

Janaina Patricio de Lima¹
 Irineu Tadeu Velasco¹
 Denise Frediane Barbeiro¹
 Eliane Schochat¹

Descritores

Audiometria de Resposta Evocada
 Audição
 Isquemia Encefálica
 Sepsis
 Tronco Encefálico

Keywords

Audiometry, Evoked Response
 Hearing
 Brain ischemia
 Sepsis
 Brain Stem

Endereço para correspondência:

Janaina Patricio de Lima
 Rua José Benedito Salinas, 68, apartamento
 152B, Jardim Itapeva, São Paulo (SP),
 Brasil, CEP: 04674-200.
 E-mail: janapatricio@yahoo.com.br

Recebido em: 08/09/2014

Aceito em: 11/01/2015

Potencial evocado auditivo de tronco encefálico em gerbils submetidos à isquemia e sepse

Auditory brainstem response in gerbils submitted to ischemia and sepsis

RESUMO

Introdução: O acidente vascular cerebral do tipo isquêmico é um quadro clínico que afeta milhares de pessoas no mundo. Como resultado dessa injúria observamos morte neuronal, e no decorrer natural de recuperação o indivíduo pode desenvolver a sepse. A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica que pode levar o indivíduo à morte. Para avaliar as condições clínicas de um paciente com esse quadro, o potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) pode ser útil, uma vez que ele não é um procedimento invasivo, sua técnica é rápida e pode ser feita à beira do leito. **Objetivo:** Verificar os valores de latência do PEATE em gerbils submetidos à isquemia e sepse. **Métodos:** Foram coletados os PEATEs de 72 gerbils machos adultos que foram distribuídos em 6 grupos: controle, sepse, isquemia, sham, isquemia com sepse e sham com sepse. Para a indução de sepse, foi aplicado lipopolissacarídeo (LPS) intraperitoneal nos gerbils. Os animais foram anestesiados antes das coletas com ketamina associada à xilazina, seus PEATEs foram coletados antes de qualquer procedimento (coleta base), após isquemia e 24 horas após a aplicação de LPS. Foi avaliada a latência absoluta da onda IV, e os valores foram comparados intergrupos. **Resultados:** Houve diferença significativa nos grupos submetidos à sepse no valor da latência da onda IV em relação aos demais grupos. **Conclusão:** O PEATE se mostrou sensível à sepse com aumento de latência da onda IV no desenvolver da doença no modelo experimental utilizado.

ABSTRACT

Introduction: An ischemic stroke is a clinical condition that affects thousands of people worldwide. As a result of this injury, neuronal death can be observed, and in the natural course of recovery, the individual may develop sepsis. Sepsis is a systemic inflammatory response that can lead the patient to death. To assess the clinical condition of a patient with this condition, the Auditory Brainstem Response (ABR) can be useful, since it is not an invasive procedure, it is a fast technique and it can be done at the bedside. **Purpose:** To assess auditory brainstem response (ABR) latency values in gerbils subjected to ischemia and sepsis. **Methods:** ABR values were collected from 72 adult male gerbils, which were divided into six groups: control, sepsis, ischemia, sham, ischemia with sepsis, and sham with sepsis. For the induction of sepsis, lipopolysaccharide (LPS) was applied intraperitoneally in gerbils. The animals were anesthetized with a ketamine/xylazine combination before collection; their ABR were collected before any procedure (base collection), after ischemia, and 24 hours after the application of LPS. The absolute latency of wave IV was evaluated, and the values were compared between groups. **Results:** There were significant differences in the groups submitted to sepsis in the latency value of wave IV in relation with the other groups. **Conclusion:** ABR was sensitive to sepsis with the increase in latency of wave IV during the development of the disease in the experimental model used.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Emergências Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

(1) Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesses: nada a declarar.

INTRODUÇÃO

O uso clínico do potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) na avaliação da integridade de vias auditivas e na pesquisa do limiar eletrofisiológico já é rotineiro^(1,2). Porém, o uso desse potencial como índice de prognóstico em diversas doenças ainda é objeto de estudo no campo da pesquisa. Estudos com o objetivo de caracterizar o PEATE nessas situações são de grande valia, uma vez que para o uso clínico em situações em que o paciente encontra-se acamado, como no caso de pacientes que sofreram um acidente vascular cerebral ou ainda vítimas de sepse, são necessários parâmetros bem definidos. Com esse enfoque, os estudos experimentais exercem papel importante, já que em laboratório é possível diminuir variáveis e, assim, entender melhor os mecanismos e os resultados encontrados⁽³⁾.

O acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) e a sepse são duas doenças que acometem um grande número de pacientes. A isquemia pode ser classificada como global ou focal, ou seja, quando há falta total ou parcial do fornecimento de oxigênio; e em completa e incompleta, quando há ou não reperfusão, isso é, retorno do fluxo sanguíneo vascular^(4,5). A ausência de oxigênio nos neurônios acarreta morte neuronal. Além disso, durante a isquemia e a reperfusão há a excitação excessiva de neurônio, fenômeno conhecido como excitotoxicidade, que é causada pelo excesso de liberação de glutamato pelos neurônios privados de oxigênio. Esse aumento de liberação de glutamato é responsável pela morte de neurônios pós-sinápticos, já que essa substância em concentração excessiva é tóxica para os neurônios^(6,7).

Muitos pacientes permanecem com sequelas pós-AVCI, além disso, no decorrer natural de recuperação, o indivíduo pode desenvolver a sepse⁽⁸⁾, que é uma resposta pró-inflamatória sistêmica, exacerbada e que possui desenvolvimento complexo, que, quando não controlado, acomete diversos órgãos, podendo inclusive levar o indivíduo ao óbito⁽⁹⁾.

Esses pacientes, muitas vezes, permanecem em unidades de terapia intensiva, e seu transporte para a realização de exames se torna difícil e arriscado. Nessa perspectiva, o PEATE se torna uma ferramenta valiosa, uma vez que é um exame não invasivo, rápido e pode ser realizado à beira do leito⁽¹⁰⁾, podendo indicar algum nível de prognóstico para o estado do paciente.

O objetivo deste estudo foi verificar os valores de latência de onda IV do PEATE em gerbils adultos nas condições de pré e pós-isquemia, pré e pós-sepse, comparando com um grupo controle e um grupo sham.

MÉTODOS

O presente estudo teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisas da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Parecer n° 0456/09). A pesquisa foi realizada no Laboratório de Investigação Médica em Emergências Clínicas da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados 72 gerbils (*Meriones unguiculatus*) machos pesando entre 56 e 79 g, entre 3 e 5 meses de vida, mantidos

em condições ambientais controladas com ciclo claro/escuro (12/12 horas), temperatura na faixa de 22 a 27°C, umidade de 45 a 65% e ambiente higienizado, recebendo ração própria comum e água *ad libitum*, provenientes do biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Justifica-se a utilização desses roedores por eles apresentarem uma falha na formação do polígono de Willis que determina uma irrigação única para 80% do parênquima cerebral. Dessa forma, a preparação cirúrgica do modelo experimental fica limitada à oclusão temporária das carótidas, eliminando complicações desnecessárias e produzindo um resultado muito mais consistente.

Os animais foram distribuídos em 6 grupos experimentais, sendo que cada grupo foi composto por 2 animais, a saber:

1. sham (cirurgia sem oclusão das carótidas);
2. isquemia (cirurgia com oclusão das carótidas);
3. sepse;
4. sham com sepse;
5. isquemia com sepse;
6. controle (sem nenhum tipo de procedimento).

Para o procedimento da isquemia, os gerbils foram anestesiados com halotano 3% em mistura gasosa de oxigênio 30% e óxido nitroso 70% e submetidos à isquemia cerebral global por 7 minutos com oclusão bilateral das carótidas. Durante o período de isquemia (7 minutos) e seguido o período de reperfusão (30 minutos), os animais foram monitorados e mantidos em temperatura controlada de 36,0±0,2°C. Em seguida, os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*.

O procedimento de isquemia e de cirurgia sem oclusão da carótida (grupo sham) foi realizado no primeiro dia de experimento, após a primeira coleta do PEATE (coleta de base).

Em relação aos grupos com sepse, no segundo dia de experimento, ou seja, 24 horas após a isquemia, foi injetado 1 mg/Kg de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* serotype 026: B6 (Sigma) por via intraperitoneal, induzindo, dessa maneira, inflamação (sepse) no animal.

