



ARTIGO ORIGINAL

Auditory evoked potentials in a newborn Wistar rat model of hyperbilirubinemia^{☆,☆☆}

Çağıl Gökdoğan^{a,*}, Aydan Genç^b, Özlem Gülbahar^c, Ozan Gökdoğan^d, Ayşe Helvacı^e, Selin Üstün Bezgin^f, Leyla Memiş^e

^a Departamento de Audiologia, Hospital Universitário, Universidade Gazi, Ankara, Turquia

^b Departamento de Audiologia, Hospital Universitário, Universidade Hacettepe, Ankara, Turquia

^c Departamento de Bioquímica, Hospital Universitário, Universidade Gazi, Ankara, Turquia

^d Departamento de Otorrinolaringologia, Hospital Memorial, Ankara, Turquia

^e Departamento de Patologia, Hospital Universitário, Universidade Gazi, Ankara, Turquia

^f Departamento de Otorrinolaringologia, Hospital Universitário, Universidade Gazi, Ankara, Turquia

Recebido em 7 de setembro de 2014; aceito em 6 de janeiro de 2015

KEYWORDS

Hyperbilirubinemia;
Wistar rats;
Sensorineural hearing
loss;
Auditory evoked
potentials

Abstract

Introduction: Hyperbilirubinemia is a common health problem in newborns. Its effects can be different according to the level and duration of the hyperbilirubinemia. The toxic effect of bilirubin on the auditory system can be seen as a sensory neural hearing loss or auditory neuropathy spectrum disorder (ANSO).

Objective: The purpose of our study was to determine the effects of toxic bilirubin level on the auditory system by using Auditory Brainstem Response audiometry.

Methods: Rats are used as animal models due to their low cost and easy attainability. Auditory Brainstem Response was used for auditory assessment. In this study, three groups were established: experimental, control and placebo groups.

Results: In the experimental group, which consists of rats with hyperbilirubinemia, sensoryneural hearing loss was found bilaterally in 4 rats (66.67%) and unilaterally in 2 rats (16.67%) and auditory neuropathy spectrum disorder was found unilaterally in 1 rat (8.33%). Auditory Brainstem Response thresholds were significantly elevated compared to control and placebo groups ($p < 0.05$).

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.10.008>

* Como citar este artigo: Gökdoğan Ç, Genç A, Gülbahar Ö, Gökdoğan O, Helvacı A, Bezgin SÜ, et al. Auditory evoked potentials in a newborn Wistar rat model of hyperbilirubinemia. Braz J Otorhinolaryngol. 2016;82:144-50.

** Instituição: Departamento de Audiologia, Hospital Universitário, Universidade Gazi, Ankara, Turquia.

* Autor para correspondência.

E-mail: cagilgokdogan@gmail.com (Ç. Gökdoğan).

PALAVRAS-CHAVE

Hiperbilirrubinemia;
Ratos Wistar;
Deficiência auditiva
neurosensorial;
Potenciais evocados
auditivos

Conclusion: Hyperbilirubinemia of newborn rats may result both in sensory neural hearing loss and auditory neuropathy spectrum disorder.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY- license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Potenciais evocados auditivos em um modelo de rato Wistar neonato com hiperbilirrubinemia**Resumo**

Introdução: A hiperbilirrubinemia é um problema de saúde comum em neonatos. Seus efeitos podem variar, dependendo do nível e da duração da hiperbilirrubinemia. O efeito tóxico da bilirrubina no sistema auditivo pode ser observado na forma de deficiência auditiva sensorioneural ou de distúrbio do espectro da neuropatia auditiva.

Objetivo: A finalidade de nosso estudo foi determinar os efeitos de nível tóxico de bilirrubina no sistema auditivo, com o uso da audiometria da resposta auditiva evocada de tronco cerebral.

Método: Os ratos são empregados como modelos animais graças a seu baixo custo e fácil obtenção. Utilizamos a resposta auditiva evocada de tronco cerebral para avaliação da audição. No estudo, foram estabelecidos três grupos: experimental, controle e placebo.

Resultados: No grupo experimental, constituído de ratos com hiperbilirrubinemia, disacusia auditiva neurosensorial foi diagnosticada bilateralmente em quatro ratos (66,67%), e unilateralmente em dois (16,67%); e distúrbio do espectro da neuropatia auditiva foi observado unilateralmente em um rato (8,33%). Os limiares da resposta evocada de tronco cerebral estavam significativamente elevados, em comparação com os grupos controle e placebo ($p < 0,05$).

