

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

GUSTAVO COELHO LOPES

*Caracterização das Respostas Evocadas Auditivas em Regime
Permanente no Mesencéfalo de Ratos Wistar*

Belo Horizonte

2011

GUSTAVO COELHO LOPES

*Caracterização das Respostas Evocadas Auditivas em Regime
Permanente no Mesencéfalo de Ratos Wistar*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes, PhD

Belo Horizonte

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 133/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Potenciais evocados auditivos de Estado Estável no Estudos dos substratos neurais envolvidos nos processos de aprendizagem e memória**", que tem como responsável(is) **Márcio Flávio Dutra Moraes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 08/2010**.

Este certificado expira-se em **11/ 08/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 133/2010**, related to the project entitled "**Auditory steady state evoked responses in the study of the neural substrates involved in memory and learning process**", under the supervisors of **Márcio Flávio Dutra Moraes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 11, 2010**.

This certificate expires in **August 11, 2015**.

Belo Horizonte, 13 de Agosto de 2010.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Neurociências do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas, Bloco A4 sala 168/240, da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio das seguintes agências de fomento:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha adorada família, sem vocês nada
aconteceria.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Márcio Moraes pela oportunidade, ensinamentos e pelo forte apoio.

Agradecimento especial ao meu grande amigo Michel Bernanos cujas contribuições foram essenciais para a conclusão deste.

Agradeço aos meus pais pelas palavras de consolo durante os momentos difíceis.

Agradeço ao Flávio (“Cabronzito”), pelos estímulos durante os momentos de desânimo.

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

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	1
Fisiologia da Audição	1
Frequência característica dos neurônios auditivos.....	3
Vias auditivas aferentes	4
Potenciais evocados	6
Potencial Evocado Auditivo	9
Potenciais Evocados Auditivos Transitórios.....	9
Respostas Evocadas Auditivas em Regime Permanente.....	13
Comparações entre Potenciais Evocados Auditivos Transitórios e Respostas Evocadas Auditivas em Regime Permanente	17
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVOS	22
<i>Objetivos Gerais</i>	22
<i>Objetivos específicos</i>	22
MATERIAIS E MÉTODOS (GERAL)	23
Animais.....	23
Confecção dos eletrodos	23
Cirurgia	24
Histologia.....	24
Estímulo Auditivo.....	26
Aquisição dos dados	27
Processamento digital dos sinais.....	28
Quantificação da intensidade do som na extremidade da barra perfurada	Erro!
Indicador não definido.	
Capítulo 1 - Varredura de Intensidade Sonora	29

Pergunta científica	29
Descrição dos Procedimentos Experimentais	29
Animais	29
Desenho experimental	29
Registro da Intensidade do Estímulo.....	30
Critérios de Processamento do Sinal.....	30
Análise estatística	31
Resultados	31
Espectrograma do EEG	31
Gráfico Polar e Espectrograma para cada animal dos Grupos Experimental e Controle.....	33
Análise Estatística	35
<i>Discussão</i>	35
Capítulo 2 – Varredura Discreta de Moduladora	38
Pergunta Científica	38
Descrição dos Procedimentos Experimentais	38
Animais	38
Desenho experimental.....	38
Correlação Histológica entre os Pontos de Registro	39
Critérios de Processamento do Sinal.....	40
Análise estatística	40
Resultados	40
Espectrograma do EEG	40
Gráficos Polares e Posições Anatômicas dos Sítios de Registro das REARPs.....	43
Análise Estatística	46
Discussão.....	47
Capítulo 3 – Varredura Contínua de Moduladora	50
Pergunta Científica	50
Descrição dos Procedimentos Experimentais	50
Animais	50
Desenho experimental	50
Critérios de Processamento do Sinal.....	51
Resultados	51
Espectrograma do EEG	51

Discussão	60
Capítulo 4 – Varredura de Portadora	62
Pergunta Científica	62
Descrição dos Procedimentos Experimentais	62
Animais	62
Desenho experimental	62
Registro da Intensidade do Estímulo.....	63
Critérios de Processamento do Sinal.....	64
Resultados.....	64
Espectrograma do EEG	64
Médias dos Grupos	76
Discussão	76
CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 A) Tonotopia da membrana basilar na cóclea. Observe a especificidade para baixas frequências no ápice da cóclea e para altas frequências na base da cóclea. B) Onda viajante na cóclea: amplitude máxima e imagem topográfica em 3-D. Adaptado de (Despoupoulos e Silbernagl 2003). 2

Figura 2: Todos os níveis do SNC apresentam componentes do sistema auditivo. A é uma vista dorsal do tronco encefálico, do ângulo assinalado pela luneta no pequeno encéfalo acima. No encéfalo estão também representados os planos de corte (números circulados) mostrados em B. Tanto em A como em B, os neurônios auditivos estão representados em preto (os aferentes) e vermelho (os eferentes). Adaptado de (Lent 2004). 5

Figura 3 - Em (A) são mostrados, sobrepostas, cinquenta respostas à estimulação do nervo ulnar no punho esquerdo. O ruído do estímulo, no início do lado esquerdo do registro é seguido por uma seqüência de ondas, cada uma com período de cerca de 20ms. Em (B) as diferenças de potencial entre os mesmos eletrodos na cabeça foram registrados, mas nenhum estímulo foi aplicado. Não ocorreram desvios comparáveis com os de (A). As escalas de tempo mostram intervalos de 5 e 20 ms. Marcas de calibração no final do lado direito de (B) mostram a deflexão produzida em cada canal por uma diferença de potencial de $20\mu\text{V}$. Adaptado de (Dawson 1947). 7

Figura 4 – Promediação. As ondas representam ondas resultantes da promediação do EEG após um estímulo sensorial. Cada número à esquerda representa o número de trechos pós-estímulo que foram utilizados na promediação. Observe quanto maior o número de trechos utilizados o potencial evocado (P100) tende a ficar mais visível e a atividade aleatória de fundo tende a zero. 8

Figura 5– Exemplos de ondas utilizadas como estímulo para registro dos potenciais transitórios. (A) Clique: produzido por uma onda elétrica quadrada com $100\mu\text{s}$ de duração, contém um espectro de frequências sonoras amplo com maior concentração de altas frequências (B) “Tone bursts”: produzido por um tom puro com 50ms de duração apresentando um espectro de frequências mais estreito e em torno da frequência do tom. 10

Figura 6– Um eletrodo ativo posicionado sobre o vertex do crânio permite o registro dos potenciais evocados auditivos do nervo auditivo e tronco encefálico (potenciais evocados auditivos de curta latência, ondas I-V), e os das estruturas mais altas da via auditiva (potenciais evocados auditivos de média e longa latência). 10

Figura 7 – Tons AM e tons FM. A parte superior da figura mostra o estímulo acústico registrado por meio de uma orelha artificial Brüel e Kjaer 4152. Os sinais foram amostrados por 50ms a 20KHz. A parte inferior da figura mostra o espectro de amplitude utilizando uma taxa de 4KHz e uma janela de Hamming. A metade esquerda da figura mostra um tom AM de 1000Hz. A profundidade de modulação foi de 90% e a intensidade de 106.5 dB SPL. As bandas de energia próximo de 500 e 1500Hz resultam da digitalização e filtragem da onda moduladora senoidal. A metade da direita mostra um tom FM com uma portadora de 1000Hz. A profundidade de modulação foi de 50% (de 750Hz a 1250Hz) e a intensidade foi de 111dB SPL. Adaptado de (Picton et al. 1987b). 15

Figura 8 - Representação esquemática do protocolo de estimulação auditiva em que variamos a intensidade da onda sonora de mesma portadora e moduladora, porém, reduzindo a intensidade do estímulo aplicado na orelha do animal. Volumes: 1 (77,24 dB SPL), 2 (67,5 dB SPL), 3 (55,88 dB SPL), e 4 (53,78 dB SPL). 30

Figura 9 - O gráfico da variação dos estímulos demonstra o perfil linear desta variação. Volumes: 1 (77,24 dB SPL), 2 (67,5 dB SPL), 3 (55,88 dB SPL), e 4 (53,78 dB SPL)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 10– Espectrograma do EEG durante todo o período de registro apresentando o espectro até 200Hz. Observe os picos na frequência de modulação (41.99 Hz) e nas suas harmônicas para as diferentes intensidades de apresentação do estímulo..... 31

Figura 12 – Variação da Intensidade do Estímulo. Os animais de ambos os grupos, Experimental e Controle, foram submetidos a uma variação da intensidade do estímulo 53,78dB; 55.88dB; 67.5dB; 77.24dB. Resultados expressos como média ± EPM. Número de animais por grupo = 4. Two-way ANOVA, post-hoc Bonferoni. Comparação intragrupo (tubo aberto versus tubo fechado): ***p<0,001; **p<0,01..... 35

Figura 13 - Diagrama esquemático representando a escala temporal de administração do estímulo sonoro e realização do registro da atividade bioelétrica para cada frequência de modulação em cada um dos seis pontos de varredura dorso-ventral. O período compreendido entre o “início do som” e o “abafamento” corresponde ao período em que o tubo de borracha permaneceu aberto. O período compreendido entre o “abafamento” e o “final do som” corresponde ao período em que o tubo de borracha foi ocluído. Os períodos “silêncio” correspondem aos períodos em que a fonte sonora permaneceu desligada. Para cada um dos seis pontos da varredura dorso-ventral realizaremos os registros para cada uma das frequências de modulação. 39

Figura 14– Espectrograma do EEG para as diferentes frequências de modulação no sítio anatômico de melhor resposta em um determinado sujeito experimental. Na figura à esquerda,(A) o espectro do EEG evidencia o pico da resposta para a menor moduladora (41,99Hz) e suas harmônicas. À direita,(B) observamos os picos da resposta para as moduladoras 106,45Hz e 186,52Hz. 41

Figura 15 - Gráficos polares e espectrogramas da resposta evocada para cada frequência de modulação nas seis posições da varredura anatômica. O bloco superior (A) representa um dos animais do grupo Experimental e o inferior(B), do grupo Controle. Cada coluna representa uma frequência de modulação(da esquerda para direita: 41,99Hz;106,45Hz; 186,52Hz) e cada linha uma posição da varredura anatômica. 42

Figura 16- Representação da amplitude e dispersão de fase das respostas por meio do gráfico polar e suas respectivas posições anatômicas, para os períodos em que o tubo permanece aberto e ocluído em cada intensidade de apresentação do estímulo. Cada conjunto horizontal representa os dados de um animal. Os seis animais superiores representam o Grupo Experimental e os quatro inferiores o Grupo Controle. Nos gráficos polares, cada cor representa uma posição anatômica (azul-claro: posição 2; rosa: posição 3; verde: posição 4; amarelo: posição 5; azul-marinho: tubo ocluído para todos as posições anatômicas) e a distância dos pontos em relação ao centro, a amplitude da resposta na frequência de modulação. Cada coluna de gráficos correlaciona-se a uma frequência de modulação, respectivamente, da esquerda para direita: FM1, FM2, FM3. No Grupo Experimental as respostas apresentaram maior amplitude e uma menor dispersão de fase em relação ao Grupo Controle. À direita dos gráficos polares estão as correlações histológicas da posição anatômica dos eletrodos para cada animal. 44

Figura 17 - Variação da Frequência de Modulação do Estímulo. Os animais de ambos os grupos, Experimental e Controle, foram submetidos a uma variação da frequência de modulação do estímulo e a resposta foi registrada em quatro pontos do mesencéfalo. A metade da esquerda representa o Grupo Experimental e à direita o Grupo Controle. Cada gráfico representa a amplitude da resposta para cada uma das frequências de modulação, de cima para baixo: 41,99Hz; 106,45Hz; 186,52Hz. Resultados expressos como média ± EPM. Número de animais no Grupo Experimental: 6, e no Controle: 4. Two-way ANOVA, post-hoc Bonferoni. Comparação intragrupo (tubo aberto versus tubo fechado): ***p<0,001; **p<0,01. 46

Figura 18 - Representação esquemática do protocolo de estimulação auditiva usando onda sonora com variação contínua da moduladora (de 10Hz a 200Hz) mantendo-se a portadora fixa. 51

Figura 19– Espectrograma do EEG para varredura contínua de modulação. Durante o período de estimulação a REARP apresenta-se como um pico que se estende diagonalmente mostrando a variação do espectro de modulação da portadora num determinado ponto da varredura anatômica em um dos sujeitos experimentais. 51

Figura 20 – Espectrogramas do EEG para varredura contínua de modulação. Na figura superior (A) observamos a FFT do registro original, com os picos da RAERP aparecendo de forma diagonal no espectrograma do sinal o que ocorre devido a um aumento linear da moduladora a 1Hz/s. Assim ao longo do tempo o pico da resposta se desloca para o próximo valor inteiro na taxa de 1 por segundo resultando numa diagonal. Na figura inferior (B) representamos o mesmo espectrograma recortado desde o início da estimulação até o final sendo os limites superiores e inferiores em torno da frequência de modulação iguais a $FM \pm 10\text{Hz}$. No eixo da “Frequência de Modulação” o zero representa 10Hz, que é a frequência inicial da varredura contínua de moduladora. A resposta aparece como picos no centro da figura perdendo a aparência diagonal. Dessa forma é possível traçar o perfil da onda de resposta e comparar entre os diferentes pontos de registro e entre os diferentes animais. 53

Figura 21 – Perfil da onda resposta na varredura de modulação contínua. Para os animais do Grupo Experimental. Cada curva representa o perfil da onda de resposta após a o recorte do espectrograma da resposta original. Cada curva do gráfico representa um animal do grupo. E cada linha colorida representa a amplitude da resposta para cada valor da moduladora. As linhas negras são utilizadas como controle do algoritmo de recorte e representam os valores da amplitude do sinal nas frequências imediatamente acima e abaixo da moduladora. 56

Figura 22 – Sobreposição das curvas de melhor resposta para cada um dos seis animais do Grupo Experimental. Os valores de cada curva foi normalizado pelo valor da média de todos os pontos da respectiva curva. No eixo das abscissas os valores das frequências de modulação(Hz), nas ordenadas os valores de amplitude normalizados(mV^2). 57

Figura 23 - Perfil da onda re resposta na varredura de modulação contínua. Para os animais do Grupo Controle. Cada curva representa o perfil da onda de resposta após a o recorte do espectrograma da resposta original. Cada curva do gráfico representa um animal do grupo. E cada linha colorida representa a amplitude da resposta para cada valor da moduladora. As linhas negras são utilizadas como controle do algoritmo de recorte e

representam os valores da amplitude do sinal nas frequências imediatamente acima e abaixo da moduladora. 59

Figura 24 – Sobreposição das curvas de melhor resposta para cada um dos seis animais do Grupo Controle. Os valores de cada curva foi normalizado pelo valor da média de todos os pontos da respectiva curva. No eixo das abscissas os valores das frequências de modulação(Hz), nas ordenadas os valores de amplitude normalizados(mV²). 60

Figura 25 - Representação esquemática do protocolo de variação contínua da portadora mantendo-se moduladora fixa. 63

Figura 26 – Onda representativa da variação da intensidade do som na ponta da barra perfurada para a estimulação auditiva de variação de portadora em dB. Observe que o sistema de geração de som não reproduz o arquivo de áudio com intensidade sonora constante para este estímulo. 63

Figura 27 – Espectrograma do EEG para o estímulo de varredura contínua de portadora. Cada espectrograma corresponde a uma posição dorso-ventral da varredura anatômica de cima para baixo na sequência do primeiro ponto de registro intra-encefálico ao sexto ponto para um dos animais do Grupo Experimental. Observe o pico de resposta na faixa da moduladora no quarto ponto de varredura anatômica e uma maior quantidade de energia no início da estimulação, ou seja, para baixas frequências de portadora. 66

Figura 28 - Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Experimental. Cada gráfico representa um animal. Cada cor está relacionada a um dos seis pontos da varredura anatômica. Nas abscissas estão as frequências de portadora e nas ordenadas a amplitude da resposta. Observamos uma grande variação da amplitude e do perfil da resposta entre os animais. Na maioria deles a maior amplitude de resposta corresponde a baixas frequências de portadora. 70

Figura 29- Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Controle. Cada gráfico representa um animal. Cada cor está relacionada a uma das seis posições da varredura anatômica. 73

Figura 30- Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Experimental, à esquerda sem correção da intensidade da resposta pela curva da intensidade do estímulo, e à direita com correção para o mesmo animal. Cada cor está relacionada a uma posição da varredura anatômica. Observe que não houve alteração no perfil da onda, porém, houve apenas alteração na escala da onda de resposta. 74

Figura 31- Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Controle , à esquerda sem correção da intensidade da resposta pela curva da

intensidade do estímulo, e à direita com correção para o mesmo animal. Cada cor está relacionada a uma posição da varredura anatômica. Observe que não houve alteração no perfil da onda, porém, houve apenas alteração na escala da onda de resposta. 75

Figura 32– Média a amplitude das REARP para 10 bandas de portadora com largura de 1490Hz para a primeira, quarta e sexta posição da varredura anatômica. Na parte superior o Grupo Experimental(A) e na inferior o Controle (B)..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS

AM – Modulado em Amplitude

BERA – Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico

BMF – Melhor Frequência de Modulação

CI – Colículo Inferior

CETEA – Comissão de Ética em Experimentação Animal

CeBIO – Centro de Bioterismo

CF – Coerência de Fase

CMQ – Coerência Quadrática da Magnitude

EEG – Eletroencefalograma

ERP – Potenciais Evento Relacionados

FC – Frequência Característica

FFT – Transformada Rápida de Fourier

FM – Frequência de Modulação

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

PE – Potencial Evocado

PEA – Potencial Evocado Auditivo

PEA-CL – Potencial Evocado Auditivo de Curta Latência

PEA-ML – Potencial Evocado Auditivo de Média Latência

PEA-LL – Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência

REARP – Resposta Evocada Auditiva em Regime Permanente

SNC – Sistema Nervoso Central

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

As faixas tonotópicas ao longo da membrana basilar, dentro da cóclea, funcionam como um sistema de decomposição espectral do estímulo sonoro. Desta forma, os neurônios sensoriais da cóclea respondem a uma frequência característica de estimulação sonora e sua atividade depende da intensidade do estímulo. A resposta ao som ascende até o córtex pelas vias auditivas, gerando, ao longo do caminho, a atividade elétrica que compõe os **Potenciais Evocados Auditivos (PEAs)**. Os PEAs são uma importante ferramenta diagnóstica. Podemos dividir didaticamente os PEAs em dois grandes grupos em função da frequência dos estímulos: os Potenciais Evocados Auditivos Transitórios e as Respostas Evocadas Auditivas em Regime Permanente (REARP). As REARP utilizam um estímulo auditivo mais fisiológico e permitem uma avaliação mais rápida da integridade das vias auditivas, contudo, os aspectos biológicos das REARP são muito menos estudados do que os PEAs transitórios. Neste trabalho mapeamos os REARP na varredura anatômica do mesencéfalo de ratos Wistar (eletrodos monopolares de implante profundo) utilizando diferentes padrões de estímulo auditivo. E avaliamos uma possível aplicação deste método na localização das camadas tonotópicas do Colículo Inferior, por meio de tons modulados em amplitude. Observamos que a intensidade da resposta é diretamente proporcional à intensidade do estímulo, isto revela que existe uma faixa de intensidade ótima para registro destas respostas. Além disso, a frequência de modulação pode variar o pico de resposta de acordo com a posição anatômica. E frequências de modulação entre 70Hz e 120Hz apresentam uma maior estabilidade em relação a outras frequências. Sendo então sugeridas para a realização de estudos que usarão as REARP como ferramenta de quantificação de alterações fisiológicas. A capacidade de localização de sítios tonotópicos, talvez seja alcançada com o uso de eletrodos bipolares e passo de varredura anatômica menor.

ABSTRACT

Tonotopic bands along the basilar membrane within the cochlea, function as a system of spectral decomposition of the sound stimulus. Thus, the cochlear sensory neurons are responding to a characteristic frequency of sound stimulation and its activity depends on the intensity of the stimulus. The response to the sound ascends to the cortex by auditory pathways, generating along the way, electrical activity that makes part of the Auditory Evoked Potentials (AEPs). The AEPs are an important diagnostic tool and, lately, has been used in applications that go beyond the scope of the assessment of hearing. We can divide the AEPs didactically into two major groups according to the frequency of stimuli: Transient Evoked Potentials and Auditory Steady State Responses (ASSR). The ASSR use an auditory stimulus more physiological and allows a more rapid assessment of the integrity of auditory pathways in addition, however, the biological aspects of REAP are much less studied than the AEPs. In this work we mapped the ASSR in the midbrain of Wistar rats (monopolar electrodes implanted deep) by an anatomical scanning using different patterns of auditory stimuli. To evaluate a possible application of this method in the tonotopic location of the IC layers, we used amplitude modulated tones. We observed that the intensity of the response is directly proportional to the intensity of the stimulus, this shows that there is an optimal intensity range to record these responses. Moreover, the frequency modulation can vary the peak response according to anatomical position. And modulation frequencies between 70Hz and 120Hz show a greater stability compared to other frequencies. Since then suggested for studies that will use tool such as ASSR quantification of physiological changes. The ability to tonotopic location of sites might be achieved with the use of bipolar electrodes and lower anatomical scanning step.

INTRODUÇÃO

Fisiologia da Audição

Nos mamíferos, a transdução da pressão sonora em sinais neurais é realizada por meio de processos mecânicos, químicos e elétricos na cóclea (caracol, em grego), um órgão sensitivo complexo, que se encontra envolvido pelo osso mais resistente do corpo. Apenas no século XIX, as pesquisas de Alfonso Corti levaram a uma descrição mais precisa do funcionamento da cóclea, modificando a idéia de uma transdução simples de ondas de pressão. Após entrar na orelha pelo meato acústico externo, as ondas são guiadas pela parede deste canal até a membrana timpânica. O movimento desta membrana desloca os ossos da orelha média (na seqüência de acionamento: martelo, bigorna e estribo), os quais são responsáveis pela condução de energia sonora até a orelha interna. A conexão entre a platina do estribo e a cóclea se dá através da janela oval. De modo a otimizar a transferência de energia entre as orelhas externa e média, a membrana timpânica deve operar com a mesma pressão em ambas as faces. Essa equalização de pressão é realizada pela tuba auditiva, que liga a orelha média à nasofaringe e mantém a pressão atmosférica. Enquanto as orelhas externa e média são preenchidas de ar, a partir da janela oval a orelha interna é preenchida por líquido, configurando uma interface ar-fluido que provocaria uma perda de energia por reflexão. Entretanto, devido à membrana timpânica ser maior do que a janela oval, a redução de área entre estas duas superfícies leva a um aumento na pressão (que equivale à força dividida pela área) na entrada da cóclea, funcionando como um amplificador mecânico e compensando as perdas ocorridas na interface ar-fluido. Este mecanismo acrescenta em média 25 dB à eficiência auditiva, enquanto o efeito de alavanca da cadeia ossicular contribui aumentado em 2,5 dB a amplificação sonora (Ginsberg e White 1999). O órgão auditivo propriamente dito é a cóclea, uma estrutura em forma de espiral composta de duas voltas e meia nos seres humanos (aproximadamente 30 mm em adultos), localizada no interior do osso temporal. A cóclea consiste em uma câmara dividida em três compartimentos repletos de fluido, separados por duas membranas: a membrana de Reisner divide a câmara superior - a escala vestibular - da escala média, enquanto que a membrana basilar separa a escala média da escala timpânica. No ápice da cóclea, o helicotrema une as escalas vestibular e timpânica; assim, estas duas câmaras compartilham o mesmo fluido, formando uma via de passagem da

onda de pressão, ao modo de um tubo de extremidade aberta. Um deslocamento no estribo, relacionado ao estímulo acústico, produz uma movimentação do fluido dentro das duas espiras e meia da escala vestibular, transmitindo uma onda de compressão até o ápice da cóclea. Ao atingir o helicotrema, o sentido da onda é invertido, e a energia retorna através da escala timpânica, provocando um movimento correspondente ao longo da membrana basilar. Sustentado por esta membrana, encontra-se o órgão de Corti, que é o principal da audição. Devido à variação de reatância mecânica da membrana basilar desde a base (próxima à janela oval) até o ápice (próximo ao helicotrema), o deslocamento produzido ao longo do comprimento da membrana torna-se específico em relação à frequência característica da onda sonora: estímulos de alta frequência provocam um máximo movimento na extremidade basal da membrana, enquanto estímulos de baixa frequência provocam máximo deslocamento na extremidade apical (Figura 1A).

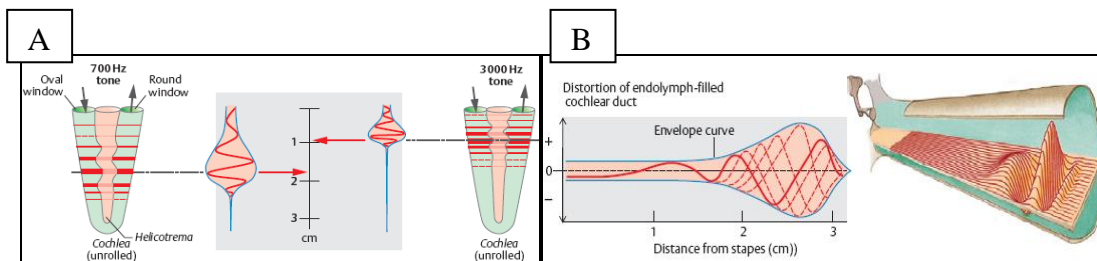


Figura 1 A) Tonotopia da membrana basilar na cóclea. Observe a especificidade para baixas frequências no ápice da cóclea e para altas frequências na base da cóclea. B) Onda viajante na cóclea: amplitude máxima e imagem topográfica em 3-D. Adaptado de (Despoupoulos e Silbernagl 2003).

Em função do estímulo auditivo, a característica física de reatância da membrana basilar produz uma vibração característica, na forma de uma onda viajante (Figura 1B). Desta forma, a membrana basilar pode ser modelada como uma série de filtros passa-faixa, agindo como um analisador de frequências para o sinal acústico de entrada (Geisler 1987). A movimentação da membrana basilar altera a excitação das células ciliadas internas, modulando sua frequência média de disparos e produzindo o impulso nervoso. As células ciliadas internas atuam como transdutores mecânico-neurais, quantificando o deslocamento da membrana basilar em informação para o sistema auditivo (Parkins 1983). Esta característica de distribuição da população neuronal em função da frequência é chamada de tonotopia, conferindo à membrana basilar as propriedades de um analisador mecânico de espectro.

Praticamente toda a informação sensorial auditiva que segue para o sistema nervoso central provém das células ciliadas internas. Sabe-se que a quase totalidade das 30.000 a 50.000 fibras nervosas que se distribuem da cóclea para o sistema nervoso central fazem contato com as células ciliadas internas, mas somente uma pequena parte das fibras auditivas (5-10%) faz sinapse com as células ciliadas externas. Embora existam aproximadamente três vezes mais células ciliadas externas do que internas, parece que as células externas transmitem pouca informação sensorial para o sistema nervoso central através de fibras aferentes. Estudos têm demonstrado que células ciliadas externas são móveis e podem alongar-se ou encurtar-se de forma lenta e sustentada ou oscilar rapidamente em frequências altas como 8 kHz (Brownell 1990). Assim, acredita-se que estas células ajam primariamente como um sistema motor mais do que como transmissor de entrada sensorial para a via auditiva central, com a sua motilidade contribuindo para a sensibilidade do órgão auditivo e para o mecanismo preciso de sintonia da membrana basilar. Este fenômeno é chamado de cóclea ativa (Dallos 1992).

Frequência característica dos neurônios auditivos

Na ausência de estimulação acústica, a maioria dos neurônios ligados às células ciliadas internas produzem potenciais de ação espontâneos de forma estocástica. A medida de descarga espontânea da maioria das unidades (registros de neurônios isolados) varia normalmente de 0 a 120 disparos por segundo (Donald *et al.* 1999). Pelo fato de um potencial de ação e o período refratário subsequente durarem em torno de 2 ms, a maior taxa de disparo observada nestas células é de 500 disparos por segundo (Hudspeth 2000). Quando um tom de uma determinada frequência e intensidade é apresentado ao indivíduo, observa-se que a frequência de descarga de uma fibra do nervo auditivo aumenta em relação à sua medida basal.

O nível do estímulo que provoca uma resposta probabilisticamente maior do que a descarga espontânea é chamado de limiar da unidade. Se o limiar para uma fibra é medido ao longo de uma série de frequências de estimulação, obtém-se uma curva de sintonia daquela unidade; a frequência para a qual o limiar é mínimo é definida como sendo a sua frequência característica (FC). Assim, cada unidade funciona como um filtro passa-faixa estreito, com frequência central em FC. Quando um tom modulado em amplitude (AM) é apresentado como estímulo, os disparos nas fibras tendem a sincronizar seu valor máximo com uma fase específica da onda modulante realizando, assim, uma espécie de retificação de meia-onda e,

consequentemente, a demodulação do sinal acústico (Joris *et al.* 2004). Concomitantemente, os neurônios da via auditiva ainda possuem uma frequência de modulação para a qual sua taxa de disparo é máxima (BMF, do inglês best modulation frequency).

