lesão coclear e prevenir a reorganização do mapa tonotópico.

A estimulação auditiva promove aumento da atividade neuronal, o que pode levar a modificações na expressão de determinados neurotransmissores, bem como de respostas tróficas fomentando efeitos de neuroplasticidade. A expressão da ativação de genes de expressão primária ou rápida como o *c-fos* participa desse processo, sendo uma das primeiras modificações observadas após a excitação neuronal. Os resultados de Zhang e

colaboradores (2002) sugerem que o *c-fos* participa de mecanismos celulares subjacentes tanto à excitabilidade quanto à proteção neuronal, uma vez que regula a expressão gênica no cérebro.

A proteína FOS é usada para indicar a localização de neurônios ativados no sistema nervoso central em resposta a um estímulo específico (YANG *et al.*, 2005). Na via auditiva a regulação da expressão da proteína FOS foi encontrada em respostas ao som e à estimulação elétrica (EHRET e FISCHER, 1991; VISCHER *et al.*, 1994; ADAMS, 1995; CARRETTA *et al.*, 1999; LUO *et al.*, 1999; NAKAMURA *et al.*, 2003). Mapeamento da expressão do *c-fos* e da proteína Fos em subregiões do núcleo coclear de ratos induzida pela estimulação acústica foi efetivado por vários autores (ROUILLER *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 1992). Arranjo tonotópico de marcação foi encontrado no núcleo coclear, exceto na região de camadas granulares, com distribuição mais difusa. Analisando os efeitos da intensidade e frequência do estímulo sonoro na expressão do RNAm do *c-fos* no tronco encefálico auditivo do rato adulto, Saint Marie e colaboradores (1999) concluíram que a atividade neuronal pode ser mapeada no sistema auditivo tanto na condição normal quanto na patológica.

Os neuropeptídeos estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central e parecem ter uma ação não somente neurotransmissora, mas também neuromodulatória e neuroprotetora, exercendo influência sobre processos plásticos do sistema nervoso central.

O NPY é o peptídeo mais abundante no sistema nervoso central e periférico (SILVA *et al.*, 2001). Ele controla a liberação de glutamato e sua excitotoxicidade e está envolvido em respostas associadas ao estresse e a ansiedade (HEILIG *et al.*, 1992; THORSELL *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001), além de sua função, já descrita, no ritmo circadiano (ALBERS e FERRIS, 1984), na coordenação da função endócrina (CATZEFLIS *et al.*, 1993) e no comportamento alimentar (GERALD *et al.*, 1996), sendo bem caracterizado como um neuromodulador no sistema nervoso central (EHLERS *et al.*, 1997). No sistema auditivo, o NPY é encontrado, entre outros neuropeptídeos, perivascularmente e no modíolo da cóclea em que fibras simpáticas estão presentes (EYBALIN, 1993), podendo ter efeito vasoconstritor, vasodilatador e/ou neuromodulador na inervação vascular coclear (LYON e PAYMAN, 2000). Nenhuma ou somente poucas fibras imunopositivas ao NPY foram descritas no núcleo coclear, no colículo inferior, lemnisco lateral e corpo geniculado medial

(YAMAZOE *et al.*, 1985). O NPY também é encontrado em células gliais, mais especificamente em astrócitos, células embainhadoras do bulbo olfatório e precursores das células de Schwann (HANSEL *et al.*, 2001; UBINK *et al.*, 2003).

A neurotensina é um tridecapeptídeo que age como um neurotransmissor do sistema nervoso central, exercendo uma ação neuromodulatória em várias funções cerebrais, incluindo os processos motores, sensoriais, atencionais e límbicos (ROBLEDO e KANEDO, 1995), além de desempenhar importante papel como hormônio circulante da periferia (VINCENT *et al.*, 1999). Está envolvida na modulação da neurotransmissão dopaminérgica coexistindo com ela em neurônios da área tegmentar ventral (LEONETTI *et al.*, 2004), relacionada com duas distintas respostas comportamentais: hipotermia e hiperatividade comportamental (KALIVAS, 1984). Relação da neurotensina com o sistema serotoninérgico também é postulada, pela influência de ambos na nocicepção, na analgesia, no ciclo sono-vigília e na regulação autonômica (JOLAS e AGHAJANIAN, 1997). A imunorreatividade da neurotensina ainda foi descrita na raiz dorsal da medula espinal (TODD *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1995) e no gânglio trigeminal (SAMSAM *et al.*, 2002), sugerindo seu envolvimento em vários tipos de modulação sensorial. A neurotensina, além disso, pode ser encontrada nos astrócitos do SNC (WOULFE *et al.*, 1992; HOSLI *et al.*, 1995; NOUEL *et al.*, 1997), sendo que sua sinalização se dá por meio dos receptores de alta afinidade nos neurônios e dos receptores de baixa afinidade nas células gliais (NOUEL *et al.*, 1997; NOUEL, 1999).

A investigação mais precisa das respostas celulares e moleculares na plasticidade neuroquímica da via auditiva, entre elas a interação entre neurotransmissores, torna-se necessária para a formação de novos conceitos relacionados à comunicação celular na via auditiva, ainda insuficientemente compreendida. Estudos que demonstrem os efeitos benéficos da estimulação auditiva específica podem fornecer subsídios e ser particularmente importantes nesse processo.

Um dos objetivos mais ambiciosos da neurociência auditiva é fornecer uma explicação de como o cérebro medeia todos os eventos acústicos (PHILLIPS, 1995) que envolvem os processos de atenção, localização, identificação, discriminação, memória, percepção e interpretação auditivas, além dos mecanismos de plasticidade do sistema auditivo.

Muitos dos estudos que fundamentam a influência da estimulação acústica na plasticidade auditiva são baseados em dados de imagem neurofuncional, sendo, entretanto, indicativos indiretos dos processos celulares.

Dessa forma, a análise tecidual experimental do tecido nervoso submetido ao estímulo sonoro poderá contribuir para o melhor entendimento do substrato neuroquímico relacionado aos fenômenos de plasticidade na via auditiva.

A compreensão dos mecanismos moleculares que controlam a excitabilidade neuronal e a plasticidade química envolvidos no processo auditivo normal e nas diversas formas de perda auditiva é crucial para a fundamentação científica necessária para o estabelecimento de estratégias de estimulação precoce, de prevenção de distúrbios auditivos, bem como para novas abordagens terapêuticas.

Com o aumento na quantidade de ruído no mundo moderno, com as diversas formas de patologias e perdas auditivas ainda sem tratamento, com a escassez de programas de estimulação e reabilitação auditivas, entender a plasticidade do sistema auditivo tem sua consequência prática e urgência.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

I-GERAL

Analisar os efeitos do estímulo sonoro na plasticidade neuroquímica das vias auditivas do rato.

II- ESPECÍFICOS

Após estímulo definido:

- 1- Análise das alterações na imunorreatividade da proteína FOS nos núcleos cocleares.
- 2- Análise das alterações na imunorreatividade do Glutamato, da Neurotensina e do NPY no órgão de Corti.
- 3- Análise das alterações na imunorreatividade do Glutamato, da Neurotensina e do NPY no gânglio espiral.
- 4- Análise das alterações na imunorreatividade do Glutamato, do GAD, da Neurotensina e do NPY nos núcleos cocleares.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAIS E MÉTODOS

I - *Expressão da proteína FOS no núcleo coclear induzida por estímulo sonoro definido.*

Estímulo Sonoro

Ratos Wistar machos (n=12) com 60 dias de idade e de aproximadamente 180 gramas, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram divididos aleatoriamente em um grupo controle (n=6) e um grupo que foi submetido à estimulação auditiva durante 1 hora, uma única vez (n=6).

A fim de se minimizarem os efeitos dos ruídos externos e, além disso, de propiciar uma adaptação ao ambiente, os animais foram mantidos por uma semana em uma sala tratada acusticamente, com ruído interno mínimo dentro de limites aceitáveis pela Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 10152 (**Figura 1**), conforme medição com decibelímetro (MINIPA MOD. 1352-A). Sob condições constantes de temperatura e umidade, o ciclo de luminosidade da sala também foi ajustado para uma fase escura das 7 h às 19h e uma fase clara das 19 h às 7 h. Separados em subgrupos de 3 animais, os ratos permaneceram em caixas convencionais de polietileno autoclavadas com livre acesso à ração e à água.

Após o período de habituação, os ratos do grupo estimulado foram levados de 3 em 3 a uma sala vizinha também tratada acusticamente, onde eram colocados em gaiolas individuais, isoladas uma das outras, sem acesso à ração e água, e submetidos à estimulação auditiva durante 1 hora, quando retornavam à sala anterior.

O estímulo sonoro consistiu de um tom puro intermitente, com dois estímulos por segundo, de 50ms de duração cada, na frequência de 8 KHz, construído no programa de computador Sound Fourge 6,0, Sonic Foundry e apresentado numa intensidade de 80 dB NPS (**Figura 2**), ajustada previamente no centro das gaiolas com um decibelímetro. A frequência do estímulo também foi confirmada por meio de sua medição com instrumento apropriado (Frequencímetro MINIPA/ Gerador de Funções MOD. MFG4203), conforme documento comprobatório em anexo. A aplicação do estímulo, gravado em CD, deu-se por

meio de caixas acústicas (BOSE), acopladas a um aparelho de som (AIWA, Digital Signal Processor NSX 999) e posicionadas 23cm acima da cabeça de cada animal (**Figura 3**).

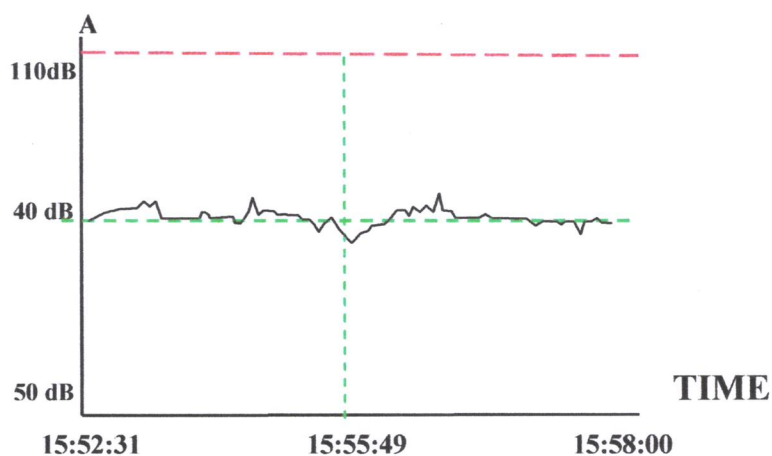


Figura 1: Aferição do ruído ambiente

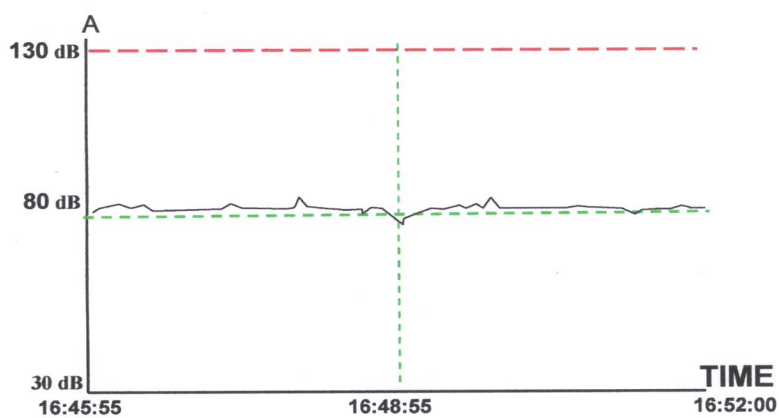
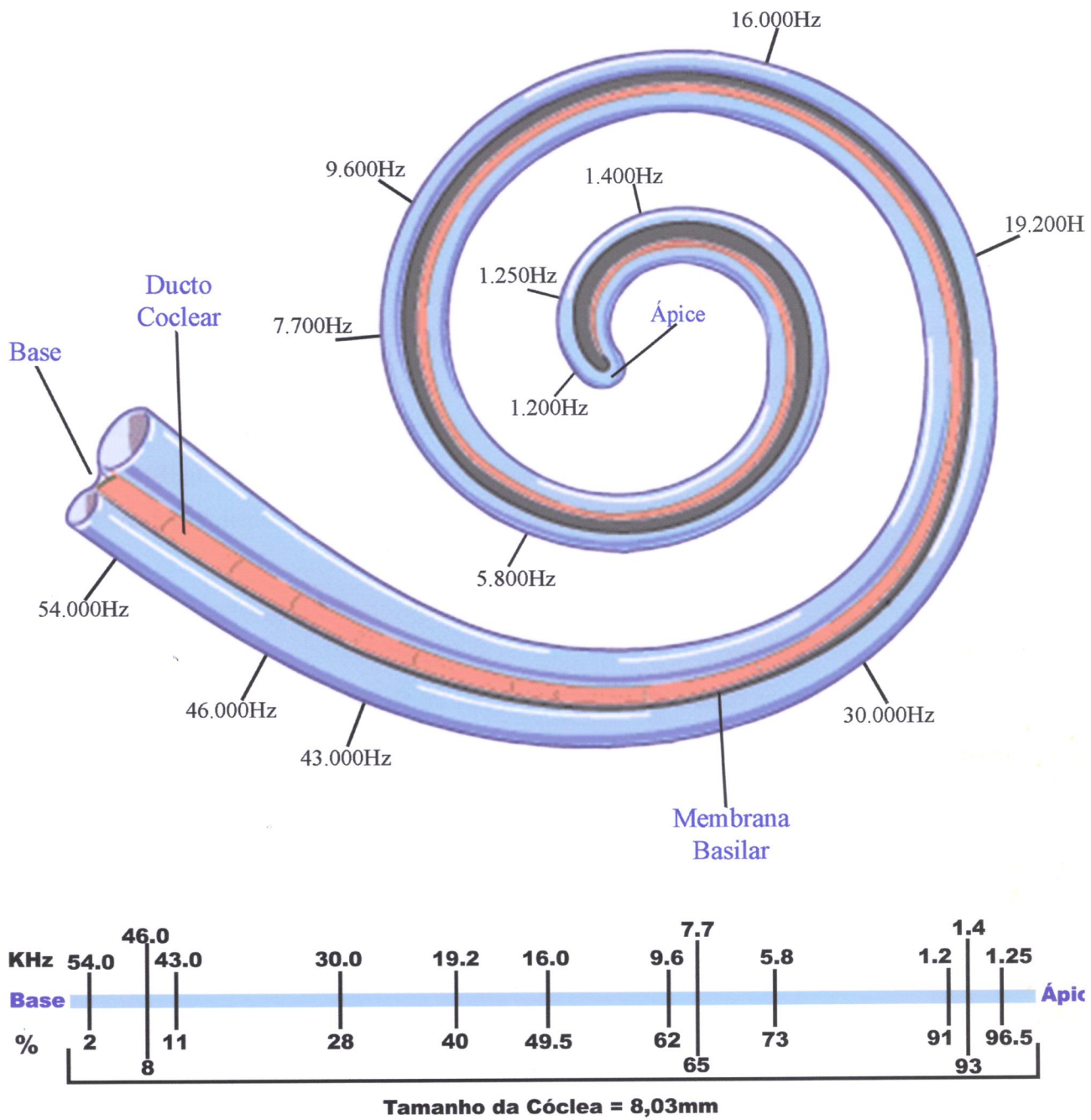


Figura 2: Aferição da intensidade do sinal sonoro no centro da caixa de estímulo



Figura 3: Fotografias ilustrando o local da estimulação auditiva e o posicionamento dos animais durante sua aplicação.



Esquema 1: Esquema ilustrativo da região da membrana basilar estimulada por diferentes freqüências na faixa de audição do rato segundo Muller, 1991.

Sacrifício dos animais

Sessenta minutos após a estimulação, os animais foram sacrificados por meio de uma perfusão transcardíaca de solução salina (NaCl 0,9%, Merck, Alemanha) a temperatura ambiente, seguida de solução fixadora modificada (ZAMBONI e DEMARTINO, 1967 apud GOMIDE e CHADI, 1999) que consiste de 4% de paraformaldeído (Merck, Alemanha) e ácido pícrico 0,2% (v/v) diluído em tampão fosfato 0,1M (pH 6,9). Os encéfalos foram rapidamente removidos e divididos em uma porção rostral e outra caudal por uma transecção coronal ao nível do mesencéfalo e imediatamente mergulhados na mesma solução fixadora por 90 minutos para a pós-fixação. Em seguida, as partes dos encéfalos foram lavadas em uma solução de sacarose tamponada a 10% por 48 horas (Merck, Alemanha) para crioproteção e então congeladas pela imersão em líquido isopentano (Sigma, EUA) resfriado com gelo seco (-40°C). Uma vez congelados, os troncos encefálicos foram armazenados em freezer -70° até sua utilização.

Processamento Tecidual

Secções coronais seriadas de 20 µm de espessura do tronco encefálico nas regiões estudadas foram obtidas em um criostato Leica, modelo CM3000 (Alemanha) com temperatura média de -20°C.

O seccionamento da ponte foi realizado segundo um protocolo de amostragem sistemática como previamente descrito por Chadi e colaboradores (1993a), Gomide e Chadi (1999) e Cerutti e Chadi (2000) e se deu nos níveis 11,30mm e 10,04mm do bregma segundo o Atlas de Paxinos e Watson (1986), nos quais se observam os núcleos coclear dorsal e coclear ventral respectivamente.

Todos os cortes foram processados para a imunohistoquímica em lâminas previamente gelatinizadas e congeladas, que permaneceram armazenadas à temperatura de -70°C até o início do procedimento imunohistoquímico.

Marcação imunohistoquímica

O método imunohistoquímico foi descrito com detalhes por Chadi e colaboradores, (1993a,b,c; 1994) e Humpel e colaboradores (1994).

Uma das séries de secções do núcleo coclear foi incubada por 48 horas à 4°C para a imunohistoquímica da proteína FOS, cujo anticorpo é feito em coelho (Affinit, Inglaterra), numa concentração de 1:600.

O sistema da imunoperoxidase indireta empregando a avidina-biotina (HSU *et al.*, 1981; Vectastain, Vector, EUA) foi usado com a 3-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloroto (DAB, Sigma, EUA) como cromógeno. Depois de lavadas em tampão fosfato, as secções foram incubadas com imunoglobulinas biotiniladas (Vector, diluído 1:250) por uma hora. Essas imunoglobulinas são obtidas de ovelha ou cavalo e produzidas contra anticorpos de animais cujos anticorpos primários foram retirados. Os anticorpos foram diluídos em tampão fosfato contendo 0,3% Triton X-100. Numa terceira incubação a avidina e uma peroxidase biotinilada foram introduzidas (Vectastain, Vector, ambas diluídas 1:125) durante 45 minutos. A reação foi completada com 0,03% de DAB (Sigma, EUA) como cromógeno e H₂O₂ (Sigma, EUA) durante 10 minutos. Os procedimentos imunohistoquímicos foram uniformizados. Assim, foram considerados os pontos de saturação do DAB, a diluição do anticorpo primário longe da saturação e um tempo de incubação ajustado de tal modo que os elementos mais escuros das secções estivessem inferiores à saturação (Zoli *et al.*, 1990).

Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica

Segundo Zoli e colaboradores (1990, 1991) e Chadi e colaboradores (1994), os dados da análise microdensitométrica das imunomarcações são semiquantitativos, mas capazes de permitir que se tenha uma estimativa da quantidade relativa da proteína imunomarcada na região estudada, principalmente quando análises comparativas do decurso temporal ou dos tratamentos são realizadas. A medida morfométrica (área) e microdensitométrica (spMGV) indica a quantidade de perfis imunopositivos e a intensidade de imunomarcações, respectivamente.

Análise morfométrica e microdensitométrica foi realizada para a análise da imunorreatividade da proteína FOS no núcleo coclear dorsal bilateralmente.

Os procedimentos de análise de imagem, realizados num analisador de imagem KS400 (Kontron, Alemanha) acoplado a uma câmara montada em um microscópio Zeiss, são resumidos a seguir, mas podem ser encontrados com detalhes na literatura (ZOLI *et al.*, 1990; CHADI *et al.*, 1993a, CHADI *et al.*, 1993b). A imagem das secções foi obtida por meio da câmara e projetada em um monitor. Campos de área definida foram amostrados em regiões específicas das secções, dependendo das imunorreatividades quantificadas. Após a correção do sombreamento, alguns procedimentos de discriminação foram realizados: os valores médios dos tons de cinza (MGV), assim como o erro padrão da média (e.p.m.) dos valores médios dos tons de cinza obtidos em áreas desprovidas de marcação específica foram medidos. Valores de tons de cinza mais escuro que o *background* MGV-3 e.p.m. foram considerados como marcação específica e desse modo, discriminados. Os MGV específicos (sp) foram definidos como a diferença entre os MGV do *background* e os MGV dos perfis discriminados. Os MGV da lâmina foram mantidos constantes em 200. Este procedimento foi repetido para cada secção, no intuito de corrigir as medidas de cada marcação específica em relação aos valores do próprio *background* (CHADI *et al.*, 1993a; CHADI *et al.*, 1993b). A área total e a média dos spMGV dos perfis imunorreativos foram obtidos dentro dos campos de quantificação.

Análise estatística

Para as análises estatísticas, foi usado o teste-t de Student, comparando-se as diferenças específicas entre os animais dos grupos controle e estimulado. Níveis de significância menores que 5% foram considerados.

II- Imunorreatividade dos neurotransmissores Glutamato, GAD, Neurotensina e Neuropeptídeo Y na via auditiva após estímulo sonoro definido.

Estimulação auditiva

Ratos Wistar machos de aproximadamente 180 gramas obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo foram utilizados, sendo divididos aleatoriamente em dois grupos: um grupo que recebeu estimulação auditiva (n=10) e um grupo controle (n=9).

A monitoração prévia da função auditiva foi realizada por meio da observação do reflexo auditivo eliciado por um ruído de alta intensidade emitido por um instrumento sonoro, conforme descrito por Hyson e Rudy (1984), atividade esta desempenhada no dia seguinte à chegada dos animais. O instrumento sonoro utilizado foi o agogô, que possui espectro de frequência de 500 a 20.000 Hz, apresentando maior intensidade entre 600 e 800 Hz e entre 3.000 e 8.000 Hz, em que atinge pelo menos 85 decibéis nível de pressão sonora (NOVAES e FICKER, 1979).

Os animais foram levados um a um para uma sala silenciosa e colocados sobre uma mesa. O agogô foi posicionado a cerca de 5 cm atrás da cabeça do animal, na linha mediana. O instrumento foi acionado, com um toque intenso na campânula grande, oferecendo o mínimo de pistas visuais para o animal. Observou-se, então, a presença de respostas comportamentais que incluíram uma inspiração profunda e repentina, além do piscar de olhos. O teste foi considerado positivo na presença da resposta comportamental descrita, independente de sua amplitude, e negativo na ausência da resposta.

Os animais foram separados em subgrupos de 3 ou 4 e receberam igual tratamento dos ratos do experimento anterior na sala tratada acusticamente. Após o mesmo período de habituação, com duração de 1 semana, a estimulação auditiva já descrita foi aplicada nos ratos do grupo estimulado, subgrupo por subgrupo, de forma idêntica ao experimento anterior, sendo que essa estimulação foi repetida durante 7 dias seguidos.

Sacrifício dos animais

No dia seguinte a última estimulação, os animais foram sacrificados por meio da perfusão transcardíaca descrita acima.