Conclusão: A hiperbilirrubinemia de ratos neonatos pode resultar tanto em disacusia auditiva neurosensorial como em distúrbio do espectro da neuropatia auditiva.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY- license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A hiperbilirrubinemia é um problema de saúde comum em neonatos, e vem sendo reconhecida como um dos principais fatores de risco para a perda da audição em bebês desde o início do século XX.¹ Os seus efeitos na função auditiva podem variar, dependendo do nível de hiperbilirrubinemia e de sua duração.² Sabe-se que um nível alto de bilirrubina é fator de risco para deficiência auditiva sensorioneural (DASN) e para distúrbio auditivo do espectro de neuropatia (DENA).³

DASN é decorrente de distúrbios ao nível da cóclea, VIII nervo craniano, tronco cerebral ou córtex. Embora 50% dos casos de DASN em crianças tenham fundo genético, esse problema também pode ocorrer dependendo das doenças no período pré-natal, natal ou pós-natal (infecções, transtornos metabólicos etc.).⁴ No período pós-natal, a hiperbilirrubinemia é a causa mais comum de DASN em neonatos; e, dependendo da hiperbilirrubinemia, em neonatos e em bebês, a prevalência desse transtorno gira em 12,8%.⁵

DENA é uma condição clínica com muitos aspectos desconhecidos, mas é amplamente estudada. Em alguns casos de DENA, apenas as células ciliadas na orelha interna são afetadas, em outros apenas a via auditiva central é afetada. Entre os fatores de risco para DENA incluem-se a hiperbilirrubinemia, prematuridade, fatores genéticos e ventilação mecânica perinatal. DENA relacionado à hiper-

bilirrubinemia é observado em 2,7% dos neonatos com esse problema.⁶

A hiperbilirrubinemia pode ter diferentes efeitos patológicos no padrão de resposta auditiva evocada de tronco Cerebral (RAETC) em indivíduos afetados. Em neonatos com hiperbilirrubinemia, com o tratamento, o padrão de RAETC pode tanto retornar ao normal como ficar ainda mais patológico, depois do retorno dos níveis sanguíneos de bilirrubina à normalidade.⁷ A ocorrência de hiperbilirrubinemia no período neonatal já foi previamente estudada em modelo de rato.^{8,9}

A finalidade de nosso estudo foi determinar os efeitos de níveis tóxicos de bilirrubina no sistema auditivo, pela audiometria de resposta auditiva evocada de tronco cerebral.

Método

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisa e de Aplicação em Animais Experimentais da Faculdade de Medicina. Obtivemos aprovação do comitê de ética em pesquisa (nº G.U.ET-12.001).

Foram criados três grupos: experimental, placebo e controle, e, em cada grupo, foram alocados seis ratos neonatos. O número de ratos em cada grupo foi limitado pelo comitê de ética. Um otorrinolaringologista realizou exames endoscópicos das orelhas de todos os animais.

Grupo experimental

O grupo experimental foi composto por seis ratos albinos Wistar machos neonatos com hiperbilirrubinemia, pesando entre 18-20 g (média: 18,33 g). Foi criado um Modelo de Hiperbilirrubinemia em Rato para o grupo experimental.

O método para o estabelecimento da hiperbilirrubinemia foi similar a procedimentos já publicados.⁹ A bilirrubina (Sigma, St. Louis, MO; B4126) foi armazenada em local escuro, e a solução foi preparada imediatamente antes da injeção. A bilirrubina foi descongelada em 0,1% M NaOH, exatamente como descrito em Hansen et al.,⁸ estabilizada com BSA e diluída com tampão de Krebs-Ringer (pH: 7,4). Determinamos a concentração de bilirrubina em 3 mg/mL e a solução preparada foi preservada à sombra à temperatura de +40°C. Cada animal no grupo experimental recebeu uma injeção intraperitoneal de bilirrubina, 50 mg/kg no 7º e 10º dias do pós-natal. Antes da 1ª injeção de bilirrubina e 24 horas após a 1ª e 2ª injeções, foram efetuadas determinações por Bilirrubinometria Transcutânea (BTc) sobre a pele, para determinação do nível de bilirrubina. No 21º dia, testes auditivos eletrofisiológicos e BTc foram realizados em seguida à anestesia intramuscular (50 mL/kg de quetamina e 10 mL/kg de xilazina). Em seguida, os ratos foram eutanasiados por coleta de sangue intracardíaco sob anestesia profunda. Determinamos quantitativamente o nível sérico de bilirrubina na amostra do sangue intracardíaco coletado; os valores foram comparados com os resultados da BTc.

Grupo placebo

O grupo de placebo foi composto por seis ratos albinos Wistar machos neonatos pesando entre 18-20 g (média: 18,3 g). Como solução de placebo, empregamos BSA e 24 mg/mL de tampão de Krebs-Ringer (pH: 7,5). A solução preparada foi preservada à sombra, na temperatura +40 °C. Para que fosse determinado se essa solução tinha efeito no sistema auditivo dos ratos, uma solução preparada sem bilirrubina foi aplicada exatamente na mesma dose usada no grupo experimental. A solução de placebo foi administrada com o mesmo procedimento utilizado nos ratos do grupo experimental, e seguindo os mesmos processos.