Vias auditivas aferentes

As vias auditivas aferentes iniciam-se nas sinapses das células ciliadas internas, no gânglio espiral. Os axônios do gânglio espiral, conjuntamente com as fibras advindas do sistema vestibular, compõem o nervo auditivo, correspondente ao VIII nervo craniano. No sistema nervoso central (SNC), os neurônios aferentes do nervo auditivo entram no tronco encefálico na altura dos núcleos cocleares dorsal e ventral, ipsilaterais à cóclea na qual os axônios originaram-se. No esquema das conexões sinápticas do sistema auditivo aferente, mostrado na Figura 2, cerca de 80% das fibras fazem sinapse no complexo olivar superior em ambos os lados do tronco cerebral, enquanto outras passam pelo complexo olivar superior, atravessam a linha média e fazem sinapse no colículo inferior (CI) contralateral. Enquanto algumas sinapses ipsilaterais acontecem no lemnisco lateral e no CI, um grande número de neurônios do núcleo coclear se estende contralateralmente ao lemnisco lateral. Portanto, há uma representação bilateral paralela ao CI (Webster *et al.* 1985). Além disso, qualquer que seja a via percorrida pelas fibras auditivas, todas as vias aferentes convergem no CI e, deste ponto, prosseguem tanto ipsi como contralateralmente, enviando axônios ao núcleo geniculado medial do tálamo, que os projeta ao córtex auditivo, localizado no lobo temporal superior. O córtex auditivo primário organiza-se em uma distribuição tonotópica, ou seja, frequências sonoras sucessivas são representadas em regiões adjacentes (Hudspeth 2000).

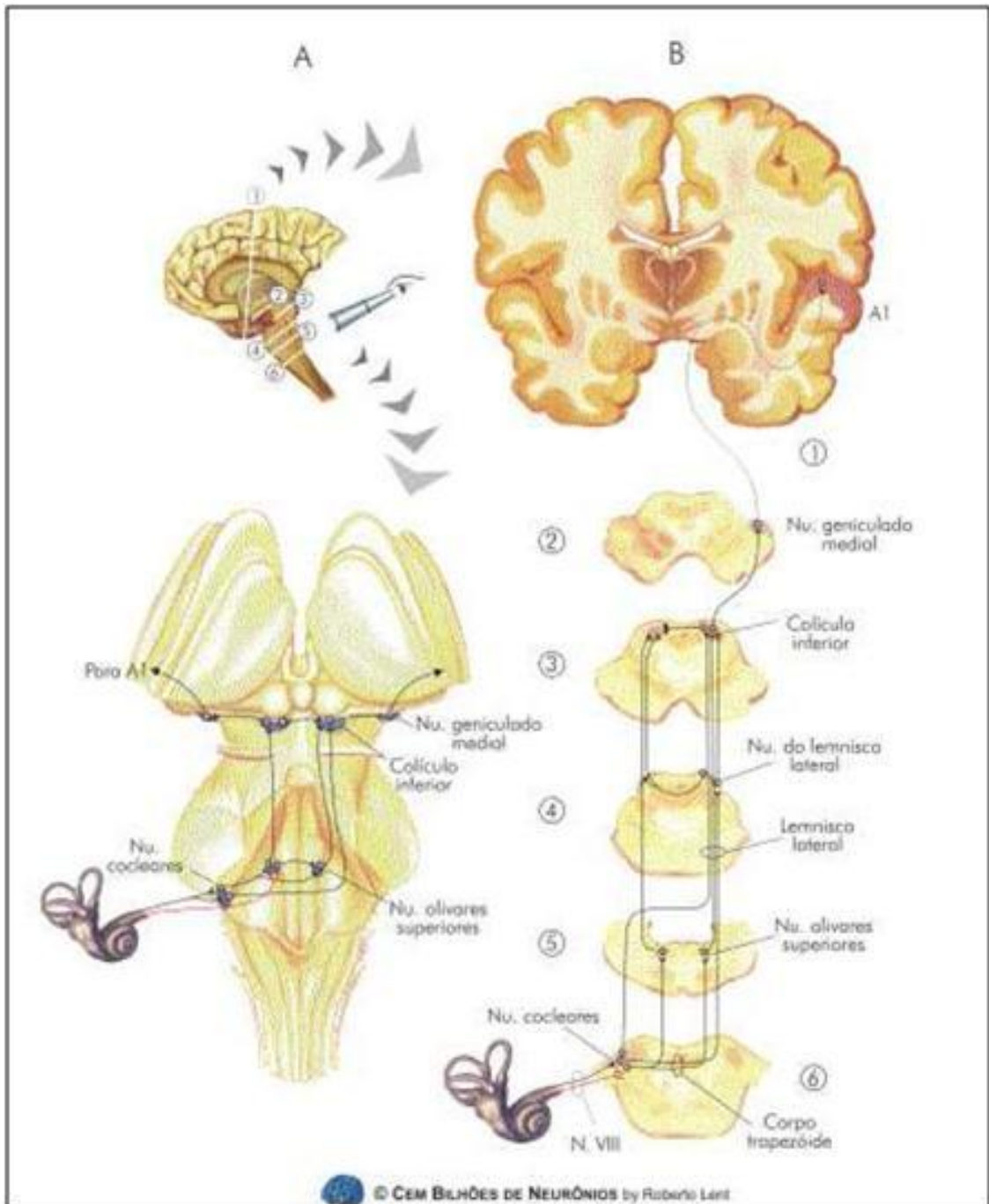


Figura 2: Todos os níveis do SNC apresentam componentes do sistema auditivo. A é uma vista dorsal do tronco encefálico, do ângulo assinalado pela luneta no pequeno encéfalo acima. No encéfalo estão também representados os planos de corte (números circulados) mostrados em B. Tanto em A como em B, os neurônios auditivos estão representados em preto (os aferentes) e vermelho (os eferentes). Adaptado de (Lent 2004).

Potenciais evocados

O registro da atividade bioelétrica espontânea gerada pelo sistema nervoso central (SNC) é conhecido como eletroencefalograma (EEG). O EEG em humanos foi descrito por Berger em 1929 como sendo constituído de padrões de potenciais elétricos semi-rítmicos com frequências e amplitudes variáveis, dependendo do estado do indivíduo (Ferraro e Durrant 1994).

A eletroencefalografia como um método geral para a investigação do funcionamento do cérebro humano inclui maneiras de determinar a reação do cérebro a uma variedade de estímulos. Poucos de tais estímulos podem ser associados com mudanças bem definidas no EEG; alguns provocam mudanças que são difíceis de visualizar. O campo da pesquisa dedicado à detecção, à quantificação, e à análise fisiológica dessas pequenas mudanças no EEG que são relacionadas a eventos particulares tem sido de interesse crescente nos últimos anos. Estas mudanças no EEG podem ser tratadas globalmente sob o termo comum de Potenciais Eventos-Relacionados (ERPs, do inglês: Event-Related Potentials); um subconjunto dos ERPs são os **Potenciais Evocados (PEs) Sensoriais** (visual, auditivo, somatossensório) (Silva 2005).

Os PEs são definidos, geralmente no domínio do tempo, como a atividade elétrica do cérebro que é provocada pela ocorrência de eventos ou de estímulos particulares. De acordo com o modelo mais amplamente aceito, PEs são sinais gerados pelas populações neuronais que tornam-se ativas temporalmente relacionadas ao estímulo; este sinal é somado à atividade contínua do EEG. Em outro ponto de vista, no entanto, PEs são assumidos como resultado da reorganização de uma parte da atividade em curso (Silva 2005). Vários pesquisadores começaram a estudar estas mudanças específicas nos registros eletroencefalográficos em resposta a estímulos táteis, visuais ou auditivos. Apesar das melhoras tecnológicas dos amplificadores, necessários para visualizar o EEG, o problema básico no estudo dos PEs é detectá-los entre as outras ondas de atividade elétrica do encéfalo nos registros de EEG (a atividade de fundo, ou seja, a atividade não relacionada ao estímulo em estudo) devido às diminutas tensões dos PEs em relação à atividade elétrica espontânea do encéfalo.

Em 1947, Dawson (Dawson 1947), um dos pioneiros nesta área, publica um trabalho em que registrou estas mudanças no EEG com estreita relação de causalidade com estímulos

elétricos somatossensórios nos nervos ulnar e poplíteo. A solução encontrada por Dawson foi fotografar os registros usando uma técnica de alto contraste, e sobrepor os trechos de EEG com os 100 milissegundos (ms) imediatamente após a aplicação do estímulo. O princípio dessa técnica era que a atividade aleatória iria apenas alargar a espessura da onda enquanto que as deflexões que se repetiam em latências idênticas se sobreporiam tornando mais clara a visualização destas últimas. (Figura 3).

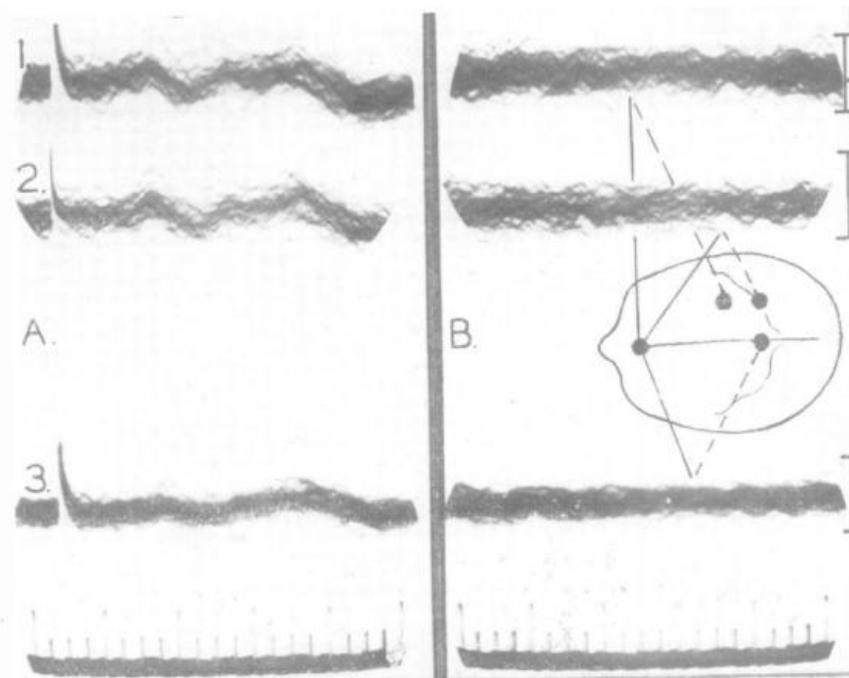


Figura 3 - Em (A) são mostrados, sobrepostas, cinquenta respostas à estimulação do nervo ulnar no punho esquerdo. O ruído do estímulo, no início do lado esquerdo do registro é seguido por uma seqüência de ondas, cada uma com período de cerca de 20ms. Em (B) as diferenças de potencial entre os mesmos eletrodos na cabeça foram registrados, mas nenhum estímulo foi aplicado. Não ocorreram desvios comparáveis com os de (A). As escalas de tempo mostram intervalos de 5 e 20 ms. Marcas de calibração no final do lado direito de (B) mostram a deflexão produzida em cada canal por uma diferença de potencial de $20\mu V$. Adaptado de (Dawson 1947).

Apesar de conseguir mostrar a diferença entre registros quando houve o estímulo e quando não houve, na maioria das vezes, a atividade elétrica de fundo é tão alta que não é possível mostrar as respostas por meio da sobreposição das ondas. Então, o mesmo Dawson, em 1951 (Dawson 1951), por sugestão de um amigo, Dr. Hunt, testou um novo método de visualização destas respostas, a **promediação**: além de sobrepor os trechos de EEG, ele fazia

a soma e extraía a média destas ondas sobrepostas utilizando um equipamento próprio. Assim, a clareza na visualização das respostas aumentou e era diretamente proporcional ao número de trechos promediados.

Com o desenvolvimento tecnológico, surgimento dos computadores e o advento da digitalização de sinais, o processamento da informação bioelétrica registrada foi facilitado. Técnicas computacionais digitais de promediação foram implantadas (Barlow 1957; Brazier 1960) aceleraram o processamento dos sinais e obtiveram grande sucesso. O processo de promediação consiste em fazer vários registros de PE (sincronizando o tempo inicial com o estímulo sensorial) e efetuar a média aritmética dos valores ponto a ponto (Figura 4). Este processo filtra a onda de PE de qualquer potencial não relacionado ao estímulo do EEG de fundo. Pois, no cálculo da média o PE retém sua amplitude e a média do ruído tende a ser diminuída. Assim, se várias amostras de EEG forem digitalizadas, armazenadas e promediadas, a relação sinal-ruído do PE será melhor à medida que atividade elétrica aleatória torna-se reduzida até chegar a zero. Isso permitiu uma maior resolução na visualização das respostas e com isso ondas de menor amplitude passaram a ser identificadas.

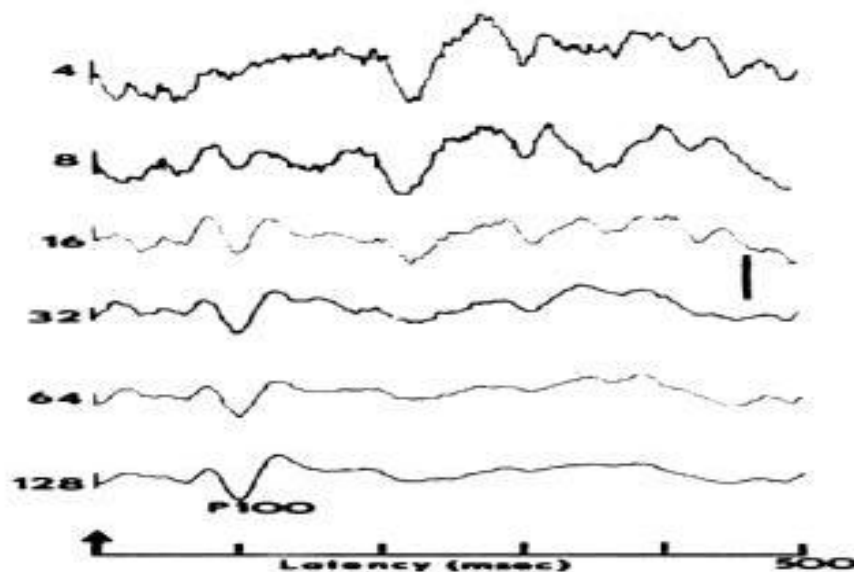


Figura 4 – Promediação. As ondas representam ondas resultantes da promediação do EEG após um estímulo sensorial. Cada número à esquerda representa o número de trechos pós-estímulo que foram utilizados na promediação. Observe quanto maior o número de trechos utilizados o potencial evocado (P100) tende a ficar mais visível e a atividade aleatória de fundo tende a zero.

Potencial Evocado Auditivo

A atividade elétrica evocada em resposta a um estímulo auditivo é denominada de **Potencial Evocado Auditivo (PEA)**. Podemos dividir didaticamente os PEAs em dois grandes grupos em função da frequência dos estímulos: os Potenciais Evocados Auditivos Transitórios e as Respostas Evocadas Auditivas em Regime Permanente.

Potenciais Evocados Auditivos Transitórios

Dentre potenciais auditivos, os transitórios foram os primeiros a serem estudados. Segundo Ferraro e Durrant (Ferraro e Durrant 1994), os primeiros registros de potenciais elétricos no escalpo humano, em resposta a estímulos auditivos, foram realizados por Davis *et al.* em 1939. Neles utilizam-se estímulos curtos a uma taxa de apresentação que permite que a resposta evocada termine antes da apresentação do próximo estímulo. Para um resultado satisfatório na promediação, são necessários vários intervalos de onda (1000 a 2000), o tempo de registro é relativamente grande, não corroborando em conseguir manter o indivíduo o mais quieto possível. Além disso, a atividade muscular excessiva, como as que ocorrem por contração do músculo pós-auricular e do músculo temporal (Picton *et al.* 1974), pode contaminar a resposta evocada, surgindo a necessidade de soluções como uso de sedativos e/ou acomodar o indivíduo em uma posição bem confortável. Geralmente, os estímulos são os cliques ou os chamados “*tone bursts*”.

O clique é um som que contém um amplo espectro de frequências, estimulando uma grande faixa da membrana basilar. É gerado por uma corrente elétrica retangular com duração de aproximadamente 100 μ s (Figura 5A). A distribuição de frequência e energia de um clique depende da corrente elétrica e da fonte sonora que o produz. Na maioria dos cliques, a densidade do espectro de energia concentra-se nas altas frequências. Entretanto, apesar de não ser específico para frequência, o rápido aumento de intensidade sonora é capaz de estimular adequadamente as células cocleares ciliadas resultando em uma boa sincronização do impulso nervoso. Os “*tones bursts*” são trechos curtos de tons puros com aproximadamente 50ms de duração (Figura 5B), soando semelhante a “bipes”. Têm a vantagem de apresentarem um menor espectro de frequência, e assim, serem mais específicos para frequência em relação aos cliques, estimulando uma área menor na membrana basilar.

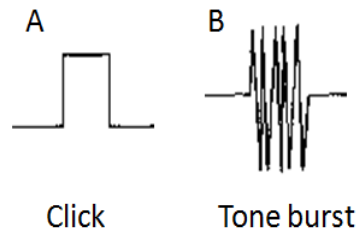


Figura 5– Exemplos de ondas utilizadas como estímulo para registro dos potenciais transitórios. (A) Clique: produzido por uma onda elétrica quadrada com 100 μ s de duração, contém um espectro de frequências sonoras amplo com maior concentração de altas frequências (B) “Tone bursts”: produzido por um tom puro com 50ms de duração apresentando um espectro de frequências mais estreito e em torno da frequência do tom.

Os PEAs transitórios são analisados em função da amplitude e latência das ondas. De acordo com a latência podem ser correlacionados com as estruturas encefálicas geradoras dos potenciais e também oferecem uma boa resolução têmporo-espacial, possibilitando a identificação de lesões anátomo-funcionais na via auditiva. É comum subdividí-los em função da latência (Davis 1976; Regan 1989) como PEAs de **Longa**, **Média** e **Curta** latência. Os PEAs de Longa Latência ou Tardios (PEA-LL) ocorrem depois de 50ms da apresentação do estímulo auditivo, enquanto os de Média Latência (PEA-ML) ocorrem entre 12ms e 50ms, e os de Curta Latência (PEA-CL) nos primeiros 10ms a 12ms após o estímulo auditivo (Figura 6).

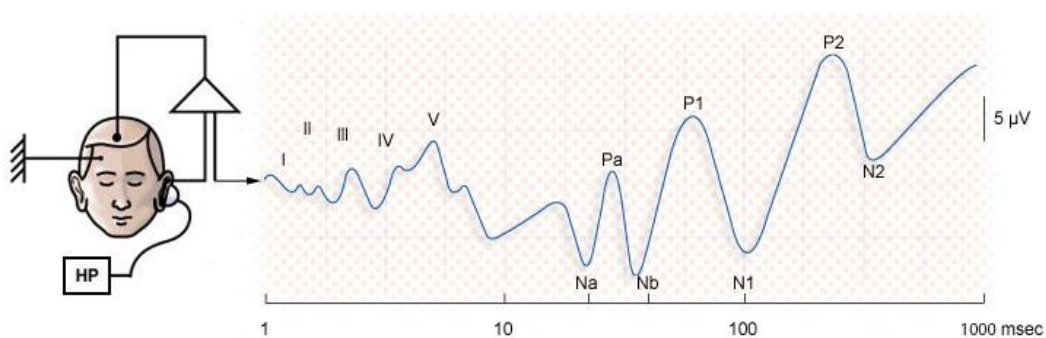


Figura 6– Um eletrodo ativo posicionado sobre o vertex do crânio permite o registro dos potenciais evocados auditivos do nervo auditivo e tronco encefálico (potenciais evocados auditivos de curta latência, ondas I-V), e os das estruturas mais altas da via auditiva (potenciais evocados auditivos de média e longa latência).

Os primeiros PEAs registrados foram os com latências entre 50 e 500ms. São representados pelos PEA-LL (Picton *et al.* 1974; Davis 1976; Picton *et al.* 1984). Podem ser subdivididos em componentes exógenos: N1, P1 e N2, que são dependentes das características dos estímulos externos; e, componentes endógenos: P300, N400, e “mismatch negativity”, que são mais dependentes de processos cognitivos internos (Celesia e Brigell 2005). Os componentes exógenos são melhor evocados por “tone bursts” e apresentam maior amplitude no vértice craniano, apesar de serem largamente distribuídos nas regiões frontal e central do escalpo. N1 é o componente mais proeminente e é gerado por múltiplas fontes incluindo o plano temporal superior, giro temporal superior e talvez até córtex motor frontal (W. R. Goff 1978; Naatanen e Picton 1987; Yamamoto *et al.* 1988). Os outros componentes exógenos podem ser gerados no córtex auditivo associativo e/ou o córtex frontal associativo (Picton *et al.* 1974; Picton *et al.* 1984). Os componentes endógenos são estudados em tarefas cognitivas.

Alguns anos depois, com o auxílio de computadores, foram registradas respostas mais rápidas e de menor amplitude, os PEA-ML, entre 10 e 50 ms (Celesia e Brigell 2005). São caracterizados por múltiplas ondas negativas e positivas denominadas: No, Po, Na, Pa e Nb. As deflexões mais estudadas são Na, ocorrendo numa latência de 15 a 20ms, e Pa que ocorre de 25 a 30ms. Os estímulos normalmente são apresentados numa taxa de até 10 vezes por segundo (10 Hz) (Celesia e Brigell 2005). Estes potenciais, que precedem os de longa latência, são supostamente provenientes da região subcortical e córtex auditivo primário (Skinner e Glatke 1977; Ferraz *et al.* 2002). Existe uma controvérsia considerável em relação às fontes geradoras dos PEA-ML. Publicações anteriores mostraram que atividade miogênica contribuía para a resposta (Celesia *et al.* 1968; Davis 1968; Celesia e Puletti 1969; Cody e Bickford 1969). Entretanto componentes neurogênicos foram demonstrados em pacientes em que foram administrados relaxantes musculares ou durante o sono (Picton *et al.* 1974; Harker *et al.* 1977; Kraus *et al.* 1985). O componente Na provavelmente origina-se de estruturas mesencefálicas incluindo o colículo inferior (Hashimoto *et al.* 1981; Kileny e Kemink 1987; McGee *et al.* 1991). A origem da onda Pa parece ser mais complexa (Celesia e Brigell 2005). Apesar desta deflexão ser claramente gerada em parte no córtex auditivo (Chatrian *et al.* 1960; Celesia *et al.* 1968; Lee *et al.* 1984; Scherg e von Cramon 1985a, b; Jacobson *et al.* 1990), há fortes evidências da contribuição subcortical na resposta (Parving *et al.* 1980; Woods *et al.* 1987). Evidências de um trabalho realizado em cobaias têm sugerido que a onda Pa é formada por um componente lateral gerado no lobo temporal e medial de origem

subcortical por meio da via auditiva secundária (Kraus *et al.* 1988; Kraus e McGee 1995). O componente Pb (algumas vezes referido como P50, por acontecer por volta de 50ms) é registrado mais eficientemente em regiões centrais e frontais medialmente no escalpo a uma frequência de estimulação menor que 1Hz. Seus geradores parecem ser os neurônios colinérgicos do sistema ativador reticular ascendente (Erwin e Buchwald 1986; Buchwald *et al.* 1989).

Os PEA-CL (de 1 a 5 ms) foram identificados inicialmente por Sohmer e Feinmesser em 1967 (Ferraz *et al.* 2002) e posteriormente descritos por Jewett *et al.* em 1970 (Jewett *et al.* 1970) e por Jewett e Williston em 1971 (Jewett e Williston 1971). São compostos por cinco ondas, e apesar de haver controvérsias sobre as fontes geradoras (Jewett *et al.* 1970; Jewett e Williston 1971; Starr e Achor 1975; Allen e Starr 1978; Hashimoto 1982a, b; Moller e Jannetta 1982; Buchwald 1983; Scherg e von Cramon 1985a, b; Legatt *et al.* 1988; Pratt *et al.* 1990; Moller e Jho 1991; Moller *et al.* 1994; Davis-Gunter *et al.* 2001), de um modo geral, são associadas aos potenciais do nervo óptico (onda I), núcleos cocleares (tronco encefálico, onda II), núcleos olivares (tronco encefálico, onda III), lemnisco lateral (tronco encefálico, onda IV) e colículo inferior (do tubérculo quadrigêmio posterior, onda V). Devido à localização no tronco encefálico destas ondas, estes potenciais são também chamados de Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (BERA - do Inglês, *Brainstem Evoked Responses Audiometry*). Para captarmos os potenciais do BERA fazemos a fixação de eletrodos nos lóbulos auriculares e no vértice craniano. As latências das ondas constituem basicamente os elementos estudados e valorizados no BERA.

Os PEAs transitórios de média e de longa latência obtiveram uma menor utilidade clínica em relação ao BERA devido à baixa reprodutibilidade dos primeiros. Há uma grande variabilidade intra e intersujeitos experimentais, pois apresentam alterações irregulares na amplitude e latência dependendo do estado cognitivo e do estado de vigília (acordado, sonolência ou anestesia) dos indivíduos (Stach 2002). Isso restringiu seu uso apenas em adultos cooperativos (Stach 2002). Ao contrário, o BERA mostrou alta reprodutibilidade, independente do nível de vigília ou estado cognitivo dos indivíduos. Com isso, diversos grupos de pesquisadores começaram a estudar os padrões do BERA de forma mais intensa, e vários trabalhos foram publicados. O foco principal das pesquisas com BERA era identificar sua habilidade para avaliar objetivamente a via auditiva periférica e central sem necessidade de participação ativa dos indivíduos (o que é necessário na audiometria comportamental, na

qual os limiares auditivos são determinados pela resposta do indivíduo em relação a estar ou não percebendo o estímulo sonoro, e nas respostas de média e longa latência). Após vários trabalhos publicados e a aplicação clínica comprovada, o BERA é atualmente o método de escolha para avaliação objetiva da via auditiva, sendo utilizado para: detectar deficiências auditivas em bebês, crianças jovens e pacientes adultos não-colaborativos; avaliar a audição em surdos funcionais; avaliar a função do tronco em pacientes suspeitos de esclerose múltipla; avaliar doenças neuro-otológicas (neuromas acústicos, tumores do ângulo ponto-cerebelar, e lesões no tronco); e monitorar o funcionamento da via auditiva em cirurgias que podem danificar a cóclea ou o nervo auditivo causando surdez (Celesia e Brigell 2005).

Respostas Evocadas Auditivas em Regime Permanente

Em 1981, Galambos *et al.* (Galambos *et al.* 1981) observaram, enquanto realizavam registros de PEA-ML utilizando “tone bursts”, que se a taxa de apresentação do estímulo (que normalmente é até 10/s) fosse aumentada, a resposta aparecia como uma onda sinusoidal na promediação do sinal. Em adultos, isto ocorreu de forma mais intensa a 40 estímulos por segundo. Galambos *et al.* então o chamaram de Potencial Evocado a 40Hz. Eles sugeriram que estes potenciais eram em grande parte a superposição dos PEA de média latência. Desde que os picos dos PEA-ML eram separados no tempo por 25ms, esta superposição seria mais efetiva a 40Hz (Picton *et al.* 2003). Estes são os primeiros registros das RESPOSTAS EVOCADAS AUDITIVAS EM REGIME PERMANENTE (REARP) (Stapells *et al.* 1984). Este trabalho de Galambos foi o principal gatilho para uma extensa pesquisa dos REARP que começa a partir de então (Picton *et al.* 2003).

Uma REARP é uma resposta evocada na qual os componentes discretos de frequência mantém-se constantes em amplitude e fase por um período infinitamente longo (Regan 1989). Desde que o registro pode ser infinito, a resposta é considerada estável numa janela temporal muito maior que o ciclo de um único estímulo (Picton, John *et al.* 2003). Esta qualificação da definição nos permite medir pequenas mudanças (ou instabilidades) nos REARP. Estes potenciais são registrados quando o estímulo é apresentado periodicamente, e mostra como o encéfalo “segue” um estímulo, ou como o estímulo “direciona” uma resposta (Picton *et al.* 2003). As respostas evocadas auditivas em regime permanente são classicamente diferenciados dos potenciais transitórios, cujos componentes de frequência mudam ao longo do tempo. Em geral, respostas transitórias são evocadas por estímulos que ocorrem

esporadicamente (teoricamente, apenas uma vez), e respostas em regime permanente são evocadas por estímulos que ocorrem mais rapidamente. Respostas fisiológicas são, geralmente, melhor avaliadas como respostas estacionárias quando a taxa de estimulação é suficientemente rápida para que a resposta transitória a um estímulo se sobreponha com as respostas aos estímulos subsequentes. Se o encéfalo respondesse de maneira linear, respostas estacionárias seriam completamente previsíveis das respostas transitórias. Entretanto o encéfalo não é linear, e respostas em regime permanente e transitórias oferecem visões independentes de sua função (Picton *et al.* 2003).

Em 1984, David Stapells *et al* (Stapells *et al.* 1984) e em 1986, James Jerger *et al* (Jerger *et al.* 1986) começaram a olhar para estes potenciais de 40Hz de uma maneira diferente: analisando o EEG não apenas no domínio do tempo (promediação), mas também no domínio da frequência (espectrograma). Fizeram a análise espectral do sinal quantificando a atividade elétrica encefálica na frequência de apresentação dos cliques ou “tone bursts”. Ou seja, eles estimulavam a uma taxa de 40 estímulos/s, e observavam o componente de 40Hz no espectro de frequência do EEG para verificar se este componente aumentava em amplitude e/ou em sincronização de fase com a apresentação periódica deste estímulo (Picton *et al.* 1987c; Stapells *et al.* 1987). A análise espectral, em lugar da promediação, funcionou bem e evoluiu-se muito sobre o conhecimento da natureza e das técnicas de quantificação dos potenciais evocados a 40Hz (Stach 2002).