Para a avaliação eletrofisiológica, foi utilizado o equipamento da marca Biologic, modelo Navigator. Os estímulos foram apresentados mediante fones de inserção 3A, posicionados na orelha esquerda dos animais, permanecendo a orelha direita não ocluída. A estimulação foi exclusiva na orelha esquerda.

Antes de todos os registros os animais foram anestesiados com injeção peritoneal de Ketamina (Parke-Davis, São Paulo, Brasil) na concentração de 100 mg/kg de peso do animal e Rompun, princípio ativo xilazina (Bayer healthCare, São Paulo, Brasil) na concentração de 4 mg/kg do peso do animal. O PEATE foi registrado mediante a utilização de três eletrodos, posicionados em Cz, mastoide esquerda M1, de acordo com o sistema internacional 10-20⁽¹¹⁾, e eletrodo terra. A mastoide esquerda foi utilizada como referência, e a pata do animal foi utilizada para o eletrodo terra. Os animais permaneceram em uma situação de escuta passiva. Para a captação do PEATE, foram utilizados 2.000 estímulos do tipo clique, com polaridade rarefeita e taxa de apresentação de 13 estímulos por segundo, intensidade de 80 dBnA e fone de inserção acoplado

ao pavilhão auricular do animal. Foram utilizados filtros passa/baixo de 100 Hz e passa/alto de 1.500 Hz. A janela de registro utilizada foi de 10.66 ms posterior à estimulação. Todas as respostas foram reproduzidas garantindo, dessa maneira, a reprodutibilidade do potencial adquirido.

Antes de qualquer procedimento, foi realizada uma avaliação eletrofisiológica (PEATE) para que essa medida servisse como linha de base para todas as outras que foram realizadas (coleta pré, realizada no 1º dia de experimento). O PEATE foi coletado novamente no segundo dia em todos os animais, após o procedimento isquêmico realizado naqueles que pertenciam ao respectivo grupo (coleta A); e uma terceira coleta foi realizada em todos os animais 24 horas após a injeção de LPS nos animais que pertenciam ao grupo de infecção (coleta B). Foi analisada, apenas, a onda IV do PEATE, devido a problema de visualização das demais ondas⁽¹²⁾. O profissional que analisou as ondas não sabia o grupo ao qual o animal pertencia, nem o momento em que se encontrava nas etapas utilizadas no trabalho.

Os resultados foram comparados nas situações pré e pós-realização do evento isquêmico e aplicação do LPS.

Para a análise estatística, foram utilizados os testes ANOVA e Tukey⁽¹³⁾. Valores inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significantes.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra média e desvio padrão das latências da onda IV do PEATE por grupo em todos os momentos do estudo. Com os dados podemos observar uma diferença significativa nos valores da primeira coleta (pré) e última coleta (B) (Tabela 2) em todos os grupos que foram induzidos à sepse (sepse, sham com sepse e isquemia com sepse). Observa-se o contrário nos grupos em que a sepse não foi induzida (controle, isquemia e sham).

DISCUSSÃO

Os dados das Tabelas 1 e 2 e da Figura 1 mostram os valores de onda IV do PEATE nos diferentes grupos estudados e a sua diferença significativa. É possível perceber diferença entre os grupos induzidos à sepse (sepse, isquemia/sepse, sepse/sham) daqueles não induzidos ao processo inflamatório (sham, isquêmico e controle). Por outro lado, na coleta B não se observa diferença entre os grupos isquêmicos e os não isquêmicos em nenhum momento da pesquisa. Com isso, temos um aumento de latência de onda IV no desenvolvimento da sepse (coleta

B, 24 horas após aplicação do LPS), o que não se observa nos demais grupos. Isso nos mostra que o PEATE foi capaz de identificar o animal com sepse, mas não o animal com isquemia.