Grupo controle

O grupo de controle foi composto por seis ratos albinos Wistar machos neonatos pesando entre 18-20 g (média: 19 g). Ao contrário do que foi feito nos grupos experimental e placebo, os ratos do grupo de controle não receberam injeção. Mas, para que fossem determinados seus níveis de bilirrubina, foram realizadas avaliações coordenadas, tendo sido seguidos os períodos determinados para os grupos experimental e placebo, e os animais foram submetidos aos mesmos processos.

Teste de resposta auditiva evocada de tronco cerebral

Neste estudo, as avaliações por RAETC dos ratos foram realizadas com o sistema Navigator Pro Model (versão 2.2.0) (Bio-Logic Systems Corp.). Para isso, utilizamos estímulo clique na frequência de 13 por segundo, janela de análise de

10 ms, média de 1.000 varreduras e filtração de 100-1.500 Hz. As mudanças na intensidade foram efetuadas de acordo com as respostas obtidas nos registros do nível de intensidade de 70 dB NA. Para que fosse determinada a existência de padrão microfônico coclear (MC), foi aplicada a mudança de polaridade de condensação (+) e de rarefação (-) na mesma intensidade, em ambas as orelhas. Para o *scan* dos limiares auditivos, em conformidade com o que é aconselhável no estímulo clique, o procedimento teve continuidade com a polaridade de rarefação (-).

Determinação da bilirrubina transcutânea

A bilirrubinemia transcutânea (BTc) foi obtida com o aparelho Minolta Air Shields Jaundice Meter JM-101 (Minolta Corero Co., Osaka, Japão). A determinação da BTc foi realizada na área dorsal dos ratos. Antes de ser usado, o medidor passou por manutenção técnica e calibração. Durante as mensurações, foi manufaturada uma placa de acrílico para evitar lesão aos ratos, que poderia ser causada pela pressão de aplicação da sonda.

Determinação da bilirrubina total sérica

Os níveis séricos totais de bilirrubina foram analisados por meio de *kits* comerciais (Roche) em sistemas autoanalisadores (Roche/Integra-800). O princípio para a determinação da bilirrubina total desse *kit* é o método diazo, baseado na determinação da quantidade de azobilirrubina, que é o resultado da reação da bilirrubina com o ácido sulfanílico diazotado.¹⁰

Avaliação estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS for Windows (versão 16.0). Os resultados da BTc empregados na determinação dos níveis de bilirrubina nos grupos foram comparados com os achados de BTs (bilirrubina total sérica) e da RAETC para as diferenças na avaliação da audição nos grupos. Foi empregada a análise de variância de Kruskal-Wallis para distribuições não normais. Assumimos um nível de significância de $p < 0,05$. Aplicamos o teste U de Mann-Whitney para testar a significância de diferenças pareadas com uso da correção de Bonferroni com fins de ajustamento para múltiplas comparações ($0,05/3 = 0,016$). Adotamos um nível geral de erro do tipo I de 5% para a inferência da significância estatística. Calculamos o coeficiente de correlação das relações entre as variáveis nos grupos, e aplicamos o teste de Spearman para cálculo do significado estatístico.

Resultados

Níveis de bilirrubinometria transcutânea e de bilirrubina total sérica

Embora não tenha sido observada significância estatística ($p > 0,05$) para a comparação dos grupos em termos de resultado da BTc (tabela 1) antes da injeção de bilirrubina, os resultados para essa variável, obtidos 24 horas depois da 1ª e 2ª injeções de bilirrubina, demonstram a presença de um nível estatisticamente mais elevado de bilirrubina ($p < 0,05$)

nos ratos que compuseram o grupo experimental, em comparação com os ratos nos grupos de placebo e controle. Ao compararmos a BTS entre os grupos, observamos que essa variável foi mais alta (com significância estatística) no grupo experimental, em comparação com os grupos de placebo e controle. Também observamos uma relação positiva, forte e estatisticamente significativa entre o valor da BTc obtido antes da eutanásia e o valor de BTS nos grupos experimental, placebo e controle.