Os potenciais evocados a 40Hz, mostraram-se susceptíveis ao estado de vigília dos indivíduos, isto restringia seu uso como método objetivo para avaliar o limiar auditivo. Porém, um outro grupo de pesquisadores, em Melbourne, na Austrália, liderados por Field Rickards, em 1984, publicou um trabalho mostrando que era possível registrar estas respostas em frequências de apresentação mais altas (Rickards e Clarck 1984) e que a amplitude da resposta decrescia com o aumento da taxa de estimulação (Picton *et al.* 2003). Eles observaram que os REARP poderiam ser prontamente registrados a frequências maiores que 60Hz. Posteriormente, nos anos 90, este mesmo grupo de pesquisadores (Cohen *et al.* 1991; Rickards *et al.* 1994; Rance *et al.* 1995) e Otávio Lins, um neurofisiologista brasileiro da Universidade Federal de Pernambuco, juntamente com o grupo de Terence W. Picton, de Toronto, no Canadá (Lins *et al.* 1996) mostraram que, à taxas de estimulação em torno de 90Hz, os REARP eram robustos e poderiam ser registrados em indivíduos dormindo, tanto adultos quanto crianças. Além disso, como o ruído de fundo diminuiu com o aumento da

frequência, a relação sinal-ruído nestas altas frequências de estimulação foi superior ou equivalente ao encontrado utilizando baixas frequências de estimulação. No final desta mesma década, aplicações clínicas dos REARP de alta frequência começaram a ser desenvolvidas e implementadas (Stach 2002).

O estímulo utilizado, para registro das REARP, pode ser um clique ou um “tone burst” apresentados em taxas entre 1 a 200 estímulos por segundo, ou por modulações periódicas da amplitude e/ou frequência de um tom puro (Rickards e Clark 1984; Picton *et al.* 2003). Kuwada *et al.* (Kuwada *et al.* 1986) encontraram que a amplitude das REARP em resposta à um tom contínuo modulado em amplitude era maior em frequências de modulação entre 25 e 50 Hz, e maior para frequências de portadora em 500 ou 1000 Hz do que para frequências de portadora mais elevadas. A amplitude da resposta evocada por uma modulação de 50 Hz diminuiu diretamente proporcional com a profundidade da modulação, mas pôde ainda ser reconhecida em uma profundidade mínima de 11%. Rees *et al.* (Rees *et al.* 1986) descreveram REARPs em humanos à frequências de 0,5 a 400 Hz de modulação em amplitude de um tom. Hall (Hall 1979) e Chambers *et al.* (Chambers *et al.* 1986) descreveram respostas na frequência de modulação de tons complexos. Picton *et al.* (Picton *et al.* 1987a) registraram REARPs para tons modulados em frequência (FM). Assim como para as REARPs a tons modulados em amplitude, relatados por Kuwada *et al.* (Kuwada *et al.* 1986), esta resposta foi maior para portadoras de baixa frequência e para altas intensidades a uma taxa de modulação em frequência de 40 Hz. Estas respostas eram prontamente identificadas a baixas profundidades de modulação de até 10 Hz.

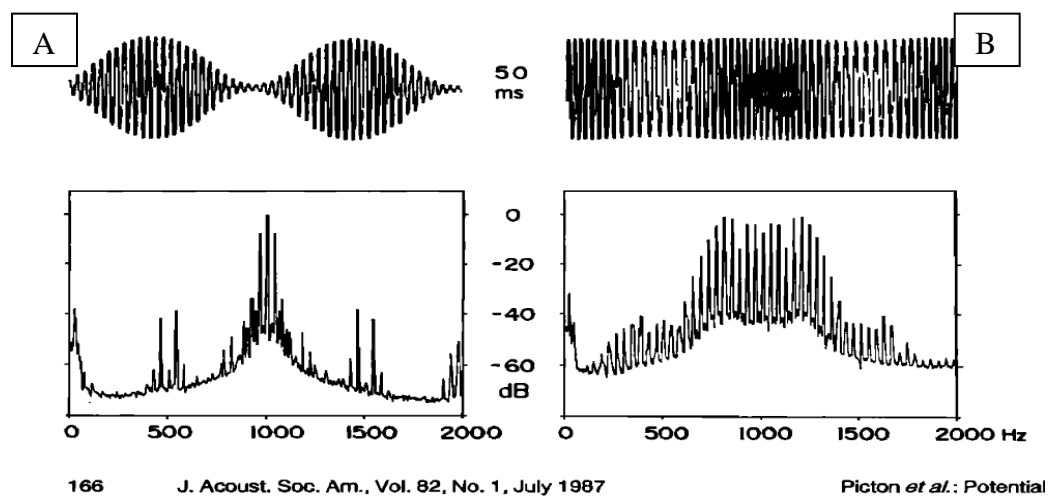


Figura 7 – (A) Tons AM e (B) tons FM. A parte superior da figura mostra o estímulo acústico registrado por meio de uma orelha artificial Brüel e Kjaer 4152. Os sinais foram

amostrados por 50ms a 20kHz. A parte inferior da figura mostra o espectro de amplitude utilizando uma taxa de 4kHz e uma janela de Hamming. A metade esquerda da figura mostra um tom AM de 1000Hz. A profundidade de modulação foi de 90% e a intensidade de 106.5 dB SPL. As bandas de energia próximo de 500 e 1500Hz resultam da digitalização e filtragem da onda moduladora senoidal. A metade da direita mostra um tom FM com uma portadora de 1000Hz. A profundidade de modulação foi de 50% (de 750Hz a 1250Hz) e a intensidade foi de 111dB SPL. Adaptado de (Picton et al. 1987b).

O uso de tons puros modulados representa uma vantagem das REARPs para estudo da via auditiva, devido ao fato de que mesmo que a modulação aumente o espectro de um tom puro, o espalhamento espectral é menor em relação ao que ocorre com um “tone burst”, ou especialmente, com os cliques. Assim, o trecho da membrana basilar estimulado é bem menor, com isso mais específico para frequência (Stach 2002). Os tons modulados em amplitude e/ou frequência utilizados possuem duas características básicas: a frequência da onda portadora, e a frequência de modulação dessa onda (frequência moduladora). A primeira diz respeito ao local da membrana basilar que será estimulado, a segunda diz respeito à frequência de apresentação desse estímulo. Assim mantém-se a frequência característica do som, e oscila-se a amplitude e/ou frequência dessa onda sonora na frequência da moduladora. Os tons modulados em amplitude apresentam um espectro que possui maior quantidade de energia na frequência da portadora e em duas bandas laterais acima (portadora + moduladora) e abaixo (portadora - moduladora) da frequência da portadora. Quando os tons são modulados em frequência ocorre um espalhamento de energia em torno da portadora, ou seja, se um tom de 1000Hz é modulado em frequência a 10%, haverá espalhamento da energia de 900Hz a 1100Hz (10% de cada lado da portadora). Isso gera a resposta elétrica, potencial evocado auditivo, na mesma frequência da modulação e estimula-se uma região mais específica da membrana basilar.

As REARP podem ser registradas sob um amplo espectro de modulação/apresentação. Medidas do espectro de fase (relativa à frequência de modulação) podem ser usadas para estimar a latência da resposta (Cone-Wesson *et al.* 2002). Quando a fase é usada para caracterizar a faixa de latência da resposta, assume-se que os geradores da resposta são os mesmos dos potenciais transitórios de similar latência. A frequência de modulação e os geradores intra-encefálicos são intimamente ligados. Frequências de modulação de 20 Hz ou

menos resultarão em uma resposta dominada por aqueles geradores responsáveis pelos PEA-LL, especificamente o córtex auditivo primário e áreas de associação. Para taxas de modulação maiores que 20 Hz e menores que 60 Hz, as características da resposta são similares às encontradas nos PEA-ML, sendo considerados como geradores as estruturas auditivas do mesencéfalo, tálamo e o córtex auditivo primário (Cone-Wesson *et al.* 2002). Frequências de modulação mais altas que 60Hz serão dominadas por potenciais evocados de estruturas do tronco encefálico, incluindo a onda V e a negatividade que a segue, alguma vezes denominada como SN-10 (Davis e Hirsh 1976). Com o propósito de usar as REARPs em aplicações audiológicas deve ser enfatizado que a presença deste potencial (em qualquer frequência de modulação) é, em boa parte, determinada pela integridade da cóclea e do nervo auditivo. As variações neuropatológicas e constitucionais de cada indivíduo que afetam os PEA transitórios são esperadas afetar as REARP da mesma forma (Cone-Wesson *et al.* 2002). Não surpreende o fato de que as baixas frequências de modulação sejam mais vulneráveis aos estados mentais do indivíduo do que as altas frequências, assim como os PEA-ML e PEA-LL (Stach 2002).

Comparações entre Potenciais Evocados Auditivos Transitórios e Respostas Evocadas Auditivas em Regime Permanente

Os supostos geradores das REARP, para frequências de modulação maiores que 60Hz, no tronco encefálico incitaram a comparação destes com o BERA, especialmente em relação à capacidade das REARP de estimar os limiares auditivos em bebês e crianças. Várias questões associadas com a comparação dos dois potenciais evocados devem ser levadas em consideração: especificidade de frequência, os geradores destas respostas, os efeitos da perda de audição, e algoritmos de detecção automática (Cone-Wesson *et al.* 2002).

Uma das limitações do BERA é a deficiência em especificidade de frequência. Isto é, o BERA é altamente dependente de sincronia neural. Num indivíduo com audição normal e funções normais da cóclea e nervo auditivo, a amplitude do BERA é maior para respostas evocadas por cliques ou “tone bursts” de alta frequência com tempo de início menor que 2s. A capacidade de obter respostas de local específico da membrana basilar correspondente a uma frequência específica é restringida pela sincronia neural e os mecanismos passivos da onda viajante na cóclea funcionalmente normal. Inferências a respeito de especificidade de frequência são inconsistentes para estímulos de alta intensidade, ou para a cóclea

funcionalmente anormal exceto quando o mascaramento com ruído é realizado para limitar o local responsivo da cóclea (Stapells 2000; Cone-Wesson *et al.* 2002). Apesar destas limitações, estimativas de limiar auditivo para tons puros podem ser razoavelmente obtidas pelo BERA (cliques e “tone bursts”). As REARPs superam algumas destas limitações (Stapells 2000; Cone-Wesson *et al.* 2002). Estes potenciais podem ser evocados por tons puros modulados em amplitude e/ou frequência. O espectro destes estímulos é mais restrito e gira em torno da frequência da portadora, isto é, menor que o espectro dos chamados “2-1-2 tone bursts” (significando o número de ciclos necessários para o tempo de subida, platô e descida) que têm sido recomendados no BERA para estimar o limiar auditivo (Hood 1998).

A possibilidade de localizar os geradores no BERA, assim como nos outros PEA transitórios, pela latência de aparecimento das ondas é igualmente encontrada nos REARP, por meio da avaliação do espectro da fase destes: baixas frequências de modulação (<20Hz) refletem a atividade de geradores responsáveis pelos PEA-LL, frequências moderadas (20Hz a 60Hz) refletem aqueles responsáveis pelos PEA-ML, e as altas frequências (60Hz) refletem atividade do tronco encefálico (PEA-CL) (Cone-Wesson *et al.* 2002).

Ambos, o BERA evocado por “tone bursts” (Stapells *et al.* 1995) e as REARP (Rance *et al.* 1995; Aoyagi *et al.* 1999) têm demonstrado eficiência clínica para estimar o audiograma em crianças. Não há diferenças significativas entre as duas técnicas (Aoyagi *et al.* 1999; Johnson e Brown 2001; Cone-Wesson *et al.* 2002). Porém, Rance et al, em 1995, mostraram que as REARPs tem a vantagem de determinar a audição residual em paciente com perda auditiva severa e profunda, ou seja, acima de 70dB, o que não acontece com o BERA evocado por “tone bursts” devido a sua limitação de intensidade máxima de saída nos audiômetros (90dB nHL) (Stach 2002). Assim, as REARPs podem dar uma faixa de informação extra em 50dB (Stach 2002).

Uma outra limitação do BERA para aplicações audiológicas é a natureza subjetiva de sua detecção (Cone-Wesson *et al.* 2002). Métodos para uma detecção automática do BERA existem, incluindo a detecção baseada em correlação (Hyde *et al.* 1998), chamada de reconhecimento de padrões (“*template matching*”), ou uma estimativa da relação sinal-ruído a partir da variância de um único ponto, F_{sp} (“F single point”) (Don *et al.* 1984). Estes algoritmos tem sido aplicados com o BERA evocado por cliques, para triagem auditiva (Sininger *et al.* 2000) e determinação de limiar auditivo (Sininger e Don 1989; Sininger

1993). Não há, entretanto, nenhum trabalho publicado descrevendo um critério usado para a detecção automática do BERA evocado por “tone bursts”. Há inúmeros exemplos de ondas de BERA próximo ao limiar auditivo evocadas por “tone bursts”, porém, a análise subjetiva é usada para detecção da resposta no ruído eletrencefalográfico.

Em contraste, há uma vasta pesquisa da eficácia dos algoritmos usados para detectar a REARP (Dobie e Wilson 1989; Champlin 1992; Dobie 1993; Dobie e Wilson 1993, 1994a, b, 1995a, b, 1996, 1998). As técnicas usadas para detectar a REARP baseiam na medida da Coerência de Fase (CF), Coerência Quadrática da Magnitude (CMQ) ou Transformada Rápida de Fourier (FFT) da resposta submetida a um teste F de variância (John e Picton 2000).

A Coerência de Fase é relacionada à razão sinal(resposta)-ruído(EEG de fundo e atividade miogênica). O conceito básico é que o atraso de fase da resposta é medido em relação à frequência de modulação. Cada amostra compondo um conjunto de respostas ou uma média da resposta pode ser submetido à FFT. Os picos no espectro resultante e a amplitude e a fase do pico espectral podem ser medidos. O seno e o cosseno dos ângulos formados por cada vetor de fase de cada amostra são calculados. Os valores de CF variam de 0 a 1. Quando as distribuições de fase das amostras de EEG estão em fase, os valores da coerência de fase serão próximos de 1. Quando a fase das amostras são aleatórias, há uma baixa coerência, com valores próximos a 0, como seria esperado para amostras contendo apenas ruído. A significância estatística do valor resultante de coerência de fase pode ser determinada.

Em contraste, o método de teste F baseia-se na energia da resposta sendo analisada por uma FFT para determinar quando a resposta ocorreu. O teste F compara a energia ou a amplitude da resposta (pico espectral à frequência de modulação) à amplitude dos componentes espectrais 60 pontos acima e 60 pontos abaixo da frequência de modulação (John e Picton 2000). Quando um determinado critério estatístico é obtido, a resposta é considerada presente nas amostras.

Dobbie e Wilson (Dobie e Wilson 1989, 1995a, b, 1998) têm empregado os métodos de CMQ para detectar e definir a REARP. Este método estima a proporção de energia no sinal de resposta (saída do sistema) que é atribuível ao sinal de estímulo (entrada do sistema). Como a resposta consiste em ambos sinal (resposta) e ruído, a CMQ pode ser encarada como

uma estimativa da relação sinal-ruído. Distribuições teóricas da CMQ tem sido determinadas, por isso, é possível determinar valores críticos para serem usados na detecção objetiva das REARPs. Se o valor da amplitude é ignorada, isto é, se todos os vetores de amplitude são definidos como 1, então $CMQ=CF^2$. A vantagem da CMQ é que quando a amplitude do potencial evocado aumenta, os valores da CMQ também aumentam, e a detecção é aumentada em comparação com métodos que medem apenas fase isoladamente. A desvantagem é que flutuações no ruído de fundo terão um efeito deletério no valor da CMQ comparado a CF e CF^2 .

Então, o uso de algoritmos de detecção automática para as REARPs assegura que a resposta eletrofisiológica foi interpretada objetivamente (Cone-Wesson *et al.* 2002). Já que a detecção do BERA evocado com “tone burst” é realizada visualmente.

Assim, dependendo do aspecto levado em consideração, as REARPs ou equivalem-se ou mostram-se superiores aos PEA transitórios. Muitos pesquisadores têm se dedicado a estudar e desenvolver esta metodologia e o conhecimento acerca das REARPs são cada vez mais abrangentes. Como o procedimento de registro dos potenciais evocados é realizado por meio de uma técnica não invasiva de registro, a maioria dos trabalhos publicados são realizados em seres humanos com a finalidade de determinar parâmetros para uma detecção objetiva dos limiares auditivos. Além da realização de audiograma objetivo, as REARPs poderiam refletir distúrbios neurológicos, por demonstração de padrões de mudança correlacionados a neuropatias específicas. Porém, isto ainda é desconhecido (Stach 2002). Diante da facilidade de se obter modelos animais de determinadas doenças neurológicas e a possibilidade de uma manipulação mais invasiva destes sujeitos experimentais é necessário o estudos destes REARP em outras espécies que não a humana.

JUSTIFICATIVA

O Colículo Inferior é a maior estrutura auditiva do tronco encefálico, recebendo aferências de vários outros núcleos da via auditiva (Caird 1991; Oliver e Huerta 1991). O CI também recebe aferências de estruturas sensoriais não-auditivas e das áreas reticulares (Aitkin *et al.* 1981; Coleman e Clerici 1987; Oliver e Huerta 1991). Dada sua ampla variedade de aferências, não surpreende supor que o CI é o maior centro de processamento para ambos os estímulos auditivos mono e binaural (Aitkin 1985; Caird 1991).

Assim, considerando as vantagens dos REARP como método para estudo não só da fisiologia da audição assim como de doenças neurológicas, considerando a importância do CI no processamento dos estímulos auditivos, e ainda, considerando a facilidade de manipulação de sujeitos experimentais animais propusemos este trabalho.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Mapear as REARPs na varredura anatômica do mesencéfalo de ratos Wistar (eletrodos monoplares de implante profundo) utilizando diferentes padrões de estímulo auditivo. Avaliar uma possível aplicação deste método na localização das camadas tonotópicas do CI, por meio de tons modulados em amplitude.

Objetivos específicos

1. Avaliar e quantificar a variação das REARPs com relação à da intensidade do estímulo auditivo para uma dada frequência de portadora e moduladora.
2. Avaliar e quantificar a dependência das REARPs com relação à frequência de modulação (variando em intervalos discretos), para uma mesma frequência de portadora, em diferentes pontos do mesencéfalo.
3. Avaliar e qualificar a dependência das REARPs com relação à frequência de modulação (variando continuamente a moduladora), para uma mesma frequência de portadora, em diferentes pontos do mesencéfalo.
4. Testar a eficácia das REARPs na localização das camadas tonotópicas do CI por meio da varredura anatômica do mesencéfalo utilizando um tom com variação contínua de frequência portadora, mantendo constante a moduladora.

MATERIAIS E MÉTODOS (GERAL)

Animais

Foram utilizados 10 ratos Wistar machos, pesando entre 250-300g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CeBIO-ICB/UFMG). Foram mantidos com água e comida *ad libitum*, submetidos a um ciclo fisiológico de 10/14 horas claro/escuro controlado a temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Cuidados sempre tomados em relação ao manuseio dos animais durante os experimentos e buscou-se, por todos os meios disponíveis, evitar sofrimento desnecessário dos mesmos, bem como minimizar o número de animais utilizados. Os protocolos estão de acordo com a *Brazilian Society for Neuroscience e Behavior Guidelines for Animal Experimentation*. Protocolos experimentais aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG) sob o número do processo 133/2010.

Confecção dos eletrodos

O eletrodo de referência, que foi fixado no osso nasal, foi confeccionado com micro-parafusos cirúrgicos (*Fine Sciences Tools*, nº 19010-00) soldados a fios de aço revestidos com Teflon (*A&M Systems*, modelo 7916). Este fio de aço foi então soldado a um fio flexível multi-filamentar de cobre. Os eletrodos monopolares foram confeccionados com o mesmo fio de aço revestido com Teflon (*A&M Systems*, modelo 7916), onde dois segmentos de fio foram trançados para aumentar a resistência à tração lateral. O animal foi aterrado por meio de uma agulha hipodérmica (*BD Precision Glide*, modelo 22 G1), que foi moldada a semelhança de um anzol após seccionarmos a parte plástica e soldada a um fio flexível multi-filamentar de cobre. O eletrodo monopolar e os fios flexíveis são soldados a fios metálicos encapados com cores diferentes e estes grampeados a um conector RJ-11 de 6 pinos. O sexto fio da esquerda para a direita (olhando-se o conector RJ-11 com a trava para trás) foi soldado ao cabo flexível correspondente à agulha de aterramento, o sétimo fio ao eletrodo monopolar, e o oitavo ao cabo flexível correspondente ao eletrodo de referência.

O conector RJ-11 foi fixado à barra vertical do estereotáxico (modelo Stoelting) preocupando-se com o correto alinhamento e fixação do eletrodo monopolar.

Cirurgia

Os animais foram anestesiados com uretana (1,4g/L) administrando a dose de 1,4mg/100g de peso do animal. A temperatura do animal foi monitorada por meio de termômetro digital introduzido no reto do animal e foi mantida em torno de 37,5°C usando uma manta de aquecimento elétrica. Foi realizada a tricotomia na região superior da cabeça com tosquiadeira, o animal foi posicionado em aparelho estereotáxico (modelo Stoelting) e fixado por meio de barras auriculares, sendo uma delas perfurada longitudinalmente de ponta a ponta para conduzir o estímulo sonoro. A barra perfurada foi colocada na orelha contralateral ao hemisfério de registro da atividade bioelétrica. Verificou-se a possibilidade de ela estar obstruída, antes da fixação do animal, desobstruindo-a se necessário. Realizou-se uma excisão elíptica da pele da região superior da cabeça ao nível da linha interauricular. A gordura subcutânea foi removida e limpou-se o osso com salina estéril. Inclinou-se a barra vertical do estereotáxico em 30° (em relação ao eixo vertical) no sentido céfalo-caudal. As suturas lambda e bregma foram niveladas. As coordenadas de bregma anotadas.

O osso nasal foi perfurado com broca odontológica para fixação do parafuso que foi usado como eletrodo de referência, fez-se a introdução do parafuso no orifício e sua fixação com acrílico odontológico. O parafuso de referência foi soldado ao conector e a agulha de aterramento fixada no músculo temporal. Foi marcado o ponto para introdução do eletrodo monopolar usando as coordenadas estereotáxicas (AP= - 6,8 ; LL= +1,4) de acordo com (Paxinos e Watson 2007) tendo o bregma como referência. Realizou-se a trepanação e o eletrodo foi gradativamente introduzido no encéfalo no sentido dorso-ventral ao passo de 1mm (DV= variando -1,5 a -6,5, tendo bregma como referência) durante a estimulação auditiva e registro das RERP, realizando-se uma varredura anatômica dorso-ventral.

Histologia

Após a realização dos procedimentos experimentais, com os animais ainda sob efeito anestésico, aplicamos uma corrente elétrica de lesão (0,1 mA) por 2s no eletrodo introduzido no CI, para produzir uma marca facilmente visível na análise histológica, em três pontos do percurso realizado pelo eletrodo durante a varredura (primeiro, terceiro e sexto ponto).

Os animais, ainda sob efeito anestésico, foram sacrificados por meio de perfusão tecidual de solução salina a 0,9%, seguida de solução de paraformaldeído a 10%.

Removemos os encéfalos, acondicionamos imersos em solução de paraformaldeído a 10% para uma melhor fixação do tecido, em frascos individuais. Os frascos foram identificados por meio de etiquetas, identificando o animal.

Após 7 dias de fixação do tecido, as peças anatômicas foram fatiadas em micrótomo em cortes sagitais, com espessura de 40 μm e as fatias montadas em lâminas gelatinizadas. Realizamos a coloração com corante Vermelho Neutro e observamos em microscópio óptico, com câmera digital acoplada para digitalização das imagens e avaliação da posição do eletrodo monopolar no CI.

Após a digitalização das imagens, elas foram comparadas ao atlas de histologia (Paxinos e Watson 2007) em versão digital. Os pontos de marcação por corrente elétrica da posição do eletrodo no encéfalo dos animais foram então anotados em uma figura do atlas para cada animal. Posteriormente, por projeção, os outros dois pontos foram adicionados a esta figura. Figura 8.

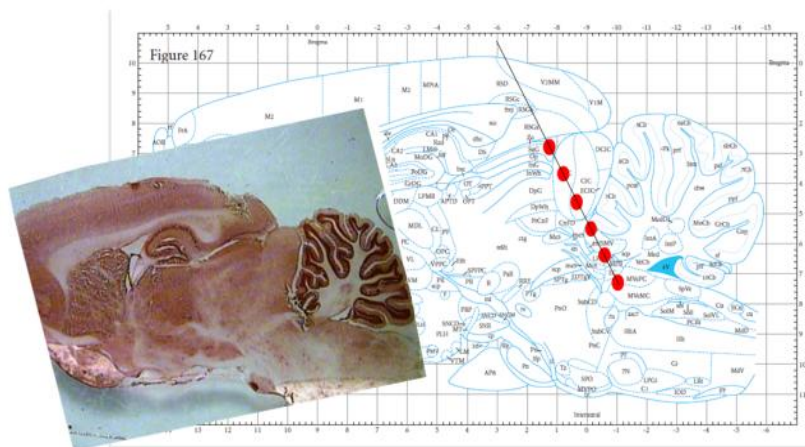


Figura 8 – Comparação entre a imagem da lâmina histológica e a figura do atlas anatomicamente correspondente. À esquerda observamos a imagem da lâmina histológica digitalizada e ao fundo a figura do atlas com o traçado do eletrodo marcado pela observação da lâmina histológica em um dos animais utilizados.

Por último, todas as figuras foram superpostas, e todos os pontos de registro para todos os ratos foram marcados em uma única figura, criando um mapa geral da distribuição dos pontos de registro.

Apenas animais com a posição do eletrodo confirmada pela histologia foram incluídos na análise dos resultados.

Estímulo Auditivo

As ondas sonoras utilizadas na estimulação auditiva foram geradas por meio do software Adobe Audition (*Adobe Systems Inc.*, versão 3.0). Os arquivos gerados foram salvos no formato de áudio MP3 com “bit rate” de 128Kbps, e transferidos para um dispositivo tocador de MP3 (*MP3 “Player”*). Conectamos a saída de áudio deste a um amplificador de som automotivo (MXR 2250 – 500w) e este um alto-falante (*tweeter Sellenium T-40*, 88dB SPL).

Para saber qual era o nível de pressão sonora que os estímulos auditivos chegavam na orelha dos animais, um decibelímetro (Brüel e Kjaer, modelo 2236) conectado ao uma placa de conversão analógico digital (DATAQ Instruments, modelo DI-148U) foi posicionado na extremidade da barra perfurada que entra em contato com a orelha do animal. Utilizou-se o mesmo software KANANDA para aquisição e registro destes sinais. O sistema de estimulação auditiva foi montado da mesma forma que durante os protocolos experimentais, porém, sem os animais. Usou-se um calibrador que emitia duas intensidades de som conhecidas: 93dB SPL e 114dB SPL. Assim, antes de iniciar o registro da variação da intensidade do som, registrava-se essas duas intensidades para servir de referência na avaliação da intensidade sonoras dos estímulos já que os dados entravam apenas como variação de voltagem.

O ruído sonoro de fundo da sala foi de, aproximadamente, 50dB SPL, valor também medido na extremidade da barra perfurada quando ocluímos o tubo de borracha. E as intensidades dos estímulos auditivos serão descritos para cada protocolo em suas respectivas seções deste texto.

Foram utilizadas como ondas portadoras e moduladoras, ondas senoidais de diferentes frequências descritas adiante na seção de cada protocolo experimental. A profundidade de modulação da amplitude das ondas portadoras foi sempre de 100%.

Como fonte sonora utilizamos um alto-falante acondicionado numa caixa metálica, para blindagem eletromagnética, e forrada internamente com espuma acústica. O estímulo

sonoro foi conduzido por um tubo de borracha da caixa metálica até a barra perfurada, e desta até o ouvido do animal. Utilizamos duas pinças hemostáticas para obstrução do tubo.

Aquisição dos dados

Após a cirurgia, ainda fixados no estereotáxico, os animais foram colocados numa gaiola de Faraday. O conector RJ-45 fixado na barra vertical do estereotáxico foi conectado a um cabo blindado e este ao sistema de aquisição e registro de biopotenciais. A temperatura do animal foi monitorada por meio de termômetro digital introduzido no reto do animal e mantida em torno de 37,5°C por meio de manta de aquecimento elétrica.

Realizamos uma varredura em sentido dorso-ventral do CI em seis pontos, descendo o eletrodo monopolar fixado à barra vertical do estereotáxico ao passo de 1 mm (iniciando a 1,5mm abaixo do nível do bregma e estendendo até 6,5mm abaixo do nível de bregma, atravessando o CI). Em cada ponto realizamos a apresentação das ondas sonoras correspondentes a cada protocolo e registramos a atividade bioelétrica por um tempo variável para cada protocolo como será explicado mais detalhadamente adiante.

O sistema de aquisição dos biopotenciais e registro é composto por módulos condicionadores, placa de conversão analógico/digital (A/D), um computador e software de aquisição e registro das ondas digitalizadas.

Os sinais bioelétricos provenientes do animal captados pela ponta do eletrodo introduzido no encéfalo e pelo parafuso de referência fixado no osso nasal seguiram por meio do cabo blindado e foram encaminhados ao módulo condicionador.