Logo após a retirada dos encéfalos de cada animal, colocados nas mesmas soluções já apresentadas, a parte petrosa do osso temporal contendo a cóclea foi removida bilateralmente e mergulhada por 90 minutos na solução fixadora; em alguns minutos do tempo da pós-fixação, as cócleas foram cuidadosamente dissecadas sob um microscópio cirúrgico, sendo constantemente banhadas no fixador durante esse procedimento. Na seqüência, um processo de desmineralização em ácido tetraacético-etilenodiamino (EDTA) (Sigma, EUA) a 8% dissolvido em PBS foi realizado por 6 dias com trocas diárias da solução. No final desse período, as cócleas foram lavadas em PBS para a retirada de todo o excesso da solução desmineralizante e mergulhadas em sacarose 20% (Merck, Alemanha) dissolvida em tampão fosfato por 48 horas para crioproteção. As cócleas foram congeladas a 40°C em isopentano dentro de cápsulas plásticas pequenas, contendo meio de congelamento (Miles Inc., EUA), em que foram orientadas espacialmente, para que as secções obtidas posteriormente fossem paralelas ao modíolo. Uma vez congelados, os troncos encefálicos e cócleas foram armazenados em freezer -70° até sua utilização.

Processamento Tecidual

Secções coronais seriadas de 20 µm de espessura do tronco encefálico e da cóclea, nas regiões estudadas, também foram obtidas no criostato Leica, descrito anteriormente, com temperatura média de -20°C para o tronco encefálico e -25°C para a cóclea.

O seccionamento da ponte foi efetivado com a mesma metodologia. O seccionamento das cócleas aconteceu segundo um protocolo de amostragem sistemática, abrangendo toda a sua extensão, desde o giro apical até o término do giro basal.

O armazenamento dos cortes processados para a imunohistoquímica, montados em lâminas previamente gelatinizadas e congeladas, foi realizado a -70° C até a sua utilização.

Marcação imunohistoquímica

As lâminas contendo as secções da cóclea foram descongeladas e secas à temperatura ambiente quando receberam um banho de 0,05% de gelatina dissolvida em PBS, a fim de propiciar maior aderência do tecido descalcificado à lâmina histológica durante o procedimento imunohistoquímico, prevenindo ou minimizando o descolamento do mesmo. Pipetada cuidadosamente sobre as secções secas, a gelatina em excesso foi retirada suavemente pela leve inclinação das lâminas, novamente colocadas para secar em temperatura ambiente, por aproximadamente 15 minutos, antes do início de tal procedimento.

Utilizando-se do método imunohistoquímico já descrito, as séries de secções, tanto do núcleo coclear quanto das cócleas direitas e esquerdas, foram submetidas à incubação de 24 horas a 4°C com um dos seguintes marcadores:

- anticorpo policlonal anti-glutamato (Sigma, EUA) feito em coelho diluído na concentração de 1:2000 para o núcleo coclear e 1:4000 para a cóclea;
- anticorpo policlonal anti-neurotensina (Península, Canadá) feito em coelho diluído na concentração de 1:600 para o núcleo coclear e de 1:500 para a cóclea;
- anticorpo policlonal anti-NPY (Sigma, EUA) feito em coelho diluído na concentração de 1:1500 para o núcleo coclear e 1:1200 para a cóclea;
- anticorpo policlonal anti-GAD (Chemicon Int., Canadá) feito em coelho diluído na concentração de 1:800 para o núcleo coclear.

Análise Quantitativa Estereológica

Esta análise foi empregada para a mensuração do número de células tipo I e tipo II dos gânglios espirais apresentando diferentes intensidades dos imunomarcadores estudados nos três giros espirais das cócleas, sendo essas intensidades consideradas como forte, moderada ou fraca, de acordo com a graduação da cor marrom conferida às células. Cada giro da cóclea do rato em torno do modíolo (apical, medial e basal) foi quantificado separadamente em toda a sua extensão para os imunomarcadores glutamato e NPY e em duas secções de cada giro para a neurotensina. As quantificações foram realizadas

utilizando-se um sistema estereológico CAST (Computer Assisted Stereologic Toolbox) que permite quantificações das alterações morfológicas e das imunorreatividades das células ou de suas partes com auxílio do computador, empregando ferramentas estereológicas descritas na bibliografia (GUNDERSEN *et al.*, 1988; WEST e GUNDERSEN, 1990; WEST *et al.*, 1991; JANSON e MOLLER, 1993; CHADI *et al.*, 1993a e GOMIDE e CHADI, 1999) e apenas brevemente apresentadas neste trabalho.

Um microscópio Olympus BX50 (Olympus, Dinamarca) conectado a um computador (IBM 330-P75, EUA) e uma câmera de vídeo em cores (JAL 2040, Protec, Japão), ambos acoplados a um monitor colorido (G70, IBM) foram utilizados. O movimento do porta-lâminas do microscópio nos eixos X-Y (Lang, Huttenberg, Alemanha) é controlado pelo programa GRID (Interactivision, Silkeborg, Dinamarca), que também é utilizado para a geração de uma grade de pontos de análise, sobreponível à imagem. Com o auxílio de um sistema de projeção, a imagem da secção e a moldura de contagem podem ser projetadas no monitor, permitindo a contagem das partículas pelo dissector óptico. O dissector é uma ferramenta estereológica que permite realizar uma estimativa do número de partículas na terceira dimensão independentemente de suas características morfológicas, definindo uma fina secção óptica dentro de uma secção espessa, por meio do movimento do plano de foco para frente e para trás. Um microcator (MT12, Heidenhan, Alemanha) ligado ao microscópio tem a finalidade de monitorizar o movimento do porta-lâminas do microscópio no eixo vertical (Z), fornecendo medidas desses movimentos, como: dados da espessura da secção, posição do dissector no espaço e a altura h do dissector. A borda da região a ser quantificada foi delineada com uma objetiva de 4x. Distâncias para amostragem nos eixos X-Y ($90 \times 90 \mu\text{m}$) foram introduzidas, fazendo com que o programa criasse uma série de campos de amostragem uniformes sobre toda a região demarcada. Uma objetiva de imersão com aumento de 100x e abertura de 1.4 foi utilizada para as contagens das intensidades dos perfis celulares imunorreativos. Dessa forma, o número de partículas pode ser estimado numa fração conhecida do referido espaço que corresponde ao volume total da região considerada. O princípio do fracionamento envolve a amostragem de partículas de modo aleatório, mas uniforme (GUNDERSEN, 1986). Assim, o número total estimado será derivado do número de partículas encontradas no espaço de referência e da probabilidade da amostra (GUNDERSEN, 1986; GUNDERSEN *et al.*, 1988). A

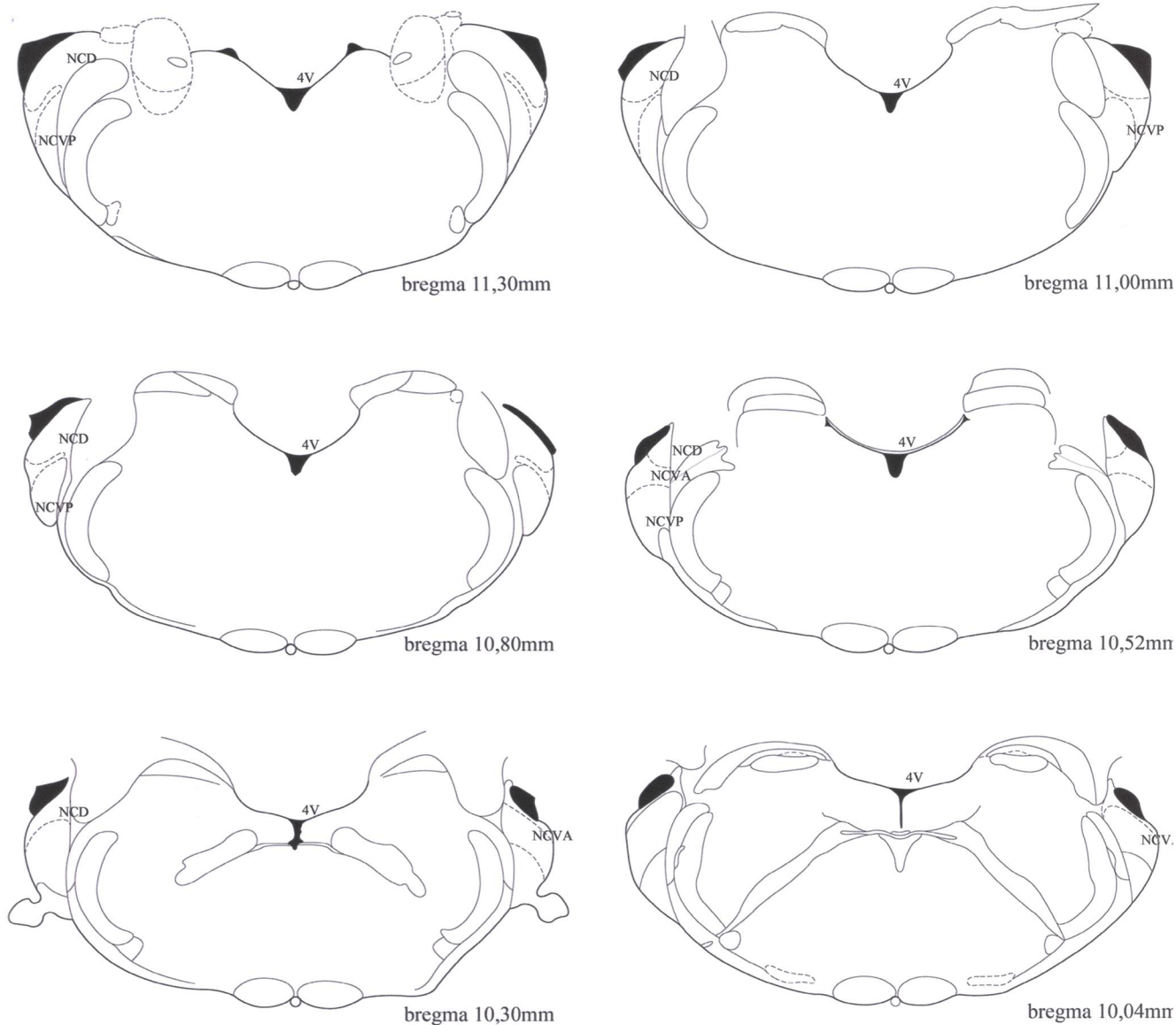
metodologia para a amostragem sistemática do dissector no interior da secção, da amostragem das partículas no interior do dissector, do cálculo do número total e do coeficiente de erro está descrita na literatura (CHADI *et al.*, 1993c; WEST e GUNDERSEN, 1990 e WEST *et al.*, 1991).

Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica

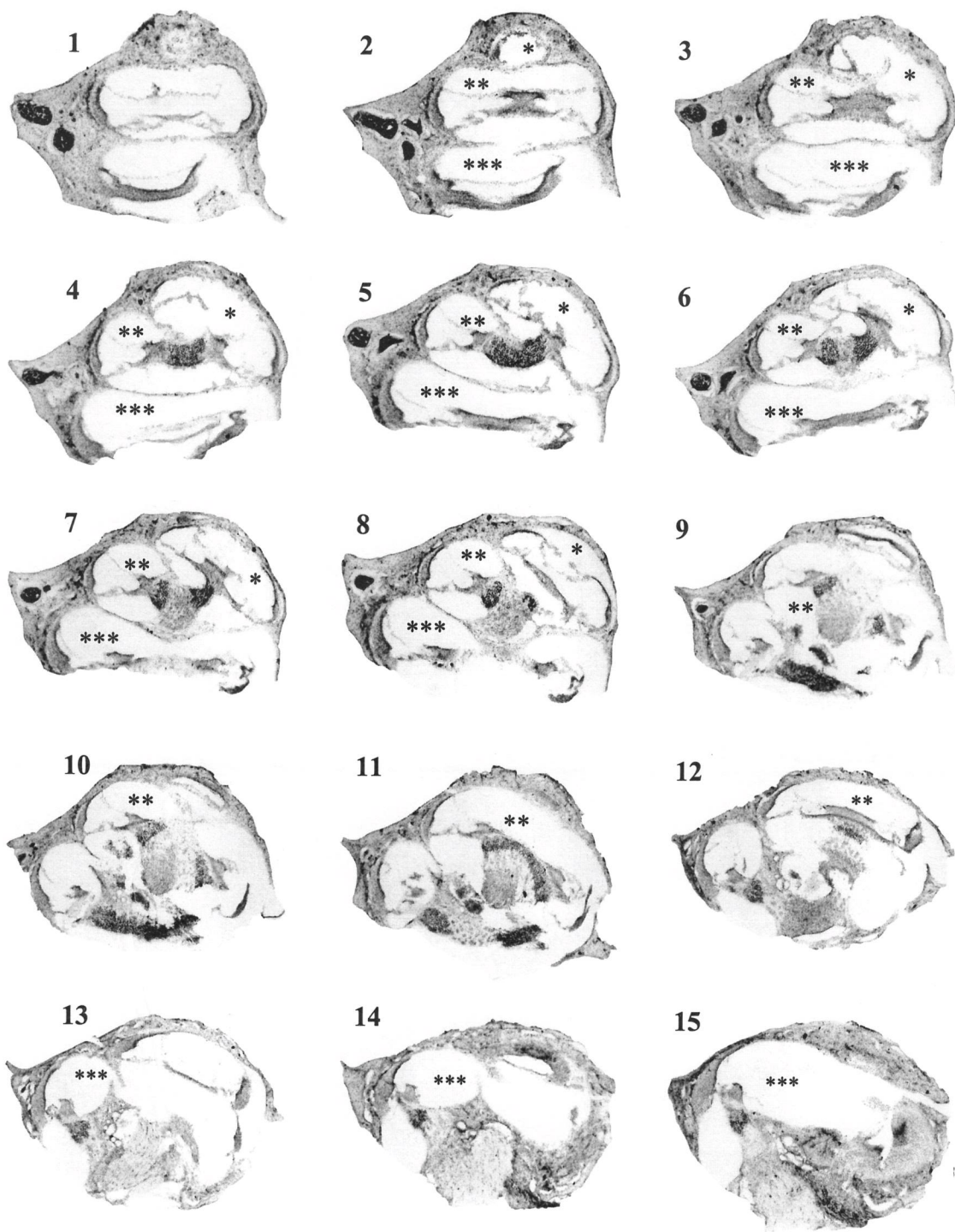
Análise morfométrica e microdensitométrica foi realizada, como descrita acima, para quantificar a imunorreatividade do glutamato e do GAD em corpos celulares, prolongamentos e terminais no núcleo coclear dorsal, bem como a imunorreatividade da neurotensina e do GAD no núcleo coclear ventral, ambas bilateralmente. Apenas análise semiquantitativa microdensitométrica foi empregada para obtenção da intensidade das imunorreatividades do glutamato, do NPY e da neurotensina nas células ciliadas internas do órgão de Corti dos giros apicais, mediais e basais das cócleas de ambos os lados de cada animal.

Análise estatística

Para as análises estatísticas, foi usado o teste-t de Student, comparando-se as diferenças específicas entre os animais dos grupos controle e estimulado. Níveis de significância menores que 5% foram considerados.



Esquema 2: Esquema de secções coronais da ponte do rato do nível do bregma -11,30mm até o nível -10,04mm retiradas do Atlas Paxinos e Watson (1986), representando uma das séries submetidas a processamento. As secções adjacentes dos cérebros foram amostradas sistematicamente a cada oitava secção crânio caudal, de modo que 8 séries com dez secções cada, foram obtidas. Abreviações: NCD= núcleo coclear dorsal, NCVP= núcleo coclear ventral posterior, NCVA= núcleo coclear ventral anterior, 4V= IV ventrículo.



Esquema 3: Imagens digitalizadas de secções corónais e adjacentes da cóclea do rato representando uma das séries submetidas ao processamento. As secções foram amostradas sistematicamente a cada quinta secção, paralelas ao eixo baso-apical, de modo que 5 séries com doze secções cada foram obtidas. *giro apical, **giro medial, ***giro basal. Barra=500µm

RESULTADOS

RESULTADOS

I - Expressão da proteína FOS no núcleo coclear induzida por estímulo sonoro definido.

Análise da Imunorreatividade da Proteína FOS

Análise Qualitativa

Neurônios imunorreativos à proteína FOS foram encontrados agrupados em região específica do núcleo coclear dorsal tanto no grupo de animais controle quanto nos animais estimulados acusticamente, sendo essa região caracterizada mais ventralmente no nível caudal do núcleo coclear dorsal (**Fig. 4 A-D**). Poucos neurônios da porção central e medial do núcleo coclear ventral expressaram a proteína FOS após o estímulo apresentado (**Fig. 4E-F**).

Análise Semiquantitativa Morfométrica da Imunorreatividade da Proteína FOS no Núcleo Coclear Dorsal

A análise semiquantitativa da imunorreatividade por imagem mostrou um aumento significativo de 505% ($p < 0.01$) na área de imunorreatividade da proteína Fos na região rostral do núcleo coclear dorsal dos animais estimulados acusticamente (**Fig. 5**).

II - Imunorreatividade dos neurotransmissores Glutamato, GAD, Neurotensina e Neuropeptídeo Y na via auditiva após estímulo sonoro definido.

Análise da Imunorreatividade do Glutamato

Análise Qualitativa

Forte imunorreatividade do glutamato foi observada no citoplasma das células ciliadas internas do órgão de Corti (**Fig. 6 A-B**), enquanto fraca marcação foi encontrada nas células ciliadas externas. Imunorreatividade variando de fraca à forte também foi

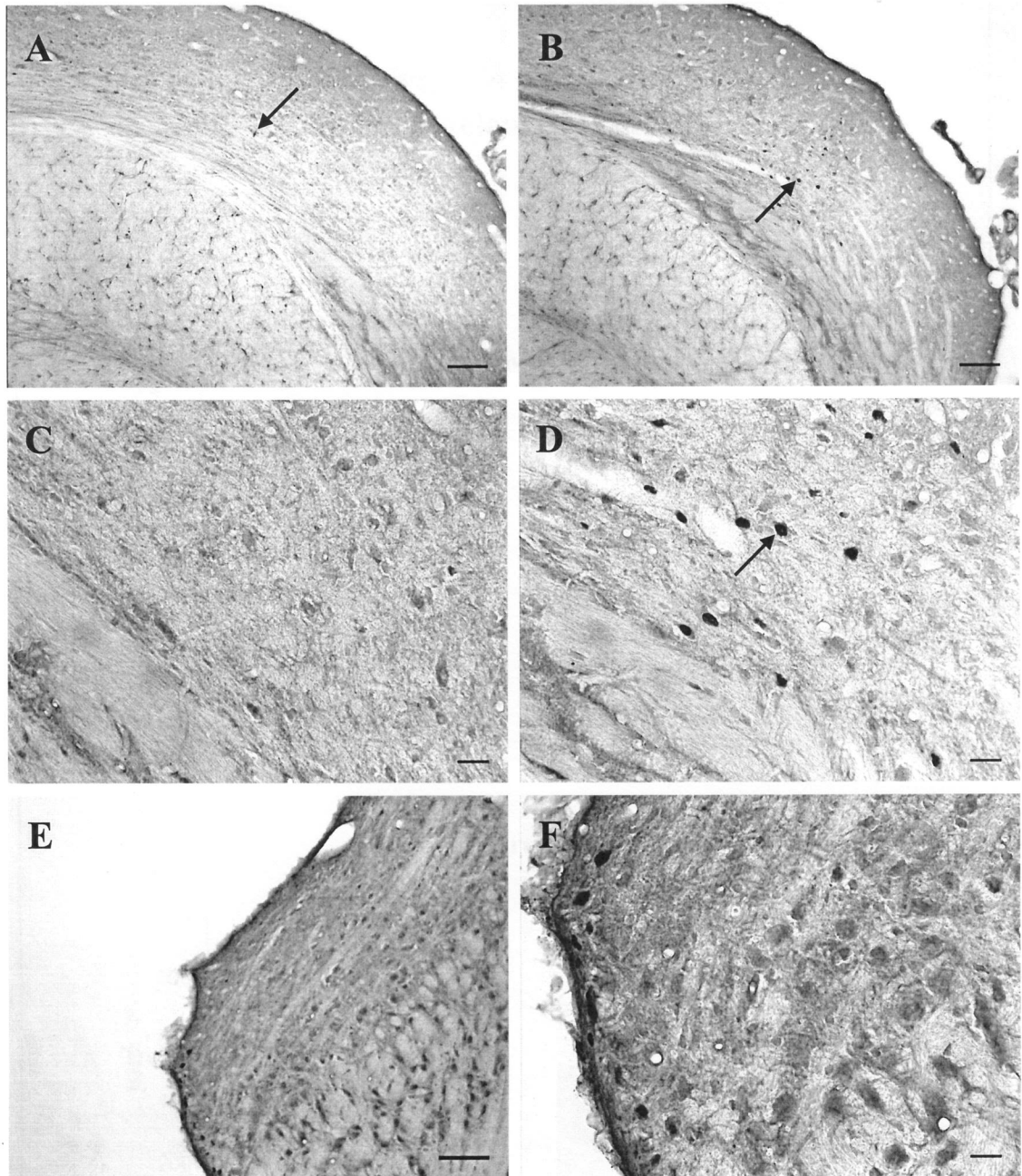


Figura 4: Fotografias mostrando a imunorreatividade da proteína FOS no núcleo de neurônios (setas) na região rostral do núcleo coclear dorsal (A-D) e no núcleo coclear ventral (E-F) dos ratos controle (A, C) e que receberam estimulação auditiva (B, D, E, F) durante 1 hora, com estímulo-sonoro na frequência de 8KHz a 80 dB NPS. Os ratos foram sacrificados 1 hora após a estimulação auditiva. Barras: 100 μ m (A, B, E) e 20 μ m (C, D, F).

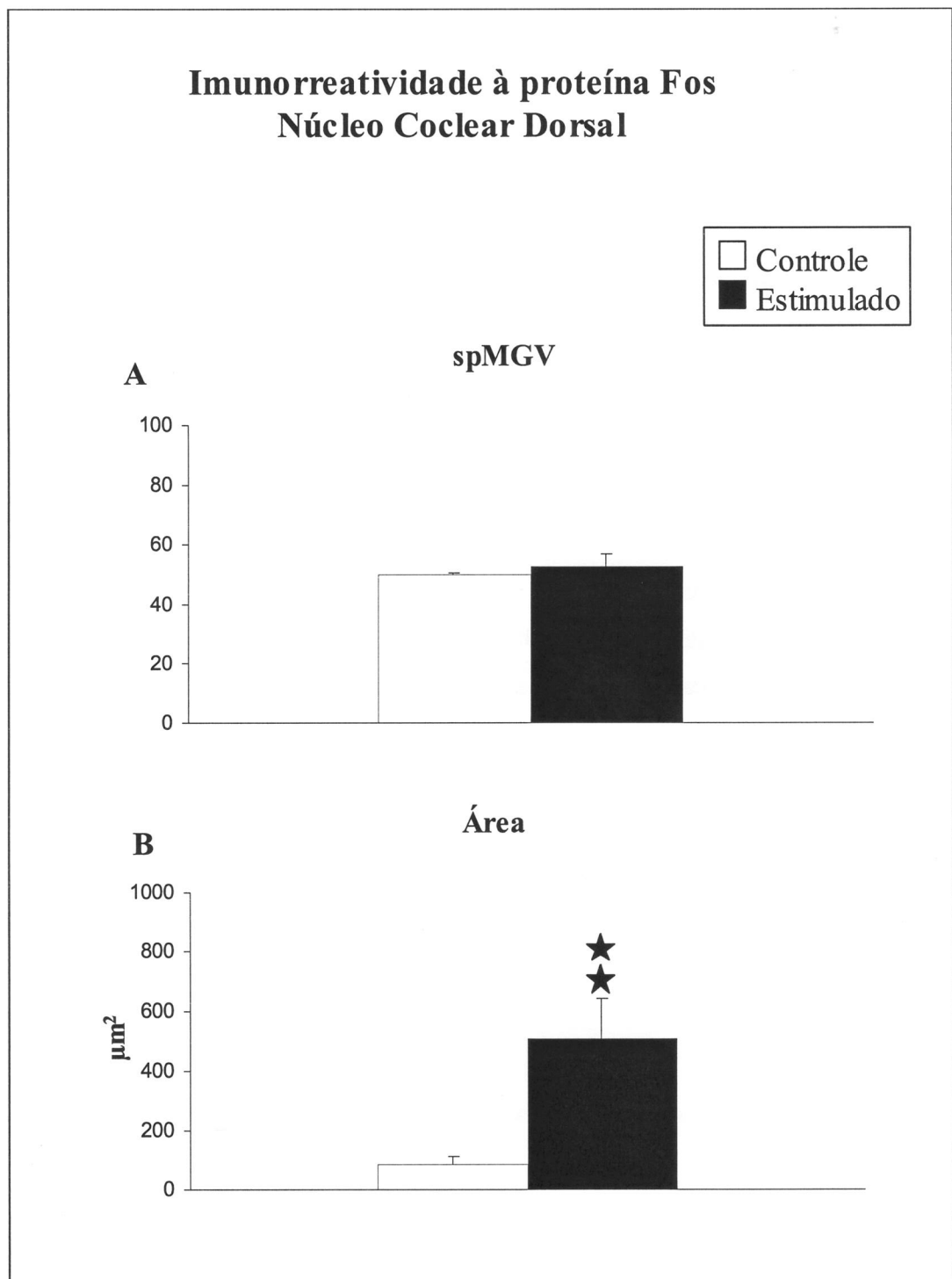


Figura 5: Efeito do estímulo sonoro definido no valor médio \pm e.p.m. dos tons de cinza específicos (**A**) e da área (**B**) dos perfis neuronais imunorreativos à proteína Fos obtidos por análise de imagem em áreas específicas do núcleo coclear dorsal, segundo teste t de Student. ★★ $p < 0,01$.

observada no citoplasma dos neurônios do gânglio espiral dos giros apical, medial e basal (Fig.6 C-D) da cóclea. Fibras moderadamente marcadas foram notadas no nervo coclear.