Respostas auditivas evocadas do tronco cerebral

Resultados dos limiares

Para a comparação da RAETC entre os grupos, foi empregada uma análise de variância com um fator (*one-way ANOVA*). De acordo com os resultados da análise, enquanto a média dos limiares da RAETC para a orelha direita não demonstrou qual-

quer diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), na orelha esquerda observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Essa diferença é resultado do fato de a intensidade do limiar auditivo da orelha esquerda nos ratos do grupo experimental ser mais elevada, em comparação com os outros dois grupos ($p < 0,016$) (tabelas 1 e 2). Para testar a relação entre os valores de BTS no grupo experimental e os limiares da RAETC, calculamos o coeficiente rho de Spearman entre as variáveis. De acordo com os resultados, não existe, nos grupos, um nível significativo de relação entre os limiares da RAETC para as orelhas esquerda e direita com o valor de BTS. Na avaliação da existência de MC no padrão da RAETC obtido dos grupos, quatro aspectos se destacaram. Categorizamos os achados de MC levando em conta esses aspectos observados. Na Categoria 1 (fig. 1), MC não foi alcançado com o padrão normal da RAETC. Na Categoria 2 (fig. 2), observamos MC sem a segunda onda

Tabela 1 Valores de BTc, BTS (mg/dl) e limiares da RAETC (dB NA) de ratos

| Ratos | Grupos | BTc1 | BTc2 | BTc3 | BTc4 | BTS | RAETC Orelha direita | RAETC Orelha esquerda |
|-------|-------------|------|------|------|------|------|----------------------|-----------------------|
| 1 | Experimento | 0,01 | 0,89 | 0,72 | 0,56 | 0,61 | 30 | 40 |
| 2 | | 0,01 | 0,86 | 0,62 | 0,4 | 0,23 | 30 | 30 |
| 3 | | 0,02 | 0,92 | 0,7 | 0,2 | 0,15 | 10 | 10 |
| 4 | | 0,01 | 0,96 | 0,69 | 0,5 | 0,58 | SR | SR |
| 5 | | 0,03 | 0,72 | 0,4 | 0,28 | 0,23 | 20 | 30 |
| 6 | | 0,02 | 0,9 | 0,74 | 0,62 | 0,69 | 40 | 50 |
| 1 | Placebo | 0,01 | 0,03 | 0,02 | 0,38 | 0,46 | 20 | 0 |
| 2 | | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,4 | 0,43 | SR | SR |
| 3 | | 0,02 | 0,05 | 0,04 | 0,28 | 0,33 | 20 | 20 |
| 4 | | 0,02 | 0,02 | 0,05 | 0,22 | 0,3 | -10 | 0 |
| 5 | | 0,01 | 0,05 | 0,03 | 0,38 | 0,44 | 10 | 10 |
| 6 | | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,3 | 0,42 | 10 | 10 |
| 1 | Controle | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | SR | SR |
| 2 | | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,15 | 0,17 | 20 | 10 |
| 3 | | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,1 | 0,17 | 10 | 20 |
| 4 | | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 10 | 20 |
| 5 | | 0,02 | 0,02 | 0,04 | 0,09 | 0,15 | 10 | 10 |
| 6 | | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,1 | 0,17 | 10 | 0 |

BTc1, antes da injeção de bilirrubina; SR, sem resposta; BTc2 e 3, valores de 24 horas depois da 1ª e 2ª injeção de bilirrubina; BTc4, valor antes da eutanásia.

Tabela 2 Limiar médio da RAETC nas orelhas direita e esquerda (dB NA)

| | Grupo | Média | DP | Mediana | Mín-Máx |
|-----------------|----------|-------|-------|---------|---------|
| Orelha direita | Controle | 12,00 | 4,47 | 10 | 10-20 |
| Limiar da RAETC | Placebo | 10,00 | 12,25 | 10 | -10-20 |
| | Estudo | 26,00 | 11,40 | 30 | 10-40 |
| Orelha esquerda | Controle | 12,00 | 8,37 | 10 | 10-20 |
| Limiar da RAETC | Placebo | 8,00 | 8,37 | 10 | 0-20 |
| | Estudo | 32,00 | 14,83 | 30 | 10-50 |

(o limiar da RAETC foi considerado como sendo o a mais baixa intensidade em que estava presente um pico II de resposta reprodutível definido). Avaliamos como Categoria 3 (fig. 3) aquela obtida na 2ª onda com o MC. Finalmente, avaliamos como Categoria 4 (fig. 4) a morfologia de onda quebrada com inclusão da 2ª onda com MC.

Discussão

A hiperbilirrubinemia é problema de saúde importante em neonatos. O sistema auditivo também é sensível à toxicidade por bilirrubina. As lesões nas áreas auditivas centrais já foram definidas em termos anatômicos e funcionais, tanto em animais como em humanos com hiperbilirrubinemia. No entanto, os efeitos fisiológicos e o neuromecanismo das lesões causadas pela hiperbilirrubinemia nos órgãos auditivos periféricos ainda são mistérios a serem desvendados.