Este amplificou o sinal com ganho de 529 vezes, e filtrou-se o sinal bioelétrico com uma banda de passagem de 1Hz a 200Hz . O sinal foi então direcionado para digitalização e para mais uma etapa de amplificação a uma placa conversora Analógico/Digital (*National Instruments Inc.*, modelo NIDAQ 6023E), conectada a um computador, e a amplificação final foi de 1058 vezes (529 x 2). Utilizou-se o software KANANDA (de autoria do Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes) para aquisição e registro dos dados, a uma frequência de amostragem de 1kHz.

Processamento digital dos sinais

Os arquivos contendo os EEG's foram processados por meio do software MATLAB (*The MathWorks Inc.*, versão 7.9.0.529 R2009b), no domínio da frequência. Para isso realizou-se a Transformada Rápida de Fourier. Este procedimento permite a representação de qualquer tipo de sinal em todos os espectros de frequência que o compõem. Dessa forma, cada protocolo experimental foi analisado de acordo com os parâmetros de estimulação auditiva, que será detalhado na seção de cada capítulo.

Registro foi separado em janelas de 2048 ms para compor o espectro ao longo do tempo. Posteriormente realizou-se uma análise estatística e representação dos dados em gráficos e figuras.

Capítulo 1 - Varredura de Intensidade Sonora

Pergunta científica

A REARP apresenta relação linear com a intensidade do estímulo? É sabido que a intensidade do estímulo auditivo influencia a intensidade da resposta evocada auditiva dentro de um determinado intervalo de pressão sonora. Ou seja, reduzindo a intensidade, a partir de um valor mínimo não ocorrerá mais resposta e aumentando-a, a partir de um valor máximo, a resposta será mantida constante. Assim, para determinar essa relação entre intensidade do som e intensidade da resposta, apresentamos aos animais o mesmo trecho de som por quatro vezes, num ponto fixo do trajeto de descida do eletrodo correspondente ao centro do CI. A única diferença entre um trecho e outro foi a pressão sonora do estímulo (fixado em dB SPL – do inglês “*Sound Pressure Level*”), que foi reduzida seqüencialmente entre uma apresentação e outra.

Descrição dos Procedimentos Experimentais

Animais

Realizada a histologia e verificação do posicionamento do eletrodo, observamos que em alguns animais o registro foi realizado fora do CI. Assim, decidimos utilizar estes animais como controle (n=4). E os animais cuja posição do eletrodo foi confirmada no interior do CI foram então considerados o grupo experimental (n=4). Dois animais foram excluídos devido a um erro metodológico na aquisição dos dados.

Desenho experimental

A onda portadora foi fixada em 5kHz e a moduladora com frequência de 43Hz (corrigida para 41,99Hz). A frequência da onda moduladora foi corrigida para que um número inteiro e primo de oscilações acontecesse dentro da janela temporal durante a análise espectral, seguindo as sugestões de (Felix *et al.* 2005), para prevenir o vazamento espectral. Iniciou-se a aquisição do EEG, inicialmente, sem nenhum tipo de estimulação auditiva (registro basal). Apresentamos o som AM com 60s de duração, por quatro vezes. Em cada vez que foi apresentado, a intensidade do som foi reduzida entre um trecho e outro (volume 1 > volume 2 > volume 3 > volume 4). O intervalo de silêncio entre eles foi variável, pois, era dependente do tempo do experimentador alterar a intensidade do estímulo no tocador de mp3,

não sendo esta variação intencional. E continuamos registrando o EEG por um tempo variável após o final do último trecho. Durante os últimos 30s do primeiro e terceiro trecho e os primeiros 30s do segundo e quarto trecho, o tubo de borracha foi ocluído para se avaliar a possibilidade contaminação eletromagnética pela fonte sonora. O protocolo de estimulação acústica está representado na Figura 9.

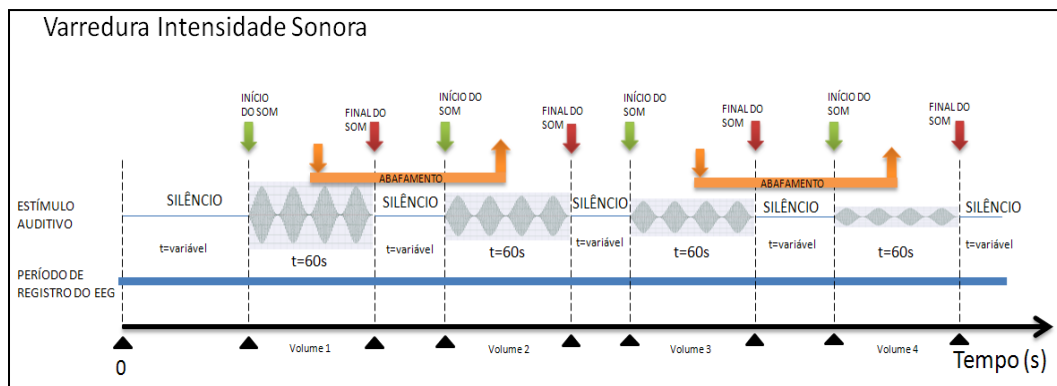


Figura 9 - Representação esquemática do protocolo de estimulação auditiva em que variamos a intensidade da onda sonora de mesma portadora e moduladora, porém, reduzindo a intensidade do estímulo aplicado na orelha do animal. As intensidade apresentadas foram: 77,24 dB SPL, 67,5 dB SPL, 55,88 dB SPL, e 53,78 dB SPL.

Registro da Intensidade do Estímulo

A intensidade do estímulo auditivo foi registrada por meio de decibelímetro conectado ao sistema de aquisição. Antes do registro dos valores da intensidade, o sistema de aquisição foi calibrado para determinação da correspondência ente os valores de voltagem de saída do decibelímetro e a intensidade do estímulo (dois primeiros platôs no início do registro, correspondentes a 93dB e 114dB) por meio de um calibrador que fornecia duas intensidades conhecidas. A intensidade do estímulo se manteve constante para cada um dos estímulos. Os valores das intensidades foram: 77,24dB; 67,5dB; 55,88dB; 53,78dB.

Crítérios de Processamento do Sinal

Os registros do EEG foram recortados nos períodos em que os estímulos de diferentes intensidades foram apresentados com 60s de duração e subdivididos em dois: tubo aberto e tubo ocluído, para cada intensidade de apresentação, com 30s cada. Sendo o primeiro relativo ao período em que o tubo conectado à barra auricular permaneceu aberto, e o segundo relativo

ao período em que ocluímos este tubo. Posteriormente, realizamos o cálculo da FFT em cada trecho, calculamos então a média da energia do sinal para 20s intermediários de cada trecho no pico espectral referente à frequência de modulação. Ou seja, descartamos os primeiros e últimos 5s de cada trecho de 30s, para o cálculo da média. Para o cálculo da FFT utilizamos uma janela de 2048 pontos com uma sobreposição de 22 pontos.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste Two-way ANOVA e pós-teste Bonferroni. Para cada grupo foi estimada a média da energia do sinal em cada intensidade de apresentação do estímulo, tanto para o período em que o tubo permaneceu aberto quanto fechado. Os valores da média da energia (amplitude) foram apresentados em função da intensidade do estímulo em dB.

Resultados

Espectrograma do EEG

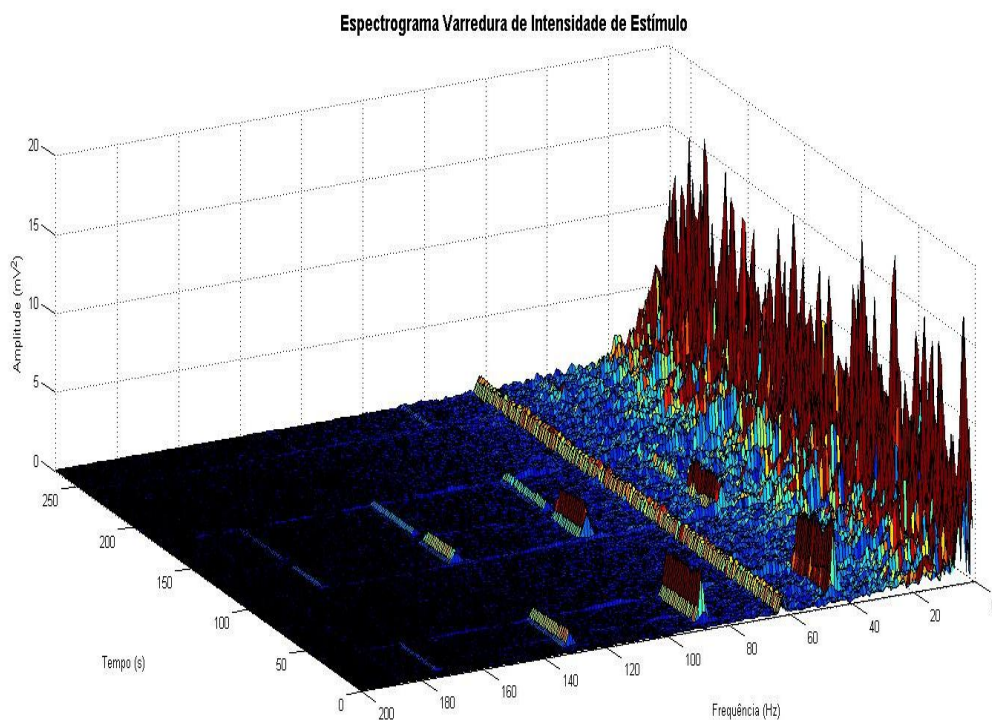
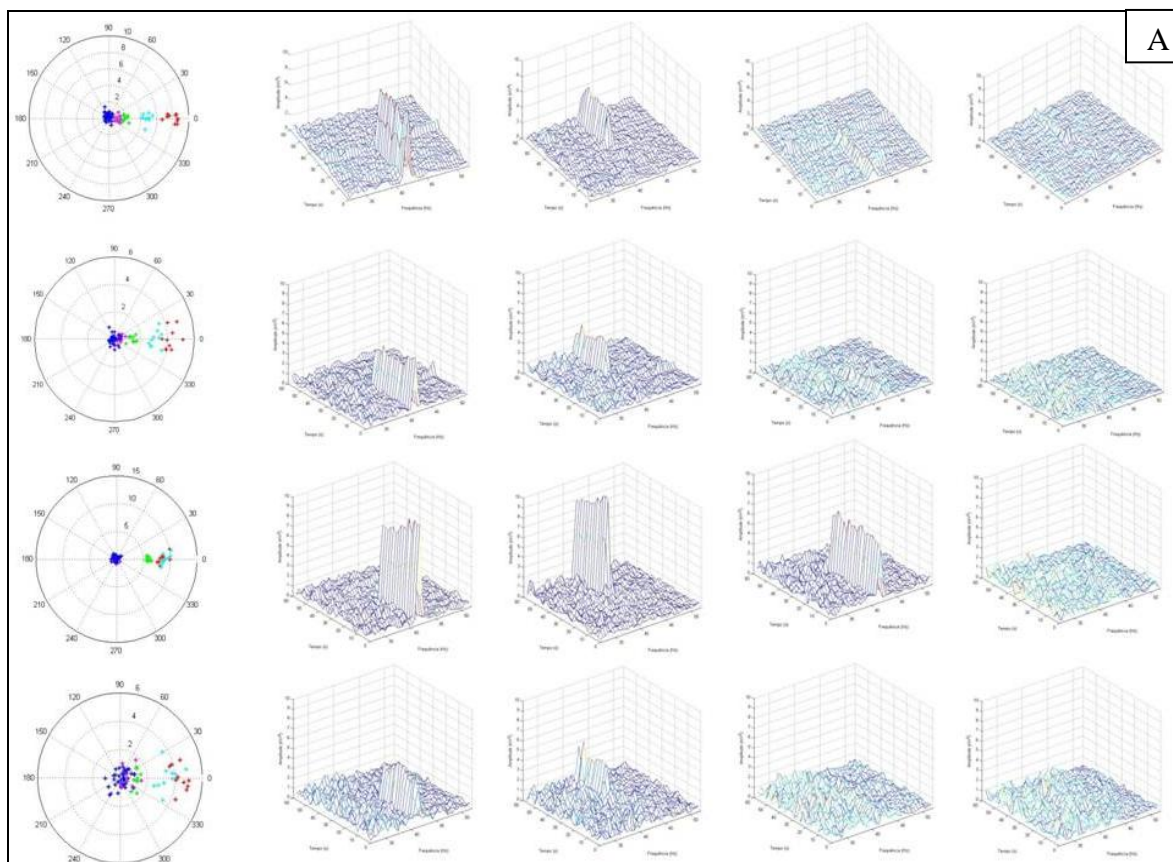


Figura 10– Espectrograma do EEG durante todo o período de registro apresentando o espectro até 200Hz. Observe os picos na frequência de modulação (41.99 Hz) e nas suas harmônicas para as diferentes intensidades de apresentação do estímulo.

Ao observar o espectrograma de todo o registro do EEG realizado, identificamos os picos espectrais para a frequência de modulação e suas harmônicas. A altura destes picos que reflete a amplitude, ou energia da resposta, é visualmente decrescente, acompanhando a intensidade decrescente do estímulo. A contaminação eletromagnética do EEG pela rede elétrica apresenta-se como um pico espectral em 60Hz, constante, que se estende por todo o período de registro.

Gráfico Polar e Espectrograma para cada animal dos Grupos Experimental e Controle



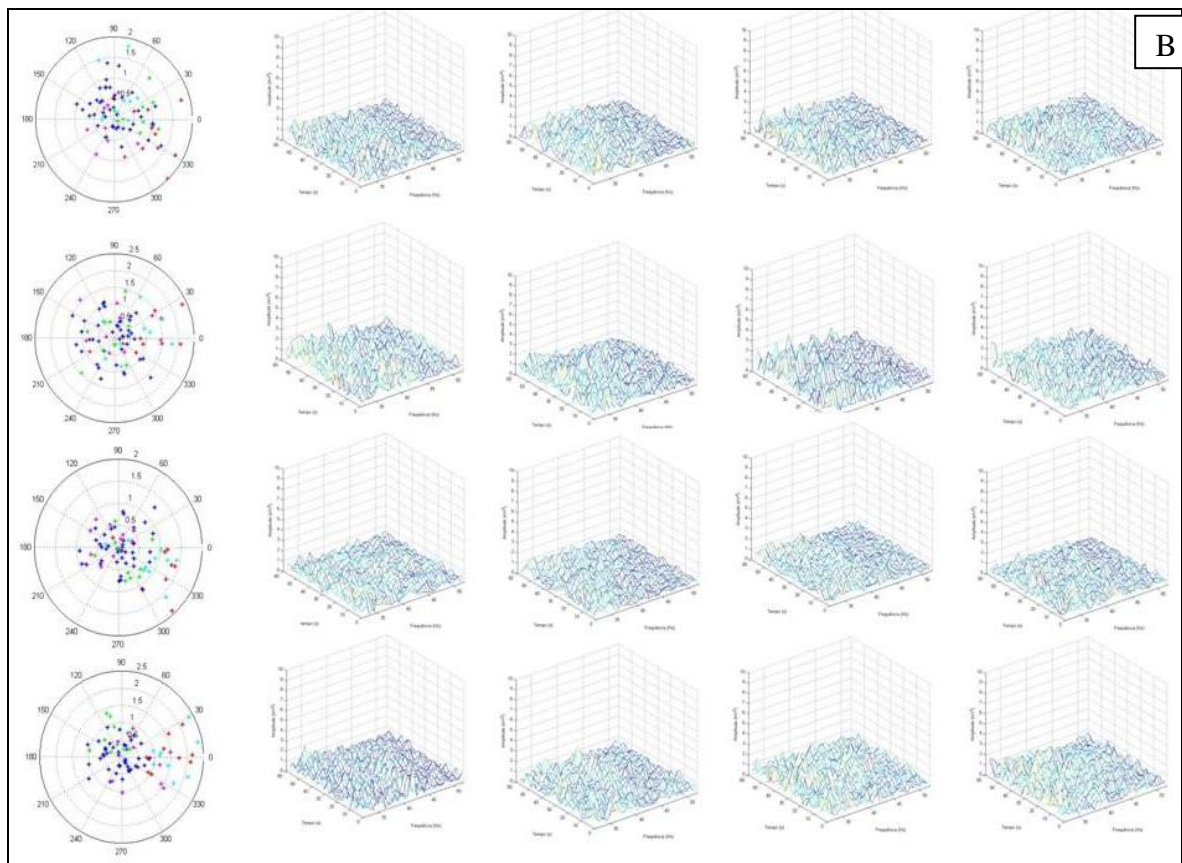


Figura 11– Representação da amplitude das respostas por meio do gráfico polar e espectrograma, para os períodos em que o tubo permanece aberto e ocluído em cada intensidade de apresentação do estímulo. Cada conjunto horizontal representa os dados de um animal. Os quatro animais superiores representam o Grupo Experimental e os quatro inferiores o Grupo Controle. À esquerda, os gráficos polares, cada cor representa uma intensidade (vermelho: 77.24dB; azul-claro: 67.5dB; verde: 55.88dB; rosa: 53,78dB; azul-marinho: tubo ocluído para todos as intensidades) e a distância em relação ao centro, a amplitude da resposta na frequência de modulação. Para o Grupo Experimental observe o agrupamento dos pontos significando estarem em fase, o que não é observado no Grupo Controle. À direita dos gráficos polares estão os espectrogramas do sinal recortado entre as frequências de 32Hz e 52Hz representados para os 60s de duração de cada estímulo, cada coluna de espectrogramas representa uma intensidade de estímulo decrescendo da esquerda para direita. Observe o aparecimento dos picos de resposta na frequência de modulação do estímulo, e o decaimento de sua amplitude diretamente proporcional ao decaimento da intensidade do estímulo, e a inexistência destes picos para o Grupo Controle.

Análise Estatística

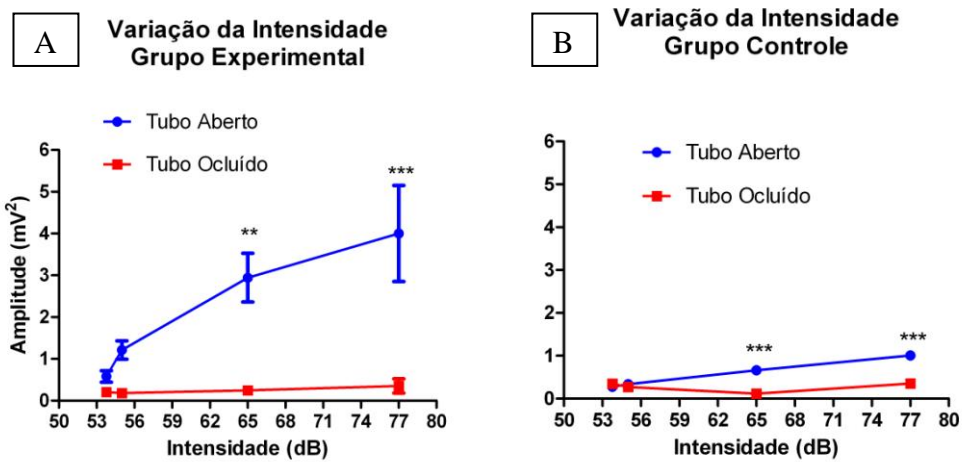


Figura 12 – Variação da Intensidade do Estímulo. Os animais de ambos os grupos, Experimental e Controle, foram submetidos a uma variação da intensidade do estímulo 53,78dB; 55.88dB; 67.5dB; 77.24dB. A figura A representa os animais do Grupo Experimental e a B os do Grupo Controle. Resultados expressos como média \pm EPM. Número de animais por grupo = 4. Two-way ANOVA, post-hoc Bonferoni. Comparação intragrupo (tubo aberto versus tubo ocluído): *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Ao observarmos os dois grupos percebemos que o grupo em que o eletrodo passou pelo centro do CI (Grupo Experimental) houve uma maior amplitude de resposta em relação ao grupo em que o eletrodo não passou pelo CI (Grupo Controle). Para as intensidades mais altas houve diferença estatística significativa, nos dois grupos (** $p < 0.01$; e *** $p < 0.001$). A oclusão do tubo revela uma redução da energia do sinal nos dois grupos. Para os estímulos de menores intensidades aparentemente não há diferença estatisticamente significativa entre o período em que o tubo permaneceu aberto em relação ao fechado. Apesar de não encontrarmos diferença estatística significativa para as intensidades mais baixas, a presença da resposta pode ser vista no espectrograma. A variação na amplitude da resposta segue o perfil monotônico da variação da intensidade do estímulo, o que é mais proeminente para o grupo experimental.

Discussão

Considerando ser o CI um dos núcleos da via auditiva onde a resposta ao estímulo irá ocorrer é de se esperar que os eletrodos que estejam mais próximos da fonte geradora captem

uma maior energia da resposta evocada, quando comparamos o grupo experimental com o grupo controle. Isto pode ser explicado pelo fato que a intensidade de um campo elétrico varia com o quadrado da distância da fonte. Assim, se considerarmos o CI como a fonte deste campo, quanto maior a distância da fonte menor o potencial registrado.

Podemos também observar que a oclusão do tubo resultou em valores de amplitude praticamente invariáveis para os diferentes valores de intensidade de estímulo, isto significa que a oclusão de fato impediu a evocação de respostas. Este período de oclusão serve como referência para avaliar o componente eletromagnético inserido pela sistema gerador e assim normalizar os valores encontrados. Além disso podem ser comparados com os valores espectrais correspondentes quando o sistema de geração de áudio estava desligado e poder verificar se houve ou não contaminação do sinal.

A amplitude da resposta é diretamente proporcional à variação da intensidade do estímulo. Isto ocorre, pois, os neurônios do CI responsivos a uma mesma frequência característica apresentam diferentes limiares de resposta à intensidade do estímulo (Donald *et al.* 1999). Ou seja, existem neurônios que só respondem a intensidades de estímulo mais altas, então, com o aumento da intensidade de estímulo alcança-se o limiar de um maior número de neurônios e com isso a amplitude da resposta é maior para maiores intensidades.

Uma outra observação a ser feita é quanto à correlação entre o perfil da variação da intensidade, e da amplitude da resposta. Ambas variam de modo linear, como já foi mostrado em outros trabalhos (Stapells *et al.* 1984; Picton *et al.* 2003).

Pequenas diferenças no sistema de temporização do conversor A/D quando comparadas àquelas do sistema de estimulação acústica podem fazer com que não exista exatamente um número inteiro de comprimentos de onda no intervalo de análise (2048 pts amostrais). Como consequência, apareceu um pequeno desvio de fase entre janelas consecutivas que foi corrigido simplesmente inserindo uma sobreposição de 22 pontos a cada janela temporal analisada em seu espectro de frequência. O fato de que o procedimento de sobreposição funcionou atesta que o erro de temporização, apesar de presente, era sistemático e, portanto, totalmente previsível e solucionável.

Nos períodos em que o tubo esteve fechado a ausência de resposta é evidenciada pela menor amplitude e pela ausência de sincronia de fase na frequência de modulação. No grupo controle a dispersão de fase evidencia mesmo uma menor amplitude ou uma ausência de resposta devido ao eletrodo estar localizado fora do gerador, isto é, o colículo inferior.

A fase da resposta evidencia o atraso sináptico que ocorre na transmissão do sinal pela via auditiva. Como evidenciado por Cone-Wesson em 2002 (Cone-Wesson *et al.* 2002) é

possível pela análise da fase, sabendo-se a latência de cada gerador, localizar o ponto da via auditiva responsável pela resposta. Assim, ondas com maior latência relacionadas a geradores mais altos da via auditiva são responsáveis pela composição de REARP de menores frequências de modulação do estímulo e vice-versa.

Quanto maior a amplitude da resposta menor a dispersão de fase, isso ocorre pois ocorre menor interferência da atividade elétrica de fundo e com isso uma melhor relação sinal-ruído e, portanto, quanto mais próximo do CI melhor a relação sinal-ruído.

Capítulo 2 – Varredura Discreta de Moduladora

Pergunta Científica

Diferentes frequências de modulação de um mesmo tom puro apresentam variação na intensidade da REARP de acordo com a localização anatômica do sítio de registro?

Descrição dos Procedimentos Experimentais

Animais

Realizada a histologia e verificação do posicionamento do eletrodo, observamos que em alguns animais o eletrodo passou por fora do CI. Assim, decidimos utilizar estes animais como Grupo Controle (n=4). E os animais cujo eletrodo atravessou o interior do CI foram então considerados o Grupo Experimental (n=6).

Desenho experimental

Os estímulos são três trechos com 40s de duração de um tom puro de 5kHz, cada trecho modulado sinusoidalmente em amplitude em uma determinada frequência: FM1=43Hz (corrigida para 41,99Hz); FM2=109Hz (corrigida para 106,45Hz); e, FM3=199Hz (corrigida para 186,52 Hz). A frequência da onda moduladora foi corrigida para que um número inteiro e primo de oscilações acontecessem dentro da janela temporal durante a análise espectral, seguindo as sugestões de (Felix *et al.* 2005), para prevenir o vazamento espectral.

Realizamos uma varredura em sentido ântero-posterior e dorso-ventral do CI, com o eletrodo inclinado em 30 graus, em seis pontos do trajeto, descendo o eletrodo monopolar fixado à barra vertical do estereotáxico ao passo de 1 mm (iniciando a 1,5mm abaixo do nível do bregma e estendendo até 6,5mm, atravessando o CI). Em cada ponto realizamos a apresentação das ondas sonoras e registramos a atividade bioelétrica

Iniciamos a aquisição do EEG sem nenhum tipo de estimulação auditiva por um tempo variável, em seguida, apresentamos sequencialmente os três trechos de 40s, com um intervalo de 30s de silêncio entre eles, e continuamos registrando o EEG por um curto período após o final do último trecho. Em cada estímulo, o tubo de borracha foi ocluído durante os últimos 20s, para que pudéssemos posteriormente avaliar a possibilidade de contaminação eletromagnética pela fonte sonora (Figura 13).

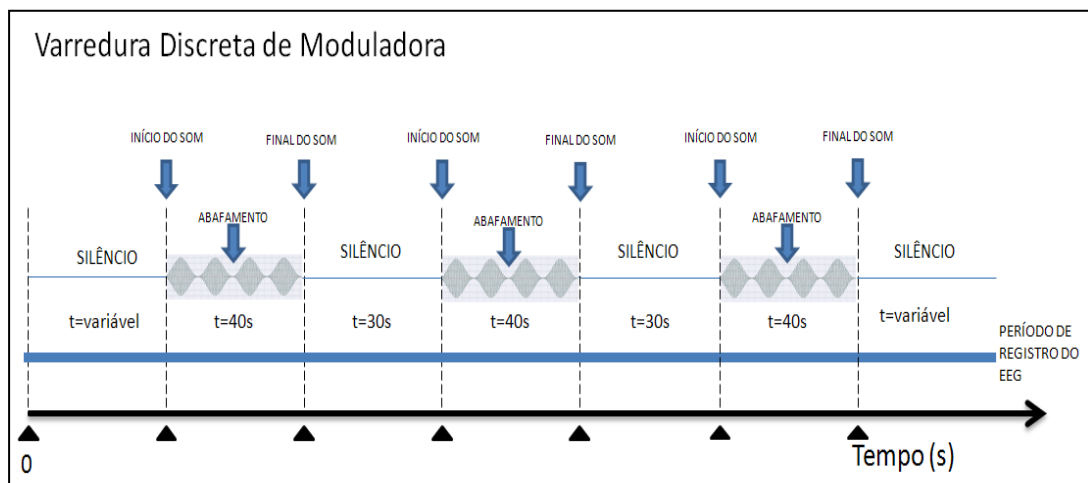


Figura 13 - Diagrama esquemático representando a escala temporal de administração do estímulo sonoro e realização do registro da atividade bioelétrica para cada frequência de modulação em cada um dos seis pontos de varredura dorso-ventral. O período compreendido entre o “início do som” e o “abafamento” corresponde ao período em que o tubo de borracha permaneceu aberto. O período compreendido entre o “abafamento” e o “final do som” corresponde ao período em que o tubo de borracha foi ocluído. Os períodos “silêncio” correspondem aos períodos em que a fonte sonora permaneceu desligada. Para cada um dos seis pontos da varredura dorso-ventral realizaremos os registros para cada uma das três frequências de modulação: $FM1=43\text{Hz}$ (corrigida para $41,99\text{Hz}$); $FM2=109\text{Hz}$ (corrigida para $106,45\text{Hz}$); e, $FM3=199\text{Hz}$ (corrigida para $186,52\text{ Hz}$).

Correlação Histológica entre os Pontos de Registro

Após a análise da posição dos eletrodos pela histologia, consideramos apenas aqueles pontos da varredura anatômica que se sobrepuseram em todos os animais no Grupo Experimental. Assim, ao invés de seis pontos de varredura anatômica, utilizamos, para análise estatística, apenas quatro pontos de cada animal. Para o Grupo Controle, devido à grande variabilidade utilizamos os pontos que consideramos histologicamente correspondentes.

Crêterios de Processamento do Sinal

Os registros do EEG foram recortados nos períodos correspondentes   apresenta o dos estímulos, com 40s de dura o e subdivididos em dois grandes grupos: tubo aberto e tubo ocluido, para cada frequência de modula o, com 20s cada. Sendo o primeiro relativo ao período em que o tubo conectado   barra auricular permaneceu aberto, e o segundo relativo ao período em que ocluimos este tubo. Posteriormente, realizamos o cálculo da FFT em cada trecho, calculamos então a média da energia do sinal no pico espectral referente   frequência de modula o, selecionando os 10s intermediários de cada trecho. Ou seja, descartamos os primeiros e últimos 5s de cada trecho de 20s, para o cálculo da m dia. Para o cálculo da FFT utilizamos uma janela de 2048 pontos com uma sobreposi o de: 48 pontos para a frequência de modula o de 41,99 Hz; 57 pontos para frequência de modula o 106,45 Hz; e 22 pontos para frequência de modula o 186,52 Hz.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste Two-way ANOVA e pós-teste Bonferroni. Para cada grupo foi calculada a média da energia do sinal em cada frequência de modula o do estímulo, tanto para o período em que o tubo permaneceu aberto quanto fechado. Os valores da média da energia (amplitude) foram apresentados em fun o da frequência de modula o do estímulo em Hz.