Prolongamentos imunorreativos ao glutamato foram vistos saindo do gânglio e cruzando a lâmina espiral óssea em sentido radial até o órgão de Corti (dado não mostrado).

A imunorreatividade do Glutamato foi observada em terminais, fibras e citoplasmas dos neurônios do núcleo coclear dorsal dos animais de ambos os grupos, com maior concentração na camada de células fusiformes (Fig.7 A-D). No núcleo coclear ventral células imunorreativas ao glutamato foram encontradas na região das células granulares (dado não mostrado).

Análise Semiquantitativa Microdensitométrica da Imunorreatividade do Glutamato nas Células Ciliadas Internas

Os resultados da análise semiquantitativa microdensitométrica de imagem estão mostrados na figura 8. O valor médio dos tons de cinza específicos da imunorreatividade do glutamato mostrou-se aumentado em 14% ($p < 0,05$) no citoplasma das células ciliadas internas do órgão de Corti no giro basal da cóclea dos animais estimulados.

Análise Quantitativa Estereológica da Imunorreatividade do Glutamato no Gânglio Espiral

A estimulação auditiva não promoveu diferenças estatísticas na porcentagem de células fortes, moderadas e fracas marcadas pela imunorreatividade do glutamato nos neurônios do gânglio espiral em nenhum dos giros da cóclea dos grupos de animais controle e estimulados (Tabela I).

Análise Semiquantitativa Microdensitométrica e Morfométrica da Imunorreatividade do Glutamato no Núcleo Coclear Dorsal

O estímulo auditivo não alterou o valor médio dos tons de cinza específicos da imunorreatividade do glutamato no núcleo coclear em nenhum dos grupos estudados, porém promoveu aumento significativo, estimado em 172% ($p < 0,01$), na área de imunorreatividade do núcleo coclear dorsal dos animais estimulados. O resultado da análise semiquantitativa morfométrica de imagem está mostrado na figura 9.

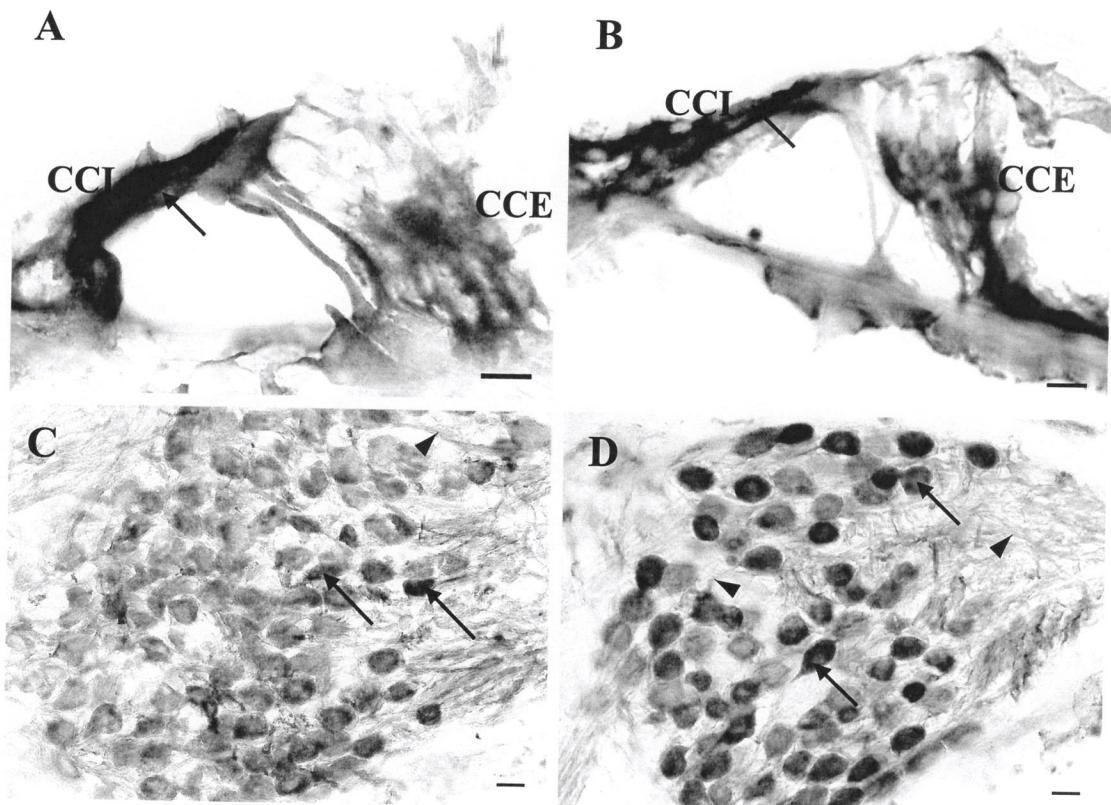


Figura 6: Fotografias mostrando a imunorreatividade do glutamato (A-D) no órgão de Corti (A-B) e no gânglio espiral (C-D) do giro basal da cóclea dos ratos controle (A, C) e que receberam estimulação auditiva (B, D). A imunorreatividade do glutamato é observada no citoplasma das células ciliadas do órgão de Corti (seta) e no citoplasma (setas) e prolongamentos (cabeças de setas) dos neurônios espirais. Barras = 10 μ m.

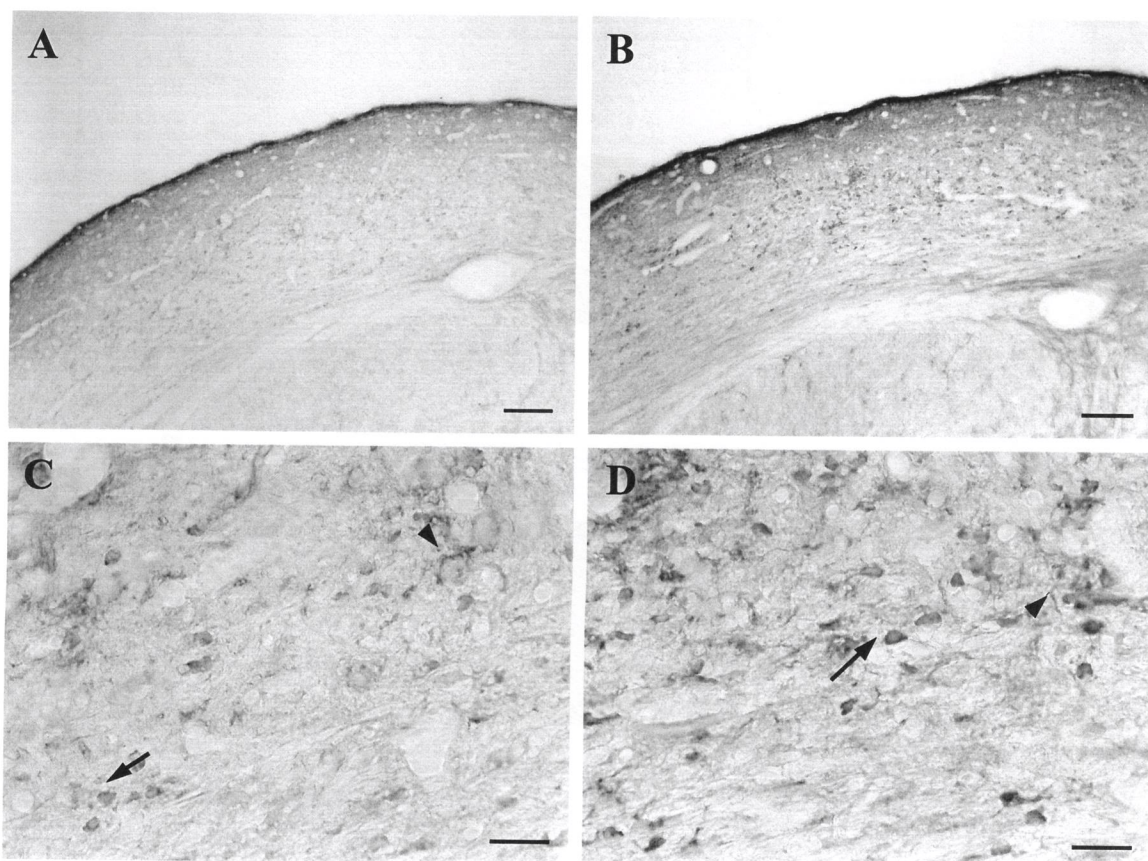


Figura 7: Fotografias da imunorreatividade do glutamato (A-D) no núcleo coclear dorsal dos ratos controle (A, C) ou estimulados acusticamente (B, D). A imunorreatividade do glutamato é observada no citoplasma de neurônios fusiformes (setas) e prolongamentos de células (cabeças de setas). Barras = 100 μ m (A, B) e 20 μ m (C, D).

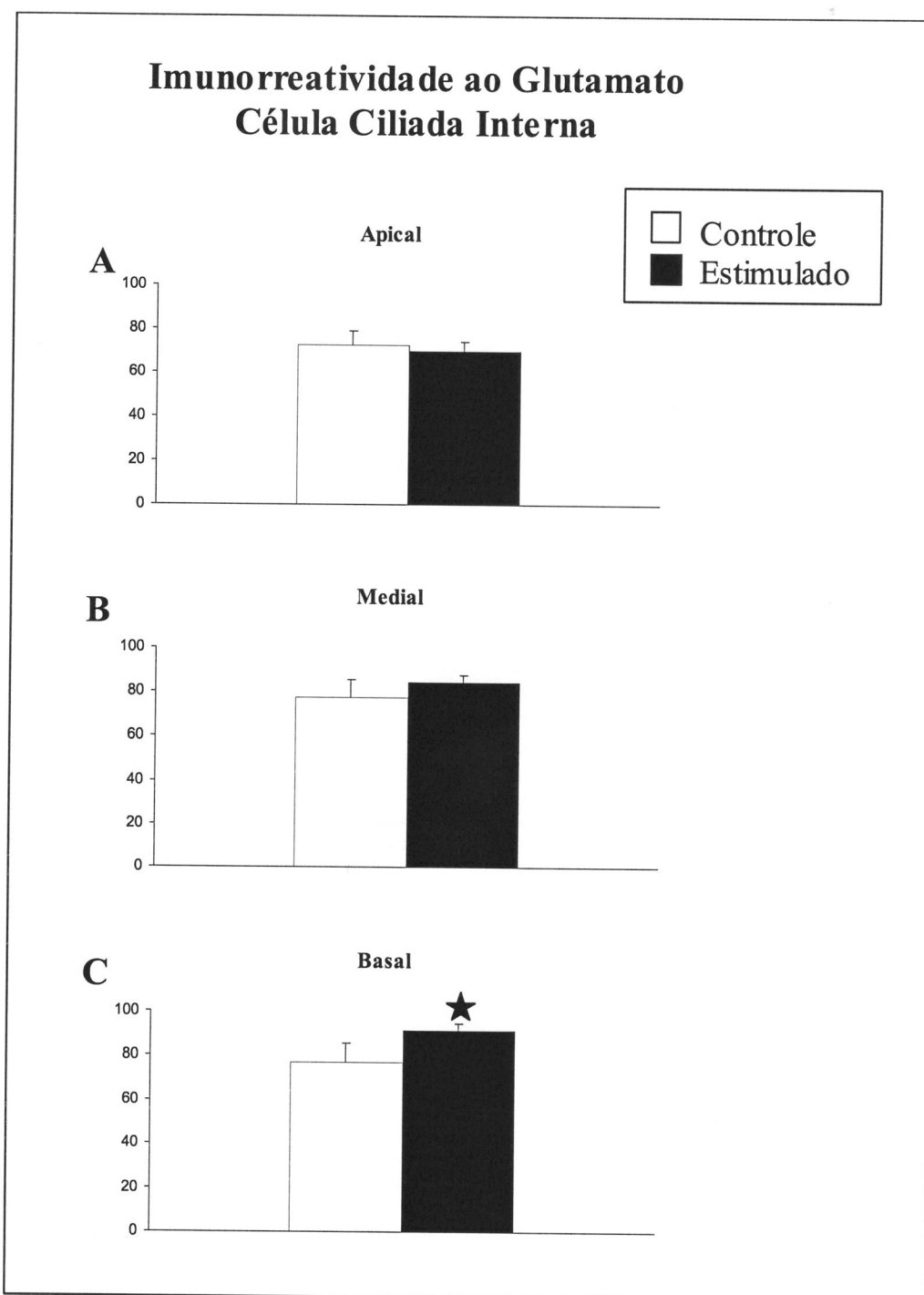


Figura 8: Efeito do estímulo sonoro definido no valor médio \pm e.p.m. dos tons de cinza específicos (spMGV) dos perfis celulares imunorreativos ao glutamato nas células ciliadas internas dos giros apical (A), medial (B) e basal (C) da cóclea. ★ $p < 0,05$, segundo teste t de Student.

Tabela 1: Porcentagem de células fortes, moderadas e fracas do gânglio espiral imunorreativas ao glutamato depois de estímulo auditivo de finido.

		FORTE		MODERADO		FRACO	
		Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
T1	Apical	7,9 ± 3,1	8,8 ± 1,3	54,9 ± 5,9	50,2 ± 5,71	37,1 ± 4,7	40,9 ± 4,7
	Medial	9,2 ± 1,9	9,1 ± 1,6	50,1 ± 3,3	57,3 ± 2,2	40,6 ± 4,6	33,5 ± 2,7
	Basal	10,7 ± 2,6	11,3 ± 1,3	51,3 ± 2,3	55,3 ± 2,5	37,9 ± 2,8	33,3 ± 2,5
T2	Apical	55,9 ± 15,7	53,2 ± 15,3	34,5 ± 12,6	39,1 ± 14,9	9,5 ± 9,5	7,62 ± 5,1
	Medial	33,6 ± 7,5	40,0 ± 6,3	52,0 ± 6,5	53,3 ± 6,6	14,4 ± 3,8	6,68 ± 2,5
	Basal	50,6 ± 8,7	42,4 ± 5,8	42,0 ± 8,6	49,5 ± 5,3	7,32 ± 2,1	8,05 ± 3,0
T1+T2	Apical	10,5 ± 3,4	11,7 ± 1,9	54,1 ± 5,5	49,6 ± 4,9	35,3 ± 4,7	38,7 ± 4,3
	Medial	11,3 ± 2,2	11,3 ± 1,9	50,2 ± 3,1	57,1 ± 2,2	38,4 ± 4,4	31,5 ± 2,8
	Basal	13,8 ± 3,1	14,0 ± 1,7	50,6 ± 2,7	54,6 ± 2,4	35,5 ± 2,5	31,3 ± 2,5

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. n=10 para grupo estimulado e n=9 para grupo controle.

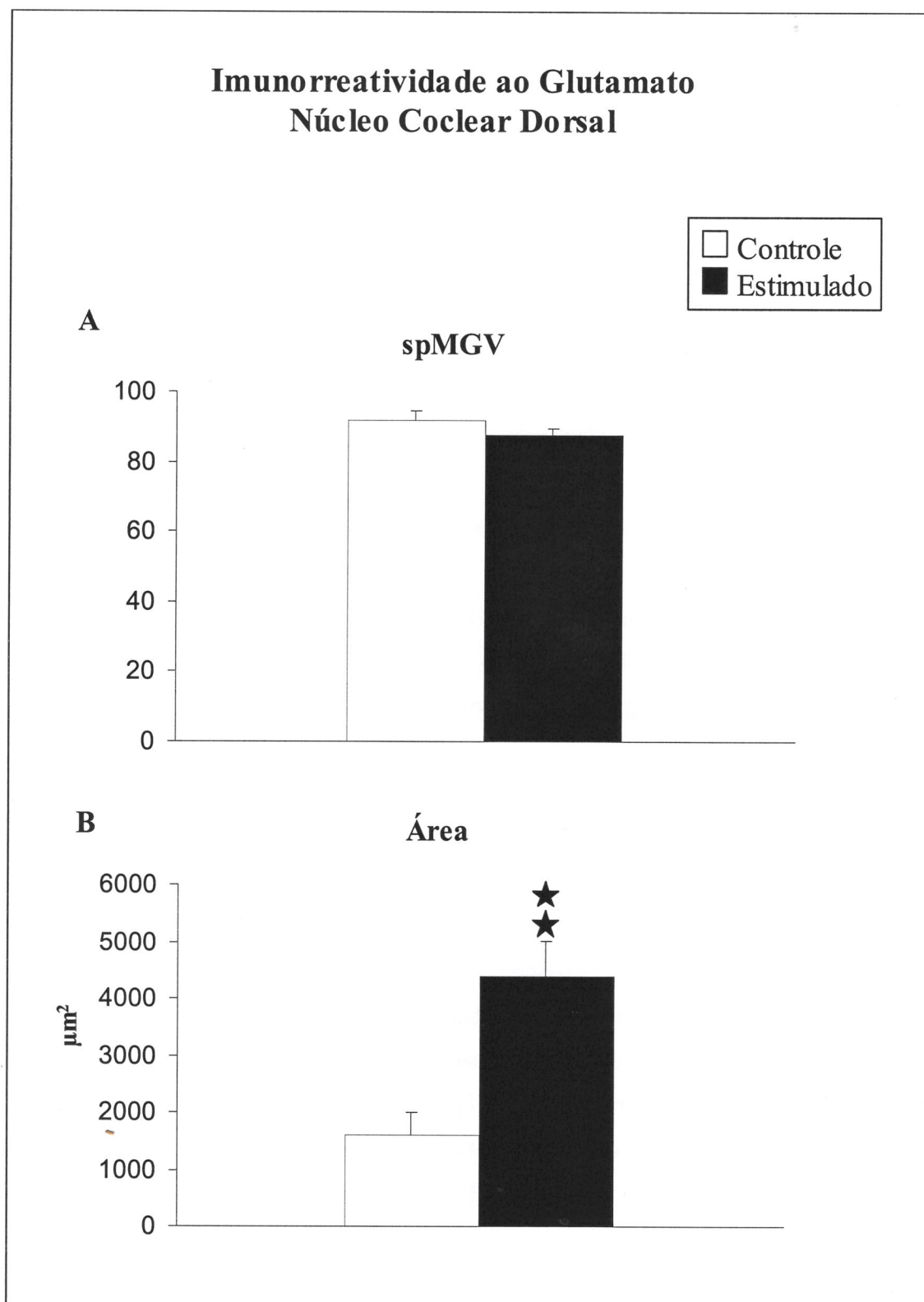


Figura 9: Efeito do estímulo sonoro definido no valor médio \pm e.p.m. dos tons de cinza específicos (A) e da área (B) dos perfis neuronais imunorreativos ao glutamato obtidos por análise de imagem em áreas específicas do núcleo coclear dorsal, segundo teste t de Student. ** $p < 0,01$.

Análise da Imunorreatividade do GAD

Análise Qualitativa

A análise do tecido imunorreativo ao GAD mostrou corpos celulares e terminais marcados tanto na subdivisão dorsal quanto na ventral do núcleo coclear. Alta densidade de terminais foi observada nas camadas 1 e 2 (camada molecular e de células fusiformes, respectivamente) do núcleo coclear dorsal e na camada granular superficial do núcleo coclear ventral (**Fig 10 A-F**); já os pericários foram observados mais esparsamente em pequenos neurônios do núcleo coclear dorsal e em células da porção ventral do núcleo (dado não mostrado).

Análise Semiquantitativa Microdensitométrica e Morfométrica da Imunorreatividade do GAD no Núcleo Coclear

A análise microdensitométrica da intensidade dos tons de cinza e a análise morfométrica da área da imunorreatividade do GAD analisados no núcleo coclear, não apontaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos de animais controle e estimulado, segundo teste-t de Student (**Figs. 11 e 12**).

Análise da Imunorreatividade da Neurotensina

Análise Qualitativa

A imunorreatividade da neurotensina foi encontrada no citoplasma das células ciliadas do órgão de Corti, com maior expressão nas células ciliadas internas e na maioria dos neurônios do gânglio espiral dos giros apical, medial e basal da cóclea. Delicadas fibras contendo imunorreatividade da neurotensina também foram vistas na lâmina espiral óssea e prolongamentos dos neurônios espirais (**Fig. 13**).

O núcleo coclear dorsal não mostrou imunomarcção para a neurotensina, somente observada no núcleo coclear ventral, em que células imunorreativas foram identificadas na porção anterior (**Fig. 14**).

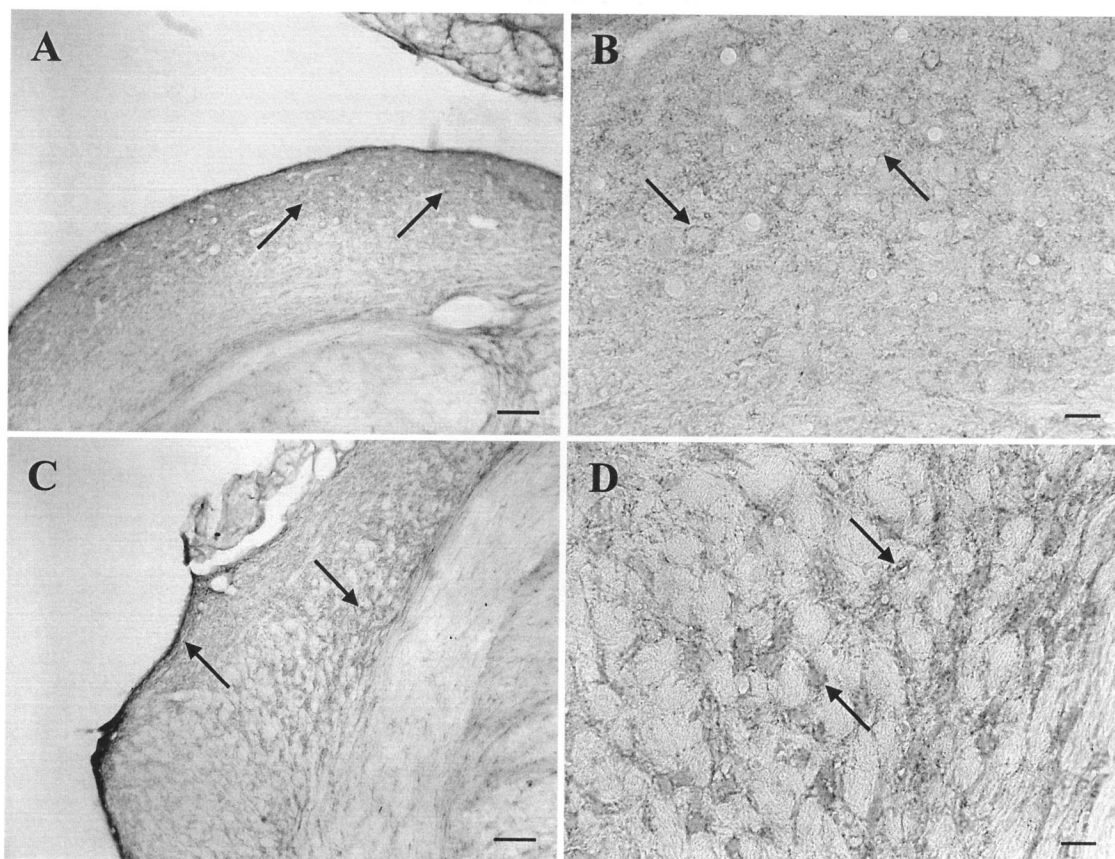


Figura 10: Fotografias da imunorreatividade do GAD (A-D) no núcleo coclear de ratos controle. A imunomarcaco do GAD   observada em numerosos terminais no núcleo coclear dorsal (A, B) e na região de células granulares no núcleo coclear ventral (C, D) Barras = 100µm (A, C) e 20µm (B, D).