A sepse é uma doença que pode acarretar um mau funcionamento cerebral, devido ao aumento de citocinas que podem provocar apoptose celular e alteração da transmissão sináptica. É um processo que envolve alteração local e sistêmica e que ainda não está totalmente esclarecido. Sabe-se, porém, que ocorre uma inflamação em excesso do organismo, e que, por meio de *feedbacks* positivos e respostas sinérgicas de vários sistemas, há a potencialização da inflamação sem controle. Entre os principais eventos observados com a excessiva produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, temos a ativação de moléculas de adesão, aumento do ácido aracônico, radicais livres de oxigênio, óxido nítrico e fator de ativação plaquetário. Todo esse descontrole de substâncias ocasiona um prejuízo nos órgãos vitais e, em relação ao sistema nervoso central, as modificações dos níveis de citocinas na sepse podem comprometer o funcionamento cerebral, ocasionando um quadro conhecido como encefalopatia séptica^(14,15).

Não foram encontrados trabalhos envolvendo PEATE e sepse, apenas estudos com outros potenciais evocados. Em estudo realizado⁽¹⁶⁾, os autores estudaram os potenciais somatossensoriais

Tabela 2. Análise estatística para comparação da latência da onda IV dos potenciais evocados auditivos de tronco encefálico entre os grupos avaliados

	Pré	Coleta A	Coleta B
Sepse x isquemia	NS	NS	0.007
Sepse x isquemia/sepse	NS	NS	NS
Sepse x controle	NS	NS	0.005
Sepse x sham	NS	NS	0.022
Sepse x sham/sepse	NS	NS	NS
Isquemia x isquemia/sepse	NS	NS	0.000
Isquemia x controle	NS	NS	NS
Isquemia x sham	NS	NS	NS
Isquemia x sham/sepse	NS	NS	0.002
Isquemia/sepse x controle	NS	NS	0.000
Isquemia/sepse x sham	NS	NS	0.000
Isquemia/sepse x sham/sepse	NS	NS	NS
Controle x sham	NS	NS	NS
Controle x sham/sepse	NS	NS	0.002
Sham x sham/sepse	NS	NS	0.005

Legenda: NS = não significante
Significância estatística ($p < 0,05$)

Tabela 1. Análise descritiva (média e desvio padrão) da latência (ms) da onda IV dos potenciais evocados auditivos de tronco encefálico nos momentos do estudo (pré, A e B), de acordo com o grupo avaliado

Coleta	Controle (n=12)	Sepse (n=12)	Isquemia (n=12)	Sham (n=12)	Isquemia/sepse (n=12)	Sepse/sham (n=12)
Pré	3,03±0,18	3,03±0,20	2,99±0,12	2,99±0,23	3,03±0,18	3,01±0,19
A	3,00±0,13	3,08±0,19	3,04±0,16	2,97±0,15	3,15±0,33	3,07±0,14
B	2,98±0,23	3,99±1,03	3,02±0,21	3,10±0,30	4,42±0,93	4,52±0,61