Resultados

Espectrograma do EEG

Ao observar o espectrograma de todo o registro do EEG realizado, identificamos os picos espectrais para a frequência de modula o e suas harmônicas. Na Figura 14A está o registro para FM de 41,99 Hz, e   direita (Figura 14B) para as outras duas FM (106,45 Hz e 186,52 Hz). A altura destes picos que reflete a amplitude, ou energia da resposta, a sua posi o no eixo das frequências demonstra a correspondência   FM. A contamina o eletromagnética do EEG pela rede elétrica apresenta-se como um pico espectral em 60Hz, constante, que se estende por todo o período de registro.

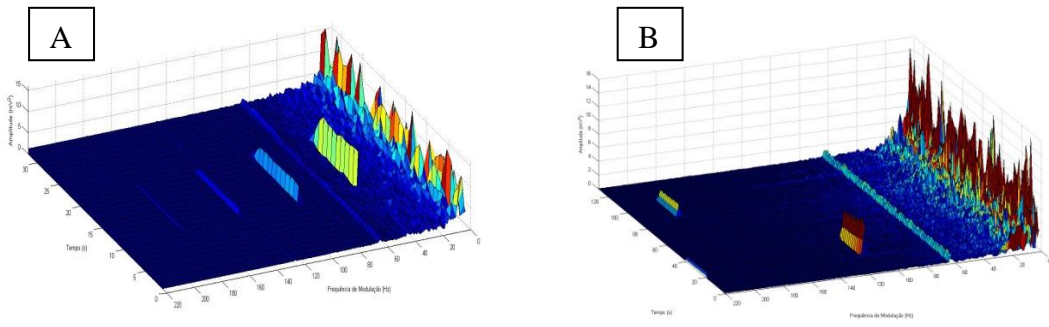
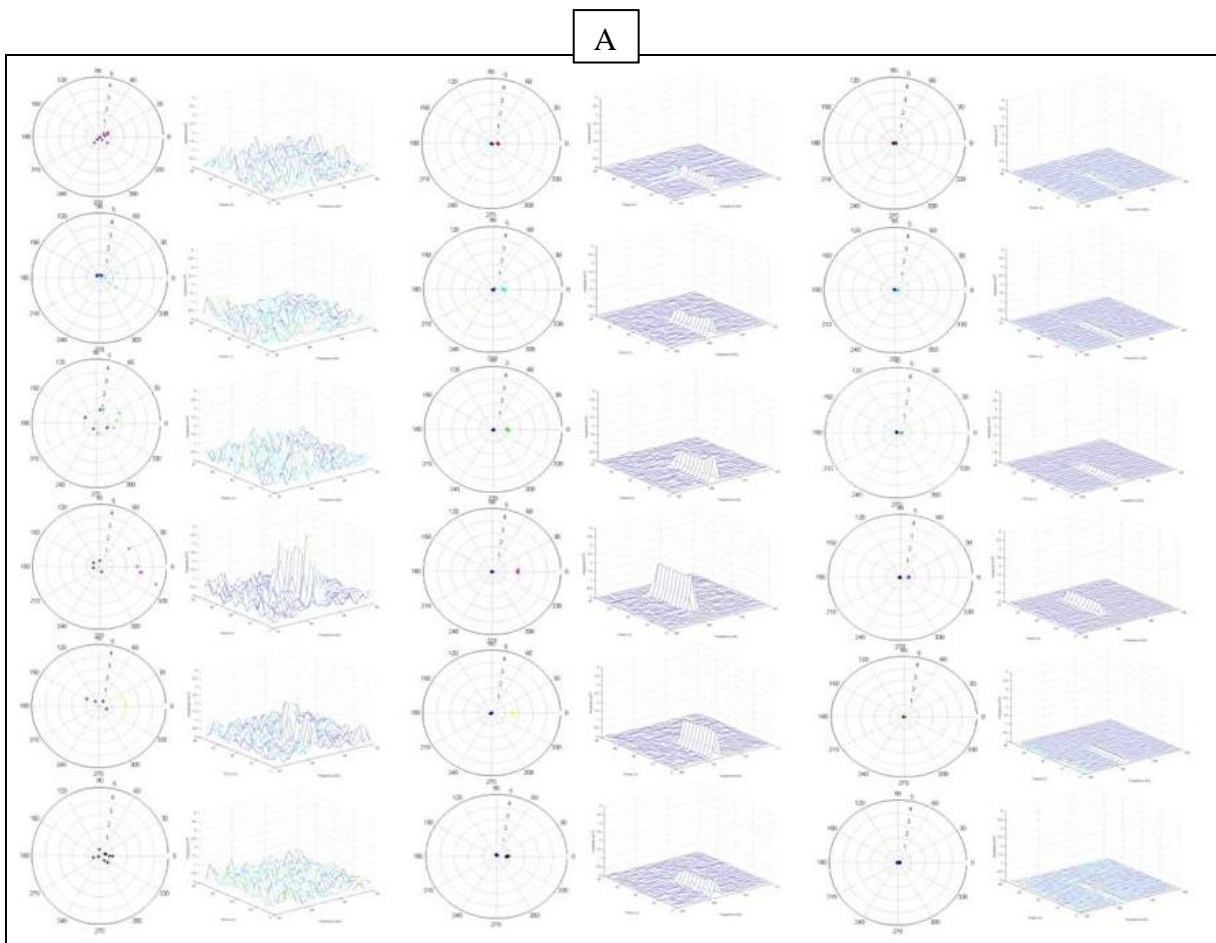


Figura 14– Espectrograma do EEG para as diferentes frequências de modulação no sítio anatômico de melhor resposta em um determinado sujeito experimental. Na figura à esquerda,(A) o espectro do EEG evidencia o pico da resposta para a menor moduladora (41,99Hz) e suas harmônicas. À direita,(B) observamos os picos da resposta para as moduladoras 106,45Hz e 186,52Hz.



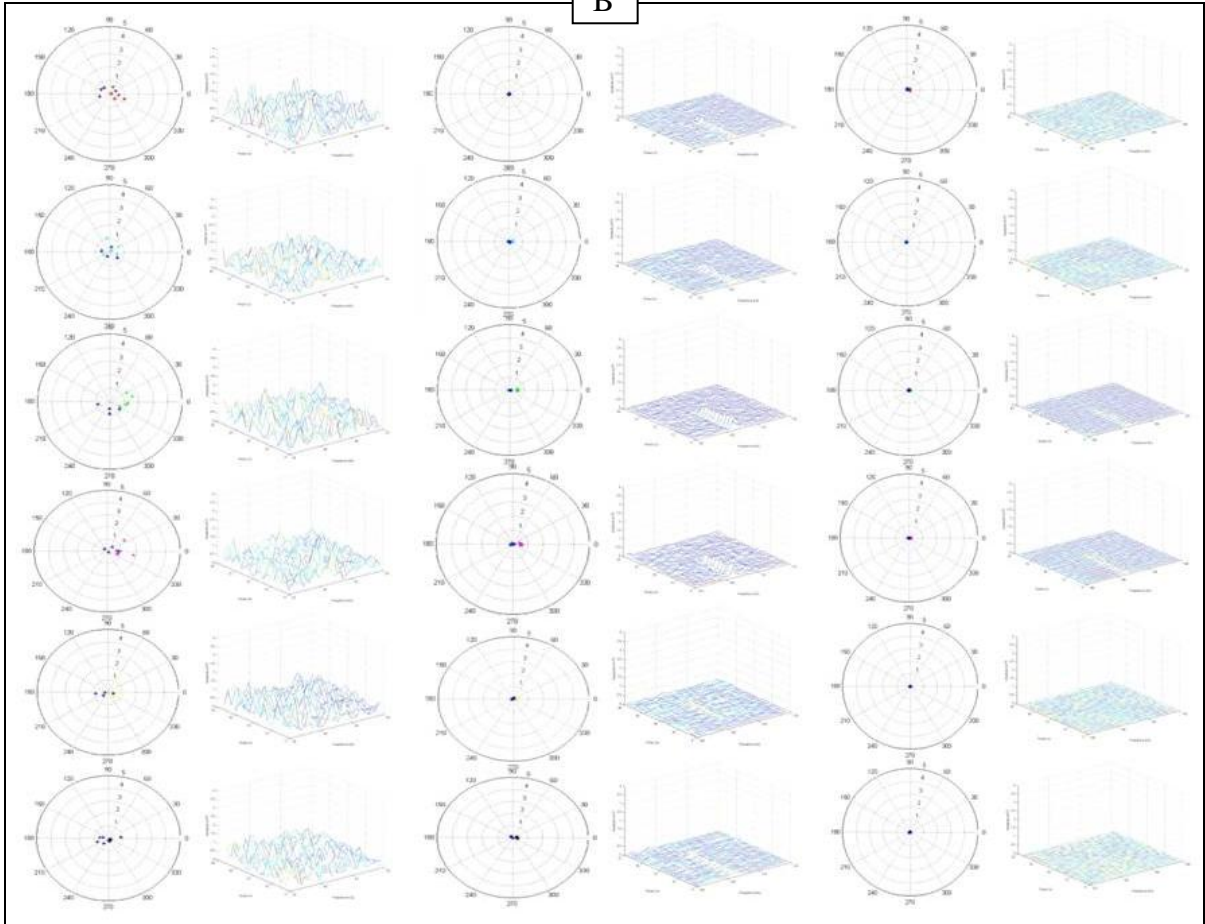
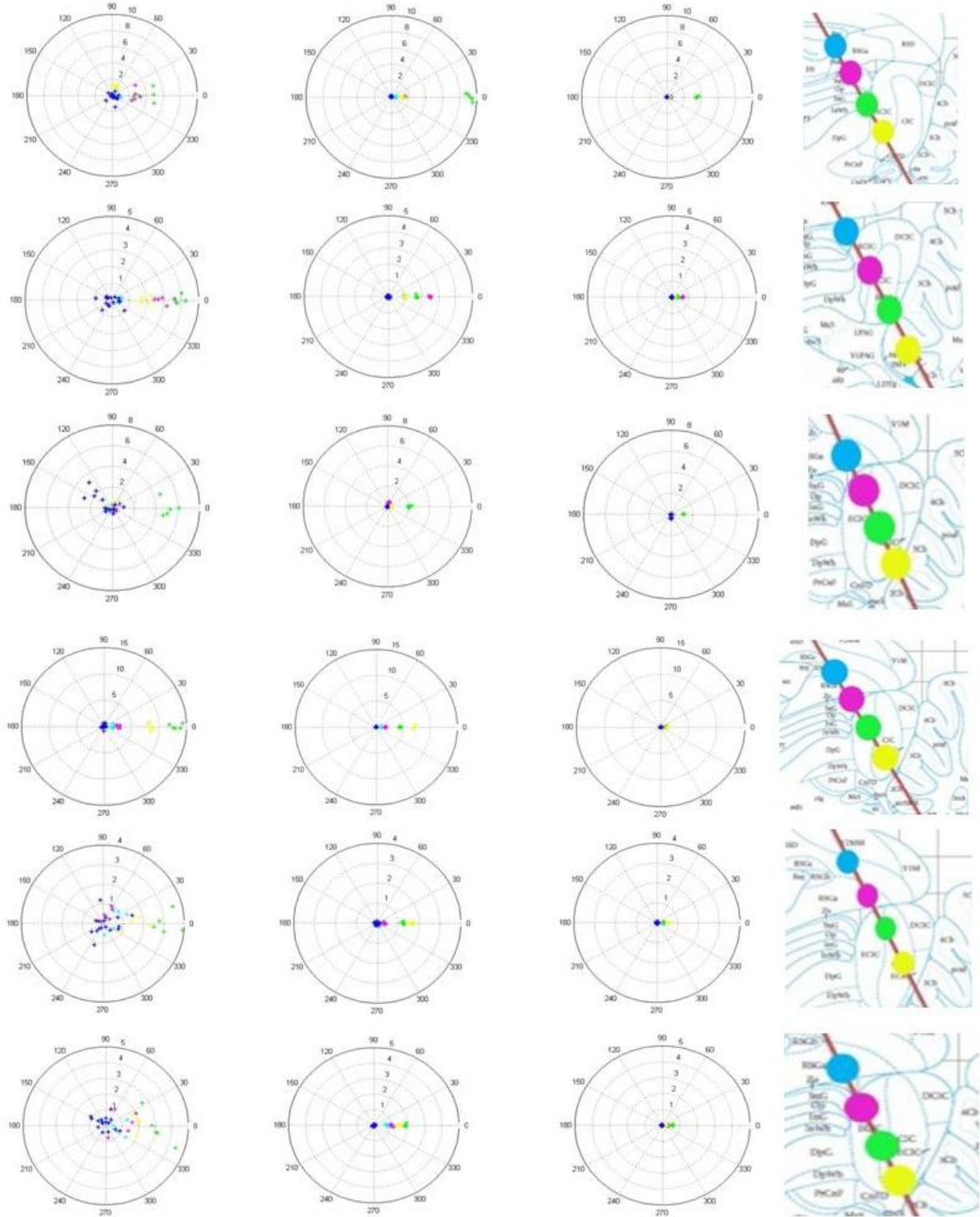
B

Figura 15 - Gráficos polares e espectrogramas da reposta evocada para cada frequência de modulação nas seis posições da varredura anatômica. O bloco superior (A) representa um dos animais do grupo Experimental e o inferior(B), do grupo Controle. Cada coluna representa uma frequência de modulação(da esquerda para direita: 41,99Hz;106,45Hz; 186,52Hz) e cada linha uma posição da varredura anatômica.

Gráficos Polares e Posições Anatômicas dos Sítios de Registro das REARPs

A



B

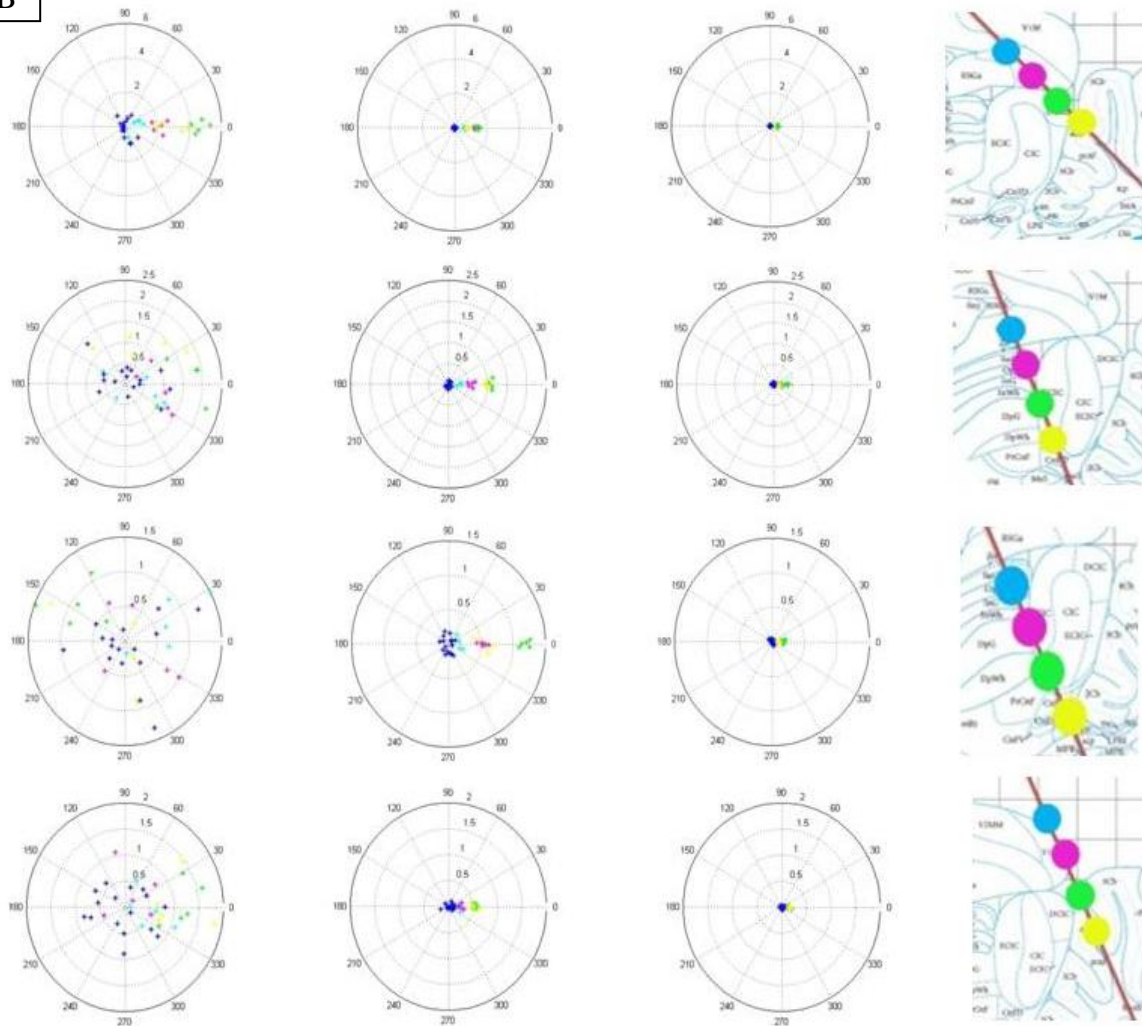


Figura 16- Representação da amplitude e dispersão de fase das respostas por meio do gráfico polar e suas respectivas posições anatômicas, para os períodos em que o tubo permanece aberto e ocluído em cada intensidade de apresentação do estímulo. Cada conjunto horizontal representa os dados de um animal. Os seis animais superiores representam o Grupo Experimental e os quatro inferiores o Grupo Controle. Nos gráficos polares, cada cor representa uma posição anatômica (azul-claro: posição 2; rosa: posição 3; verde: posição 4; amarelo: posição 5; azul-marinho: tubo ocluído para todas as posições anatômicas) e a distância dos pontos em relação ao centro, a amplitude da resposta na frequência de modulação. Cada coluna de gráficos correlaciona-se a uma frequência de modulação, respectivamente, da esquerda para direita: $FM1=43\text{Hz}$ (corrigida para $41,99\text{Hz}$); $FM2=109\text{Hz}$ (corrigida para $106,45\text{Hz}$); e, $FM3=199\text{Hz}$ (corrigida para $186,52\text{Hz}$). No Grupo Experimental as respostas apresentaram maior amplitude e uma menor

dispersão de fase em relação ao Grupo Controle. À direita dos gráficos polares estão as correlações histológicas da posição anatômica dos eletrodos para cada animal.

A REARP apresentou variação de amplitude para as diferentes frequências de modulação entre os diferentes sítios anatômicos. Em alguns animais do grupo experimental o pico de resposta para 106,45Hz foi na terceira posição da varredura anatômica enquanto que o pico de resposta para 41,99Hz foi na quarta.

Para os animais do grupo controle a amplitude das REARP foram todas menores que para o grupo experimental. Além disso a modulação em 41,99Hz apresentou grande dispersão de fase.

As REARP apresentaram maior amplitude para todas as frequências quanto mais próximo o eletrodo estava do gerador, colículo inferior.

Análise Estatística

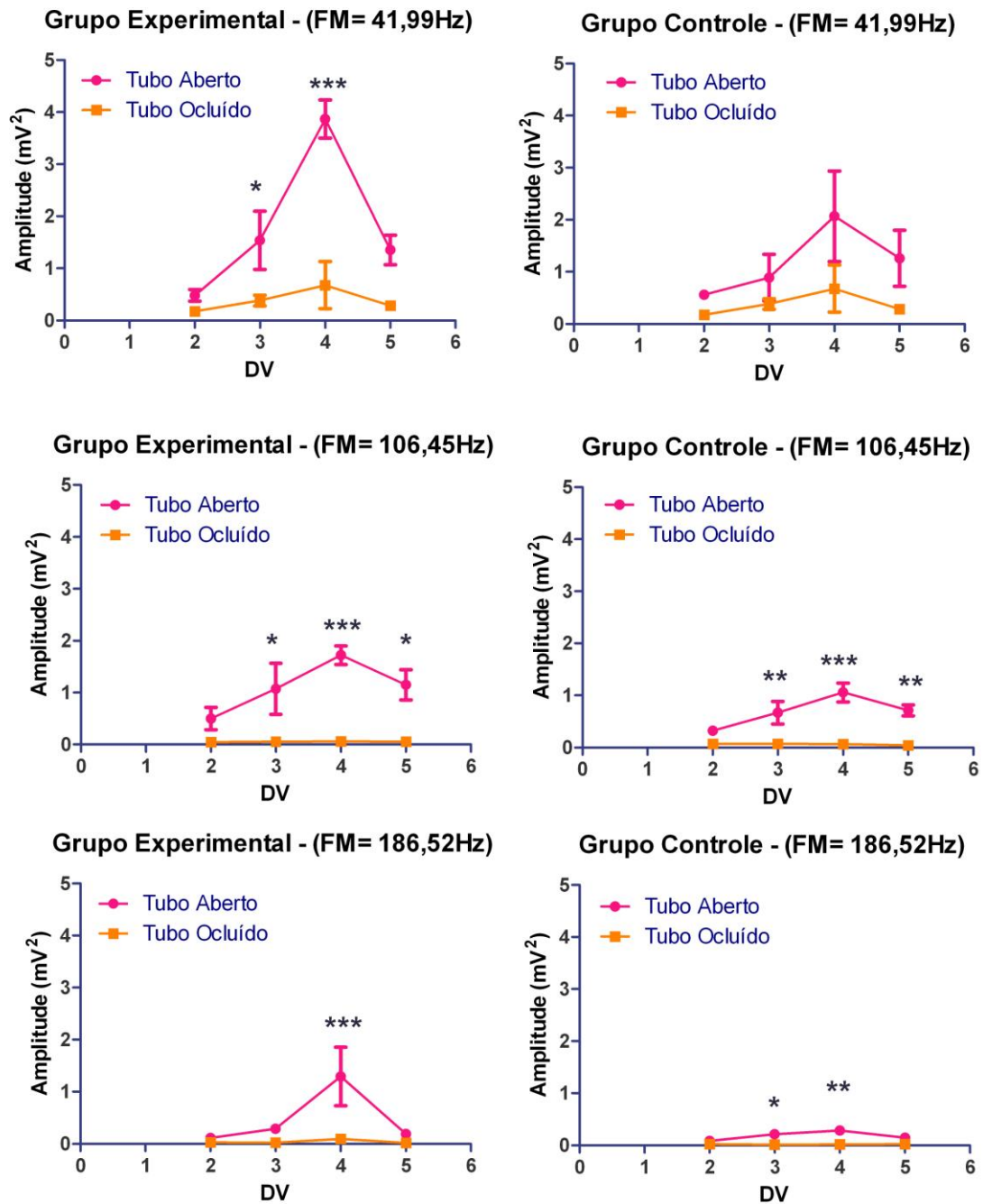


Figura 17 - Variação da Frequência de Modulação do Estímulo. Os animais de ambos os grupos, Experimental e Controle, foram submetidos a uma variação da frequência de modulação do estímulo e a resposta foi registrada em quatro pontos do mesencéfalo. A metade da esquerda representa o Grupo Experimental e à direita o Grupo Controle. Cada gráfico representa a amplitude da resposta para cada uma das frequências de modulação, de cima para baixo: 41,99Hz; 106,45Hz; 186,52Hz. DV significa a posição dorso-ventral da

*varredura anatômica sendo cada DV um dos seis pontos de registro no trajeto do eletrodo, assim o DV 2 é o segundo ponto. Resultados expressos como média ± EPM. Número de animais no Grupo Experimental: 6, e no Controle: 4. Two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni. Comparação intragrupo (tubo aberto versus tubo fechado): *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.*

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste Two-way ANOVA e pós-teste Bonferroni (**= $p < 0.001$; **= $p < 0.01$; e *= $p < 0.05$). Comparando os Grupos Experimental e Controle em relação a cada uma das frequências de modulação, observamos que há uma diferença na intensidade da REARP, sendo pelo aproximadamente duas vezes maior no Grupo Experimental na posição anatômica de registro mais próxima do centro do CI. Nas outras posições anatômicas a diferença foi bem menor.

Além disso, há também um aumento da intensidade da resposta quando comparamos os diferentes sítios anatômicos de registro das REARPs. O quarto ponto da varredura anatômica (DV4) é o local de registro mais próximo do centro do CI tanto no Grupo Experimental quanto no Controle e nele é evidenciado a amplitude máxima de resposta para cada frequência de modulação. A intensidade máxima da resposta também varia entre as diferentes moduladoras, para um mesmo sítio anatômico. Sendo que a as frequências de modulação 41,99 Hz e 106,45 Hz apresentam maior amplitude de resposta. E a primeira apresentando uma amplitude maior que a segunda. Porém, a atividade elétrica basal também é maior para primeira. Esta superioridade de amplitude para 41,99Hz possa talvez ser anulada por uma menor relação sinal-ruído. O que é evidenciado pela não existência de diferença estatisticamente significativa entre a energia do sinal para o período em que o tubo esteve aberto e o período em que o tubo esteve fechado no Grupo Controle nesta moduladora. Já quando observamos a amplitude da REARP para a frequência de modulação 106,45Hz, existe diferença estatisticamente significativa entre a energia do sinal para o período em que o tubo esteve aberto e o período em que o tubo esteve fechado tanto no Grupo Controle quanto no Experimental. Esta melhor relação sinal-ruído também pode ser observada para a moduladora de 186,52 Hz, nesta frequência de modulação a amplitude máxima de resposta, entretanto, é menor que nas outras duas frequências de modulação.

Discussão

Analisando cada frequência de modulação separadamente, a diferença na amplitude da REARP entre os Grupos Experimental e Controle pode ser explicada pela proximidade com o

gerador. O que também explica a máxima amplitude nos sítios anatômicos de registro localizados mais próximo do centro do CI, já que esta característica da resposta varia com o campo elétrico e com isso inversamente proporcional ao quadrado da distância.

Segundo Cone-Wesson (Cone-Wesson *et al.* 2002) as REARP obtidas por frequências de modulação mais altas (>60Hz) refletem estruturas inferiores da via e as mais baixas (<60Hz) refletem geradores superiores da via. Nossas observações mostram que apesar da maior amplitude da REARP ter ocorrido para a moduladora de 41,99Hz; 106,45Hz apresenta a melhor relação sinal/ruído (“tubo aberto” v.s. “tubo fechado”). Houve diferença estatisticamente significativa, mesmo para os pontos distantes do CI, para as maiores frequências de modulação. Apesar destes dados corroborarem com a afirmativa de Cone-Wesson, devemos analisar os resultados cautelosamente. Primeiro, quanto mais rostral na via auditiva, maior será o número de sinapses e portanto menor deverá ser a capacidade do sistema de responder em fase com moduladoras de frequências maiores (a crescente complexidade das redes neurais funcionariam como um filtro passa-baixas). Segundo, osciladores cerebrais intrínsecos são dependentes da função dos diversos substratos neurais subjacentes e, portanto, geram EEGs de fundo com espectro característico; logo, regiões diferentes podem “contaminar” os REARPs interferindo na relação sinal/ruído de forma anátomo-dependente. Nossos resultados foram coletados com uma metodologia invasiva que permite separar a contribuição de substratos neurais específicos, enquanto que registros coletados do crânio seriam a soma das contribuições de todas as “estações” sinápticas ao longo da via auditiva.

A intensidade da resposta em relação à frequência de modulação pode também ser influenciada por três fatores: o neurônio ou circuito não consegue responder a determinadas moduladoras; a via filtra o sinal devido ao número de sinapses; e a relação sinal-ruído muda, pois, o EEG basal interfere na faixa (banda de frequência) da moduladora.

A variação do pico do estímulo, dada pela frequência de modulação, poderia estar ultrapassando a frequência de disparo máxima dos neurônios da via (Donald *et al.* 1999), assim, os neurônios começariam a apresentar um padrão de disparo constante. Como nem todos os neurônios possuem frequências de disparo máximas iguais, uma menor população de neurônios estaria apresentando “bursts” de disparos na frequência de modulação. Se considerarmos que para um tom puro constante os neurônios disparam numa frequência fixa e constante para uma determinada intensidade de estímulo, e que quando modulamos um som ocorre uma variação na intensidade do estímulo na frequência de modulação e com isso uma variação na frequência de disparo destes neurônios, e que é essa variação da frequência de

disparo que gera a onda da REARP. Se a variação do pico da portadora é tão alta que antes do próximo potencial de ação do neurônio a amplitude do som desce e sobe novamente, este neurônio perderia a capacidade de discriminar esta variação e manteria seu disparo constante seja ele alto ou baixo. Com a constância da taxa de disparo não mais visualizaríamos os PEA. Para frequências de modulação ainda mais altas estes neurônios passariam a ser estimulados entre os potenciais de ação, em períodos refratários, e assim, ora teriam neurônios em fase refratária e enquanto outros estão disponíveis para disparar, ora o inverso. Reduzindo o sincronismo neural e com isso a REARP.