Foi definido na literatura que o DENA pode ser observado em um terço a metade dos casos com níveis altos de hiperbilirrubinemia.^{11,12} A DASN também pode ser observada em casos de hiperbilirrubinemia (12,8%).⁵

A toxicidade da bilirrubina está intimamente relacionada à BTS. Embora se observe alta correlação entre o nível de bilirrubina e DASN em humanos, essa correlação diminui em casos de DENA, muito embora, em níveis superiores a 20 mg/dL, ocorra um aumento na possibilidade de observação de DENA.³

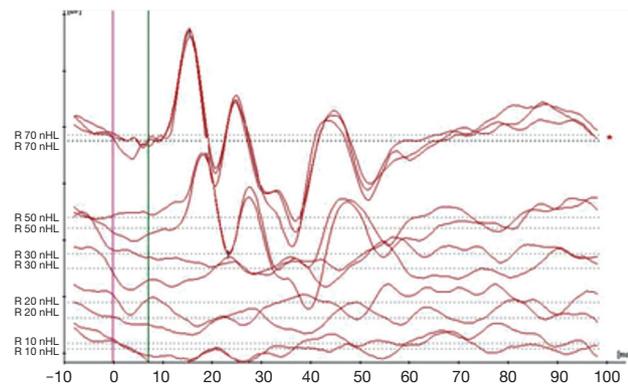


Figura 1 Exemplo para a Categoria 1 (padrão de RAETC normal).

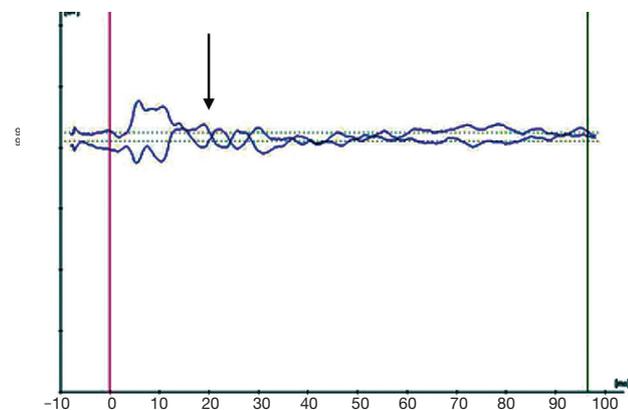


Figura 2 Exemplo para a Categoria 2 (padrão microfônico coclear sem limiar da RAETC).

São poucas as publicações que definem diferenças tão nítidas e a relação com doenças em modelos animais. Devido às dificuldades e à limitação em encontrar e desenvolver modelos animais, é tarefa difícil determinar com clareza os níveis de bilirrubina e as doenças resultantes dessa situação.¹³

No desenvolvimento do modelo de rato com hiperbilirrubinemia, frequentemente se recorre à injeção de bilirrubina, devido à facilidade de acesso e de aplicação, e também pela facilidade de obtenção da neurotoxicidade, pela absorção pelo sistema circulatório em curto período de tempo.^{13,14} Em estudo realizado em 2011, Gao et al.¹⁴ demonstraram que a aplicação de bilirrubina livre é eficiente em termos de utilização, tanto para a hiperbilirrubinemia como para a formação de DENA. Por essa razão, no presente estudo demos preferência à injeção intra-abdominal de bilirrubina no desenvolvimento do modelo de rato com hiperbilirrubinemia.

Hai Bo Ye et al.¹³ afirmam que, em casos nos quais foi injetada uma pequena dose única de bilirrubina em modelos animais, a lesão não foi duradoura e, por essa razão, doses altas e repetidas podem ser mais efetivas para determinar os efeitos da hiperbilirrubinemia a longo prazo. Contudo, os pesquisadores também enfatizam o fato de haver maior risco de mortalidade com essas manipulações. No estudo, já corroborado por pré-estudos, utilizamos o modelo de Hansen et al.,⁸ com determinação da dose de bilirrubina apropriada para o peso dos ratos neonatos e que não resultasse em mortalidade.

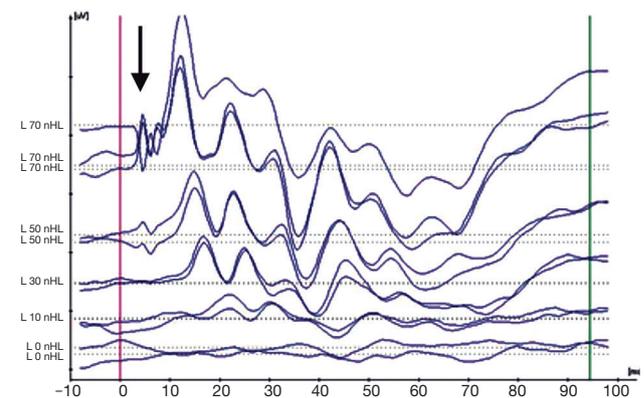


Figura 3 Exemplo para a Categoria 3 (RAETC normal com padrão microfônico coclear).