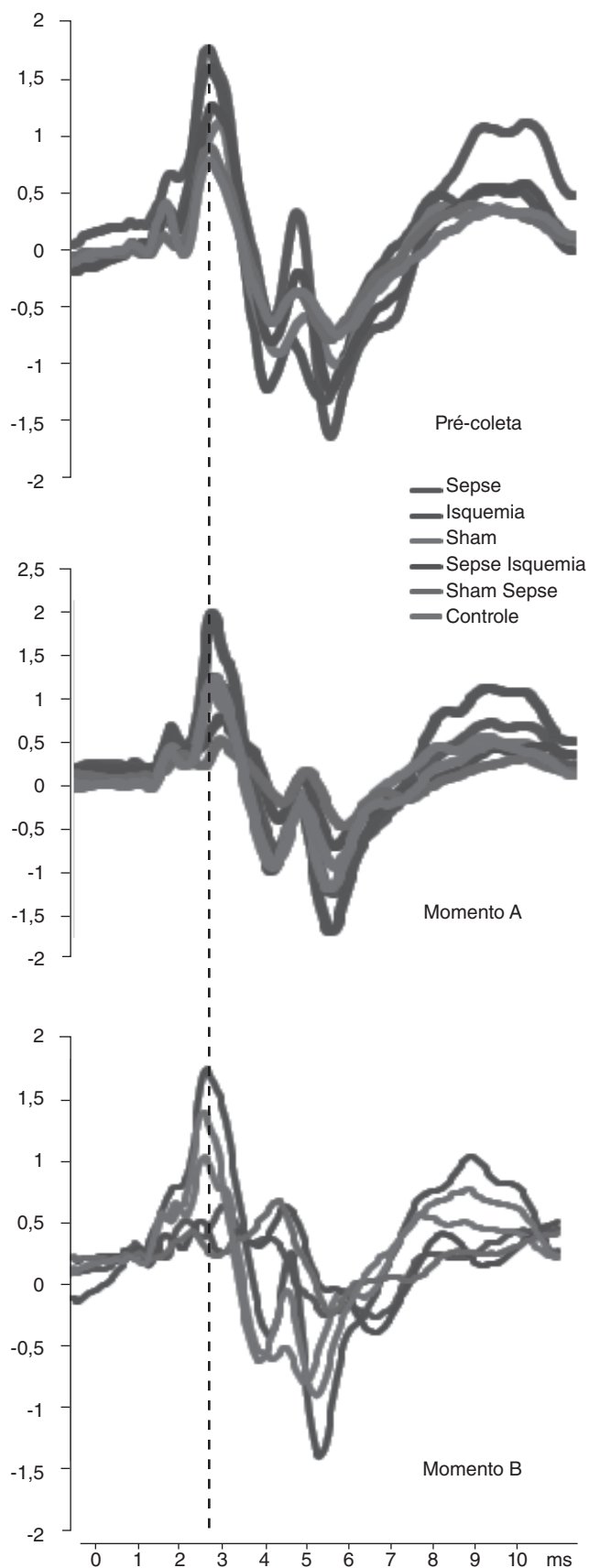


Figura 1. Traçado da média do potencial evocado auditivo de tronco encefálico em cada grupo de estudo em todos os momentos de coleta (pré, A, B)

cortical (N20-N70) e subcortical (N13-N20) para avaliar a incidência da encefalopatia séptica em pacientes com sepse severa e choque séptico. A conclusão do grupo foi que esses potenciais são sensíveis para esse tipo de avaliação, e o prejuízo deles esteve associado à severidade da doença.

Os grupos submetidos apenas à isquemia não apresentaram diferença significativa daqueles sem isquemia e sem sepse. O valor de latência absoluta da onda IV não se alterou entre a coleta pré e a coleta B. No presente trabalho, os animais foram submetidos à oclusão da carótida no primeiro dia de experimento, e o PEATE foi coletado após 24 horas de tal procedimento. A análise realizada também foi apenas da onda IV.

Em estudo realizado com gatos submetidos à isquemia através da oclusão da carótida comum, os autores⁽¹⁷⁾ verificaram presença da onda I e ausência das demais ondas no PEATE. Nesse estudo, o PEATE foi avaliado logo após o procedimento cirúrgico.

Em estudo posterior⁽¹⁸⁾, os autores verificaram as latências das ondas do PEATE em ratos Wistar submetidos à oclusão da artéria cerebelar anteroinferior. Eles dividiram o estudo em dois grupos conforme a coleta: ipsilateral à oclusão (grupo A) e contralateral à oclusão (coleta B). Os autores observaram diferentes tipos de ondas no grupo A, desde ausência total de ondas do PEATE, até presença das ondas I, II, III e IV, com aumento de latências interpicos I-IV e II-IV. Já em relação ao grupo B (coleta contralateral à oclusão), os autores observaram, em todos os traçados, presença das ondas I, II, III e IV, com aumento de latências interpicos I-IV e II-IV. Todas as coletas foram realizadas até 60 minutos após a oclusão. Os autores justificaram a variabilidade de resposta no grupo A devido às possíveis variações de vasos da artéria cerebelar anteroinferior. Segundo eles, quando existe uma circulação contralateral significativa, pode ocorrer irrigação sanguínea na cóclea, capaz de manter presença de ondas do PEATE.

Em nosso estudo, acreditamos que os valores do PEATE mantidos antes e após a isquemia podem ser justificados pelo fato do potencial em questão avaliar a região de tronco encefálico. Sabe-se que danos isquêmicos estão relacionados, principalmente, às regiões corticais (área CA1 do córtex)⁽¹⁹⁾. Além disso, o PEATE, neste estudo, foi coletado após 24 horas do procedimento de isquemia, dessa maneira, pode ter ocorrido alguma lesão durante a falta de irrigação sanguínea conforme citado por Inui et al.⁽¹⁸⁾, porém o próprio organismo pode ter se recuperado do evento. Neste estudo o PEATE não foi sensível à isquemia.