Capítulo 3 – Varredura Contínua de Moduladora

Pergunta Científica

A resposta evocada em regime permanente (REARP) apresenta alguma faixa de modulação em que a amplitude da resposta se mantém constante, para as várias posições da varredura anatômica?

Descrição dos Procedimentos Experimentais

Animais

Realizada a histologia e verificação do posicionamento do eletrodo, observamos que em alguns animais o eletrodo passou por fora do CI. Assim, decidimos utilizar estes animais como Grupo Controle (n=4). E os animais cujo eletrodo atravessou o interior do CI foram então considerados o Grupo Experimental (n=6).

Desenho experimental

O estímulo é um tom puro cuja frequência é constante: 10KHz, modulado em amplitude por uma onda senoidal, cuja frequência varia de 10Hz a 200Hz, linearmente, com duração de 190s. Um aumento linear de 1Hz/s. Apresentado seis vezes para cada animal, para cada ponto da varredura anatômica

Iniciou-se a aquisição do EEG, inicialmente, sem nenhum tipo de estimulação auditiva por um tempo variável, em seguida, durante 190s, a onda de portadora constante (10KHz) modulada em amplitude (10Hz a 200Hz) é apresentada, seguida por um intervalo de tempo variável, sem estimulação auditiva (silêncio) (Figura 18).

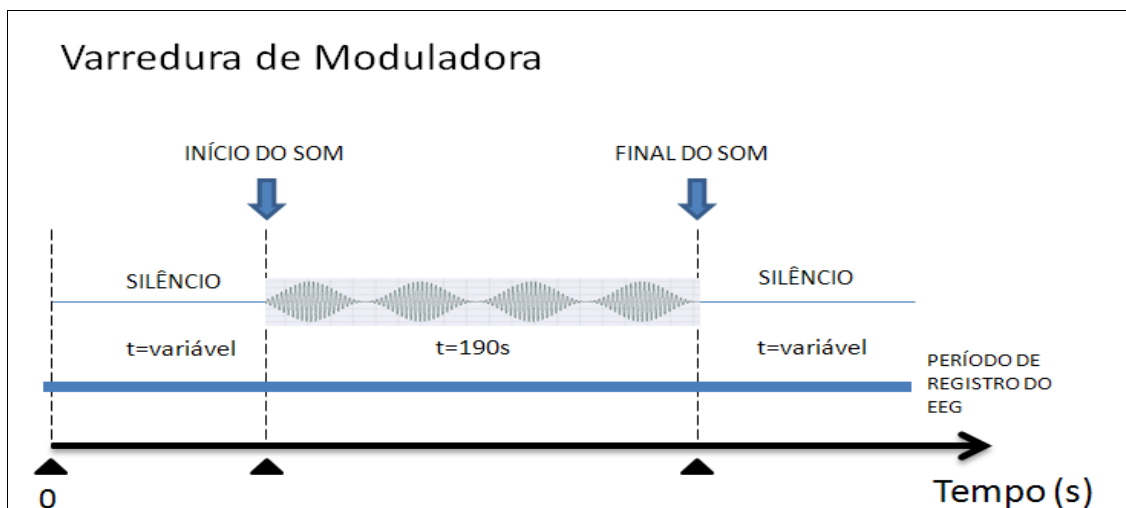


Figura 18 - Representação esquemática do protocolo de estimulação auditiva usando onda sonora com variação contínua da moduladora (de 10Hz a 200Hz) mantendo-se a portadora fixa.

Crítérios de Processamento do Sinal

Os registros do EEG foram recortados nos períodos correspondentes à apresentação dos estímulos. Posteriormente, realizamos o cálculo da FFT e observamos o perfil da onda ao longo da estimulação para avaliar se existe algum trecho da varredura de modulação em que a resposta permanece constante. Além disso, a partir do início da estimulação conhecendo-se a taxa de variação linear da frequência de modulação (1Hz/s) realizamos um ajuste nos gráficos encontrados onde a onda de resposta apresentava-se diagonalmente e recortamos com uma margem de 10Hz acima e abaixo ponto a ponto no trecho em que a resposta era esperada. Assim alinhamos cada ponto de resposta para posterior análise do perfil da onda. Para o cálculo do FFT também utilizamos 2048 pontos, porém, sem sobreposição dos pontos.

Resultados

Espectrograma do EEG

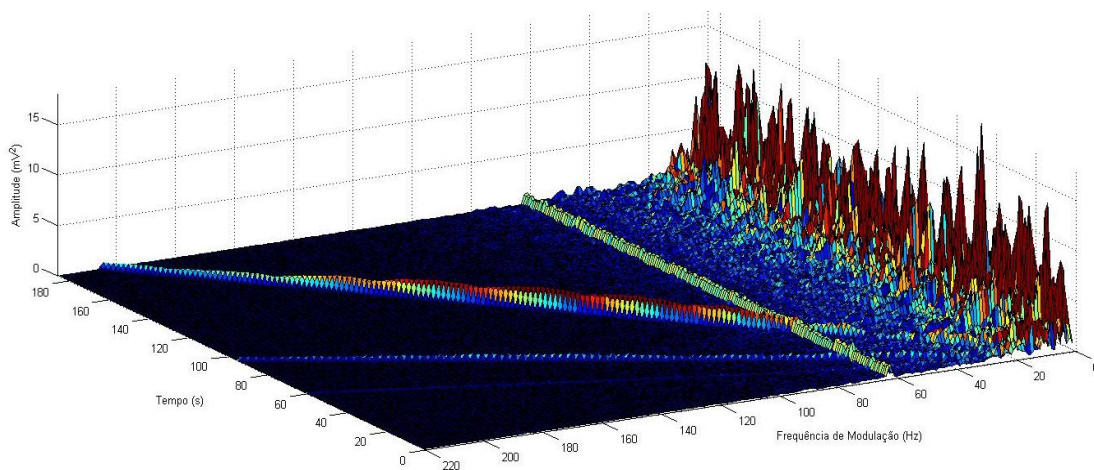


Figura 19– Espectrograma do EEG para varredura contínua de modulação. Durante o período de estimulação a REARP apresenta-se como um pico que se estende diagonalmente mostrando a variação do espectro de modulação da portadora num determinado ponto da varredura anatômica em um dos sujeitos experimentais.

O espectrograma do EEG evidencia presença de resposta variando em função da frequência de modulação. A amplitude e visibilidade da resposta evocada torna-se maior com o aumento da relação sinal-ruído.

Após o cálculo da FFT do EEG, realizamos um recorte no sinal com uma margem de 10Hz acima e abaixo da frequência de modulação desde o instante inicial de estimulação até o instante final, segundo a segundo. Partindo do fato de que no primeiro instante de resposta o pico ocorreria a 10Hz e no último instante a 200Hz, sabendo a taxa de variação da moduladora de 1Hz/s, utilizamos a seguinte função: $f(x) = ax \pm b$ para recorte do registro, sendo $f(x)$ os limites superiores e inferiores, e tendo como centro a frequência de modulação naquele determinado instante da estimulação; a representa a taxa de variação da moduladora por segundo (então, $a=1\text{Hz/s}$); e, b é a frequência de modulação do estímulo no instante inicial, ou seja 10Hz. Criamos então um algoritmo no software MATLAB e assim automatizamos o recorte dos registros de EEG. Após isto, a resposta que se apresentava diagonalmente no espectro do sinal (Figura 19 e 20A), passou a ser apresentada perpendicularmente (Figura 20B), a partir daí, selecionamos apenas os valores dos pontos centrais do intervalo da FFT correspondentes à frequência de modulação para cada instante de estimulação e traçamos o perfil da onda de resposta (Figuras 21 e 23).

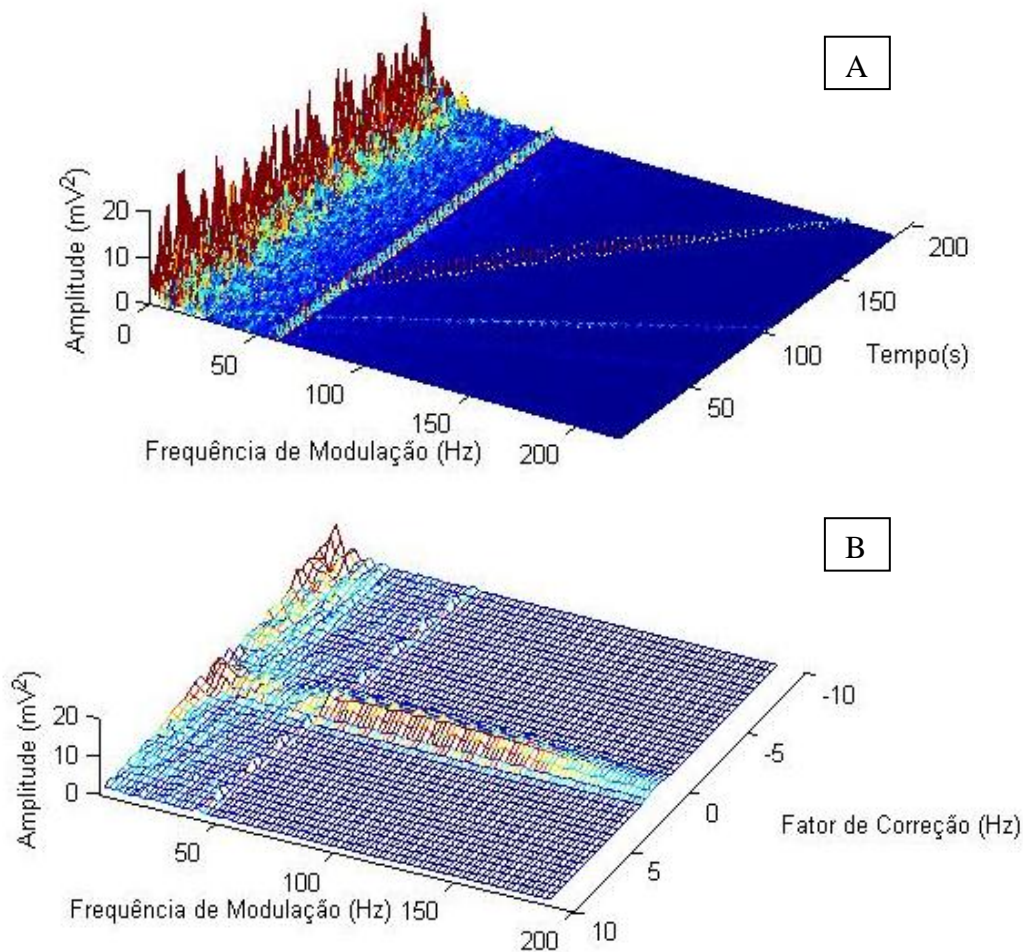
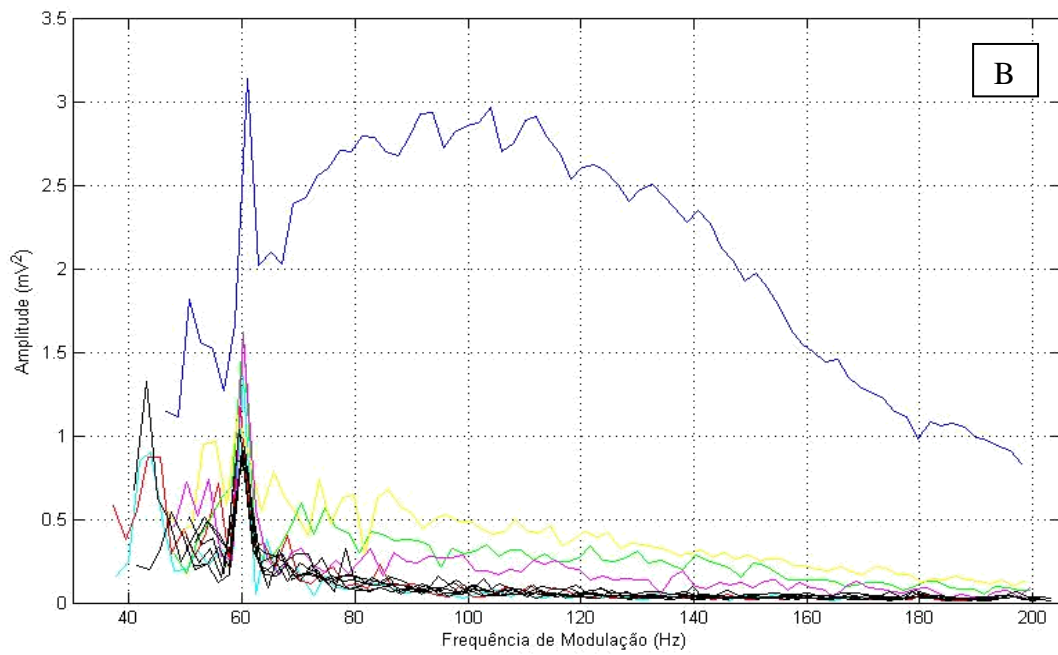
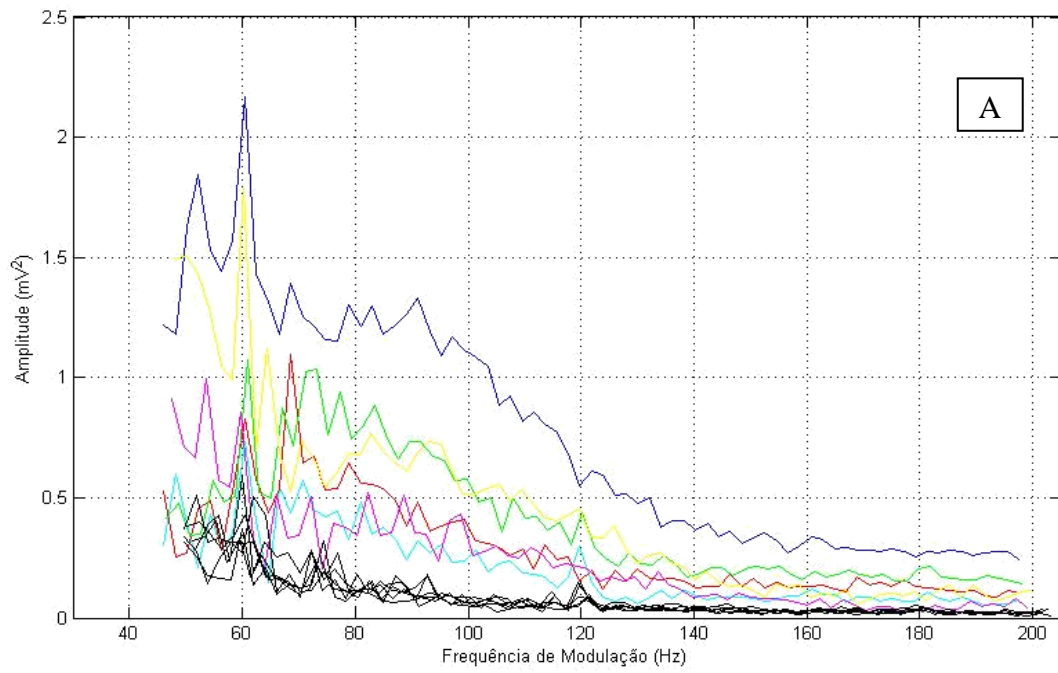
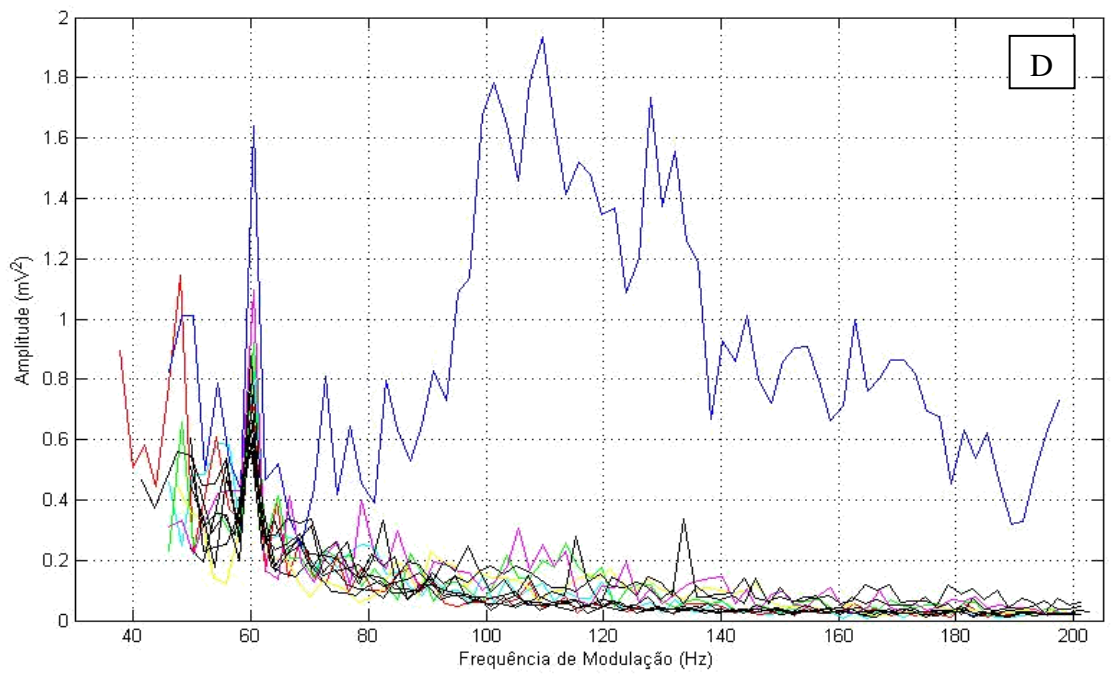
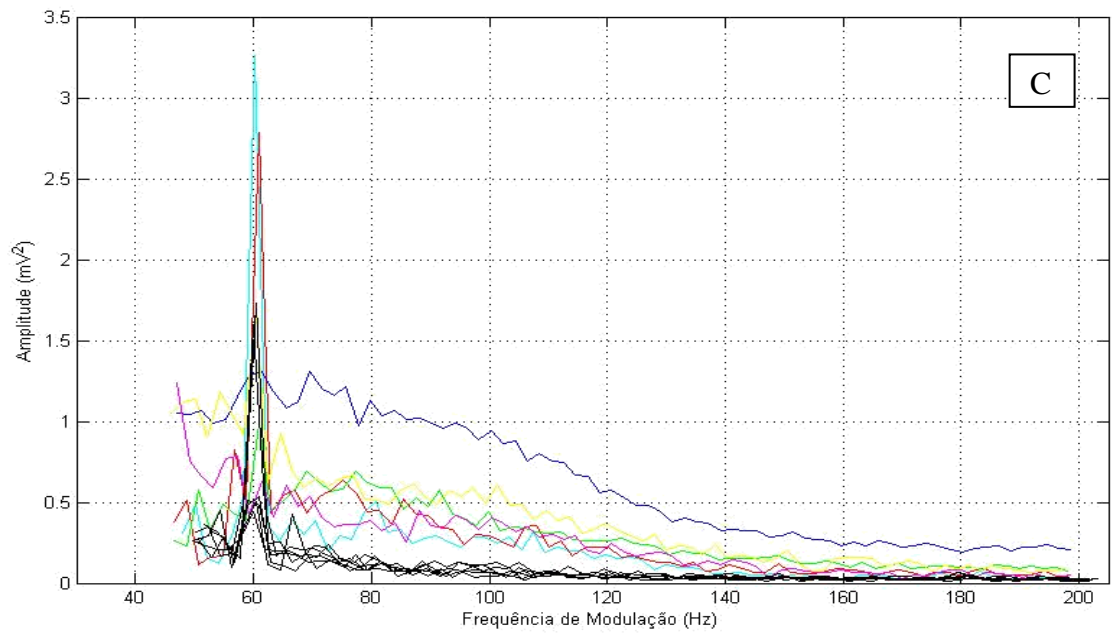


Figura 20 – Espectrogramas do EEG para varredura contínua de modulação. Na figura superior (A) observamos a FFT do registro original, com os picos da REARP aparecendo de forma diagonal no espectrograma do sinal o que ocorre devido a um aumento linear da moduladora a 1Hz/s. Assim ao longo do tempo o pico da resposta se desloca para o próximo valor inteiro na taxa de 1 por segundo resultando numa diagonal. Na figura inferior (B) representamos o mesmo espectrograma recortado desde o início da estimulação até o final sendo os limites superiores e inferiores em torno da frequência de modulação iguais a $FM \pm 10\text{Hz}$. No eixo da “Frequência de Modulação” o zero representa 10Hz, que é a frequência inicial da varredura contínua de moduladora. A resposta aparece como picos no centro da figura perdendo a aparência diagonal. Dessa forma é possível traçar o perfil da onda de resposta e comparar entre os diferentes pontos de registro e entre os diferentes animais.

Perfil da REARP para a Varredura de Modulação Contínua





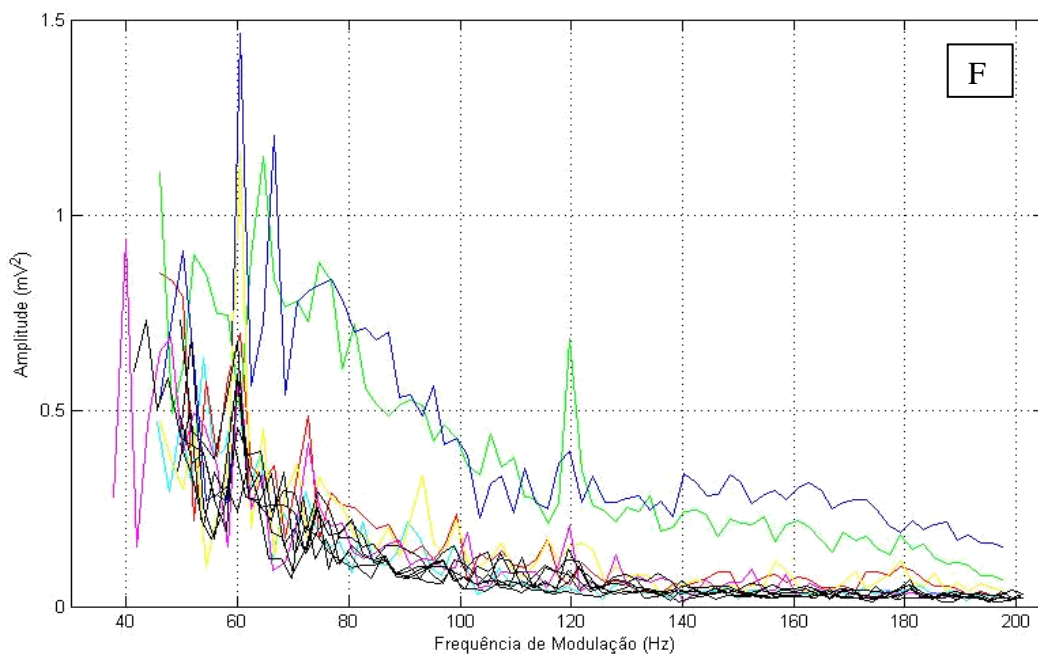
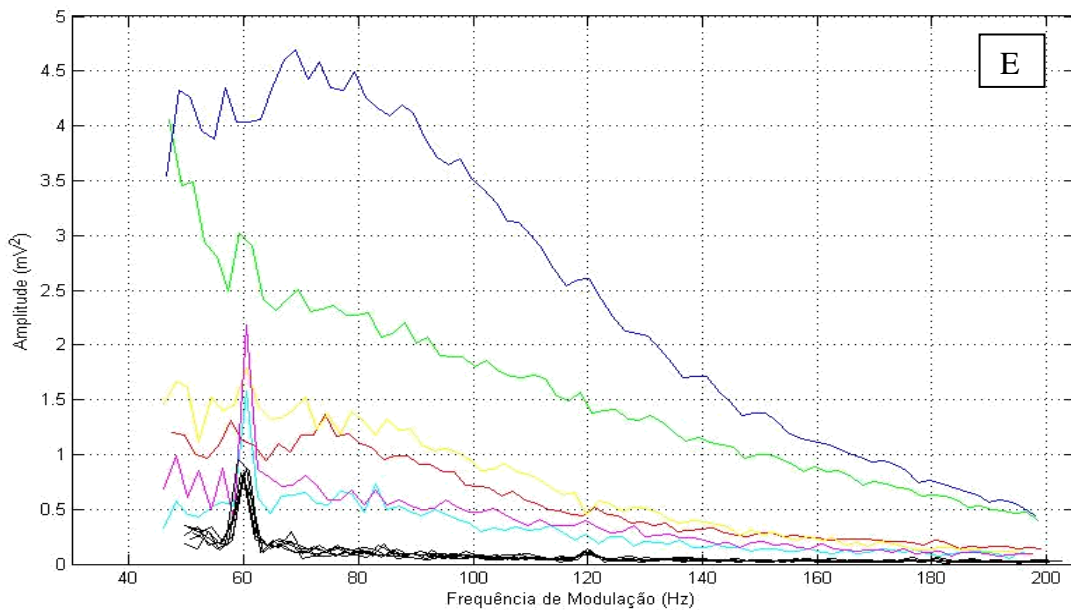


Figura 21 – Perfil de resposta na varredura de modulação contínua para os animais do Grupo Experimental (A,B, C, D, E, F). Cada curva representa o perfil de resposta após a o recorte do espectrograma da resposta original. Cada curva do gráfico representa um animal do grupo, e cada linha colorida representa a amplitude da resposta para cada valor da moduladora. As linhas negras são utilizadas como controle do algoritmo de recorte e representam os valores da amplitude do sinal nas frequências imediatamente acima e abaixo da moduladora.

Cada animal do grupo experimental mostrou um perfil diferente da REARP. Porém, em alguns animais o perfil das ondas não variou muito entre as diferentes posições anatômicas, apresentando apenas uma variação da amplitude entre estas posições. Todos os animais apresentaram uma redução da amplitude da resposta a partir de um determinado valor de modulação e uma saturação da queda e manutenção do valor da amplitude nas moduladoras mais altas.

A posição da varredura anatômica de maior amplitude de resposta está relacionada com a proximidade do cóliculo inferior, quanto mais próxima do gerador maior a resposta como era de se esperar.

A variação da amplitude da melhor resposta entre os diferentes animais reflete a variabilidade de posição do eletrodo entre eles. Porém na maioria deles a resposta esteve acima da frequência marginal à moduladora representada pelas linhas negras.