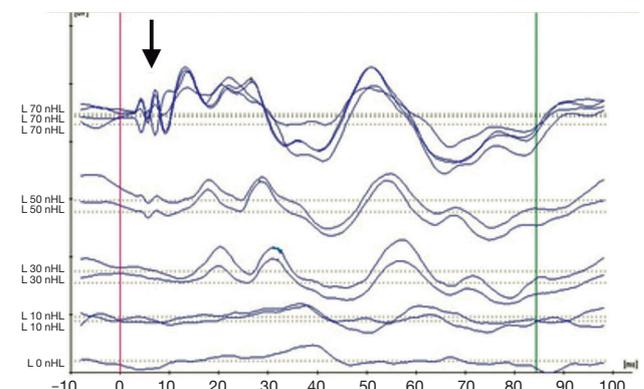


Figura 4 Exemplo para a Categoria 4 (morfologia de onda quebrada, inclusive a 2ª onda microfônica coclear).

De acordo com Wennberg et al.,¹⁵ em decorrência da insuficiência de métodos de abordagem na monitorização de BTS em animais neonatos experimentais, é tarefa difícil estabelecer uma relação entre nível de bilirrubina e neurotoxicidade. Na literatura, não existem publicações que definam BTS em termos de ratos neonatos. As razões mais importantes para tal cenário são o baixíssimo volume de sangue em ratos neonatos (p. ex., um volume de aproximadamente 1 cc em ratos com uma semana de idade) e que esses animais morrem por ocasião da coleta do sangue. Isso também gera um importante problema ético. Mas, o método da BTc utilizado para determinar o nível de bilirrubina em humanos - um procedimento não invasivo - também pode ser utilizado tanto em ratos como em neonatos. Segundo a literatura, os resultados da BTc são similares aos do nível sérico da bilirrubina total. Embora seja prática mais confiável observar a BTS no sangue, constatou-se que BTc pode ser empregada como alternativa.¹⁶ No estudo, para que fossem determinados os níveis de bilirrubina dos ratos, foram realizadas determinações periódicas pelo método da bilirrubinometria transcutânea até o sacrifício dos animais. Comparamos o nível de bilirrubina determinado pelas mensurações antes do sacrifício dos animais e das BTSs no sangue coletado pelo método intracardiaco em seguida à eutanásia, tendo sido determinada uma relação significativa, compatível com os achados da literatura.

Alguns pesquisadores relatam que os valores de BTc alcançam o nível máximo 24-48 horas após a injeção de bilirrubina em ratos albinos Wistar, e que esses valores diminuem com o passar do tempo.^{8,9} De acordo com os dados da BTc obtidos no estudo, o nível significativamente mais alto de bilirrubina no grupo experimental, em comparação com os outros grupos, é indicador importante da proximidade do nível de toxicidade por bilirrubina. O aumento relativo na determinação da BTc antes do sacrifício em todos os grupos pode ser explicado pela variabilidade nos valores de bilirrubina no sangue até a idade adulta.

Em neonatos, frequentemente se dá preferência à RAETC na determinação do efeito da toxicidade por bilirrubina no sistema auditivo. A RAETC, que é empregada na avaliação da sensibilidade auditiva, é preferida em neonatos por ser um método objetivo e não invasivo, e por ser mais confiável em comparação a outros métodos de testes e de determinação do MC na identificação de DENA.¹⁷⁻¹⁹

Nos estudos realizados em ratos com hiperbilirrubinemia, embora tenham sido avaliadas diferenças como alongamento da latência e diminuição da amplitude na RAETC, também efetuamos a avaliação do limiar auditivo, juntamente com essas variáveis; e observamos a ocorrência de aumentos significativos nos limiares das RAETCs dos animais.^{13,14,19,20} No estudo, embora tenhamos determinado valores para dados e morfologias próximos à normalidade nos ratos do grupo de controle (com a exceção de um rato), observamos aumento nos limiares dos achados da RAETC e deterioração na morfologia nos grupos de placebo e experimental. Neste último grupo, embora tenhamos obtido achados compatíveis no registro do MC e DENA de um rato em uma orelha, não foi possível captar a resposta da RAETC sem registro do MC na outra orelha. Nos outros ratos, observamos deteriorações na RAETC em diferentes padrões.

Nesses animais, o estabelecimento das ondas da RAETC difere do que ocorre em humanos. Em humanos, a 1ª e

2ª ondas têm origem no VIII nervo craniano, e a 3ª tem origem no NC mas, sabe-se que, em ratos, a 1ª e 2ª ondas se originam do NC, e a 3ª no COS.²¹⁻²³ Na avaliação morfológica realizada nos ratos do grupo experimental, acreditamos que as deteriorações observadas no NC também causem deteriorações na morfologia das RAETCs.^{13,14,19} Shapiro et al.²⁴ afirmam que, em ratos Gunn, a toxicidade aguda por bilirrubina altera significativamente a RAETC nas primeiras quatro horas.