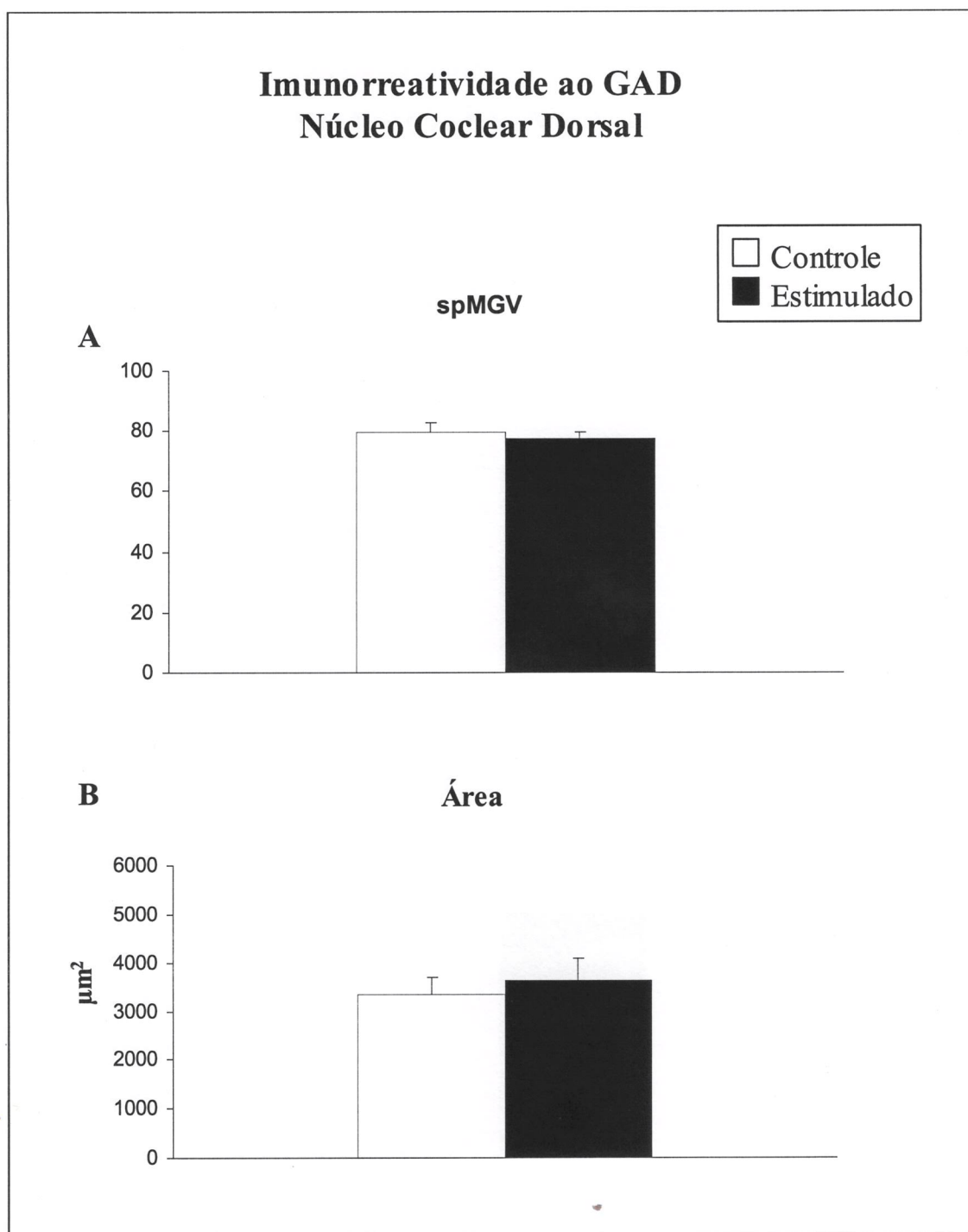


Figura 11: Efeito do estímulo sonoro definido no valor médio \pm e.p.m. dos tons de cinza específicos (A) e da área (B) dos perfis neuronais imunorreativos ao GAD obtidos por análise de imagem em áreas específicas do núcleo coclear dorsal, segundo teste t de Student.

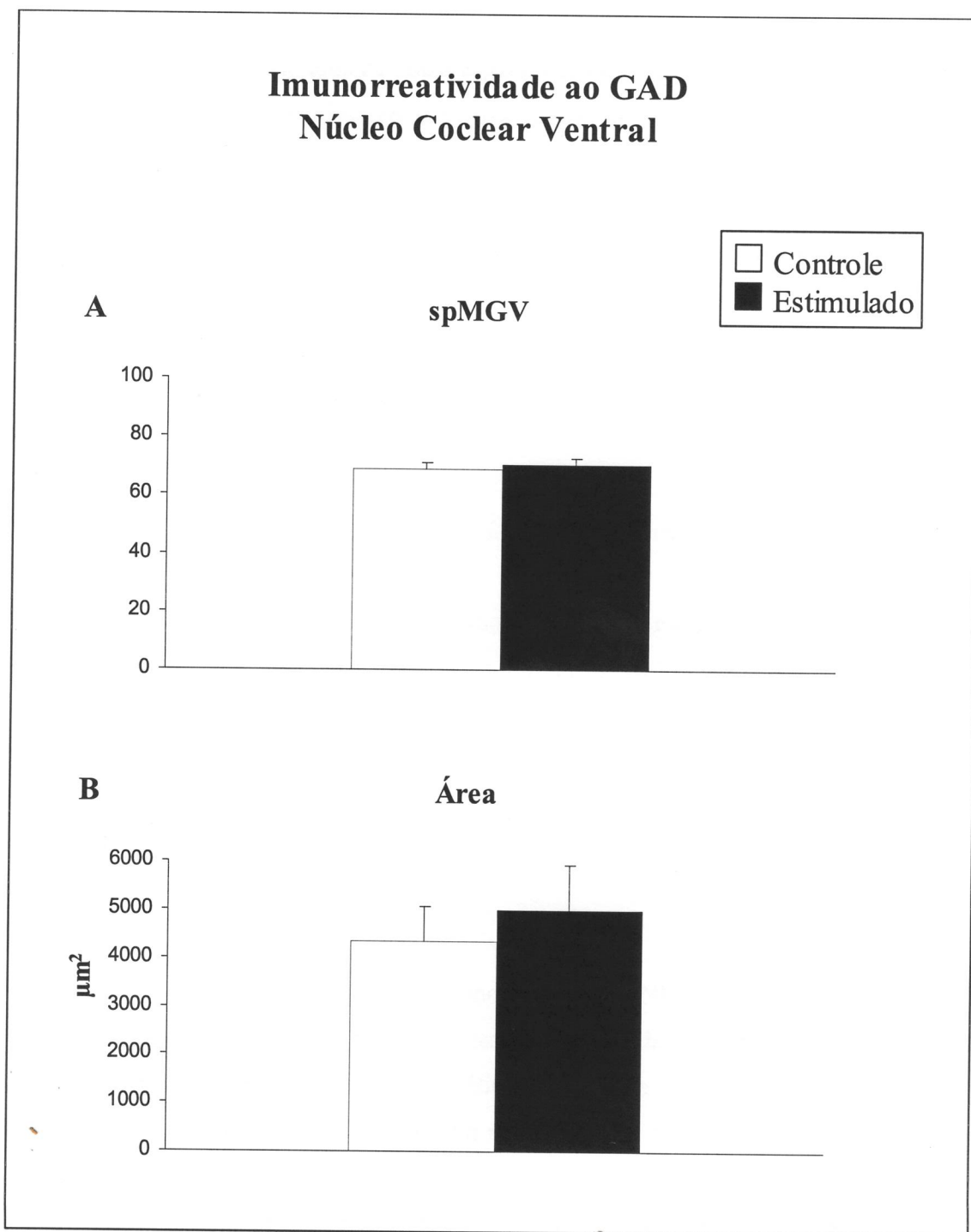


Figura 12: Efeito do estímulo sonoro definido no valor médio \pm e.p.m. dos tons de cinza específicos (A) e da área (B) dos perfis neuronais imunorreativos ao GAD obtidos por análise de imagem em áreas específicas do núcleo coclear ventral, segundo teste t de Student.

Análise Semiquantitativa Microdensitométrica da Imunorreatividade da Neurotensina nas Células Ciliadas Internas

O valor médio dos tons de cinza específicos da imunorreatividade da neurotensina mostrou-se diminuído em 13% ($p < 0,05$) nas células ciliadas internas do órgão de Corti especificamente no giro apical da cóclea no grupo de animais estimulados (**Fig. 15**).

Análise Quantitativa Estereológica da Imunorreatividade da Neurotensina no Gânglio Espiral

Nenhum efeito decorrente da estimulação auditiva foi observado na imunorreatividade da neurotensina no gânglio espiral em qualquer um dos giros apical, medial ou basal da cóclea (**Tabela 2**).

Análise Semiquantitativa Microdensitométrica e Morfométrica da Imunorreatividade da Neurotensina no Núcleo Coclear Ventral

Na análise da área e do valor médio dos tons de cinza da imunorreatividade da neurotensina no núcleo coclear ventral não foram encontradas diferenças entre o grupo de animais controle e estimulado segundo teste-t de Student.

Análise da Imunorreatividade do NPY

Análise Qualitativa

Células ciliadas mostraram-se imunopostivas ao NPY, com forte marcação nas células ciliadas internas e fraca marcação nas células ciliadas externas. Neurônios espirais apresentaram imunorreatividade citoplasmática do NPY de fraca à forte intensidade (**Fig. 16**). Fibras marcadas foram encontradas no nervo coclear, no gânglio espiral e na lâmina espiral óssea. Todos esses resultados foram observados em ambos os grupos de animais.

Ausência da imunomarcção para o NPY foi observada tanto na subdivisão dorsal quanto na ventral do núcleo coclear (**Fig. 17**).

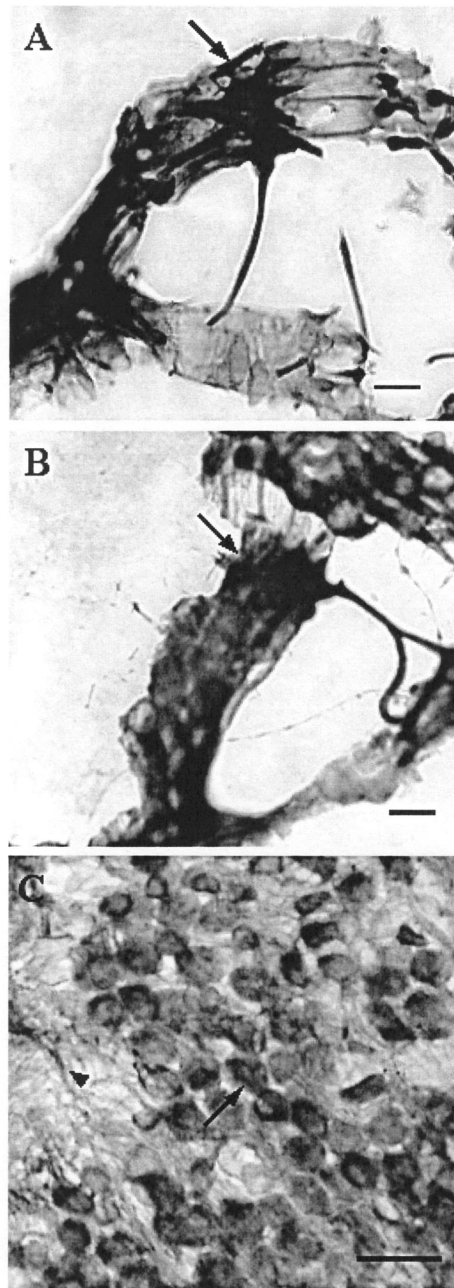


Figura 13: Fotografias mostrando a imunorreatividade da neurotensina (A-D) nas células ciliadas internas do órgão de Corti do giro apical da cóclea dos ratos controle (A) e estimulados acusticamente (B). Em C foto ilustrativa do gânglio espiral (GE) do giro medial da cóclea mostrando a imumarcção da neurotensina. A imunorreatividade é observada no citoplasma das células ciliadas (seta) do órgão de Corti (A, B) e no citoplasma (setas) e prolongamentos (cabeça de seta) dos neurônios espirais (C). Barras = 20 μ m (A, B) e 30 μ m (C).

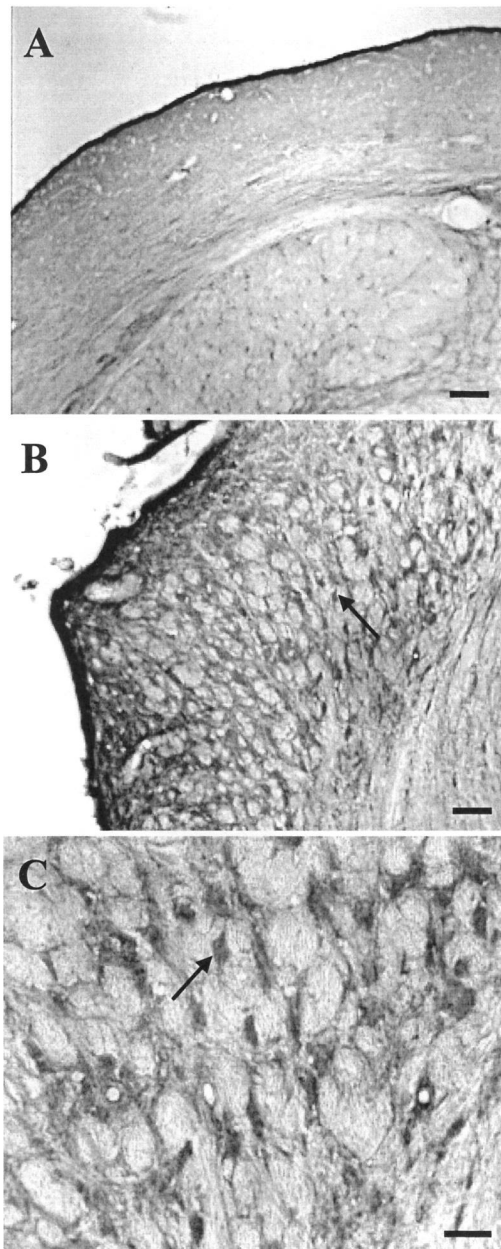


Figura 14: Fotografias ilustrativas da imunorreatividade da neurotensina (A-C) no núcleo coclear dorsal (A) e ventral de ratos (B, C). Ausência de marcação da neurotensina é observada no núcleo coclear dorsal, enquanto células imunopositivas (setas) são vistas no núcleo coclear ventral (B, C). Barras = 100 μ m (A, B) e 30 μ m (C).

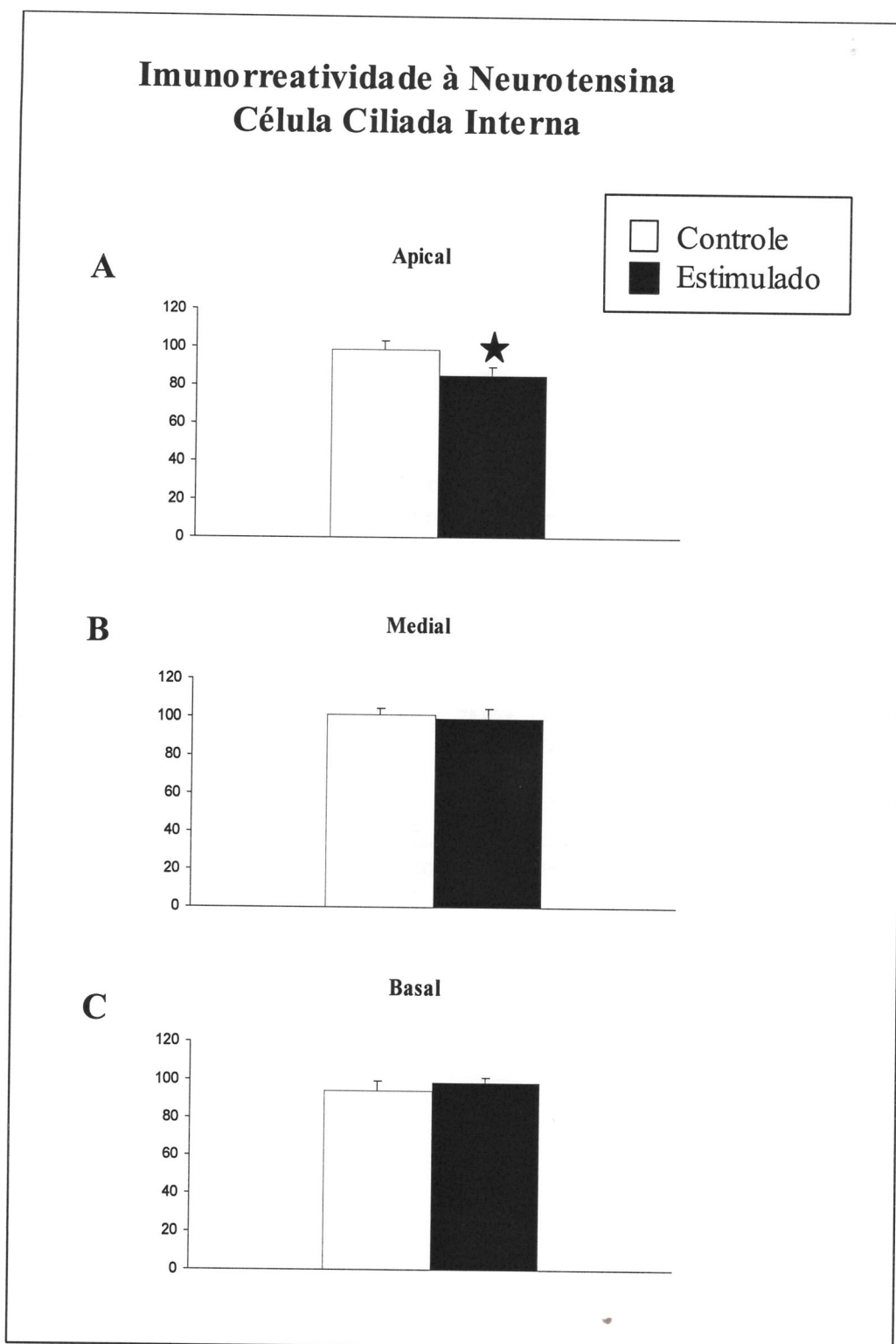


Figura 15: Efeito do estímulo sonoro definido no valor médio \pm e.p.m. dos tons de cinza específicos (spMGV) dos perfis celulares imunorreativos à neurotensina nas células ciliadas internas dos giros apical (A), medial (B) e basal (C) da cóclea. ★ $p < 0,05$, segundo teste t de Student.

Tabela 2: Porcentagem de células fortes, moderadas e fracas do gânglio espiral imunorreativas à neurotensina depois de estímulo auditivo definido.

		FORTE		MODERADO		FRACO	
		Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado
T1	Apical	9,3 ± 3,6	5,8 ± 2,6	45,3 ± 6,4	31,6 ± 4,6	45,3 ± 9,3	62,5 ± 4,8
	Medial	7,5 ± 2,7	11,4 ± 4,0	50,3 ± 4,8	51,7 ± 1,9	43,1 ± 6,4	36,8 ± 4,5
	Basal	6,4 ± 2,7	8,2 ± 2,2	43,9 ± 4,7	50,6 ± 3,3	49,7 ± 4,6	41,1 ± 4,0
T2	Apical	37,5 ± 23,9	16,7 ± 16,7	54,2 ± 20,8	52,8 ± 18,5	8,25 ± 8,2	30,5 ± 16,3
	Medial	17,8 ± 14,1	8,06 ± 4,4	73,8 ± 13,4	85,7 ± 5,0	8,33 ± 5,4	6,19 ± 4,1
	Basal	20,9 ± 11,9	6,0 ± 4,2	71,2 ± 11,6	81,8 ± 5,9	7,78 ± 5,7	12,2 ± 5,8
T1+T2	Apical	9,6 ± 3,5	6,2 ± 3,0	46,3 ± 6,9	31,8 ± 4,8	44,2 ± 9,3	61,9 ± 4,8
	Medial	7,7 ± 3,0	11,2 ± 4,0	52,2 ± 4,3	53,8 ± 1,9	40,8 ± 6,0	35,0 ± 4,3
	Basal	7,3 ± 2,5	7,9 ± 1,9	45,8 ± 4,7	52,6 ± 3,1	46,8 ± 4,5	39,5 ± 3,9

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. n=10 para grupo estimulado e n=9 para grupo controle.

Análise Semiquantitativa Microdensitométrica da Imunorreatividade do NPY nas Células Ciliadas Internas

A estimulação auditiva não promoveu alteração no valor médio dos tons de cinza específicos da imunorreatividade do NPY nas células ciliadas do órgão de Corti em nenhum dos giros da cóclea dos animais do grupo estimulado.

Análise Quantitativa Estereológica da Imunorreatividade do NPY no Gânglio Espiral

O resultado da análise estereológica está mostrado nas figuras 18 e 19 e na tabela 3. Aumento significativo na intensidade da imunorreatividade do NPY, de 119% ($p < 0,05$), foi observado especificamente nos neurônios tipo II com forte marcação no gânglio espiral do giro apical da cóclea dos animais que receberam a estimulação auditiva.

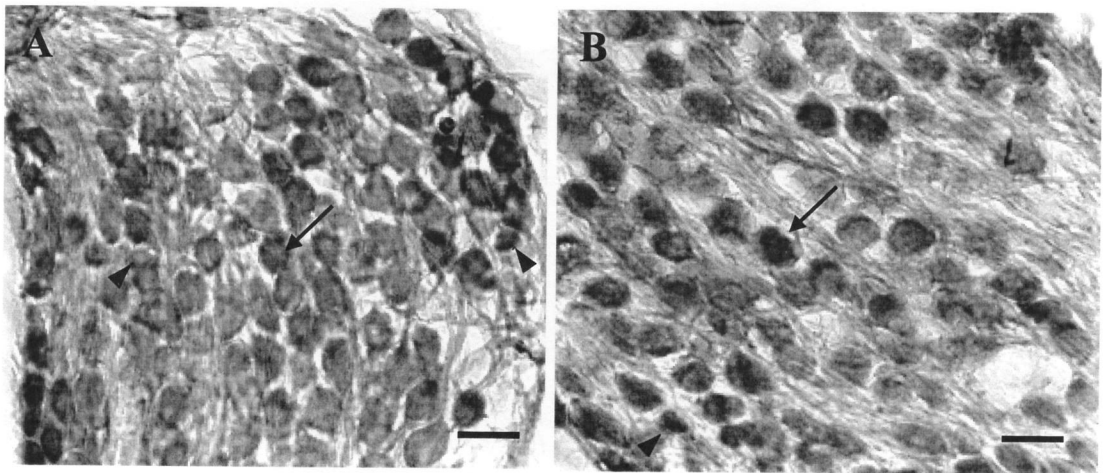


Figura 16: Fotografias mostrando a imunorreatividade do NPY (A-D) no gânglio espiral do giro apical da cóclea dos ratos controle (A) e estimulados acusticamente (B). A imunorreatividade do NPY é observada no citoplasma dos neurônios tipo I (setas) e tipo II (cabeças de setas) e nos prolongamentos dos neurônios espirais. Em A são apontados neurônios com marcação moderada e em B com forte marcação. Barras = 20 μ m.