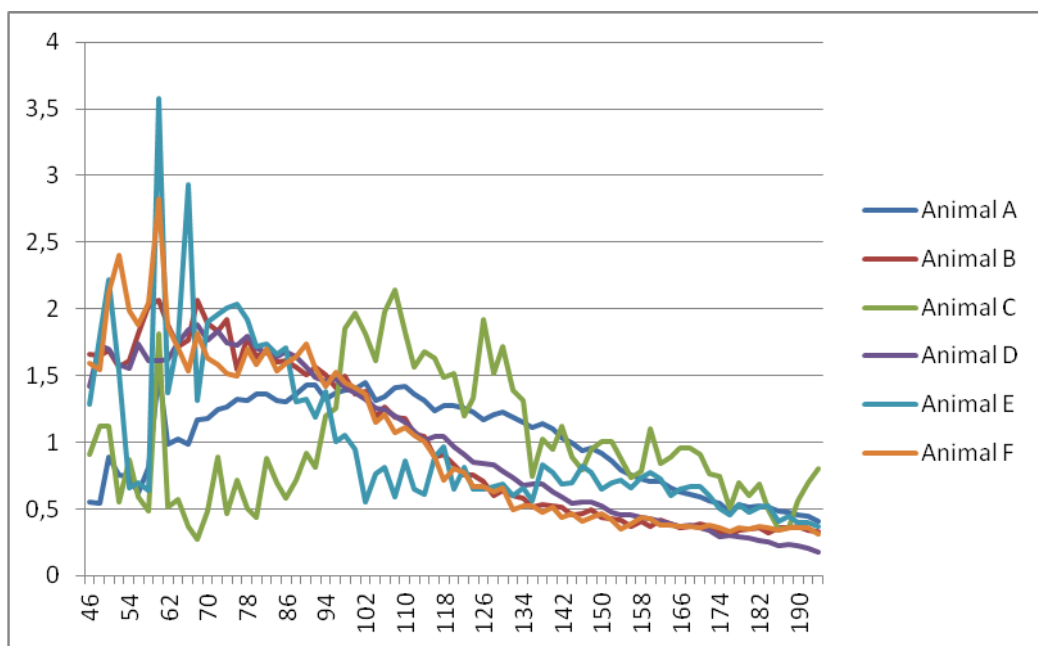
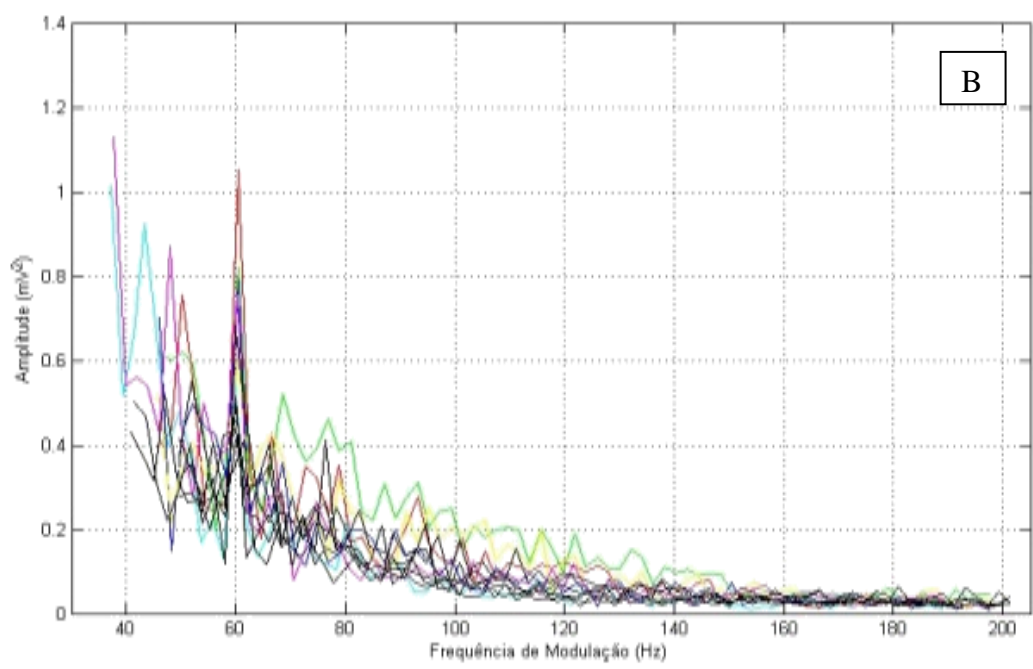
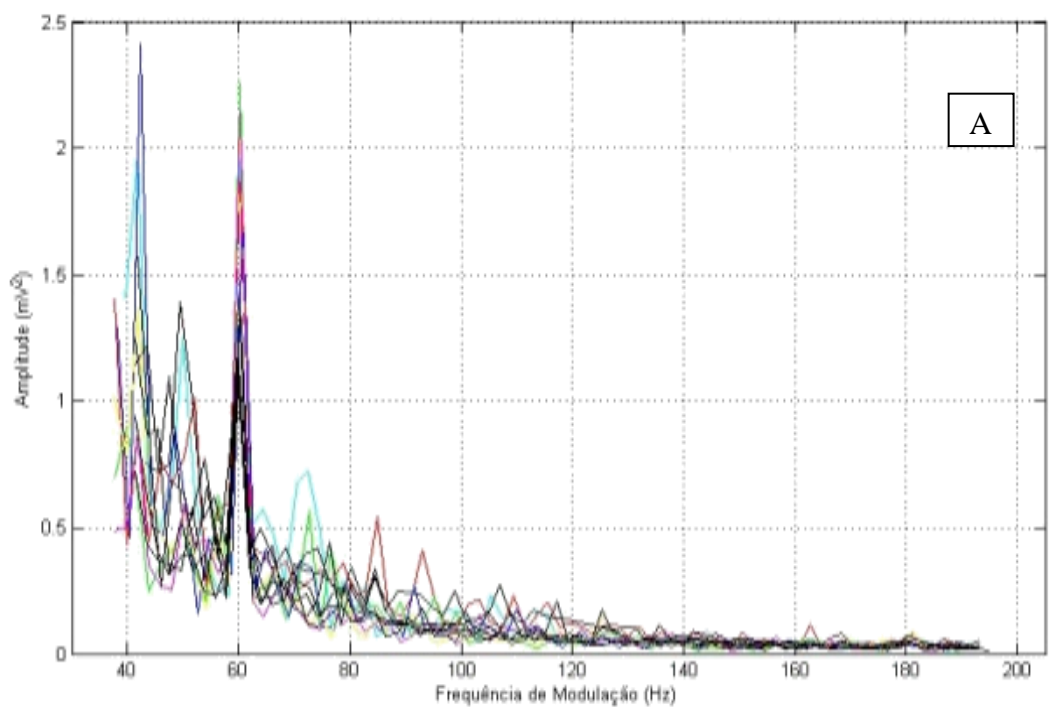


Figura 22 – Sobreposição das curvas de melhor resposta para cada um dos seis animais do Grupo Experimental. Os valores de cada curva foi normalizado pelo valor da média de todos os pontos da respectiva curva. No eixo das abscissas os valores das frequências de modulação (Hz), nas ordenadas os valores de amplitude normalizados (mV^2).



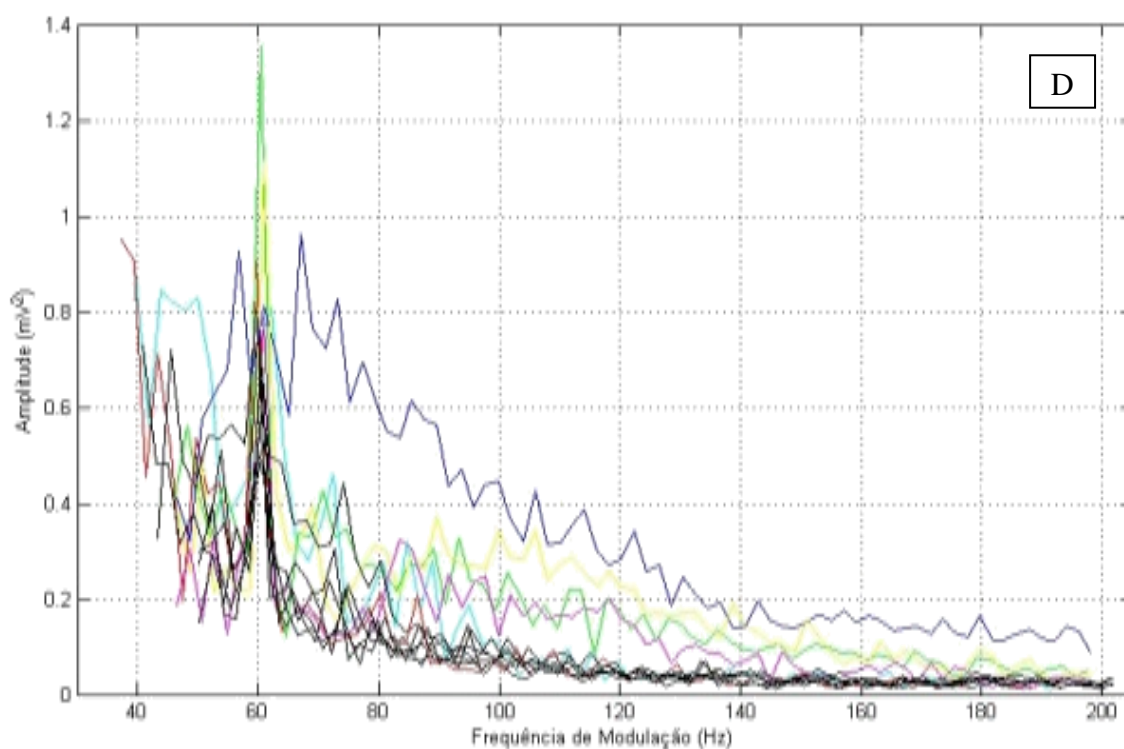
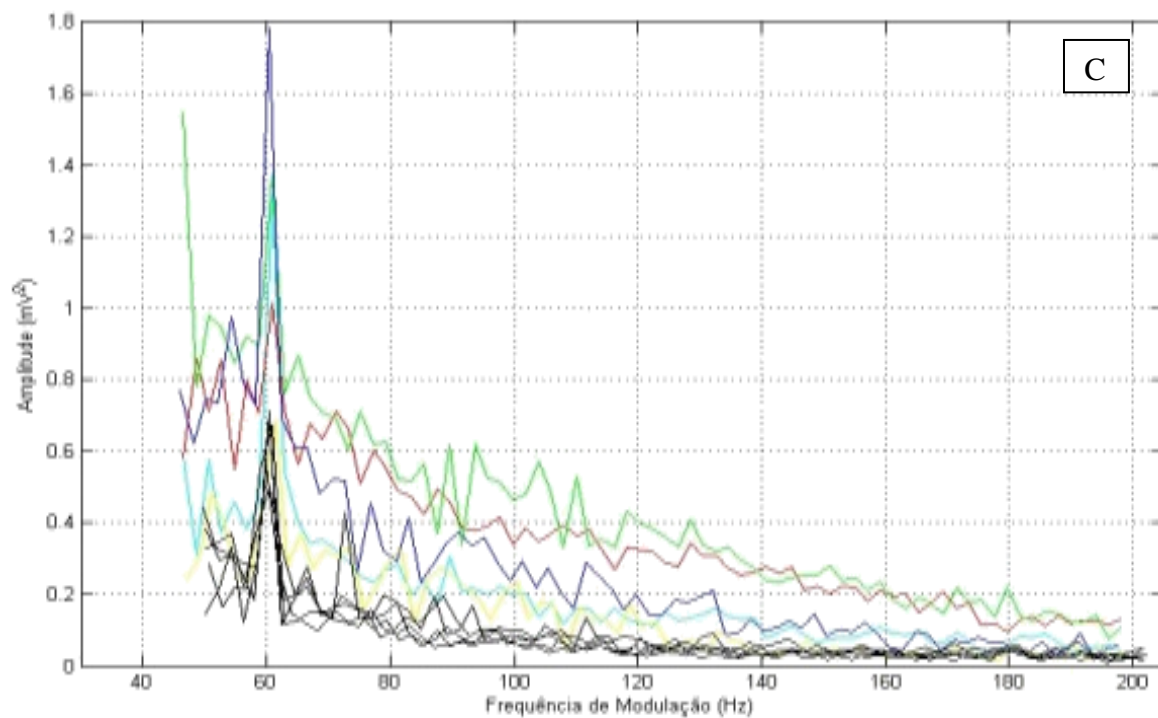


Figura 23 - Perfil da onda re resposta na varredura de modulação contínua. Para os animais do Grupo Control (A, B, C, D). Cada curva representa o perfil da onda de resposta após a o recorte do espectrograma da resposta original. Cada curva do gráfico representa um animal do grupo. E cada linha colorida representa a amplitude da resposta para cada

valor da moduladora. As linhas negras são utilizadas como controle do algoritmo de recorte e representam os valores da amplitude do sinal nas frequências imediatamente acima e abaixo da moduladora.

Cada animal do Grupo Controle mostrou um perfil diferente da REARP. Porém, em dois animais o perfil das ondas não variou muito entre as diferentes posições anatômicas, apresentando apenas uma variação da amplitude entre estas posições, assim como nos animais do Grupo Experimental. Todos os dois animais apresentaram uma redução da amplitude da resposta a partir de um determinado valor de modulação, valores estes bem mais baixos que no Grupo Experimental.

Nos outros dois animais, os valores relativos à frequência de modulação estão muito próximos dos valores das frequências marginais à moduladora, significando uma possível ausência de resposta ou uma resposta muito baixa devido à posição dos eletrodos.

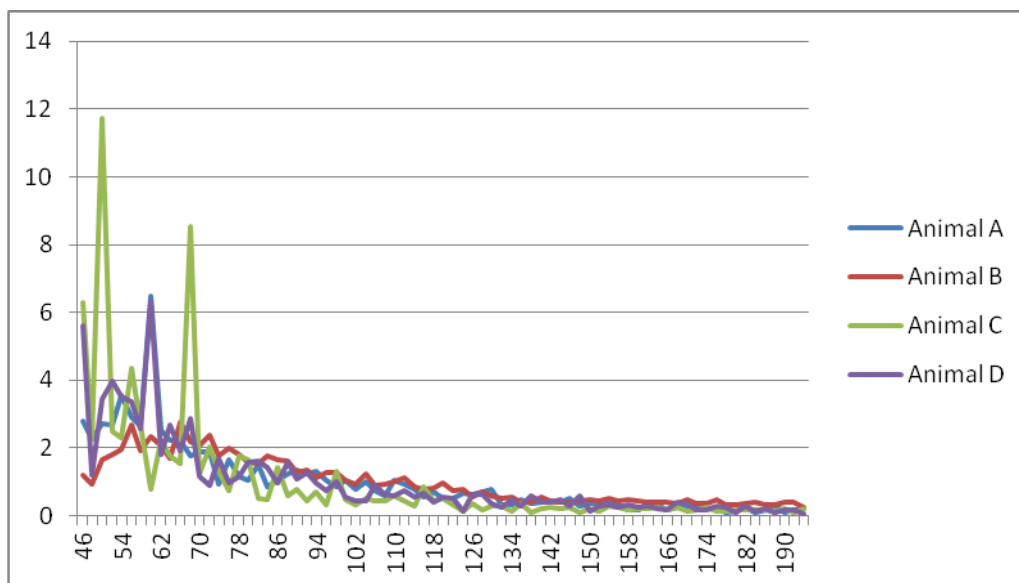


Figura 24 – Sobreposição das curvas de melhor resposta para cada um dos seis animais do Grupo Controle. Os valores de cada curva foi normalizado pelo valor da média de todos os pontos da respectiva curva. No eixo das abscissas os valores das frequências de modulação (Hz), nas ordenadas os valores de amplitude normalizados (mV^2).

Discussão

A vantagem de recortar os espectrogramas é a facilidade de trabalhar com os dados e a possibilidade de evidenciar as variações na amplitude de acordo com a frequência analisada.

Assim, podemos selecionar os picos de resposta para a varredura de moduladora e observar a ausência de resposta para as frequências marginais à de modulação num mesmo instante do registro. Além disso o perfil dessa resposta fica mais evidente quando recortamos o espectrograma.

Na grande maioria dos animais do grupo experimental houve queda da amplitude máxima da resposta para a metade deste valor a partir de 120Hz de modulação, exceto em dois deles. Porém em todos houve uma redução significativa antes de 200Hz. Isto pode ter ocorrido devido ao filtro utilizado na placa de aquisição dos sinais que varia de 0,5Hz a 200Hz, ocorrendo uma filtragem antes de 200Hz. Uma outra explicação seria a real incapacidade da via auditiva de responder a frequências mais altas ocorrendo uma redução da sincronização neural e com isso redução da amplitude da resposta. No Grupo Controle a intensidade das respostas foi muito baixa quando comparado ao Grupo Experimental o que é evidenciado pela sobreposição das curvas de perfil da resposta às curvas das frequências marginais à moduladora.

No Grupo Experimental observamos que ocorre uma faixa de modulação em que a resposta mantém-se alta e com pouca variação. Esta faixa vaiou de um animal para o outro, mas, com exceção de um animal, poderíamos considerar que esta faixa estende-se de 70Hz a 120Hz, o que sugere uma maior estabilidade na sincronização neural. Isto pode estar ocorrendo devido à latência de resposta das estruturas do mesencéfalo, que dominam as REARP quando usamos frequências de modulação acima de 60Hz como descrito por Davis e Hirsh em 1976 (Davis e Hirsh 1976), sendo mais evidenciada por volta de 90Hz (Stach 2002).

Capítulo 4 – Varredura de Portadora

Pergunta Científica

A REARP apresenta resolução espacial entre portadoras diferentes, para uma mesma moduladora, quando varredura anatômica de registros intra-encefálicos são feitos? Ou seja, é possível se detectar a Frequência Característica de um determinado sítio anatômico de registro usando a técnica de varredura de portadora no REARP?

Descrição dos Procedimentos Experimentais

Animais

Realizada a histologia e verificação do posicionamento do eletrodo, observamos que em alguns animais o eletrodo passou por fora do CI. Assim, decidimos utilizar estes animais como Grupo Controle (n=4). E os animais cujo eletrodo atravessou o interior do CI foram então considerados o Grupo Experimental (n=6).

Desenho experimental

A onda portadora é uma senóide cuja frequência varia de 100Hz a 15kHz, linearmente, durante 372,5s, um aumento linear de 40Hz/s. Foi utilizada como onda moduladora uma senóide de 43Hz (corrigida para 41,99Hz). A frequência da onda moduladora foi corrigida para que um número inteiro e primo de oscilações aconteça dentro da janela temporal durante a análise espectral, seguindo as sugestões de Felix, et al (2005), para prevenir o vazamento espectral. E 30s após o final deste trecho de som foi também apresentado uma onda de som portadora fixada em 5kHz e mesma moduladora (41,99Hz) durante 40s com a finalidade de clampearmos o tubo após 20s e testarmos se havia contaminação eletromagnética pela fonte sonora.

Iniciou-se a aquisição do EEG, inicialmente, sem nenhum tipo de estimulação auditiva por um tempo variável, em seguida, durante 372,5s, a onda de portadora variável (100Hz a 15kHz) modulada em 41,99Hz é apresentada, seguida por um intervalo de variável sem estimulação auditiva (silêncio), como na Figura 25.

Varredura de Portadora

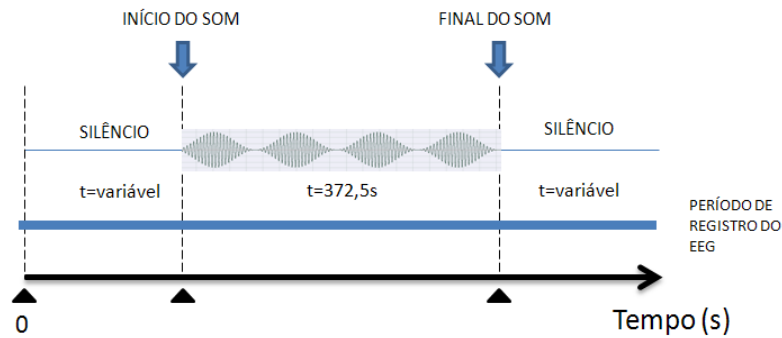


Figura 25 - Representação esquemática do protocolo de variação contínua da portadora mantendo-se moduladora fixa.

Registro da Intensidade do Estímulo

O estímulo sonoro apresentou variação da intensidade ao longo da variação do tempo. Repetiu-se esta coleta de dados por 10 vezes para avaliar a regularidade dessa variação. A onda representativa dessa variação para o trecho de som cuja portadora varia está ilustrada na Figura 26.

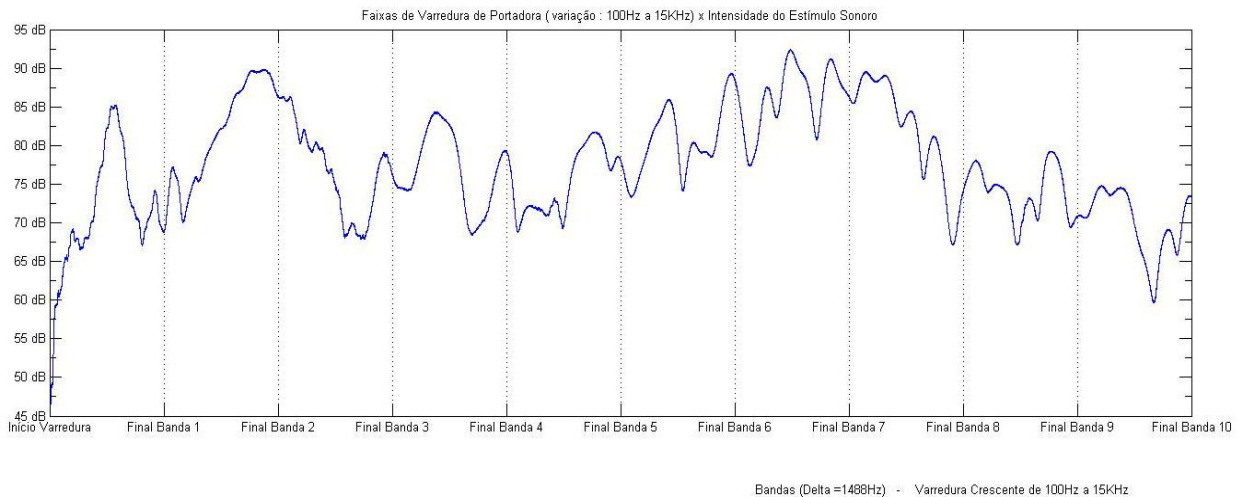


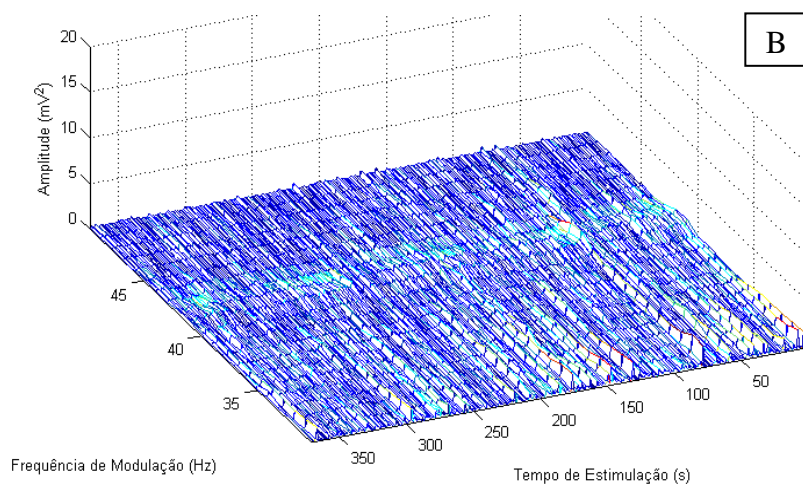
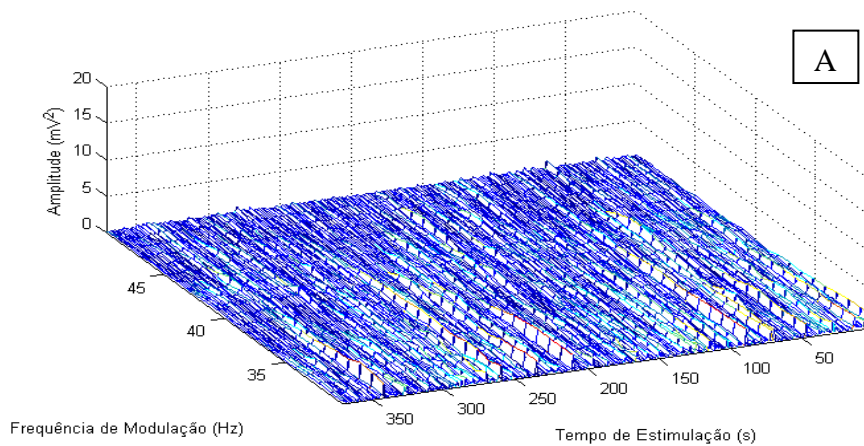
Figura 26 – Onda representativa da variação da intensidade do som na ponta da barra perfurada para a estimulação auditiva de variação de portadora em dB. Observe que o sistema de geração de som não reproduz o arquivo de áudio com intensidade sonora constante para este estímulo.

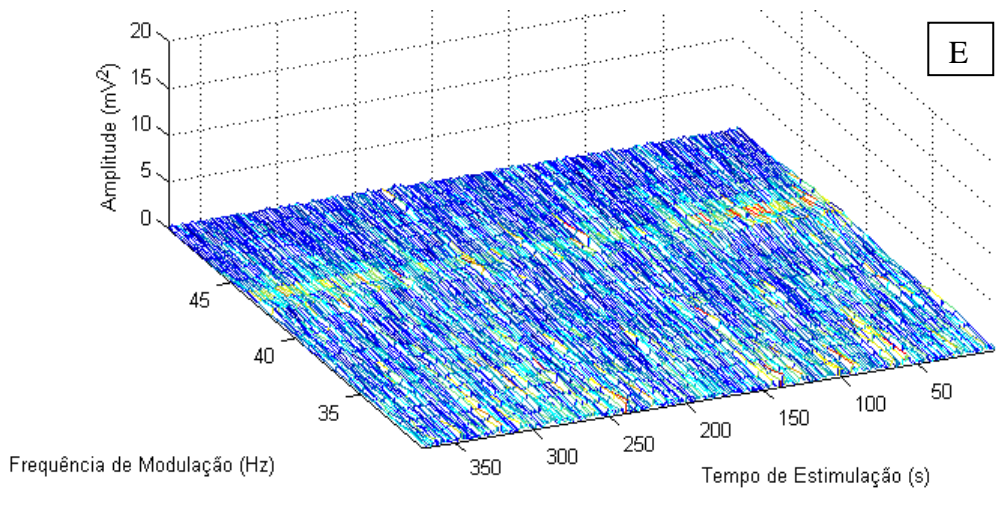
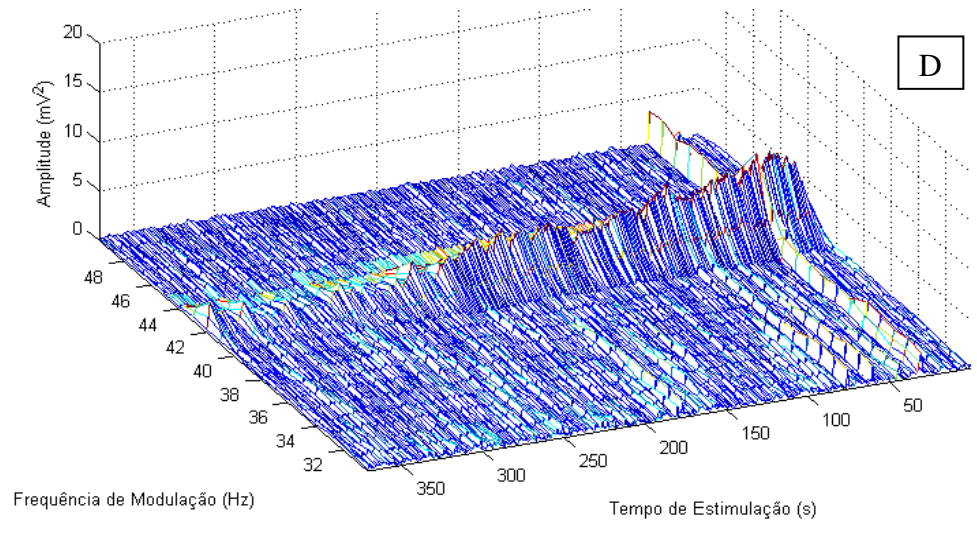
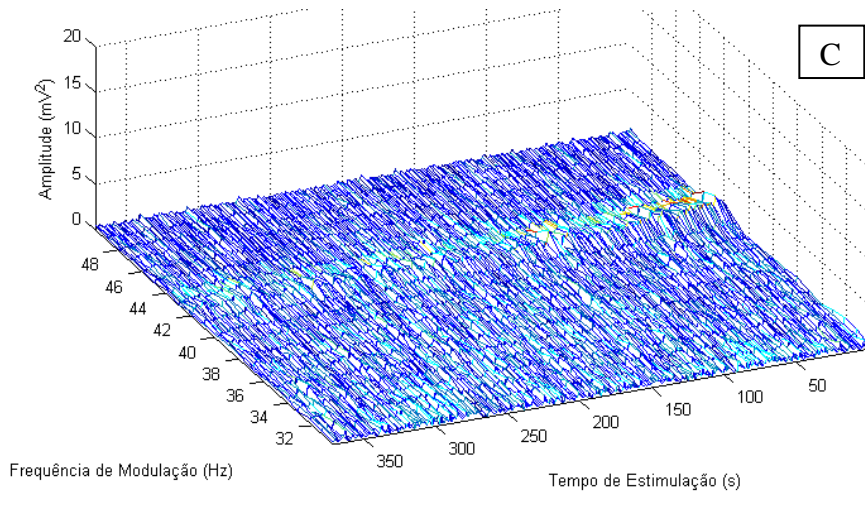
Critérios de Processamento do Sinal

Os registros do EEG foram recortados nos períodos correspondentes à apresentação dos estímulos. Posteriormente, realizamos o cálculo da FFT e observamos o perfil da onda ao longo da estimulação para avaliar se existe variação da amplitude da resposta de acordo com o sítio anatômico. Selecionamos apenas a frequência de modulação para traçar este perfil da resposta.