Nos estudos realizados em neonatos com hiperbilirrubinemia, foi definida uma melhora espontânea em cerca de 50% dos animais, sem qualquer intervenção nos padrões em que RAETC não foi obtida e em que houve observação de MC.¹⁶ Além disso, a lesão nervosa no tronco cerebral auditivo que provoca a alteração na RAETC diminui a sincronização formada pela ativação dos neurônios auditivos. Portanto, o potencial de membrana dos neurônios auditivos diminui e ocorre corrupção da função nervosa no tronco cerebral auditivo, causada pela hiperbilirrubinemia.^{13,14,19,20,25} Em nosso estudo, as injeções de bilirrubina foram aplicadas antes da formação da barreira hematoencefálica nos ratos neonatos. Considerando tal fato e a necessidade de cuidados maternos até a vida adulta, além do maior risco de mortalidade quando tais animais são afastados de suas mães ou durante a anestesia, não realizamos as avaliações por RAETC efetuadas imediatamente após as injeções. Por essa razão, também não foram avaliados o efeito agudo da toxicidade pela bilirrubina e seu seguimento.

Na literatura, enfatiza-se a dificuldade de um seguimento prolongado em estudos animais, e também vale a pena mencionar que não existem resultados relacionados a esse aspecto. No nosso estudo, depois da 2ª dose injetada, esperamos por 11 dias, até que os ratos alcançassem a idade adulta. Durante esse período, acredita-se que ocorra diminuição dos efeitos potenciais da hiperbilirrubinemia. Mas, embora o efeito da hiperbilirrubinemia tenha diminuído (como também pôde ser observado no estudo), em decorrência da obtenção de limiares de alta intensidade da RAETC que acompanharam os níveis de bilirrubina, acredita-se que esse evento tenha causado deterioração na morfologia das ondas e na possibilidade de se obter achados de DENA e/ou RAETC.

Podwall et al.²⁶ relatam que, na ausência de fatores de risco, obtiveram um padrão de DENA na orelha esquerda acompanhado de achados radiológicos normais. Esses autores referem também que, embora o efeito tóxico da bilirrubina tenha sido sistêmico, também é possível observar resultados unilaterais, dependendo da localização do envolvimento.

Durante o desenvolvimento do nosso modelo, seguimos as instruções de Hansen et al.,⁸ uma vez que o tipo de rato e a bilirrubina em pó utilizada foram os mesmos empregados para provocar hiperbilirrubinemia. Considerando que, na literatura, a mesma solução tem sido utilizada em grupos placebo, não foi realizado um pré-estudo relacionado aos efeitos da solução no sistema auditivo. No entanto, na avaliação dos achados do grupo placebo, resultados similares foram obtidos nas avaliações da RAETC de alguns ratos, em comparação com os ratos no grupo experimental.

Quando se leva em consideração que os valores da BTS não são altos na BTc desse grupo, pode-se pensar que a solução também é efetiva no sistema auditivo. Esse achado, que pode ser considerado como o ponto fraco do estudo, também fornece informações muito valiosas para a compreensão do

efeito real da hiperbilirrubinemia no sistema auditivo, mediante o estudo do efeito da solução que será utilizada na formação de hiperbilirrubinemia em modelos animais.

Tal como na hipótese do estudo, promovemos aumento dos níveis sanguíneos de bilirrubina com a injeção de doses tóxicas desse agente em ratos neonatos, e observamos que a hiperbilirrubinemia pode causar DASN e/ou DENA. Além disso, também vale a pena mencionar, a observação de que os efeitos da hiperbilirrubinemia podem se expressar em diferentes padrões na RAETC.

Conclusão

Em nosso estudo, após o estabelecimento de um modelo de ratos neonatos com hiperbilirrubinemia por meio da administração de uma dose tóxica de bilirrubina, pudemos fazer uma analogia dos efeitos do nível da bilirrubina em bebês e crianças de risco, e analisar as respostas eletrofisiológicas da audição e as diferenças morfológicas.

Foi observado que a hiperbilirrubinemia pode aumentar o limiar da RAETC em seus efeitos de longo prazo e, também, que ela deteriora a morfologia das ondas. Levamos em consideração que a deterioração da morfologia das ondas na RAETC pode estar ligada à diminuição da sincronização formada pela lesão nervosa no tronco cerebral auditivo e à ativação dos neurônios auditivos. Também foi possível notar que a hiperbilirrubinemia pode causar DENA e DASN, e que MC pode ser observado sem a resposta da RAETEC e, finalmente, que, em aplicações sistêmicas, pode existir não só estabelecimento bilateral, mas também unilateral.