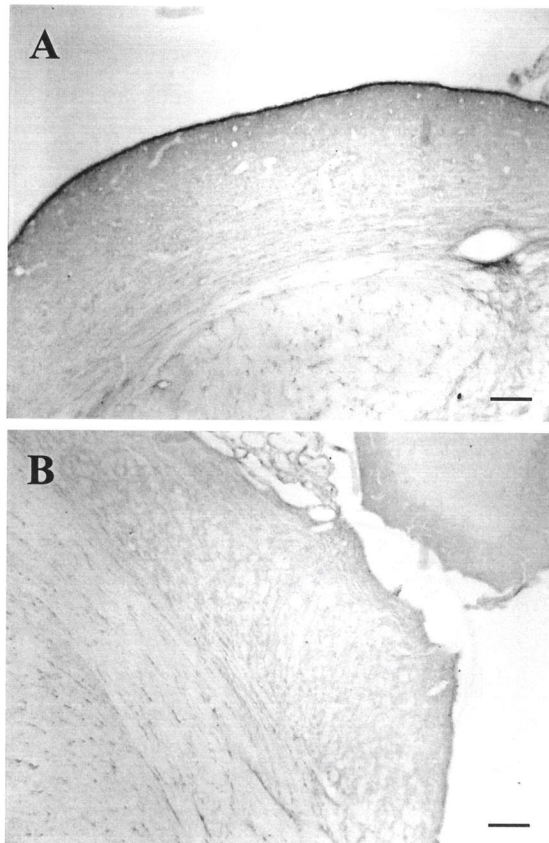


Figura 17: Fotografias da imunorreatividade do NPY (A-B) no núcleo coclear dorsal (A) e ventral de ratos controle (B), ilustrando ausência de marcação. Barras = 100 μ m.

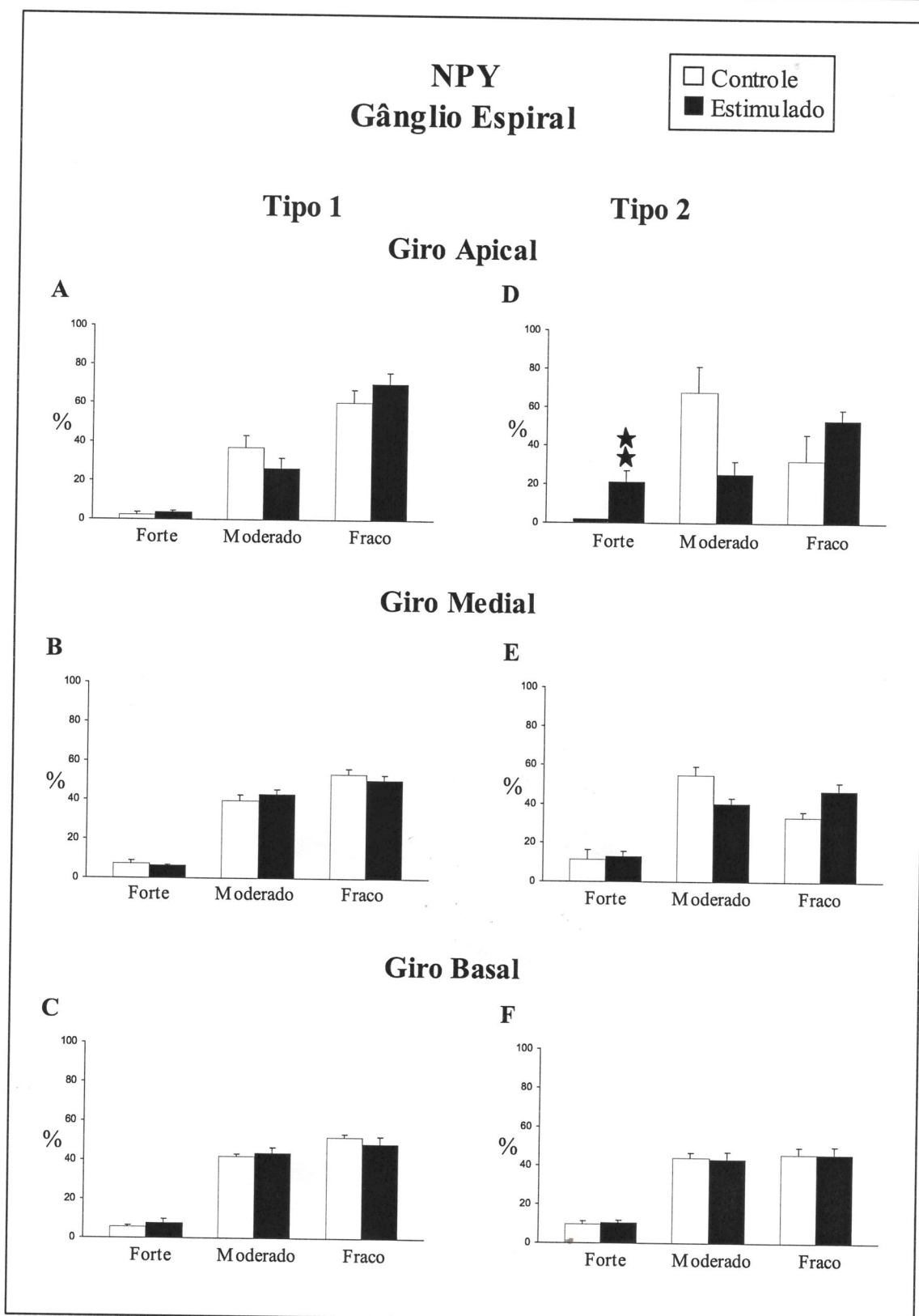


Figura 18: Efeito do estímulo auditivo definido na intensidade da imunorreatividade ao NPY nos perfis celulares dos neurônios tipo I (A, B, C) e tipo II (D, E, F) dos giros apical (A, D), medial (B, E) e basal (C, F) da cóclea. ★★ $p < 0,01$, segundo teste t de Student.

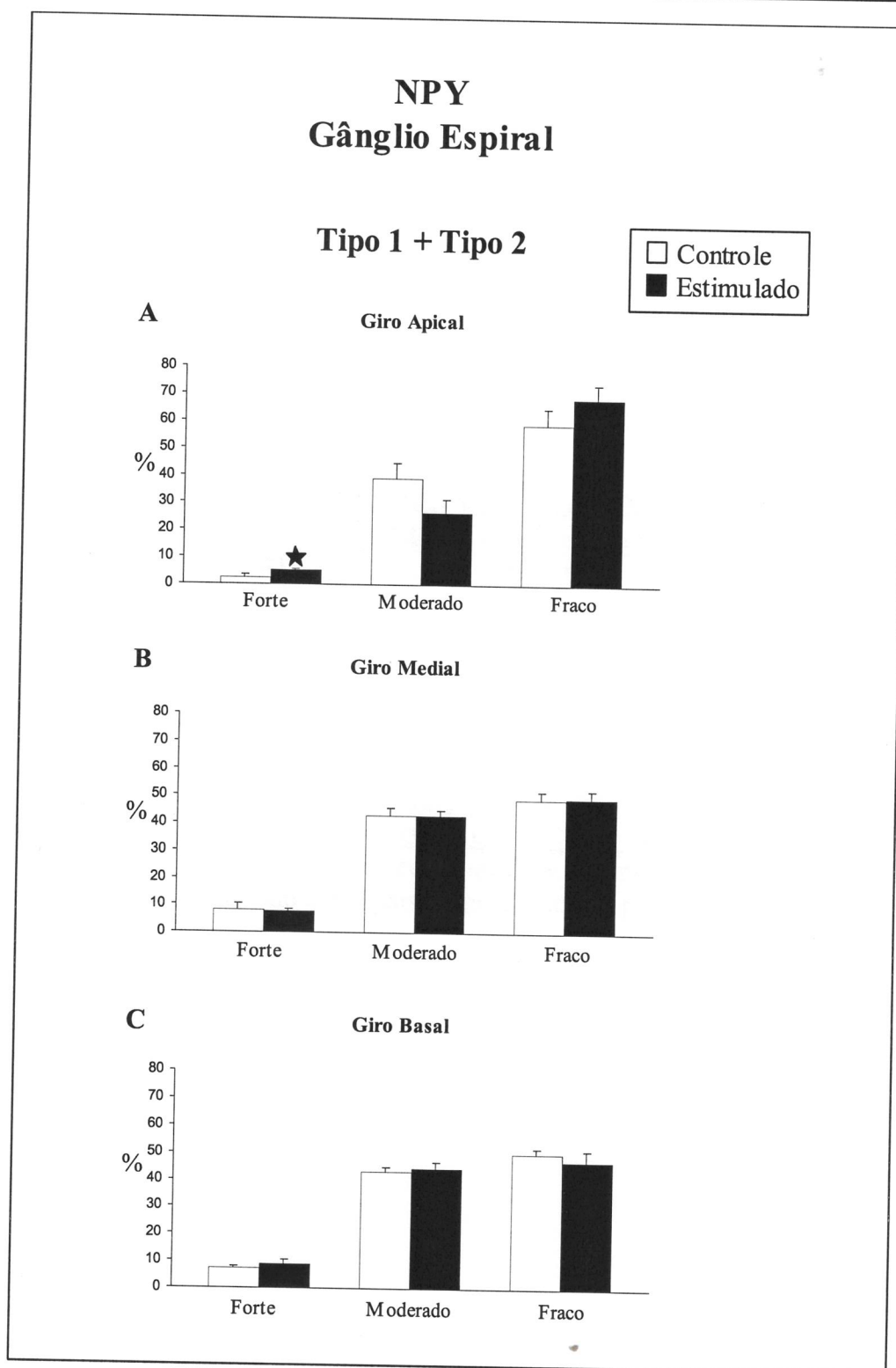


Figura 19: Efeito do estímulo auditivo definido na intensidade da imunorreatividade ao NPY nos perfis celulares dos giros apical (A), medial (B) e basal (C) da cóclea. ★ $p < 0,05$, segundo teste t de Student.

Tabela 3: Porcentagem de células fortes, moderadas e fracas do gânglio espiral imunorreativas ao NPY depois de estímulo auditivo definido.

	FORTE		MODERADO		FRACO		
	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle	Estimulado	
T1	Apical	2,3 ± 1,3	3,6 ± 0,9	37,2 ± 6,0	26,4 ± 5,3	60,4 ± 6,5	70,0 ± 5,7
	Medial	7,2 ± 1,6	6,5 ± 0,6	39,5 ± 2,9	43,0 ± 2,5	53,2 ± 2,8	50,5 ± 2,5
	Basal	5,8 ± 0,9	7,8 ± 1,8	42,2 ± 1,1	43,8 ± 2,6	52,0 ± 1,6	48,4 ± 3,8
T2	Apical	0,0 ± 0,0	19,8 ± 6,0*	56,2 ± 15,7	35,7 ± 9,6	43,7 ± 15,7	44,4 ± 9,5
	Medial	14,7 ± 5,5	13,6 ± 3,2	48,6 ± 4,8	43,8 ± 2,6	36,6 ± 4,0	42,5 ± 3,4
	Basal	11,6 ± 1,4	11,9 ± 3,2	47,9 ± 3,9	47,3 ± 3,9	40,5 ± 4,7	40,8 ± 5,2
T1+T2	Apical	2,3 ± 1,3	5,2 ± 0,5**	39,2 ± 5,5	26,5 ± 4,9	58,6 ± 6,0	68,2 ± 5,1
	Medial	8,1 ± 2,2	7,6 ± 0,9	42,8 ± 2,9	42,9 ± 2,1	49,0 ± 2,4	49,5 ± 2,5
	Basal	7,1 ± 1,0	8,6 ± 1,9	43,1 ± 1,5	44,3 ± 2,5	49,8 ± 1,9	47,0 ± 3,9

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. n=10 para grupo estimulado e n=9 para grupo controle. * p<0,05; ** p<0,01.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Existe uma evidência crescente da plasticidade relacionada à atividade na via auditiva (ASAKO *et al.*, 2005). O presente estudo examinou os efeitos da estimulação auditiva na plasticidade neuroquímica do sistema auditivo por meio da imunomarcação de dois neurotransmissores aminoácidos, o glutamato e o GAD, enzima que sintetiza o GABA, e de dois neuropeptídeos, o NPY e a neurotensina, no órgão de Corti, no gânglio espiral e no núcleo coclear. O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório da via auditiva (EYBALIN, 1993), enquanto que o GABA é o principal inibitório (RUBIO, 2004). Ações opostas para os dois neuropeptídeos estudados aqui também são descritas em outros sistemas (BECK *et al.*, 1996; GULLO *et al.*, 1998; KUPFERMANN e SCHWARTZ, 2000), sendo analisados agora na via auditiva.

A realização do experimento da expressão da proteína FOS no núcleo coclear induzida por estímulo sonoro definido, efetivado inicialmente, foi importante na adequação da metodologia para a promoção da estimulação auditiva. Como um indicador bioquímico da atividade neuronal, a proteína FOS é usada para apontar a localização de neurônios ativados no sistema nervoso central em resposta a um estímulo (YANG *et al.*, 2005). Neste trabalho a imunomarcação da proteína FOS permitiu a localização de grupos de neurônios responsivos ao estímulo sonoro em região específica do núcleo coclear. O aumento significativo na sua expressão revelou maior excitabilidade neuronal naquela região diante do estímulo.

Nossos dados para a imunomarcação da proteína FOS são congruentes com os obtidos na literatura, que nos mostram células imunopositivas à proteína em todas as camadas do núcleo coclear dorsal depois de um estímulo auditivo de 8.000 Hz, com uma distribuição mais densa na camada profunda em relação à molecular e a de células fusiformes (YANG *et al.*, 2005). Além disso, dados de trabalhos anteriores apontam para uma localização mais ventral da proteína FOS nos níveis caudais do núcleo coclear dorsal depois da estimulação auditiva nessa mesma frequência de 8 kHz (SATO *et al.*, 1992; SAINT MARIE *et al.*, 1999), como também foi observado no presente estudo. Resultados coincidentes com o estudo de Yang e colaboradores (2005) ainda são encontrados no núcleo coclear ventral, em que são observadas células imunoreativas à proteína Fos de forma mais abundante na camada granular externa, em suas margens lateral e medial,

quando comparadas ao centro do núcleo. A ativação de células granulares nessa camada indica que algumas delas podem ser tonotopicamente organizadas, enquanto outras podem não ser, já que não parecem contribuir com a tonotopia (YANG *et al.*, 2005). Tanto neurônios quanto células granulares mostraram pouca ou nenhuma marcação da proteína Fos sem a estimulação auditiva, reforçando a hipótese de que o estímulo sonoro foi o principal responsável pela ativação de tais células, resultado este igualmente obtido aqui.

A intensidade de 80dB NPS utilizada neste experimento para a apresentação do estímulo acústico, entre outras avaliadas, foi considerada por Saint Marie e colaboradores (1999) ideal para se mapear a tonotopia no tronco encefálico por produzir uma resposta robusta, mas não prejudicial ao sistema. Diante dos mesmos argumentos, Norenã e Eggermont também elegeram 80dB NPS para aplicação de um estímulo auditivo, no que consideraram ambiente enriquecido acusticamente. Turner e colaboradores (2005) relatam que os estudos que se concentram na intensidade sonora freqüentemente concluem que sons menos intensos que 85dB NPS são relativamente seguros para a audição, mas que pouco é conhecido sobre os efeitos dos sons com intensidades mais baixas. A exposição crônica a níveis ≤ 70 dB NPS é aparentemente não prejudicial para a cóclea, mas, ao contrário, parecem melhorar o processamento do sinal auditivo (TURNER *et al.*, 2005). Poon e Chen (1992) postularam que a exposição pós-natal a treinos de tons melhora a habilidade dos animais expostos para processar aqueles mesmos sinais. Zhang e colaboradores (2002) demonstraram que uma única exposição de 45 minutos a 80dB NPS na freqüência de 10kHz não somente aumentou a marcação da proteína FOS (medida da atividade neuronal) em estruturas auditivas do cérebro, mas também aumentou a marcação em estruturas não auditivas como o lócus ceruleus, amígdala e o hipotálamo.

Assim, o estímulo auditivo utilizado neste experimento mostrou ser um método eficiente para ativar grupos específicos de neurônios e, portanto, para se estudar a plasticidade da via auditiva.

A atividade neuronal subsequente a estímulos deflagram respostas de neuroplasticidade (BAO *et al.*, 2003; SALAZAR *et al.*, 2004.). Neste estudo analisamos as alterações químicas na via auditiva aferente, periférica e central, de animais estimulados acusticamente. Todos os neurotransmissores estudados tiveram sua imunorreatividade

modificada na cóclea após a estimulação auditiva, sem que o mesmo ocorresse no núcleo coclear.

Aumento significativo na imunomarcção do glutamato foi encontrado nas células ciliadas internas do giro basal da cóclea e maior número de neurônios imunorreativos ao glutamato também foi observado no núcleo coclear dorsal dos animais que receberam a estimulação auditiva.

Sabe-se que a densidade da inervação aferente nas células ciliadas internas é maior na região basal da cóclea (FRITZCH *et al.*, 2004) e que o glutamato, como principal neurotransmissor excitatório da via auditiva aferente, está presente intensamente nessas células (EYBALIN, 1993; RAPHAEL e ALSCHULER, 2003). Com base nesses dados, pode-se supor que, embora o estímulo sonoro em questão seja caracterizado tonotopicamente na região apical, ainda que pudesse haver uma maior imunorreatividade ao glutamato no ápice da cóclea após o estímulo sonoro apresentado, ela pode não ter sido o bastante para ser detectada em função da menor inervação dessa área, mascarando-se o pico de deslocamento da membrana basilar que corresponde ao lugar da frequência principal. É importante ressaltar ainda que, por ser um órgão extremamente requintado, a cóclea é uma estrutura de difícil estudo para os pesquisadores (Kiernan, 2006), que freqüentemente apresentam problemas técnicos relacionados à preparação das amostras, além de limitações nas metodologias disponíveis como ferramenta de análise. Desse modo, pode-se considerar igualmente a possibilidade do método de análise de imagem utilizado neste estudo não ter sido sensível o suficiente para indicar possíveis alterações de pequena magnitude na quantidade do neurotransmissor que por ventura tenha ocorrido no giro apical da cóclea após a estimulação auditiva.

A presença do glutamato em todas as camadas do núcleo coclear dorsal e na região de células granulares, sendo encontrado em citoplasmas, fibras e terminais, está de acordo com dados da literatura (GODFREY *et al.*, 2000; RUBIO, 2004), porém, neste trabalho, sua observação mais evidente se deu na camada de células fusiformes, principalmente no grupo de animais estimulados, e não na camada molecular como se referem Godfrey e colaboradores (2000).

O aumento da área imunorreativa à proteína FOS e do glutamato em região específica do núcleo coclear dorsal demonstrou que a exposição à estimulação acústica

utilizada no presente estudo foi capaz de causar mudanças no processamento da informação auditiva pelos neurônios do núcleo coclear. Essas mudanças parecem estar relacionadas principalmente à ativação de um maior número de neurônios na transmissão da informação, tornando-a potencializada e possivelmente melhorando o processamento do sinal auditivo. Modificações no controle excitatório da atividade neural, como encontrada na imunomarcagem do glutamato, pode ser um dos vários mecanismos pelos quais a codificação neural é adaptada para alteração das entradas da periferia, sendo uma manifestação de neuroplasticidade.

Nossos resultados para a marcação imunoreativa do GAD no núcleo coclear culminam com estudos anteriores, que descrevem a localização imunohistoquímica do GAD em numerosos terminais, encontrados principalmente nas camadas molecular e de células fusiformes do núcleo coclear dorsal e também no núcleo coclear ventral (SHIRAISHI *et al.*, 1985; MUGNAINI, 1985; 1987; MUSIEK *et al.*, 1990). Nós utilizamos anticorpo anti-GAD para localizar possíveis neurônios GABAérgicos no núcleo coclear, considerando que aquele é a principal enzima conversora deste.

O estudo de Ebert e Ostwald (1995) mostra que uma possível função fisiológica do GABA é melhorar o contraste entre sinal/ruído no núcleo coclear ventral, sugerindo que o papel funcional do GABA é agir como transmissor do *feedback* inibitório descendente do tronco encefálico auditivo, favorecendo a transmissão dos sinais acústicos relevantes em oposição aos menos significativos. A principal fonte da inibição GABAérgica no núcleo coclear ventral se origina de células do complexo olivar superior, vindas dos núcleos lateral e ventral do corpo trapezóide que se projetam para o núcleo coclear ventral e usam o GABA como neurotransmissor (OSTAPOFF *et al.*, 1990, 1997). Muitos axônios eferentes imunopositivos ao GAD no núcleo coclear dorsal ainda derivam de fibras da estria acústica dorsal (SCHWEITZER, 1993). O mecanismo de processamento auditivo que melhora o contraste acústico pode ter uma importância fundamental no comportamento do animal, porém uma vez que o nosso experimento foi realizado em sala tratada acusticamente, ou seja, na ausência de qualquer outro ruído, fez-se desnecessária a melhora do sinal acústico em contraposição a outros sons, o que pode justificar o fato de não encontrarmos diferenças estatísticas significativas na imunorreatividade do GAD no núcleo coclear ventral após a estimulação auditiva.

Já no núcleo coclear dorsal, é descrito um diferente papel funcional para o GABA. Numerosos interneurônios GABAérgicos exercem uma poderosa inibição na porção dorsal do núcleo coclear (WENTHOLD *et al.*, 1977; RUBIO, 2004). Segundo Wynne e colaboradores (1995) a demonstração do GAD nas células granulares levantou a hipótese de que elas podem desempenhar uma ação inibitória nas células fusiformes e nas células radiadas. Além disso, a presença do RNAm da subunidade do receptor $\alpha 1$ GABA_A na região de células granulares sugere que essas células também participam da circuitaria inibitória local dessa região (WYNNE *et al.*, 1995). O equilíbrio entre os neurotransmissores aminoácidos excitatórios e inibitórios contribui para o processamento auditivo normal pelo núcleo coclear dorsal (RUBIO, 2004) e para o bom funcionamento de todo o tronco encefálico auditivo (BURAS *et al.*, 2006).

Neurônios fusiformes são neurônios de projeção que inervam o núcleo central do colículo inferior (OLIVER, 1984) e é possível que eles exerçam uma ação excitatória e não inibitória em seus alvos, sendo por isso imunopositivos ao glutamato (OTTERSEN e STORM-MATHISEMN, 1984) e não ao GABA, como encontrado neste estudo e em trabalhos anteriores, em que a marcação do GABA é encontrada somente em terminais da camada de células fusiformes (SHIRAISHI *et al.*, 1985; MUGNAINI, 1985; MOORE e MOORE, 1987; MUSIEK *et al.*, 1990). Diante de um estímulo sonoro não prejudicial ao sistema auditivo, a inibição GABAérgica pode não ser essencial ou pode ser realizada por um diferente neurotransmissor, como a glicina, outro transmissor inibitório com uma concentração relativamente alta e bem acima dos níveis do GABA, em todas as subdivisões do núcleo coclear (ROSS *et al.*, 1995; GODFREY *et al.*, 2000), sendo considerada, por muitos autores, o principal neurotransmissor inibitório nesse núcleo (ALTSCHULER *et al.*, 1986; CASPARY *et al.*, 1987, 1994; BLEDSOE *et al.*, 1990; HELFERT *et al.*, 1992; GOLDING e OERTEL, 1996; ZHENG *et al.*, 2000).