CONCLUSÃO

O presente estudo encontrou forte correlação entre o aumento de latência da onda IV do PEATE nos animais induzidos à sepse. Dessa forma, a avaliação desse potencial pode servir como um fator de prognóstico para identificar prejuízo de tronco encefálico em gerbils com sepse. Em contrapartida, o mesmo efeito não foi observado nos animais submetidos à isquemia, cujo valor de onda IV não se alterou.

**JPL realizou os exames nos gerbils e elaborou o manuscrito; ITV e ES corrigiram o manuscrito; DFB foi responsável pelo procedimento de isquemia e indução de sepse nos animais estudados.*

REFERÊNCIAS

1. Casali RL, Santos MFC. Potencial evocado auditivo de tronco encefálico: padrão de respostas de lactentes termos e prematuros. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76(6):729-38.
2. Pedriali IVG, Kozłowski L. Potenciais evocados auditivos de tronco encefálico na detecção do neurinoma do acústico. *Arquivos Int Otorrinolaryngol.* 2005;9(1):303-6.
3. Seelig VC. Questões atuais relacionadas ao uso de modelos animais em pesquisa científica [monografia]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
4. Lenzi GL, Frackowiak RS, Jones T. Cerebral oxygen metabolism and blood flow in human cerebral ischemic infarction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1982;2(3):321-35.
5. Joaquim MAS, Patriota GC, Bianco AM. Isquemia encefálica, cascatas vasodilatadoras e alterações bioquímicas. *Arq Bras Neurocir.* 2010;29(2):58-63.
6. Zipfel GJ, Lee JM, Choi DW. Reducing calcium overload in the ischemic brain. *N Engl J Med.* 1999;341(20):1543-4.
7. Stehno-Bittel L. Neuroplasticidade. In: Lundy-Ekman L. *Neurociência: fundamentos para reabilitação.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 61-70.
8. Basile-Filho A, Suen VMM, Martins MA, Coletto FA, Marson F. Monitorização da resposta orgânica ao trauma e à sepse. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2001;34:5-17.
9. Juncal VR, Britto Neto LA, Camelier AA, Messeder OHC, Farias AMC. Impacto clínico do diagnóstico de sepse à admissão em UTI de um hospital privado em Salvador, Bahia. *J Bras Pneumol.* 2011;37(1):85-92.
10. Jardim M, Person OC, Rapoport PB. Potencial evocado auditivo de tronco encefálico como auxílio diagnóstico de morte encefálica. *Pró-Fono R Atual Cient.* 2008;20(2):123-8.
11. Jasper HH. The ten-twenty electrode system of the International Federation. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 1958;10:371-5.
12. Smith DI, Kraus N. Postnatal development of the auditory brainstem response (ABR) in the unanesthetized gerbil. *Hear Res.* 1987;27(2):157-64.
13. Field A. Descobrimos a estatística usando o SPSS. 2ª edição. São Paulo: Artmed; 2009.
14. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Karl IE. Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(5 Suppl):S225-8.
15. Silva FP. Nomenclatura e Epidemiologia. In: Silva FP, Velasco IT. *Sepse.* Barueri: Manole; 2007. p. 12-8.
16. Zauner C, Gendo A, Kramer L, Funk GC, Bauer E, Schenk P, et al. Impaired subcortical and cortical sensory evoked potential pathways in septic patients. *Crit Care Med.* 2002;30(5):1136-9.
17. Sohmer H, Gafni M, Havatslet G. Persistence of auditory nerve response and absence of brain-stem response in severe cerebral ischaemia. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1984;58(1):65-72.
18. Inui H, Murai T, Matsunaga T. Auditory brainstem response findings in brainstem ischemia following selective occlusion of the anterior inferior cerebellar artery in the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1995;252(3):181-5.
19. O'Sullivan SB, Schmitz TJ. *Fisioterapia, avaliação e tratamento.* 2ª ed. São Paulo: Manole; 1993.