Financiamento

Todo o apoio financeiro para o presente estudo foi providenciado pelos autores.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Oysu Ç, Aslan I, Ulubil A, Başerer N. Incidence of cochlear involvement in hyperbilirubemic deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002;111:1021-5.
- Öğün B, Şerbetçioğlu B, Duman N, Özkan H, Kırkım G. Long-term outcome of neonatal hyperbilirubinemia: subjective and objective audiological measures. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2003;28:507-13.
- Nickisch A, Massinger C, Ertl-Wagner B, von Voss H. Pedaudiologic findings after severe neonatal hyperbilirubinemia. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009;266:207-12.
- Akyıldız N. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi, vol. 1. Ankara: BilimselTıp Press; 2002. p. 215-332.
- Boo NY, Rohani AJ, Asma A. Detection of sensorineural hearing loss using automated auditory brainstem-evoked response and transient-evoked otoacoustic emission in term neonates with severe hyperbilirubinaemia. *Singapore Med J.* 2008;49:209-14.
- Sharma A, Cardon G, Henion K, Roland P. Cortical maturation and behavioral outcomes in children with auditory neuropathy spectrum disorder. *Int J Audiol.* 2011;50:98-106.
- Nunez-Batalla F, Carro-Fernandez P, Antuna-Leon ME, Gonzalez-Trelles T. Incidence of hypoacusia secondary to hyperbilirubinaemia in a universal neonatal auditory screening programme based on otoacoustic emissions and evoked auditory potentials. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2008;59:108-13.
- Hansen T, Tommarello S, Allen J. Subcellular localization of bilirubin in rat brain after in vivo i.v. administration of [3H]bilirubin. *Pediatr Res.* 2001;49:203-7.
- Mesner O, Miller MJ, Iben SC, Prabha KC, Mayer CA, Haxhiu MA, et al. Hyperbilirubinemia diminishes respiratory drive in a rat pup model. *Pediatr Res.* 2008;64:270-4.
- Balistreri WF, Shaw LM. Liver function. Em: Tietz NW, editor. *Fundamentals of clinical chemistry.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1987.
- Madden C, Rutter M, Hilbert L, Greinwaid JH Jr, Choo DI. Clinical and audiological features in auditory neuropathy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:1026-30.
- Rance G, Briggs RJ. Assessment of hearing in infants with moderate to profound impairment: the Melbourne experience with auditory steady-state evoked potential testing. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 2002;189:22-8.
- Ye HB, Shi HB, Wang J, Ding DL, Yu DZ, Chen ZN, et al. Bilirubin induces auditory neuropathy in neonatal guinea pigs via auditory nerve fiber damage. *J Neurosci Res.* 2012;90:2201-13.
- Gao X, Yang X, Zhang B. Neuroprotection of taurine against bilirubin-induced elevation of apoptosis and intracellular free calcium ion in vivo. *Toxicol Mech Methods.* 2011;21:383-7.
- Wennberg RP, Ahlfors CE, Bhutani VK, Johnson LH, Shapiro SM. Toward understanding kernicterus: a challenge to improve the management of jaundiced newborns. *Pediatrics.* 2006;117:474-85.
- Vreman HJ, Wong RJ, Chan ML, Young BW, Stevenson DK. Transcutaneous bilirubinometry: a noninvasive tool for studying newborn jaundiced rats before and after exposure to light. *Pediatr Res.* 2006;59:203-9.
- Ngo RY, Tan HK, Balakrishnan A, Lim SB, Lazaroo DT. Auditory neuropathy/auditory dys-synchrony detected by universal newborn hearing screening. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70:1299-306.
- Wilson WJ, Sharp KJ, Hansen C, Kwong P, Kelly A. Especially prominent cochlear microphonic activity in the auditory brainstem response. *Int J Audiol.* 2007;46:362-73.
- Shapiro SM, Nakamura H. Bilirubin and the auditory system. *J Perinatol.* 2001;21:59-62.
- Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol.* 2003;29:410-21.
- Overbeck GW, Church MW. Effects of tone burst frequency and intensity on the auditory brainstem response (ABR) from albino and pigmented rats. *Hear Res.* 1992;59:129-37.
- Parham K, Sun XM, Kim D. Noninvasive assessment of auditory function in mice: auditory brainstem response and distortion product otoacoustic emissions. Em: Willott JP, editor. *Handbook of mouse auditory research: from behavior to molecular biology.* New York: CRC Press; 2001.
- Alvarado JC, Fuentes-Santamaria V, Jareño-Flores T, Blanco JL, Juiz JM. Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: a study in Wistar rats. *Neurosci Res.* 2012;73:302-11.
- Shapiro SM, Te Selle ME. Cochlear microphonics in the jaundiced Gunn rat. *Am J Otolaryngol.* 1994;15:129-37.
- Jiang ZD, Brosi DM, Wilkinson AR. Changes in BAER wave amplitudes in relation to total serum bilirubin level in term neonates. *Eur J Pediatr.* 2009;168:1243-50.
- Podwall A, Podwall D, Gordon TG, Lamendola P, Gold AP. Unilateral auditory neuropathy: case study. *J Child Neurol.* 2002;17:306-9.