Segundo Rubio (2004), aproximadamente 86% de todos os terminais sinápticos inibitórios que contêm GABA também contêm glicina. Caspary e colaboradores (1987) sugeriram que a glicina, moldando sua função para altas intensidades, reduz a resposta para sons intensos. Além disso, como já foi demonstrado por vários estudos, as alterações na neurotransmissão dada pelo GABA ocorre em vários tipos de distúrbios auditivos, como por exemplo, na presbiacusia e no zumbido (CASPARY *et al.*, 1990; MILBRANDT *et al.*,

1996; 1997; RAZA *et al.*, 1994; PALOMBI e CASPARY, 1996; BAUER *et al.*, 2000). O estudo de Milbrandt e colaboradores (2000) mostra mudanças significativas nos níveis do GAD no colículo inferior em animais expostos a sons intensos (12kHz, 106dB por 10h), que acarretam um trauma acústico, o que sugere alterações na neurotransmissão realizada pelo GABA. Outros estudos também documentam a influência da diminuição do GABA em neurônios do colículo inferior após exposição intensa a ruído (SALVI *et al.*, 1990; POPELAR *et al.*, 1994; ABBOT *et al.*, 1999; SZCZEPANIAK e MOLLER, 1995, 1996; POYATOS *et al.*, 2004). Assim, os neurotransmissores GABA e glicina são críticos para a codificação com alta fidelidade da informação acústica no tronco encefálico auditivo (BAUER *et al.*, 2000; BURAS *et al.*, 2006) e, freqüentemente, mostram-se aí alterados diante de uma perturbação no sistema auditivo (ASAKO *et al.*, 2005), o que não é o caso aqui. Neste trabalho, a variação nos níveis de GABA pode não ter sido necessária pela preservação dos receptores e da via auditiva, dada por estímulo sonoro de intensidade não lesiva.

Ainda que os neuropeptídeos analisados estejam pouco presentes ou até ausentes no núcleo coclear, como constatado pela imunohistoquímica, ambos apresentaram modificações em sua imunorreatividade no giro apical da cóclea após o estímulo auditivo, seja no órgão de Corti ou no gânglio espiral. Embora os resultados do glutamato tenham sido relevantes principalmente no giro basal, por motivos já discutidos, modificações mais significativas na imunomarcção eram de fato esperadas no giro apical da cóclea, uma vez que o estímulo auditivo foi apresentado na freqüência de 8 kHz e o trabalho de Muller (1991a) já ter caracterizado uma posição mais apical na cóclea de ratos para a freqüência de 7.70 kHz. Assim, os neuropeptídeos apresentaram uma resposta tonotopicamente plástica ao estímulo sonoro definido.

A quantificação da imunorreatividade do NPY demonstrou maior número de neurônios espirais tipo II com forte marcação exclusivamente no giro apical da cóclea dos animais estimulados. Na literatura, poucos trabalhos referem-se à presença do NPY na cóclea do rato, tendo sido sua imunomarcção detectada nas fibras do modíolo e na raiz do nervo coclear (YLIKOSKI *et al.*, 1989), porém Anniko e colaboradores (1995) encontraram a expressão do NPY em uma pequena subpopulação de células do gânglio espiral de humanos, inferindo que pudessem se tratar de neurônios do tipo II. Ainda que a função dos

neurônios tipo II não esteja totalmente esclarecida nos dias atuais (REID *et al.*, 2004), é aceito que eles proporcionam o feedback eletromecânico da célula ciliada externa (KIM, 1984; RAPHAEL e ALTSCHULER, 2003) e possuem um papel significativo no processamento do som, uma vez que inervam um grande número de células ciliadas externas que são essenciais para a manutenção de respostas normais ao estímulo (REID *et al.*, 2004).

Já foi descrita a participação do NPY no processamento periférico de vias aferentes (MERIGHI *et al.*, 1990; GUEDES *et al.*, 2004). Acredita-se que ele apresenta uma importante função na modulação da informação nociceptiva (HIRUMA *et al.*, 2002), produzindo efeitos antinociceptivos pela inibição da liberação de neurotransmissores de terminais centrais de neurônios aferentes primários e pela inibição direta de nociceptores aferentes primários (DUGGAN *et al.*, 1991; BROQUA *et al.*, 1996; NAVEILHAN *et al.*, 2001; MANTYH *et al.*, 1994). Na orelha interna, a maior ação postulada para o NPY é regulação da pressão sanguínea local. Uma vez que observamos a presença do NPY na cóclea e no gânglio espiral, além do aumento de sua imunorreatividade nos neurônios tipo II, este trabalho levanta a possibilidade de que o NPY também está envolvido no processamento periférico da orelha interna, participando da transmissão da informação motora das células ciliadas externas pelos neurônios tipo II.

O NPY produz pequenas respostas vasoconstritoras em artérias coronárias isoladas de coelho (HAN e ABEL, 1987) e em artérias cerebrais isoladas de ratos (XIA *et al.*, 1992). Roberts e colaboradores (1999) demonstraram que o NPY produz uma pequena contração em artérias auriculares isoladas e que essa contração pode ser aumentada com manipulações farmacológicas. Além disso, já foi postulado o efeito vasoconstritor no NPY na orelha interna (LYON e PAYMAN, 2000). Do mesmo modo, o NPY também pode estar contribuindo para a contração das células ciliadas externas que fazem contato com neurônios tipo II e cujo movimento de contração é imprescindível para a transdução do som. O aumento da imunorreatividade do NPY diante da estimulação auditiva reforça essa hipótese.

Os achados de Hokfelt e colaboradores (1998) sugerem que os mecanismos neuropeptidérgicos do NPY participam de mudanças adaptativas de neurônios sensoriais em resposta a lesões. Itou e colaboradores (2001) demonstram que existe uma redução

contínua da corrente sangüínea coclear induzida pelo NPY na perda auditiva neurossensorial provocada pelo estresse, como na surdez súbita. Por outro lado, podemos considerar que o NPY também pode participar de mudanças adaptativas diante um estímulo auditivo benéfico, como foi observado no presente estudo.

Existem diferenças entre os mecanismos das regiões apical e basal da cóclea (ASHMORE e MAMMANO, 2001; ADAMSON *et al.*, 2002a, b), sendo que as distinções nos padrões de respostas entre os neurônios tipo I e tipo II são mais pronunciadas no giro basal (REID *et al.*, 2004). Existem poucas vesículas pré-sinápticas nas sinapses entre as células ciliadas externas e os neurônios tipo II no giro basal, enquanto múltiplas vesículas, como observadas nas células cilidas internas, são encontradas apenas nas sinapses do giro apical (RAPHAEL e ALSCHULER, 2003). É possível também que esse seja um dos motivos pelos quais a diferença na quantificação da imunorreatividade do NPY nos neurônios tipo II encontrada neste trabalho tenha diferido apenas no giro apical da cóclea dos animais estimulados.

Foi mencionado que o NPY exerce uma ação modulatória no transporte axonal de neurônios sensoriais sob condições patológicas e fisiológicas (HIRUMA *et al.*, 2002) e que pode inibir a liberação de neurotransmissores de fibras aferentes primárias (FRISTAD *et al.*, 1996). É possível que o NPY possa modular a função de neurotransmissores cocleares clássicos, como o glutamato, além de interagir com outros neuropeptídeos (RAPHAEL e ALTSCHULER, 2003). Talvez esse também possa ser um motivo pelo qual somente os neuropeptídeos e não o glutamato tenham se modificado no giro apical da cóclea diante da estimulação auditiva apresentada.

Vários neuropeptídeos como o CGRP, a substância P, a somatostatina e a neurotensina, também observada nesse estudo, já foram descritos na cóclea (TACHIBANA *et al.*, 1979; KONG *et al.*, 2002; FELIX *et al.*, 2002; GOMIDE *et al.*, 2005). A modificação simultânea da expressão do NPY e da neurotensina tonotopicamente no giro apical da cóclea diante da estimulação auditiva indica que deve existir uma interação entre as funções peptidérgicas relacionadas à neurotransmissão e/ou à neuroplasticidade na via auditiva periférica.

Neste trabalho não encontramos imunorreatividade do NPY no núcleo coclear, resultado coincidente com dados da literatura que apontam ausência de marcação ou

somente poucas fibras imunopositivas ao NPY no núcleo coclear dorsal ou ventral (YAMAZOE *et al.*, 1985), o que sugere que a participação do NPY nos mecanismos de processamento auditivo se dá principalmente na via auditiva periférica, com ações já discutidas.

A expressão da neurotensina também foi influenciada pela estimulação auditiva nas células ciliadas do giro apical coclear, havendo diminuição de sua imunorreatividade nas células dessa região frente ao estímulo sonoro apresentado. Dessa forma, é bem possível que a neurotensina também esteja envolvida nos mecanismos neuronais de processamento auditivo e na modulação sináptica da transmissão aferente na cóclea de ratos.

Já foi apresentada a implicação da neurotensina em vários tipos de modulação sensorial (JENNES *et al.*, 1982; ROBLEDO e KANEDO, 1995; SAMSAM *et al.*, 2002). Efeito antinociceptivo (ZHANG *et al.*, 1995), como também apresentado para o NPY, e neuroléptico endógeno (NEMEROFF, 1992; FEIFEL *et al.*, 1997) já foram descritos para a neurotensina. É possível perceber a interação existente entre a neurotensina e o NPY em vários sistemas. Resultados eletrofisiológicos mostram que a neurotensina e o NPY tem efeitos inibitórios em subpopulações separadas de pequenos neurônios do gânglio da raiz dorsal, sendo que a população de neurônios que contém neurotensina é complementar a que contém NPY, respondendo somente a um ou a outro neuropeptídeo (ZHANG *et al.*, 1995). Por outro lado uma diminuição nos níveis de neurotensina e um aumento nos níveis do NPY podem ser observados após uma axotomia periférica (transecção do nervo ciático) (WAKISAKA *et al.*, 1991; ZHANG *et al.*, 1995). Além disso, enquanto a neurotensina desempenha um papel inibitório da ingestão (BECK *et al.*, 1996; GULLO *et al.*, 1998), o NPY ao contrário é o maior estimulante dessa função (KUPFERMANN e SCHWARTZ, 2000), o que ressalta ações opostas para ambos os neuropeptídeos. Efeitos opostos da neurotensina e do NPY também pode ser observado nos trabalhos de Robledo e colaboradores (1995) e de Ehlers e colaboradores (1997), respectivamente. Ambos os estudos foram realizados com medidas eletrofisiológicas depois da administração intracerebroventricular dos neuropeptídeos; o primeiro encontrou um aumento, relacionado à dose, na amplitude e na área do componente N1 do potencial evocado auditivo (ERPs), enquanto o segundo encontrou uma diminuição nesse componente depois de um clique de som. Desse modo, é provável que também na via auditiva periférica a neurotensina esteja

modulando a sinalização da transmissão da informação auditiva de maneira inversa ao NPY no giro apical da cóclea, pois enquanto o NPY aumenta, ela diminui seu efeito diante do estímulo sonoro.

Assim como acontece em relação ao NPY, são escassos os trabalhos relacionados à neurotensina no núcleo coclear. A única referência encontrada na literatura descreve sua imunorreatividade apenas esparsamente em fibras e terminais do núcleo coclear dorsal (UHL *et al.*, 1979). Diferente do que foi descrito, a imunomarcagem da neurotensina foi demonstrada aqui apenas no núcleo coclear ventral, não sofrendo alteração em função da estimulação auditiva.

A exposição ao estímulo sonoro definido causou mudanças na função auditiva, o que pode estar induzindo também alterações no processamento neuronal de estruturas auditivas, tanto periféricas, como é o caso dos neurônios do gânglio espiral, quanto nas estruturas centrais, observadas neste estudo no núcleo coclear.

A presença da imunorreatividade apenas para os aminoácidos glutamato e GAD e não para os neuropeptídeos NPY e neurotensina no núcleo coclear dorsal pode-nos levar a inferir que a interação entre os neuropeptídeos na via auditiva aferente pode não estar relacionada exclusivamente ao processamento neuronal da audição, mas a outras funções como a neuromodulação e a neuroproteção.

Embora nós não conheçamos as mudanças específicas na percepção da informação auditiva resultante das alterações no processamento da informação auditiva nos níveis da cóclea e núcleo coclear, o presente trabalho indica que a plasticidade observada aqui pode ter também algum papel nas desordens do sistema auditivo.

Assim, os resultados obtidos neste estudo nos ajudam a compreender melhor como a informação acústica é progressivamente transformada ao longo da via auditiva, tendo implicações tanto para as respostas plásticas que ocorrem no processamento auditivo normal quanto no patológico.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. O estímulo sonoro definido utilizado neste estudo mostrou-se uma ferramenta adequada para se estudar a plasticidade da via auditiva.
2. A estimulação auditiva provocou alterações locais na neuroquímica da via auditiva, sendo elas:
 - aumento da área imunorreativa à proteína FOS no núcleo coclear dorsal;
 - aumento da área imunorreativa ao glutamato o núcleo coclear dorsal;
 - aumento da imunorreatividade ao glutamato nas células ciliadas internas do órgão de Corti no giro basal da cóclea;
 - diminuição da imunorreatividade da neurotensina nas células ciliadas internas do giro apical da cóclea.
 - aumento da imunorreatividade do NPY nos neurônios tipo II, com forte marcação, no gânglio espiral do giro apical da cóclea;
3. A via auditiva periférica e núcleos do tronco encefálico relacionados à audição respondem de forma plástica a estímulos sonoros.
4. A estimulação auditiva específica, não prejudicial, pode ser uma estratégia para maximizar o potencial trófico e plástico das vias neurais relacionadas, podendo prevenir ou minimizar distúrbios auditivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, S. D., L. F. Hughes, C. A. Bauer, R. Salvi e D. M. Caspary. Detection of glutamate decarboxylase isoforms in rat inferior colliculus following acoustic exposure. Neuroscience, v.93, n.4, p.1375-81. 1999.
- Adams, J. C. Sound stimulation induces Fos-related antigens in cells with common morphological properties throughout the auditory brainstem. J Comp Neurol, v.361, n.4, Oct 30, p.645-68. 1995.
- Adamson, C. L., M. A. Reid e R. L. Davis. Opposite actions of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on firing features and ion channel composition of murine spiral ganglion neurons. J Neurosci, v.22, n.4, Feb 15, p.1385-96. 2002.
- Adamson, C. L., M. A. Reid, Z. L. Mo, J. Bowne-English e R. L. Davis. Firing features and potassium channel content of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location. J Comp Neurol, v.447, n.4, Jun 10, p.331-50. 2002.
- Albernaz, P.L.M. Vias Auditivas Centrais. In: Tratado de Otorrinolaringologia – SBROL, v.2 p.401-405. 2003.
- Albers, H. E. e C. F. Ferris. Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. Neurosci Lett, v.50, n.1-3, Sep 7, p.163-8. 1984.
- Altschuler, R. A., H. Betz, M. H. Parakkal, K. A. Reeks e R. J. Wenthold. Identification of glycinergic synapses in the cochlear nucleus through immunocytochemical localization of the postsynaptic receptor. Brain Res, v.369, n.1-2, Mar 26, p.316-20. 1986.
- Altschuler, R. A., D. W. Hoffman e R. J. Wenthold. Neurotransmitters of the cochlea and cochlear nucleus: immunocytochemical evidence. Am J Otolaryngol, v.7, n.2, Mar-Apr, p.100-6. 1986.
- Altschuler, R. A., C. E. Sheridan, J. W. Horn e R. J. Wenthold. Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea, Hear Res, v.42. p. 167-73. 1989.
- Anniko, M., W. Arnold, T. Stigbrand e A. Strom. The human spiral ganglion. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, v.57, n.2, Mar-Apr, p.68-77. 1995.
- Asako, M., A. G. Holt, R. D. Griffith, E. D. Buras e R. A. Altschuler. Deafness-related decreases in glycine-immunoreactive labeling in the rat cochlear nucleus. J Neurosci Res, v.81, n.1, Jul 1, p.102-9. 2005.

- Ashmore, J. Biophysics of the cochlea - biomechanics and ion channelopathies. Br Med Bull, v.63, p.59-72. 2002.
- Ashmore, J. F., G. S. Geleoc e L. Harbott. Molecular mechanisms of sound amplification in the mammalian cochlea. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.22, Oct 24, p.11759-64. 2000.
- Ashmore, J. F. e F. Mammano. Can you still see the cochlea for the molecules? Curr Opin Neurobiol, v.11, n.4, Aug, p.449-54. 2001.
- Atoji, Y., H. Watanabe, Y. Yamamoto e Y. Suzuki. Distribution of neurotensin-containing neurons in the central nervous system of the dog. J Comp Neurol, v.353, n.1, Feb 27, p.67-88. 1995.
- Bao, S., E. F. Chang, J. D. Davis, K. T. Gobeske e M. M. Merzenich. Progressive degradation and subsequent refinement of acoustic representations in the adult auditory cortex. J Neurosci, v.23, n.34, Nov 26, p.10765-75. 2003.
- Bauer, C. A., T. J. Brozoski, T. M. Holder e D. M. Caspary. Effects of chronic salicylate on GABAergic activity in rat inferior colliculus. Hear Res, v.147, n.1-2, Sep, p.175-82. 2000.
- Bayona, N. A., J. Bitensky e R. Teasell. Plasticity and reorganization of the uninjured brain. Top Stroke Rehabil, v.12, n.3, Summer, p.1-10. 2005.
- Beck, B., A. Burette, J. P. Nicolas e C. Burette. Opposite influence of carbohydrates and fat on hypothalamic neurotensin in Long-Evans rats. Life Sci, v.59, n.4, p.349-56. 1996.
- Berglund, A. M. e M. C. Brown. Central trajectories of type II spiral ganglion cells from various cochlear regions in mice. Hear Res, v.75, n.1-2, May, p.121-30. 1994.
- Bledsoe, S. C., Jr., C. R. Snead, R. H. Helfert, V. Prasad, R. J. Wenthold e R. A. Altschuler. Immunocytochemical and lesion studies support the hypothesis that the projection from the medial nucleus of the trapezoid body to the lateral superior olive is glycinergic. Brain Res, v.517, n.1-2, May 28, p.189-94. 1990.
- Broqua, P., J. G. Wettstein, M. N. Rocher, B. Gauthier-Martin, P. J. Riviere, J. L. Junien e S. G. Dahl. Antinociceptive effects of neuropeptide Y and related peptides in mice. Brain Res, v.724, n.1, Jun 10, p.25-32. 1996.
- Brown, M.C. Audition. In: Zigmond, M.J. Fundamental Neuroscience. San Diego: Academic Press, p.791-820. 1999.
- Buonomano, D. V. e M. M. Merzenich. Cortical plasticity: from synapses to maps. Annu Rev Neurosci, v.21, p.149-86. 1998.

- Buras, E. D., A. G. Holt, R. D. Griffith, M. Asako e R. A. Altschuler. Changes in glycine immunoreactivity in the rat superior olivary complex following deafness. J Comp Neurol, v.494, n.1, Jan 1, p.179-89. 2006.
- Canlon, B., E. Borg e A. Flock. Protection against noise trauma by pre-exposure to a low level acoustic stimulus. Hear Res, v.34, n.2, Jul 15, p.197-200. 1988.
- Carretta, D., A. Herve-Minvielle, V. M. Bajo, A. E. Villa e E. M. Rouiller. Preferential induction of fos-like immunoreactivity in granule cells of the cochlear nucleus by acoustic stimulation in behaving rats. Neurosci Lett, v.259, n.2, Jan 8, p.123-6. 1999.
- Caspary, D. M., P. M. Backoff, P. G. Finlayson e P. S. Palombi. Inhibitory inputs modulate discharge rate within frequency receptive fields of anteroventral cochlear nucleus neurons. J Neurophysiol, v.72, n.5, Nov, p.2124-33. 1994.
- Caspary, D. M., A. Raza, B. A. Lawhorn Armour, J. Pippin e S. P. Arneric. Immunocytochemical and neurochemical evidence for age-related loss of GABA in the inferior colliculus: implications for neural presbycusis. J Neurosci, v.10, n.7, Jul, p.2363-72. 1990.
- Catzeflis, C., D. D. Pierroz, F. Rohner-Jeanrenaud, J. E. Rivier, P. C. Sizonenko e M. L. Aubert. Neuropeptide Y administered chronically into the lateral ventricle profoundly inhibits both the gonadotropic and the somatotropic axis in intact adult female rats. Endocrinology, v.132, n.1, Jan, p.224-34. 1993.
- Cerutti, S. M. e G. Chadi. S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. Cell Biol Int, v.24, n.1, p.35-49. 2000.
- Chadi, G., Y. Cao, R. F. Pettersson e K. Fuxe. Temporal and spatial increase of astroglial basic fibroblast growth factor synthesis after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons. Neuroscience, v.61, n.4, Aug, p.891-910. 1994.
- Chadi, G., A. Moller, L. Rosen, A. M. Janson, L. A. Agnati, M. Goldstein, S. O. Ogren, R. F. Pettersson e K. Fuxe. Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. Exp Brain Res, v.97, n.1, p.145-58. 1993.
- Chadi, G., L. Rosen, A. Cintra, B. Tinner, M. Zoli, R. F. Pettersson e K. Fuxe. Corticosterone increases FGF-2 (bFGF) immunoreactivity in the substantia nigra of the rat. Neuroreport, v.4, n.6, Jun, p.783-6. 1993.
- Chadi, G., B. Tinner, L. F. Agnati e K. Fuxe. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) immunoreactivity exists in the noradrenaline, adrenaline and 5-HT nerve cells of the rat brain. Neurosci Lett, v.160, n.2, Oct 1, p.171-6. 1993.

- Chang, E. F. e M. M. Merzenich. Environmental noise retards auditory cortical development. Science, v.300, n.5618, Apr 18, p.498-502. 2003.
- Chen, R., L. G. Cohen e M. Hallett. Nervous system reorganization following injury. Neuroscience, v.111, n.4, p.761-73. 2002.
- Cotman, C. W. e D. T. Monaghan. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their properties. Adv Exp Med Biol, v.203, p.237-52. 1986.
- Doucet, J. R. e D. K. Ryugo. Projections from the ventral cochlear nucleus to the dorsal cochlear nucleus in rats. J Comp Neurol, v.385, n.2, Aug 25, p.245-64. 1997.
- Duggan, A. W., P. J. Hope e C. W. Lang. Microinjection of neuropeptide Y into the superficial dorsal horn reduces stimulus-evoked release of immunoreactive substance P in the anaesthetized cat. Neuroscience, v.44, n.3, p.733-40. 1991.
- Ebert, U. e J. Ostwald. GABA can improve acoustic contrast in the rat ventral cochlear nucleus. Exp Brain Res, v.104, n.2, p.310-22. 1995.
- Ehlers, C. L., C. Somes, A. Lopez, D. Kirby e J. E. Rivier. Electrophysiological actions of neuropeptide Y and its analogs: new measures for anxiolytic therapy? Neuropsychopharmacology, v.17, n.1, Jul, p.34-43. 1997.
- Ehret, G. e R. Fischer. Neuronal activity and tonotopy in the auditory system visualized by c-fos gene expression. Brain Res, v.567, n.2, Dec 20, p.350-4. 1991.
- Eybalin, M. Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. Physiol Rev, v.73, n.2, Apr, p.309-73. 1993.
- Eybalin, M. e R. A. Altschuler. Immunoelectron microscopic localization of neurotransmitters in the cochlea. J Electron Microscop Tech, v.15, n.3, Jul, p.209-24. 1990.
- Fechner, F. P., J. J. Nadol, B. J. Burgess e M. C. Brown. Innervation of supporting cells in the apical turns of the guinea pig cochlea is from type II afferent fibers. J Comp Neurol, v.429, n.2, Jan 8, p.289-98. 2001.
- Feifel, D., T. L. Reza e S. L. Robeck. Pro-dopamine effects of neurotensin on sensorimotor gating deficits. Peptides, v.18, n.9, p.1457-60. 1997.
- Felix, H. Anatomical differences in the peripheral auditory system of mammals and man. A mini review. Adv Otorhinolaryngol, v.59, p.1-10. 2002.
- Fristad, I., K. J. Heyeraas e I. H. Kvinnsland. Neuropeptide Y expression in the trigeminal ganglion and mandibular division of the trigeminal nerve after inferior alveolar nerve axotomy in young rats. Exp Neurol, v.142, n.2, Dec, p.276-86. 1996.

- Fritsch, B., L. Tessarollo, E. Coppola e L. F. Reichardt. Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance. Prog Brain Res, v.146, p.265-78. 2004.
- Fuchs, P. A. Synaptic transmission at vertebrate hair cells. Curr Opin Neurobiol, v.6, n.4, Aug, p.514-9. 1996.
- Gale, J. E. e J. F. Ashmore. The outer hair cell motor in membrane patches. Pflugers Arch, v.434, n.3, Jul, p.267-71. 1997.
- Geleoc, G. S. e J. R. Holt. Developmental acquisition of sensory transduction in hair cells of the mouse inner ear. Nat Neurosci, v.6, n.10, Oct, p.1019-20. 2003.
- Gerald, C., M. W. Walker, L. Criscione, E. L. Gustafson, C. Batzl-Hartmann, K. E. Smith, P. Vaysse, M. M. Durkin, T. M. Laz, D. L. Linemeyer, A. O. Schaffhauser, S. Whitebread, K. G. Hofbauer, R. I. Taber, T. A. Branchek e R. L. Weinsank. A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. Nature, v.382, n.6587, Jul 11, p.168-71. 1996.
- Gillespie, P. G. e R. G. Walker. Molecular basis of mechanosensory transduction. Nature, v.413, n.6852, Sep 13, p.194-202. 2001.
- Gil Loyzaga, P. E. Innervation of the auditory receptor and cochlear nuclei. An R Acad Nac Med (Madr), v.114, n.4, p.1063-86; discussion 1086-7. 1997.
- Gil-Loyzaga, P. Neuroplasticity in the auditory system. Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord), v.126, n.4, p.203-7. 2005.
- Godfrey, D. A., W. B. Farms, T. G. Godfrey, N. L. Mikesell e J. Liu. Amino acid concentrations in rat cochlear nucleus and superior olive. Hear Res, v.150, n.1-2, Dec, p.189-205. 2000.
- Golding, N. L. e D. Oertel. Context-dependent synaptic action of glycinergic and GABAergic inputs in the dorsal cochlear nucleus. J Neurosci, v.16, n.7, Apr 1, p.2208-19. 1996.
- Gomide, V. C. e G. Chadi. The trophic factors S-100beta and basic fibroblast growth factor are increased in the forebrain reactive astrocytes of adult callosotomized rat. Brain Res, v.835, n.2, Jul 24, p.162-74. 1999.
- Gomide, V. C., A. C. De Francisco e G. Chadi. Localization of neurotensin immunoreactivity in neurons and organ of corti of rat cochlea. Hear Res, v.205, n.1-2, Jul, p.1-6. 2005.
- Guedes, R. P., M. I. Marchi, M. Achaval e W. A. Partata. Complete sciatic nerve transection induces increase of neuropeptide Y-like immunoreactivity in primary

- sensory neurons and spinal cord of frogs. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.139, n.4, Dec, p.461-7. 2004.
- Gullo, L., R. Pezzilli, P. Tomassetti e R. De Giorgio. Plasma cholecystokinin and neurotensin after an ordinary meal in humans. A prolonged time study. Gastroenterol Clin Biol, v.22, n.1, Jan, p.25-8. 1998.
- Gundersen, H. J. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. J Microsc, v.143 (Pt 1), Jul, p.3-45. 1986.
- Gundersen, H. J., T. F. Bendtsen, L. Korbo, N. Marcussen, A. Moller, K. Nielsen, J. R. Nyengaard, B. Pakkenberg, F. B. Sorensen, A. Vesterby e Et Al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. Apmis, v.96, n.5, May, p.379-94. 1988.
- Han, C. e P. W. Abel. Neuropeptide Y potentiates contraction and inhibits relaxation of rabbit coronary arteries. J Cardiovasc Pharmacol, v.9, n.6, Jun, p.675-81. 1987.
- Hansel, D. E., B. A. Eipper e G. V. Ronnett. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. Nature, v.410, n.6831, Apr 19, p.940-4. 2001.
- Heilig, M., S. Mcleod, G. K. Koob e K. T. Britton. Anxiolytic-like effect of neuropeptide Y (NPY), but not other peptides in an operant conflict test. Regul Pept, v.41, n.1, Sep 3, p.61-9. 1992.
- Helfert, R. H., J. M. Juiz, S. C. Bledsoe, Jr., J. M. Bonneau, R. J. Wenthold e R. A. Altschuler. Patterns of glutamate, glycine, and GABA immunolabeling in four synaptic terminal classes in the lateral superior olive of the guinea pig. J Comp Neurol, v.323, n.3, Sep 15, p.305-25. 1992.
- Hiruma, H., A. Saito, T. Kusakabe, T. Takenaka e T. Kawakami. Neuropeptide Y inhibits axonal transport of particles in neurites of cultured adult mouse dorsal root ganglion cells. J Physiol, v.543, n.Pt 1, Aug 15, p.85-97. 2002.
- Hokfelt, T., C. Broberger, X. Zhang, M. Diez, J. Kopp, Z. Xu, M. Landry, L. Bao, M. Schalling, J. Koistinaho, S. J. Dearmond, S. Prusiner, J. Gong e J. H. Walsh. Neuropeptide Y: some viewpoints on a multifaceted peptide in the normal and diseased nervous system. Brain Res Brain Res Rev, v.26, n.2-3, May, p.154-66. 1998.
- Horvath, M., K. S. Kraus e R. B. Illing. Olivocochlear neurons sending axon collaterals into the ventral cochlear nucleus of the rat. J Comp Neurol, v.422, n.1, Jun 19, p.95-105. 2000.
- Hosli, E., S. Stauffer e L. Hosli. Autoradiographic and electrophysiological evidence for the existence of neurotensin receptors on cultured astrocytes. Neuroscience, v.66, n.3, Jun, p.627-33. 1995.

- Hsu, S. M., L. Raine e H. Fanger. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem, v.29, n.4, Apr, p.577-80. 1981.
- Hudspeth, A. Mechanical amplification of stimuli by hair cells. Curr Opin Neurobiol, v.7, n.4, Aug, p.480-6. 1997.
- Hudspeth, A.J. Hearing. In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. Principles of Neural Science. New York: Mc Graw-Hill, p. 590-613. 2000.
- Humpel, C., G. Chadi, A. Lippoldt, D. Ganten, K. Fuxe e L. Olson. Increase of basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) messenger RNA and protein following implantation of a microdialysis probe into rat hippocampus. Exp Brain Res, v.98, n.2, p.229-37. 1994.
- Hyson, R. L. e J. W. Rudy. Ontogenesis of learning: II. Variation in the rat's reflexive and learned responses to acoustic stimulation. Dev Psychobiol, v.17, n.3, May, p.263-83. 1984.
- Illing, R. B., K. S. Kraus e M. A. Meidinger. Reconnecting neuronal networks in the auditory brainstem following unilateral deafening. Hear Res, v.206, n.1-2, Aug, p.185-99. 2005.
- Irvine, D. R., R. Rajan e M. Brown. Injury- and use-related plasticity in adult auditory cortex. Audiol Neurootol, v.6, n.4, Jul-Aug, p.192-5. 2001.
- Itou, M., K. Ogawa, Y. Inoue, M. Sato e J. Kanzaki. Effects of neuropeptide Y on cochlear blood flow in guinea pigs. Acta Otolaryngol, v.121, n.5, Jul, p.573-8. 2001.
- Jacono, A. A., B. Hu, R. D. Kopke, D. Henderson, T. R. Van De Water e H. M. Steinman. Changes in cochlear antioxidant enzyme activity after sound conditioning and noise exposure in the chinchilla. Hear Res, v.117, n.1-2, Mar, p.31-8. 1998.
- Janson, A. M. e A. Moller. Chronic nicotine treatment counteracts nigral cell loss induced by a partial mesodiencephalic hemitranssection: an analysis of the total number and mean volume of neurons and glia in substantia nigra of the male rat. Neuroscience, v.57, n.4, Dec, p.931-41. 1993.
- Jennes, L., W. E. Stumpf e P. W. Kalivas. Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. J Comp Neurol, v.210, n.3, Sep 20, p.211-24. 1982.
- Jolas, T. e G. K. Aghajanian. Neurotensin and the serotonergic system. Prog Neurobiol, v.52, n.6, Aug, p.455-68. 1997.
- Kaas, J. H., T. A. Hackett e M. J. Tramo. Auditory processing in primate cerebral cortex. Curr Opin Neurobiol, v.9, n.2, Apr, p.164-70. 1999.

- Kalivas, P. W. Neurotensin in the ventromedial mesencephalon of the rat: anatomical and functional considerations. J Comp Neurol, v.226, n.4, Jul 10, p.495-507. 1984.
- Kennedy, H. J., A. C. Crawford e R. Fettiplace. Force generation by mammalian hair bundles supports a role in cochlear amplification. Nature, v.433, n.7028, Feb 24, p.880-3. 2005.
- Kiernan, A.E. The paintfill method as a tool for analyzing the three-dimensional structure of the inner ear. Brain Res, v. 1091, n.1, May 26; p.270-6. 2006
- Kikuchi, T., J. C. Adams, Y. Miyabe, E. So e T. Kobayashi. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. Med Electron Microsc, v.33, n.2, p.51-6. 2000.
- Kilgard, M. P., P. K. Pandya, J. Vazquez, A. Gehi, C. E. Schreiner e M. M. Merzenich. Sensory input directs spatial and temporal plasticity in primary auditory cortex. J Neurophysiol, v.86, n.1, Jul, p.326-38. 2001.
- King, A. J. Auditory perception: does practice make perfect? Curr Biol, v.9, n.4, Feb 25, p.R143-6. 1999.
- King, A. J. e D. R. Moore. Plasticity of auditory maps in the brain. Trends Neurosci, v.14, n.1, Jan, p.31-7. 1991.
- Kolb, B. e Whishaw, I. Q. Neurociência do Comportamento. Trad. sob a direção de All Tasks Traduções Técnicas, Localização de Software e Tecnologia de Liguagem. Barueri, SP: Ed. Manole, 601 p. 2002.
- Kong, W. J., A. W. Scholtz, K. Kammen-Jolly, R. Gluckert, B. Hussl, P. B. Von Cauvenberg e A. Schrott-Fischer. Ultrastructural evaluation of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the human cochlea and vestibular endorgans. Eur J Neurosci, v.15, n.3, Feb, p.487-97. 2002.
- Kros, C. Hearing: aid from hair force. Nature, v.433, n.7028, Feb 24, p.810-1. 2005.
- Kungel, M. e E. Friauf. Somatostatin and leu-enkephalin in the rat auditory brainstem during fetal and postnatal development. Anat Embryol (Berl), v.191, n.5, May, p.425-43. 1995.
- Kupfermann, I. e Schwartz, J. Motivação. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M. Fundamentos da Neurociência e do Comportamento. Trad. sob a direção de Engelhardt, MC. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p 489-500. 2000.
- Leake, P. A., R. L. Snyder e G. T. Hradek. Spatial organization of inner hair cell synapses and cochlear spiral ganglion neurons. J Comp Neurol, v.333, n.2, Jul 8, p.257-70. 1993.

- Leake, P. A., R. L. Snyder e M. M. Merzenich. Topographic organization of the cochlear spiral ganglion demonstrated by restricted lesions of the anteroventral cochlear nucleus. J Comp Neurol, v.320, n.4, Jun 22, p.468-78. 1992.
- Leonetti, M., P. Brun, M. Clerget, R. Steinberg, P. Soubrie, B. Renaud e M. F. Suaud-Chagny. Specific involvement of neurotensin type 1 receptor in the neurotensin-mediated in vivo dopamine efflux using knock-out mice. J Neurochem, v.89, n.1, Apr, p.1-6. 2004.
- Luo, L., A. F. Ryan e R. L. Saint Marie. Cochlear ablation alters acoustically induced c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem. J Comp Neurol, v.404, n.2, Feb 8, p.271-83. 1999.
- Lyon, M. J. e R. N. Payman. Comparison of the vascular innervation of the rat cochlea and vestibular system. Hear Res, v.141, n.1-2, Mar, p.189-98. 2000.
- Malmierca, M. S. The structure and physiology of the rat auditory system: an overview. Int Rev Neurobiol, v.56, p.147-211. 2003.
- Mantyh, P. W., C. J. Allen, S. Rogers, E. Demaster, J. R. Ghilardi, T. Mosconi, L. Kruger, P. J. Mannon, I. L. Taylor e S. R. Vigna. Some sensory neurons express neuropeptide Y receptors: potential paracrine inhibition of primary afferent nociceptors following peripheral nerve injury. J Neurosci, v.14, n.6, Jun, p.3958-68. 1994.
- Martin, P. e A. J. Hudspeth. Active hair-bundle movements can amplify a hair cell's response to oscillatory mechanical stimuli. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.25, Dec 7, p.14306-11. 1999.
- Matsubara, A., J. H. Laake, S. Davanger, S. Usami e O. P. Ottersen. Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. J Neurosci, v.16, n.14, Jul 15, p.4457-67. 1996.
- Merighi, A., S. Kar, S. J. Gibson, S. Ghidella, A. Gobetto, S. M. Peirone e J. M. Polak. The immunocytochemical distribution of seven peptides in the spinal cord and dorsal root ganglia of horse and pig. Anat Embryol (Berl), v.181, n.3, p.271-80. 1990.
- Michler, S. A. e R. B. Illing. Acoustic trauma induces reemergence of the growth- and plasticity-associated protein GAP-43 in the rat auditory brainstem. J Comp Neurol, v.451, n.3, Sep 23, p.250-66. 2002.
- Milbrandt, J. C., R. L. Albin, S. M. Turgeon e D. M. Caspary. GABAA receptor binding in the aging rat inferior colliculus. Neuroscience, v.73, n.2, Jul, p.449-58. 1996.
- Milbrandt, J. C., T. M. Holder, M. C. Wilson, R. J. Salvi e D. M. Caspary. GAD levels and muscimol binding in rat inferior colliculus following acoustic trauma. Hear Res, v.147, n.1-2, Sep, p.251-60. 2000.

- Milbrandt, J. C., C. Hunter e D. M. Caspary. Alterations of GABAA receptor subunit mRNA levels in the aging Fischer 344 rat inferior colliculus. J Comp Neurol, v.379, n.3, Mar 17, p.455-65. 1997.
- Moore, J. K. e R. Y. Moore. Glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in brainstem auditory nuclei of the rat. J Comp Neurol, v.260, n.2, Jun 8, p.157-74. 1987.
- Moucha, R., P. K. Pandya, N. D. Engineer, D. L. Rathbun e M. P. Kilgard. Background sounds contribute to spectrotemporal plasticity in primary auditory cortex. Exp Brain Res, v.162, n.4, May, p.417-27. 2005.
- Mugnaini, E. GABA neurons in the superficial layers of the rat dorsal cochlear nucleus: light and electron microscopic immunocytochemistry. J Comp Neurol, v.235, n.1, May 1, p.61-81. 1985.
- Muller, M. Developmental changes of frequency representation in the rat cochlea. Hear Res, v.56, n.1-2, Nov, p.1-7. 1991.
- Muller, M. Frequency representation in the rat cochlea. Hear Res, v.51, n.2, Feb, p.247-54. 1991.
- Musiek, F. E. e D. W. Hoffman. An introduction to the functional neurochemistry of the auditory system. Ear Hear, v.11, n.6, Dec, p.395-402. 1990.
- Nakamura, M., S. K. Rosahl, E. Alkahlout, A. Gharabaghi, G. F. Walter e M. Samii. C-Fos immunoreactivity mapping of the auditory system after electrical stimulation of the cochlear nerve in rats. Hear Res, v.184, n.1-2, Oct, p.75-81. 2003.
- Naveilhan, P., H. Hassani, G. Lucas, K. H. Blakeman, J. X. Hao, X. J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, P. Thoren e P. Ernfors. Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor. Nature, v.409, n.6819, Jan 25, p.513-7. 2001.
- Nemeroff, C. B., B. Levant, B. Myers e G. Bisette. Neurotensin, antipsychotic drugs, and schizophrenia. Basic and clinical studies. Ann N Y Acad Sci, v.668, p.146-56. 1992.
- Nilsen, K. E. e I. J. Russell. Timing of cochlear feedback: spatial and temporal representation of a tone across the basilar membrane. Nat Neurosci, v.2, n.7, Jul, p.642-8. 1999.
- Niu, X. e B. Canlon. Protective mechanisms of sound conditioning. Adv Otorhinolaryngol, v.59, p.96-105. 2002.
- Nobili, R., F. Mammano e J. Ashmore. How well do we understand the cochlea? Trends Neurosci, v.21, n.4, Apr, p.159-67. 1998.

- Norena, A. J. e J. J. Eggermont. Enriched acoustic environment after noise trauma reduces hearing loss and prevents cortical map reorganization. J Neurosci, v.25, n.3, Jan 19, p.699-705. 2005.
- Nouel, D., M. P. Faure, J. A. St Pierre, R. Alonso, R. Quirion e A. Beaudet. Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. J Neurosci, v.17, n.5, Mar 1, p.1795-803. 1997.
- Nouel, D., P. Sarret, J. P. Vincent, J. Mazella e A. Beaudet. Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. Neuroscience, v.94, n.4, p.1189-97. 1999.
- Novaes, B.C.A.C e Ficker, L.B.A. A importância do conhecimento dos espectros dos sons grosseiros utilizados no trabalho com deficientes auditivos e suas aplicações práticas. Atualização em otologia e foniatria, v.5 p.53-58. 1979.
- Oestreicher, E., A. Wolfgang e D. Felix. Neurotransmission of the cochlear inner hair cell synapse--implications for inner ear therapy. Adv Otorhinolaryngol, v.59, p.131-9. 2002.
- Oliver, D. L. e D. K. Morest. The central nucleus of the inferior colliculus in the cat. J Comp Neurol, v.222, n.2, Jan 10, p.237-64. 1984.
- Ostapoff, E. M., C. G. Benson e R. L. Saint Marie. GABA- and glycine-immunoreactive projections from the superior olivary complex to the cochlear nucleus in guinea pig. J Comp Neurol, v.381, n.4, May 19, p.500-12. 1997.
- Ostapoff, E. M., D. K. Morest e S. J. Potashner. Uptake and retrograde transport of [3H]GABA from the cochlear nucleus to the superior olive in the guinea pig. J Chem Neuroanat, v.3, n.4, Jul-Aug, p.285-95. 1990.
- Ottersen, O. P. e J. Storm-Mathisen. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. J Comp Neurol, v.229, n.3, Nov 1, p.374-92. 1984.
- Palombi, P. S. e D. M. Caspary. Responses of young and aged Fischer 344 rat inferior colliculus neurons to binaural tonal stimuli. Hear Res, v.100, n.1-2, Oct, p.59-67. 1996.
- Paxinos, G. e Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, 1986.
- Petralia, R. S., Y. X. Wang, H. M. Zhao e R. J. Wenthold. Ionotropic and metabotropic glutamate receptors show unique postsynaptic, presynaptic, and glial localizations in the dorsal cochlear nucleus. J Comp Neurol, v.372, n.3, Aug 26, p.356-83. 1996.

- Phillips, D. P. Central auditory processing: a view from auditory neuroscience. Am J Otol, v.16, n.3, May, p.338-52. 1995.
- Pollak, G. D., R. M. Burger e A. Klug. Dissecting the circuitry of the auditory system. Trends Neurosci, v.26, n.1, Jan, p.33-9. 2003.
- Poon, P. W. e X. Chen. Postnatal exposure to tones alters the tuning characteristics of inferior collicular neurons in the rat. Brain Res, v.585, n.1-2, Jul 10, p.391-4. 1992.
- Popelar, J., J. P. Erre, J. M. Aran e Y. Cazals. Plastic changes in ipsi-contralateral differences of auditory cortex and inferior colliculus evoked potentials after injury to one ear in the adult guinea pig. Hear Res, v.72, n.1-2, Jan, p.125-34. 1994.
- Pouyatos, B., G. Morel, A. M. Lambert-Xolin, K. Maguin e P. Campo. Consequences of noise- or styrene-induced cochlear damages on glutamate decarboxylase levels in the rat inferior colliculus. Hear Res, v.189, n.1-2, Mar, p.83-91. 2004.
- Puel, J. L. Chemical synaptic transmission in the cochlea. Prog Neurobiol, v.47, n.6, Dec, p.449-76. 1995.
- Puel, J. L., J. Ruel, M. Guitton, J. Wang e R. Pujol. The inner hair cell synaptic complex: physiology, pharmacology and new therapeutic strategies. Audiol Neurootol, v.7, n.1, Jan-Feb, p.49-54. 2002.
- Raphael, Y. e R. A. Altschuler. Structure and innervation of the cochlea. Brain Res Bull, v.60, n.5-6, Jun 15, p.397-422. 2003.
- Rauschecker, J. P. Auditory cortical plasticity: a comparison with other sensory systems. Trends Neurosci, v.22, n.2, Feb, p.74-80. 1999.
- Raza, A., J. C. Milbrandt, S. P. Arneric e D. M. Caspary. Age-related changes in brainstem auditory neurotransmitters: measures of GABA and acetylcholine function. Hear Res, v.77, n.1-2, Jun 15, p.221-30. 1994.
- Reid, M. A., J. Flores-Otero e R. L. Davis. Firing patterns of type II spiral ganglion neurons in vitro. J Neurosci, v.24, n.3, Jan 21, p.733-42. 2004.
- Ricci, A. J., H. J. Kennedy, A. C. Crawford e R. Fettiplace. The transduction channel filter in auditory hair cells. J Neurosci, v.25, n.34, Aug 24, p.7831-9. 2005.
- Roberts, R. E., D. A. Kendall e V. G. Wilson. A study of NPY-mediated contractions of the porcine isolated ear artery. Br J Pharmacol, v.127, n.1, May, p.284-90. 1999.
- Robledo, P., W. M. Kaneko e C. L. Ehlers. Effects of neurotensin on EEG and event-related potentials in the rat. Psychopharmacology (Berl), v.118, n.4, Apr, p.410-8. 1995.

- Ross, C. D., D. A. Godfrey e J. A. Parli. Amino acid concentrations and selected enzyme activities in rat auditory, olfactory, and visual systems. Neurochem Res, v.20, n.12, Dec, p.1483-90. 1995.
- Rouiller, E. M., X. S. Wan, V. Moret e F. Liang. Mapping of c-fos expression elicited by pure tones stimulation in the auditory pathways of the rat, with emphasis on the cochlear nucleus. Neurosci Lett, v.144, n.1-2, Sep 14, p.19-24. 1992.
- Ruben, R. J. e I. Rapin. Plasticity of the developing auditory system. Ann Otol Rhinol Laryngol, v.89, n.4 Pt 1, Jul-Aug, p.303-11. 1980.
- Rubio, M. E. e J. M. Juiz. Chemical anatomy of excitatory endings in the dorsal cochlear nucleus of the rat: differential synaptic distribution of aspartate aminotransferase, glutamate, and vesicular zinc. J Comp Neurol, v.399, n.3, Sep 28, p.341-58. 1998.
- Rubio, M. E. Differential distribution of synaptic endings containing glutamate, glycine, and GABA in the rat dorsal cochlear nucleus. J Comp Neurol, v.477, n.3, Sep 20, p.253-72. 2004.
- Safieddine, S., A. M. Prior e M. Eybalin. Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase, tyrosine hydroxylase, calcitonin gene-related peptide and opioid peptides coexist in lateral efferent neurons of rat and guinea-pig. Eur J Neurosci, v.9, n.2, Feb, p.356-67. 1997.
- Saint Marie, R. L., L. Luo e A. F. Ryan. Effects of stimulus frequency and intensity on c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem. J Comp Neurol, v.404, n.2, Feb 8, p.258-70. 1999.
- Salazar, R. F., C. Kayser e P. Konig. Effects of training on neuronal activity and interactions in primary and higher visual cortices in the alert cat. J Neurosci, v.24, n.7, Feb 18, p.1627-36. 2004.
- Salvi, R. J., S. S. Saunders, M. A. Gratton, S. Arehole e N. Powers. Enhanced evoked response amplitudes in the inferior colliculus of the chinchilla following acoustic trauma. Hear Res, v.50, n.1-2, Dec, p.245-57. 1990.
- Salvi, R. J., J. Wang e D. Ding. Auditory plasticity and hyperactivity following cochlear damage. Hear Res, v.147, n.1-2, Sep, p.261-74. 2000.
- Samsam, M., R. Covenas, J. Yajeya, R. Ahangari, J. A. Narvaez, M. C. Montes-Gonzalo e S. Gonzalez-Baron. Implication of the neuropeptides methionine enkephalin, neurotensin and somatostatin of the caudal trigeminal nucleus in the experimental migraine. Rev Neurol, v.34, n.8, Apr 16-30, p.724-9. 2002.
- Santos-Sacchi, J. New tunes from Corti's organ: the outer hair cell boogie rules. Curr Opin Neurobiol, v.13, n.4, Aug, p.459-68. 2003.

- Ross, C. D., D. A. Godfrey e J. A. Parli. Amino acid concentrations and selected enzyme activities in rat auditory, olfactory, and visual systems. Neurochem Res, v.20, n.12, Dec, p.1483-90. 1995.
- Rouiller, E. M., X. S. Wan, V. Moret e F. Liang. Mapping of c-fos expression elicited by pure tones stimulation in the auditory pathways of the rat, with emphasis on the cochlear nucleus. Neurosci Lett, v.144, n.1-2, Sep 14, p.19-24. 1992.
- Ruben, R. J. e I. Rapin. Plasticity of the developing auditory system. Ann Otol Rhinol Laryngol, v.89, n.4 Pt 1, Jul-Aug, p.303-11. 1980.
- Rubio, M. E. e J. M. Juiz. Chemical anatomy of excitatory endings in the dorsal cochlear nucleus of the rat: differential synaptic distribution of aspartate aminotransferase, glutamate, and vesicular zinc. J Comp Neurol, v.399, n.3, Sep 28, p.341-58. 1998.
- Rubio, M. E. Differential distribution of synaptic endings containing glutamate, glycine, and GABA in the rat dorsal cochlear nucleus. J Comp Neurol, v.477, n.3, Sep 20, p.253-72. 2004.
- Safieddine, S., A. M. Prior e M. Eybalin. Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase, tyrosine hydroxylase, calcitonin gene-related peptide and opioid peptides coexist in lateral efferent neurons of rat and guinea-pig. Eur J Neurosci, v.9, n.2, Feb, p.356-67. 1997.
- Saint Marie, R. L., L. Luo e A. F. Ryan. Effects of stimulus frequency and intensity on c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem. J Comp Neurol, v.404, n.2, Feb 8, p.258-70. 1999.
- Salazar, R. F., C. Kayser e P. Konig. Effects of training on neuronal activity and interactions in primary and higher visual cortices in the alert cat. J Neurosci, v.24, n.7, Feb 18, p.1627-36. 2004.
- Salvi, R. J., S. S. Saunders, M. A. Gratton, S. Arehole e N. Powers. Enhanced evoked response amplitudes in the inferior colliculus of the chinchilla following acoustic trauma. Hear Res, v.50, n.1-2, Dec, p.245-57. 1990.
- Salvi, R. J., J. Wang e D. Ding. Auditory plasticity and hyperactivity following cochlear damage. Hear Res, v.147, n.1-2, Sep, p.261-74. 2000.
- Samsam, M., R. Covenas, J. Yajeya, R. Ahangari, J. A. Narvaez, M. C. Montes-Gonzalo e S. Gonzalez-Baron. Implication of the neuropeptides methionine enkephalin, neurotensin and somatostatin of the caudal trigeminal nucleus in the experimental migraine. Rev Neurol, v.34, n.8, Apr 16-30, p.724-9. 2002.
- Santos-Sacchi, J. New tunes from Corti's organ: the outer hair cell boogie rules. Curr Opin Neurobiol, v.13, n.4, Aug, p.459-68. 2003.

- Sato, K., T. Houtani, T. Ueyama, M. Ikeda, T. Yamashita, T. Kumazawa e T. Sugimoto. Mapping of the cochlear nucleus subregions in the rat with neuronal Fos protein induced by acoustic stimulation with low tones. Neurosci Lett, v.142, n.1, Aug 3, p.48-52. 1992.
- Schweitzer, L., T. Cecil e E. J. Walsh. Development of GAD-immunoreactivity in the dorsal cochlear nucleus of the hamster and cat: light and electron microscopic observations. Hear Res, v.65, n.1-2, Feb, p.240-52. 1993.
- Shiraishi, T., E. Senba, M. Tohyama, J. Y. Wu, T. Kubo e T. Matsunaga. Distribution and fine structure of neuronal elements containing glutamate decarboxylase in the rat cochlear nucleus. Brain Res, v.347, n.1, Nov 11, p.183-7. 1985.
- Silva, A. P., A. P. Carvalho, C. M. Carvalho e J. O. Malva. Modulation of intracellular calcium changes and glutamate release by neuropeptide Y1 and Y2 receptors in the rat hippocampus: differential effects in CA1, CA3 and dentate gyrus. J Neurochem, v.79, n.2, Oct, p.286-96. 2001.
- Sirevaag, A. M., J. E. Black, D. Shafron e W. T. Greenough. Direct evidence that complex experience increases capillary branching and surface area in visual cortex of young rats. Brain Res, v.471, n.2, Oct 1, p.299-304. 1988.
- Sirevaag, A. M. e W. T. Greenough. A multivariate statistical summary of synaptic plasticity measures in rats exposed to complex, social and individual environments. Brain Res, v.441, n.1-2, Feb 16, p.386-92. 1988.
- Sirevaag, A. M. e W. T. Greenough. A multivariate statistical summary of synaptic plasticity measures in rats exposed to complex, social and individual environments. Brain Res, v.441, n.1-2, Feb 16, p.386-92. 1988.
- Spirou, G. A., B. J. May, D. D. Wright e D. K. Ryugo. Frequency organization of the dorsal cochlear nucleus in cats. J Comp Neurol, v.329, n.1, Mar 1, p.36-52. 1993.
- Spoendlin, H. Neural connections of the outer hair cell system. Acta Otolaryngol, v.87, n.3-4, Mar-Apr, p.381-7. 1979.
- Spoendlin, H. Sensory neural organization of the cochlea. J Laryngol Otol, v.93, n.9, Sep, p.853-77. 1979.
- Steel, K. P. e C. J. Kros. A genetic approach to understanding auditory function. Nat Genet, v.27, n.2, Feb, p.143-9. 2001.
- Suga, N., Z. Xiao, X. Ma e W. Ji. Plasticity and corticofugal modulation for hearing in adult animals. Neuron, v.36, n.1, Sep 26, p.9-18. 2002.

- Suneja, S. K., C. G. Benson, J. Gross e S. J. Potashner. Evidence for glutamatergic projections from the cochlear nucleus to the superior olive and the ventral nucleus of the lateral lemniscus. J Neurochem, v.64, n.1, Jan, p.161-71. 1995.
- Syka, J. Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function, and during learning. Physiol Rev, v.82, n.3, Jul, p.601-36. 2002.
- Szczepaniak, W. S. e A. R. Moller. Evidence of decreased GABAergic influence on temporal integration in the inferior colliculus following acute noise exposure: a study of evoked potentials in the rat. Neurosci Lett, v.196, n.1-2, Aug 18, p.77-80. 1995.
- Szczepaniak, W. S. e A. R. Moller. Evidence of neuronal plasticity within the inferior colliculus after noise exposure: a study of evoked potentials in the rat. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, v.100, n.2, Mar, p.158-64. 1996.
- Tachibana, M., J. M. Rothman e P. S. Guth. Somatostatin along the auditory pathway. Hear Res, v.1, n.4, Dec, p.365-8. 1979.
- Talwar, S. K. e G. L. Gerstein. Reorganization in awake rat auditory cortex by local microstimulation and its effect on frequency-discrimination behavior. J Neurophysiol, v.86, n.4, Oct, p.1555-72. 2001.
- Thompson, A. M. e B. R. Schofield. Afferent projections of the superior olivary complex. Microsc Res Tech, v.51, n.4, Nov 15, p.330-54. 2000.
- Thompson, G. C., A. M. Cortez e D. M. Lam. Localization of GABA immunoreactivity in the auditory brainstem of guinea pigs. Brain Res, v.339, n.1, Jul 22, p.119-22. 1985.
- Thorsell, A., M. Michalkiewicz, Y. Dumont, R. Quirion, L. Caberlotto, R. Rimondini, A. A. Mathe e M. Heilig. Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.23, Nov 7, p.12852-7. 2000.
- Todd, A. J., G. Russell e R. C. Spike. Immunocytochemical evidence that GABA and neurotensin exist in different neurons in laminae II and III of rat spinal dorsal horn. Neuroscience, v.47, n.3, p.685-91. 1992.
- Tohyama, Y., E. Senba, T. Yamashita, M. Kitajiri, H. Kuriyama, T. Kumazawa, K. Ohata e M. Tohyama. Coexistence of calcitonin gene-related peptide and enkephalin in single neurons of the lateral superior olivary nucleus of the guinea pig that project to the cochlea as lateral olivocochlear system. Brain Res, v.515, n.1-2, May 7, p.312-4. 1990.
- Tong, L., R. A. Altschuler e A. G. Holt. Tyrosine hydroxylase in rat auditory midbrain: distribution and changes following deafness. Hear Res, v.206, n.1-2, Aug, p.28-41. 2005.

- Turner, J. G., J. L. Parrish, L. F. Hughes, L. A. Toth e D. M. Caspary. Hearing in laboratory animals: strain differences and nonauditory effects of noise. Comp Med, v.55, n.1, Feb, p.12-23. 2005.
- Ubink, R., L. Calza e T. Hokfelt. 'Neuro'-peptides in glia: focus on NPY and galanin. Trends Neurosci, v.26, n.11, Nov, p.604-9. 2003.
- Uhl, G. R., R. R. Goodman e S. H. Snyder. Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. Brain Res, v.167, n.1, May 5, p.77-91. 1979.
- Usami, S., K. K. Osen, N. Zhang e O. P. Ottersen. Distribution of glutamate-like and glutamine-like immunoreactivities in the rat organ of Corti: a light microscopic and semiquantitative electron microscopic analysis with a note on the localization of aspartate. Exp Brain Res, v.91, n.1, p.1-11. 1992.
- Vetter, D. E., J. C. Adams e E. Mugnaini. Chemically distinct rat olivocochlear neurons. Synapse, v.7, n.1, Jan, p.21-43. 1991.
- Vetter, D. E. e E. Mugnaini. An evaluation of retrograde tracing methods for the identification of chemically distinct cochlear efferent neurons. Arch Ital Biol, v.128, n.2-4, Jul, p.331-53. 1990.
- Vincent, J. P., J. Mazella e P. Kitabgi. Neurotensin and neurotensin receptors. Trends Pharmacol Sci, v.20, n.7, Jul, p.302-9. 1999.
- Vischer, M. W., V. Bajo-Lorenzana, J. Zhang, R. Hausler e E. M. Rouiller. Activity elicited in the auditory pathway of the rat by electrical stimulation of the cochlea. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, v.57, n.6, Nov-Dec, p.305-9. 1995.
- Vischer, M. W., R. Hausler e E. M. Rouiller. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the auditory pathway of the Sprague-Dawley rat elicited by cochlear electrical stimulation. Neurosci Res, v.19, n.2, Mar, p.175-85. 1994.
- Wakisaka, S., K. C. Kajander e G. J. Bennett. Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. Neurosci Lett, v.124, n.2, Apr 1, p.200-3. 1991.
- Wang, X. The unexpected consequences of a noisy environment. Trends Neurosci, v.27, n.7, Jul, p.364-6. 2004.
- Wenthold, R. J. e R. L. Gulley. Aspartic acid and glutamic acid levels in the cochlear nucleus after auditory nerve lesion. Brain Res, v.138, n.1, Dec 9, p.111-23. 1977.
- West, M. J. e H. J. Gundersen. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. J Comp Neurol, v.296, n.1, Jun 1, p.1-22. 1990.

- West, M. J., L. Slomianka e H. J. Gundersen. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. Anat Rec, v.231, n.4, Dec, p.482-97. 1991.
- Wickesberg, R. E. e D. Oertel. Tonotopic projection from the dorsal to the anteroventral cochlear nucleus of mice. J Comp Neurol, v.268, n.3, Feb 15, p.389-99. 1988.
- Willott, J. F. e L. Bross. Effects of prolonged exposure to an augmented acoustic environment on the auditory system of middle-aged C57BL/6J mice: cochlear and central histology and sex differences. J Comp Neurol, v.472, n.3, May 3, p.358-70. 2004.
- Willott, J. F. e J. G. Turner. Neural plasticity in the mouse inferior colliculus: relationship to hearing loss, augmented acoustic stimulation, and prepulse inhibition. Hear Res, v.147, n.1-2, Sep, p.275-81. 2000.
- Willott, J. F., J. G. Turner e V. S. Sundin. Effects of exposure to an augmented acoustic environment on auditory function in mice: roles of hearing loss and age during treatment. Hear Res, v.142, n.1-2, Apr, p.79-88. 2000.
- Woulfe, J., F. Checler e A. Beaudet. Light and Electron Microscopic Localization of the Neutral Metalloendopeptidase EC 3.4.24.16 in the Mesencephalon of the Rat. Eur J Neurosci, v.4, n.12, p.1309-1319. 1992.
- Wynne, B., A. R. Harvey, D. Robertson e D. J. Sirinathsinghji. Neurotransmitter and neuromodulator systems of the rat inferior colliculus and auditory brainstem studied by in situ hybridization. J Chem Neuroanat, v.9, n.4, Dec, p.289-300. 1995.
- Wynne, B. e D. Robertson. Somatostatin and substance P-like immunoreactivity in the auditory brainstem of the adult rat. J Chem Neuroanat, v.12, n.4, May, p.259-66. 1997.
- Xia, J., T. O. Neild e N. Kotecha. Effects of neuropeptide Y and agonists selective for neuropeptide Y receptor sub-types on arterioles of the guinea-pig small intestine and the rat brain. Br J Pharmacol, v.107, n.3, Nov, p.771-6. 1992.
- Yamazoe, M., S. Shiosaka, P. C. Emson e M. Tohyama. Distribution of neuropeptide Y in the lower brainstem: an immunohistochemical analysis. Brain Res, v.335, n.1, May 27, p.109-20. 1985.
- Yang, Y., R. L. Saint Marie e D. L. Oliver. Granule cells in the cochlear nucleus sensitive to sound activation detected by Fos protein expression. Neuroscience, v.136, n.3, p.865-82. 2005.
- Yao, W. e D. A. Godfrey. Immunohistochemical evaluation of cholinergic neurons in the rat superior olivary complex. Microsc Res Tech, v.41, n.3, May 1, p.270-83. 1998.

- Ylikoski, J., U. Pirvola, O. Happola, P. Panula e I. Virtanen. Immunohistochemical demonstration of neuroactive substances in the inner ear of rat and guinea pig. Acta Otolaryngol, v.107, n.5-6, May-Jun, p.417-23. 1989.
- Ylikoski, J., U. Pirvola, J. Virkkala, P. Suvanto, X. Q. Liang, E. Magal, R. Altschuler, J. M. Miller e M. Saarna. Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. Hear Res, v.124, n.1-2, Oct, p.17-26. 1998.
- Zhang, J., D. Zhang, J. S. Mcquade, M. Behbehani, J. Z. Tsien e M. Xu. c-fos regulates neuronal excitability and survival. Nat Genet, v.30, n.4, Apr, p.416-20. 2002.
- Zhang, X., Z. Q. Xu, L. Bao, A. Dagerlind e T. Hokfelt. Complementary distribution of receptors for neurotensin and NPY in small neurons in rat lumbar DRGs and regulation of the receptors and peptides after peripheral axotomy. J Neurosci, v.15, n.4, Apr, p.2733-47. 1995.
- Zheng, L., D. A. Godfrey, H. J. Waller, T. G. Godfrey, K. Chen e Y. Sun. Effects of high-potassium-induced depolarization on amino acid chemistry of the dorsal cochlear nucleus in rat brain slices. Neurochem Res, v.25, n.6, Jun, p.823-35. 2000.
- Zoli, M., F. Ferraguti, G. Biagini, A. Cintra, K. Fuxe e L. F. Agnati. Corticosterone treatment counteracts lesions induced by neonatal treatment with monosodium glutamate in the mediobasal hypothalamus of the male rat. Neurosci Lett, v.132, n.2, Nov 11, p.225-8. 1991.

FONTE CONSULTADA

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT - Norma NBR 10152- Níveis de ruído para conforto acústico (NB 95). Rio de Janeiro, 1990.

ANEXOS

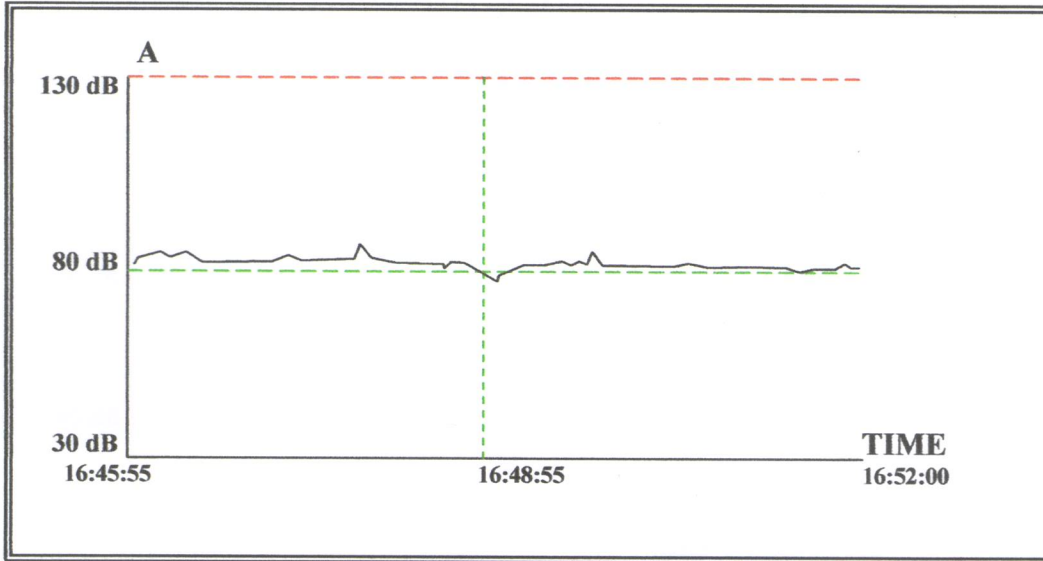


COMERCIO E SERVIÇOS LTDA

CENTRO TECNICO DE EQUIPAMENTOS AUDIOLOGICOS
CNPJ 01.247.669/0001-45

Certificado de Aferição

GRÁFICO DEMONSTRATIVO DE EMISSÃO DE SINAL EM GAIOLAS

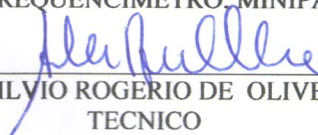


REFERENCIAS:

DISTANCIA DA FONTE GERADORA DE SINAL23 cm
 FREQUENCIAS DE TESTE8000HZ
 TIPO DE ONDASENOIDAL
 INTENSIDADE80 DB (NPS)
 FONTE GERADORA DE SINAL: AMPLIFICADOR AIWA MOD. NSX 999 DIGITAL SIGNAL PROCESSOR,
 E CAIXAS ACUSTICAS BOSS MOD 101

INSTRUMENTOS UTILIZADOS PARA AFERIÇÃO DOS SINAIS

DECIBELIMETRO: SIMPSON MOD. 386
 FILTRO DE BANDA DE OITAVA MOD. 386
 DECIBELIMETRO MINIPA MOD. 1352-A
 OSCILOSCOPIO MINIPA MOD.1221 S
 FREQUENCIMETRO: MINIPA/GERADOR DE FUNÇÕES MOD. MFG4203


 SILVÍO ROGERIO DE OLIVEIRA
 TECNICO

DATA 16/12/2003

pagina 01 de 0

RUA DOM JOSÉ DE BARRO Nº 17 - CJ. 72th - 7º ANDAR - CENTRO - SÃO PAULO - SP
 CEP 01038 000

01 247 669/0001-45

C.T.E.A. COM. E SERV. LTDA. - ME

TEL. (11) 31515935 - 32583304

Rua Dom José de Barros, 17 Conj. 72-75

Centro - CEP 01038-000

SÃO PAULO - SP



COMERCIO E SERVIÇOS LTD

CENTRO TECNICO DE EQUIPAMENTOS AUDIOLOGICOS
CNPJ 01.247.669/0001-45

Certificado de Aferição (Ruído Ambiente)

LOCAL: USP UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
SETOR: LABORATÓRIO

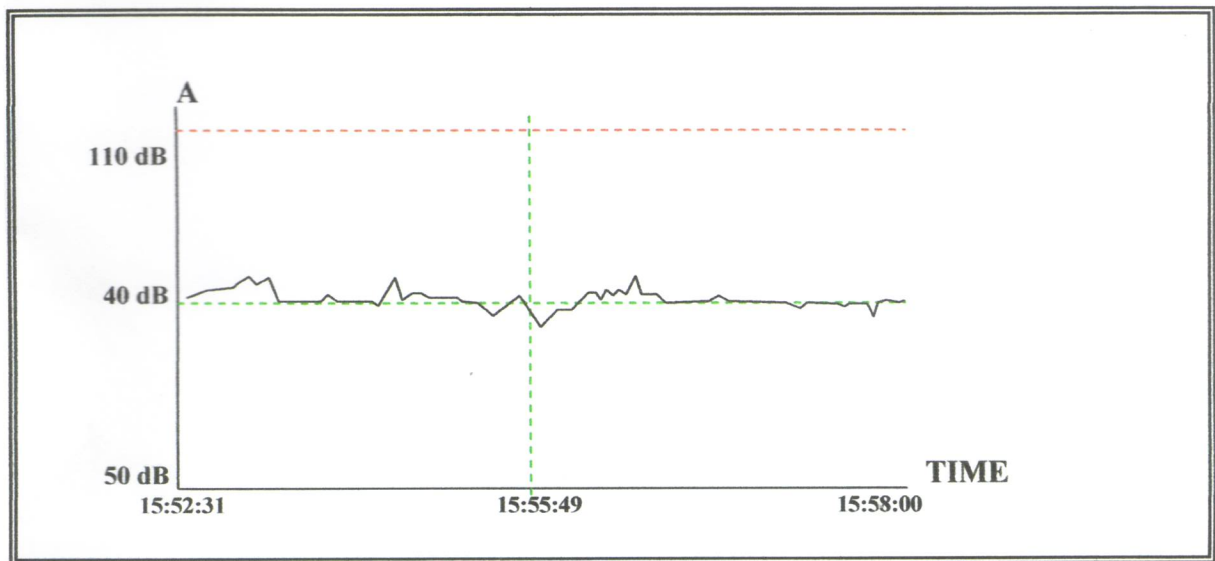


GRÁFICO REFERENTE A AFERIÇÃO DE RUÍDO AMBIENTE

INSTRUMENTOS UTILIZADOS:
DECIBELIMETRO SIMPSON MOD. 386
FILTRO DE BANDAS DE OITAVAS MOD. 386
DECIBELIMETRO MINIPA MOD. 1352-A


SÍLVIO ROGERIO DE OLIVEIRA

DATA 12/12/2003

pagina 02 d

RUA DOM JOSÉ DE BARRO Nº 17 - CJ. 72^h - 7º ANDAR - CENTRO - SÃO PAULO - SP
CEP 01038 000

01 247 669/0001-45

TEL. (11) 31515935 - 32583304

C.T.E.A. COM. E SERV. LTDA. - ME

Rua Dom José de Barros, 17 Conj. 72-75

Centro - CEP 0103 -000

SÃO PAULO - SP