Resultados

Espectrograma do EEG





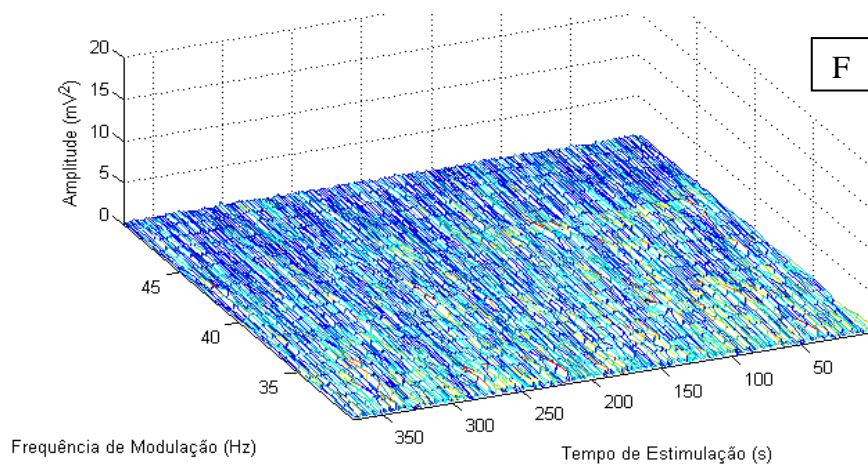
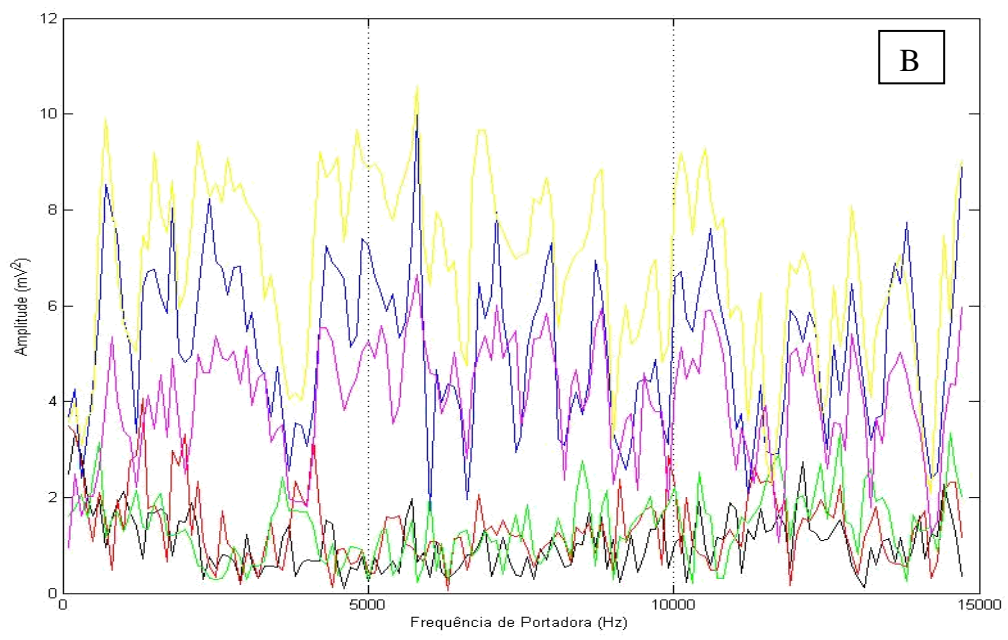
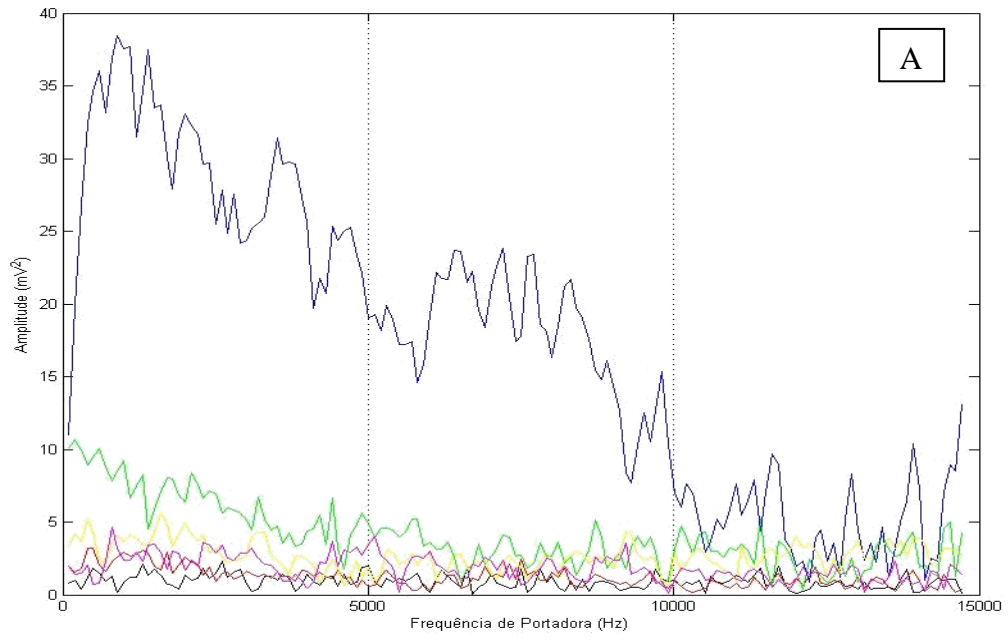
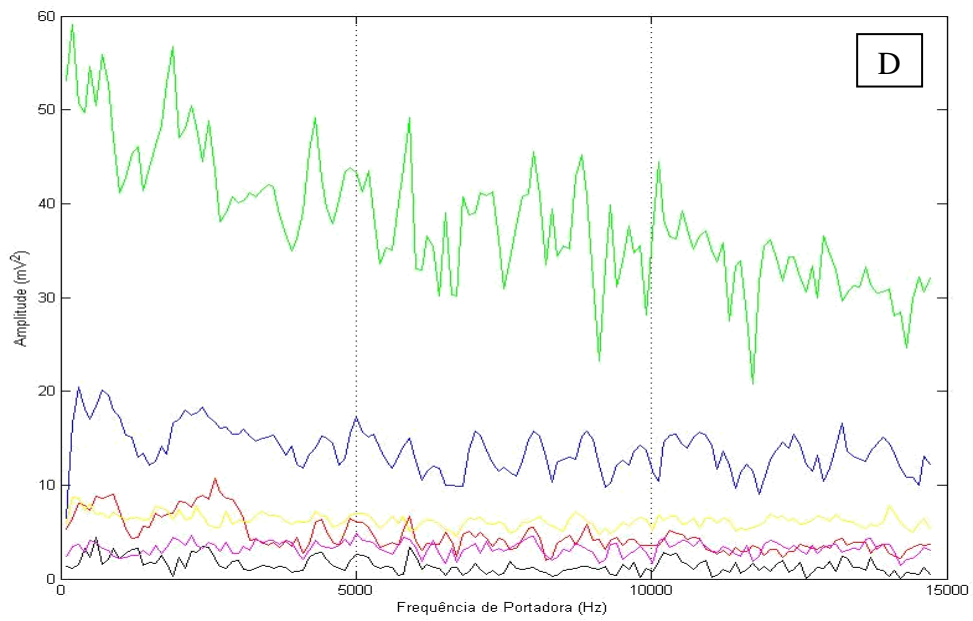
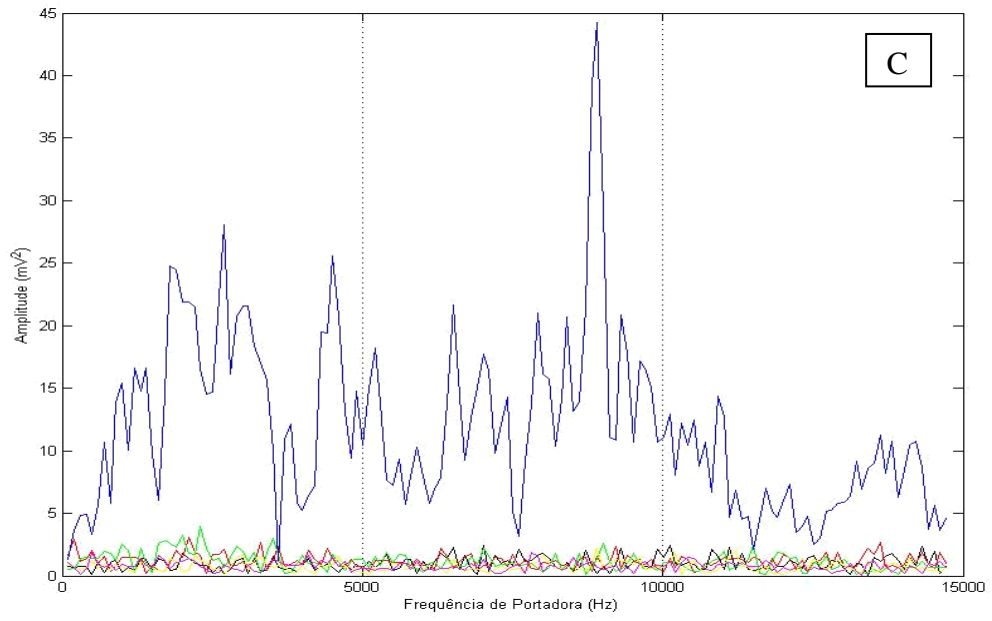


Figura 27 – Espectrograma do EEG para o estímulo de varredura contínua de portadora. Cada espectrograma corresponde a uma posição dorso-ventral da varredura anatômica de cima para baixo na seqüência do primeiro ponto de registro intra-encefálico ao sexto ponto para um dos animais do Grupo Experimenta com diferença de 1mm entre eles. Observe o pico de resposta na faixa da moduladora no quarto ponto de varredura anatômica e uma maior quantidade de energia no início da estimulação, ou seja, para baixas frequências de portadora.

O espectrograma do EEG evidencia aumento da energia na frequência de modulação. Que aumenta com a proximidade da fonte geradora. A figura 27 mostra um exemplo em que a amplitude da resposta no quarto ponto da varredura anatômica foi maior para portadoras de baixa frequência. No primeiro ponto (Figura 27A) há ausência de resposta, no segundo e terceiro (Figuras 27B e 27C) há um aumento gradual da energia na frequência de modulação, com máxima amplitude no quarto ponto. A partir do quinto ponto a energia começa a diminuir na frequência de modulação até o quase total desaparecimento no sexto ponto de registro.





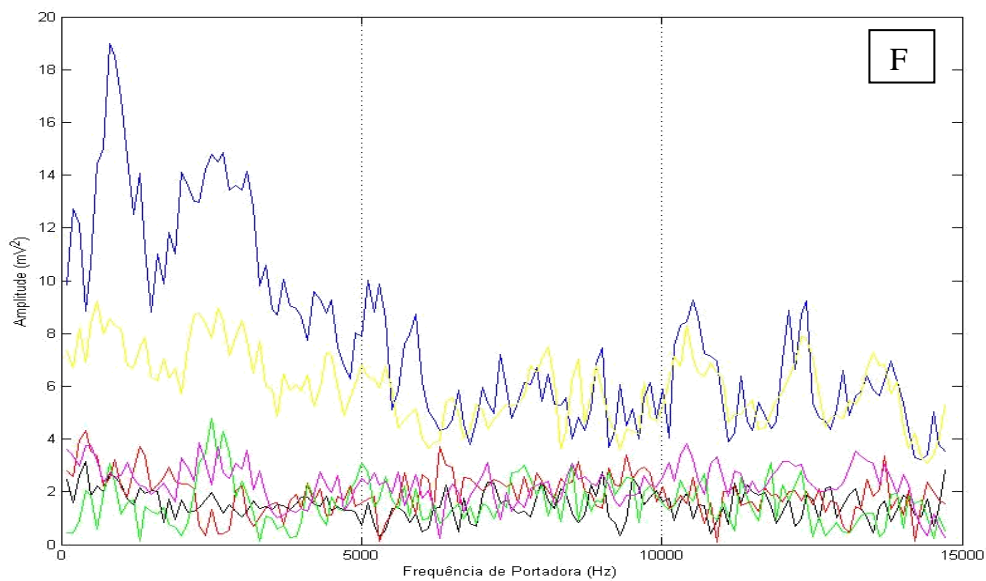
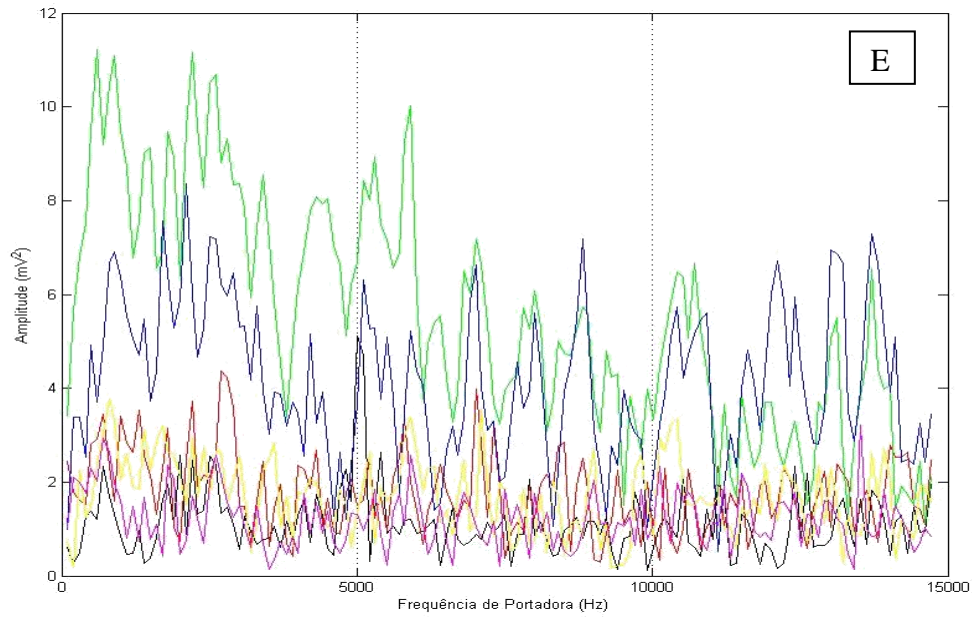
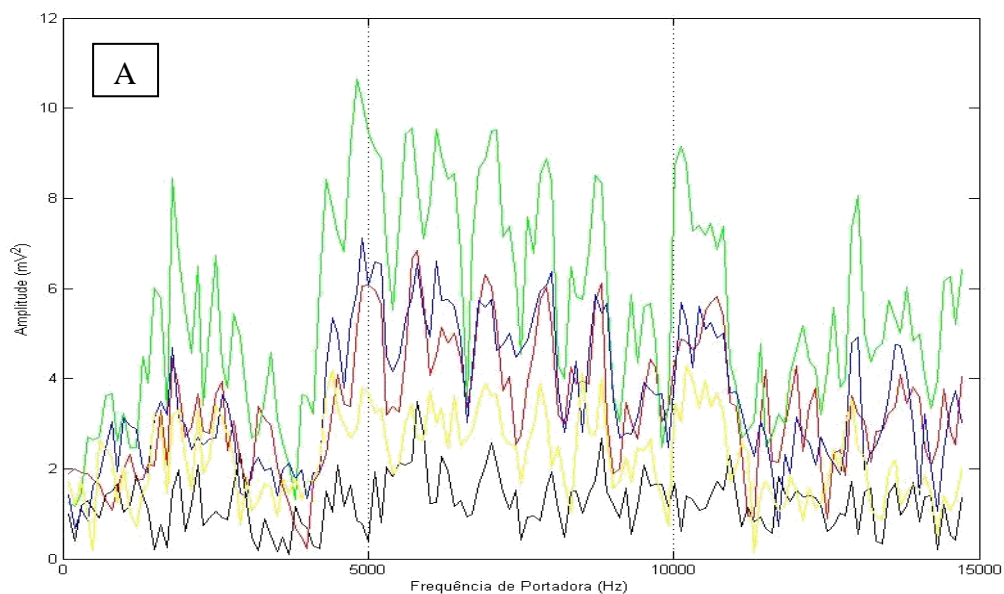
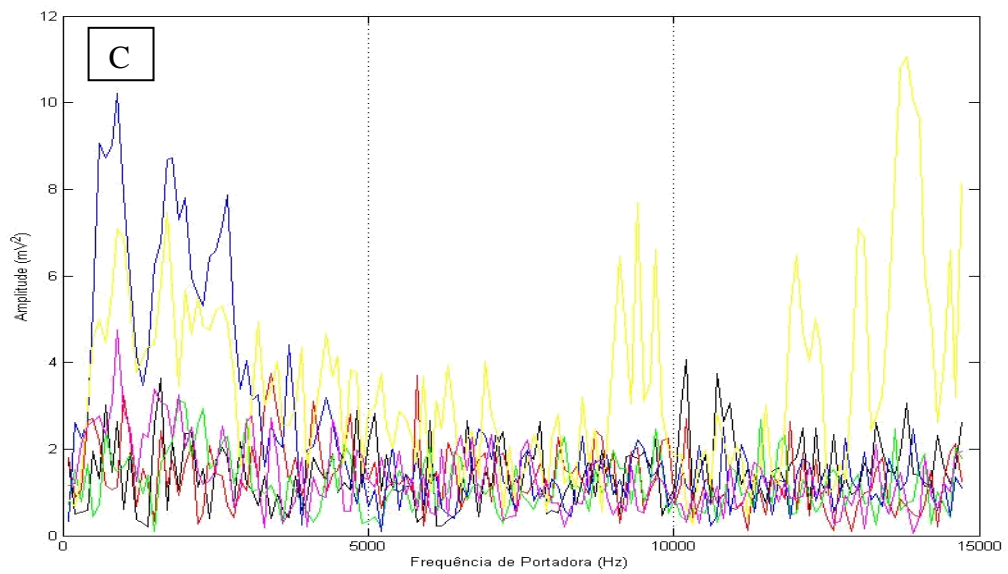
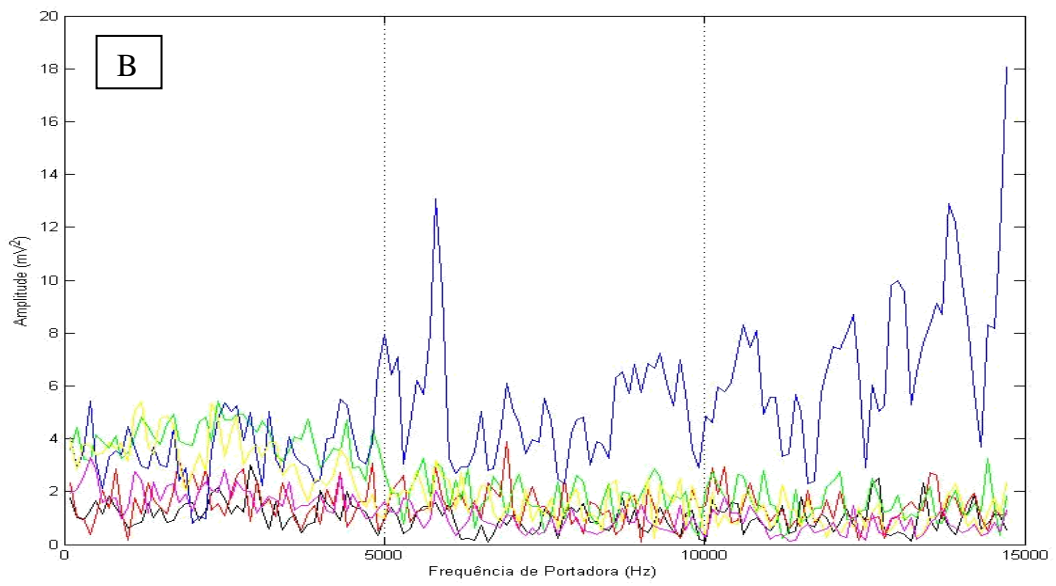


Figura 28 - Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Experimental. Cada gráfico representa um animal. Cada cor está relacionada a um dos seis pontos da varredura anatômica. Nas abscissas estão as frequências de portadora (kHz) e nas ordenadas a amplitude da resposta (mV^2). Observamos uma grande variação da amplitude e do perfil da resposta entre os animais. Na maioria deles a maior amplitude de resposta corresponde a baixas frequências de portadora.

Na Figura 28 observamos que cada animal do Grupo Experimental apresentou um perfil de resposta, onde a máxima amplitude variou entre as diferentes faixas de portadora. A energia da resposta também variou entre eles. Em dois animais (Figuras 28B e 28E) não houve grande diferença da resposta entre as diferentes posições da varredura anatômica, no restante podemos observar que houve pontos em que a amplitude da resposta mostrou-se bem maior em relação aos outros pontos anatômicos de registro. O aumento de amplitude para determinada faixa de modulação não ficou evidente nos dois animais do segundo e quinto gráficos (Figuras 28B e 28E), no restante observamos aumento da energia para as portadoras de baixa frequência o que demonstra um localizacionismo tonotópico.





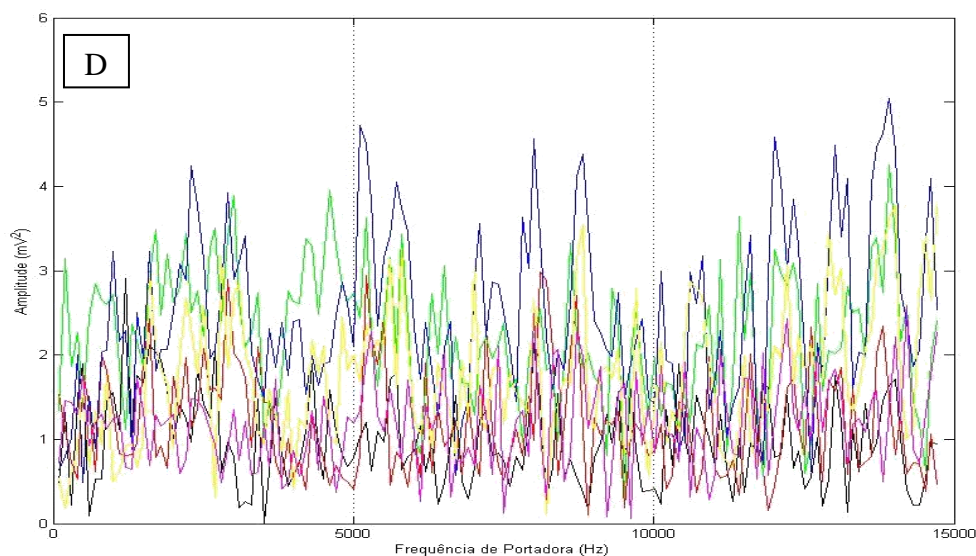


Figura 29- Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Controle. Cada gráfico representa um animal. Cada cor está relacionada a uma das seis posições da varredura anatômica.

Na Figura 29 observamos que cada animal do Grupo Controle apresentou um perfil de resposta, onde a máxima amplitude variou entre as diferentes faixas de portadora. A energia da resposta também variou entre eles, mas manteve-se abaixo de 20 mV². Em dois animais (Figura 29A e 29D) não houve grande diferença da resposta entre as diferentes posições da varredura anatômica, no restante podemos observar que houve pontos em que a amplitude da resposta mostrou-se bem maior entre os pontos anatômicos de registro. O aumento de amplitude para determinada faixa de modulação ficou evidente em dois animais (Figuras 29C e 29D). Sendo que em um animal (Figura 29C) houve um aumento da energia para portadoras de baixas frequências em um ponto do registro e no ponto seguinte para portadoras de alta frequência sugerindo um certo localizacionismo tonotópico como desejávamos.

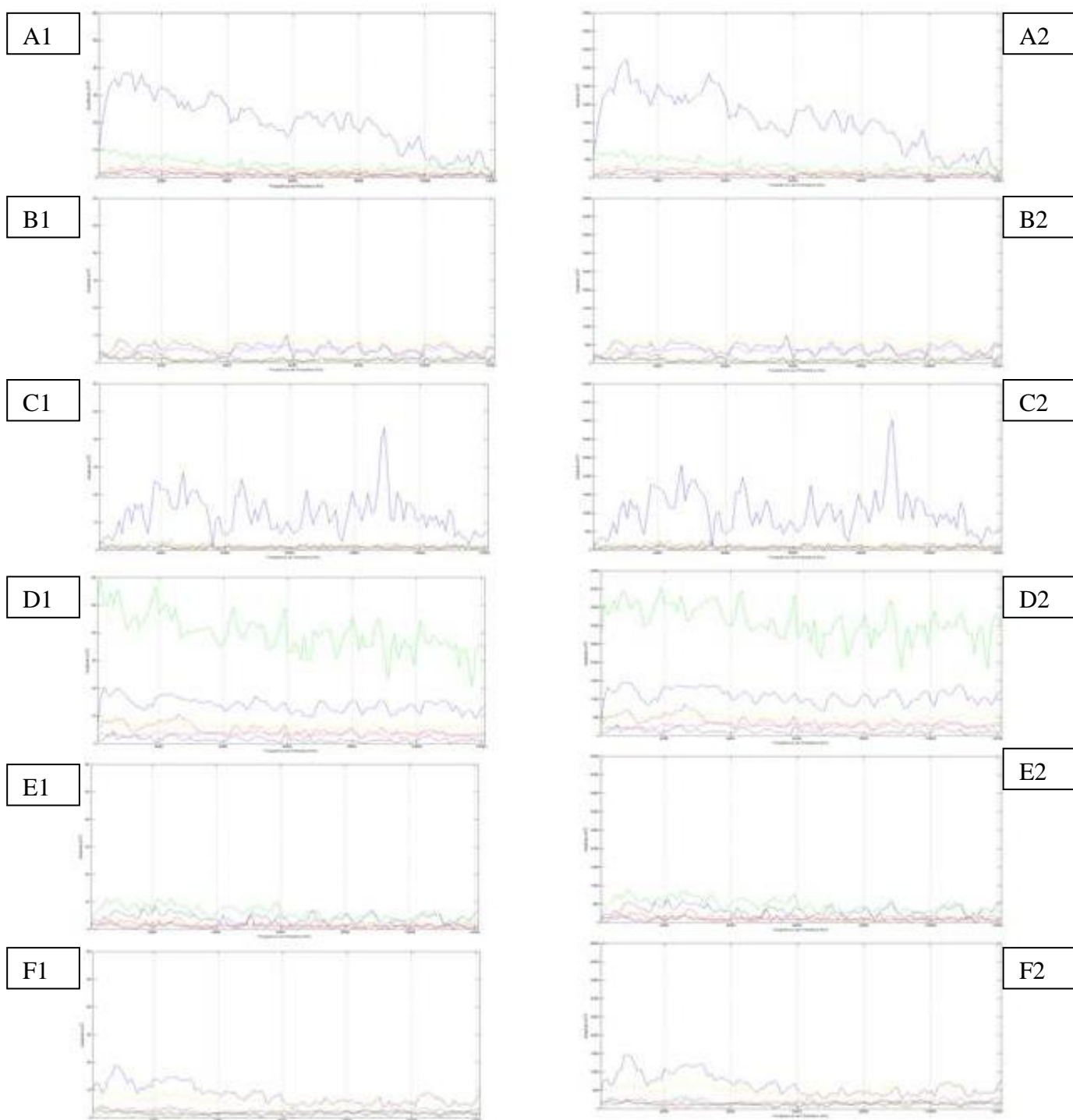


Figura 30- Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Experimental (A, B, C, D, E, F), à esquerda (1) sem correção da intensidade da resposta pela curva da intensidade do estímulo, e à direita (2) com correção para o mesmo animal. Cada cor está relacionada a uma posição da varredura anatômica. Observe que não houve alteração no perfil da onda, porém, houve apenas alteração na escala da onda de resposta.

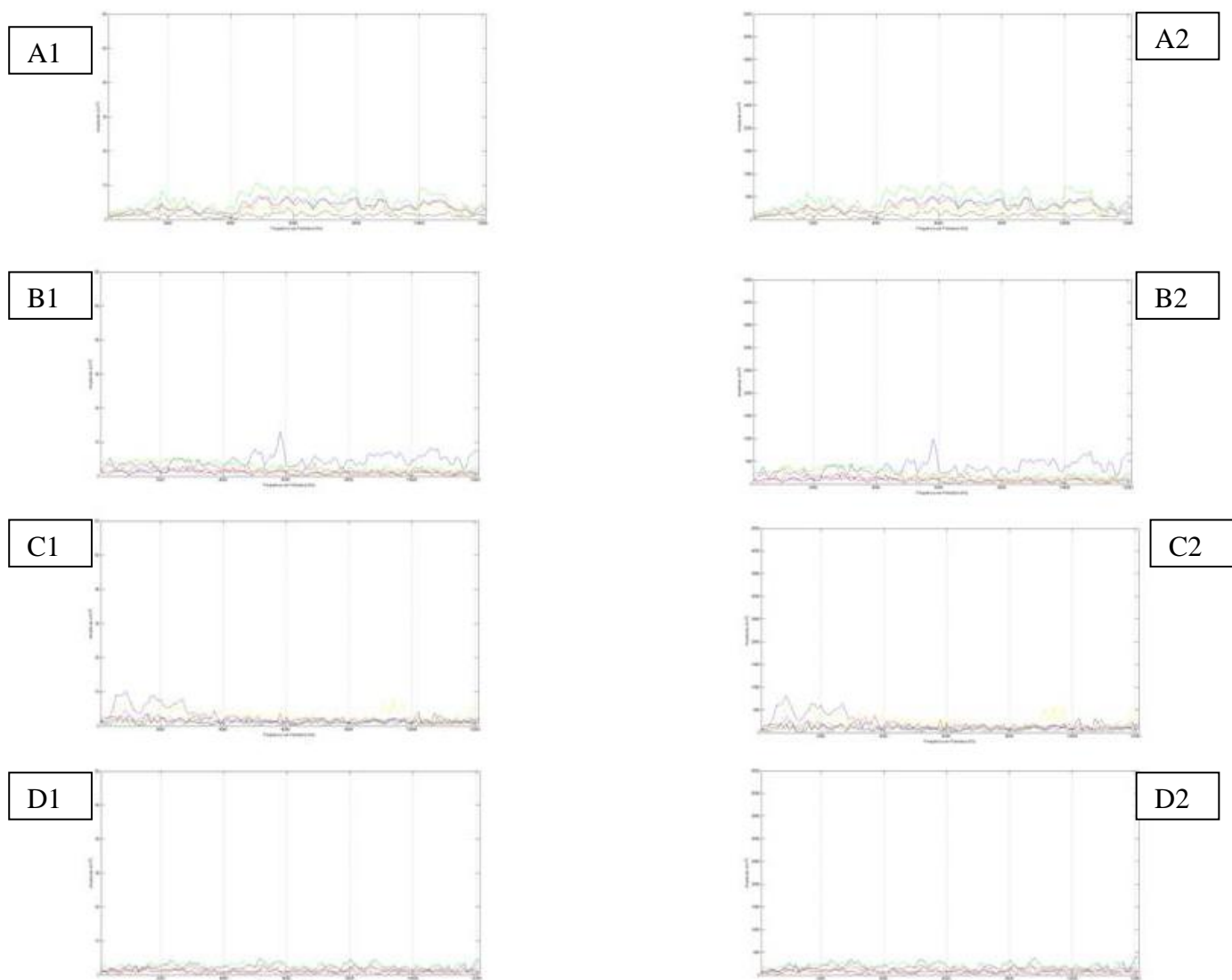


Figura 31- Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Controle (A, B, C, D), à esquerda (1) sem correção da intensidade da resposta pela curva da intensidade do estímulo, e à direita (2) com correção para o mesmo animal. Cada cor está relacionada a uma posição da varredura anatômica. Observe que não houve alteração no perfil da onda, porém, houve apenas alteração na escala da onda de resposta.

A normalização das respostas em relação à intensidade do estímulo, para o que utilizamos a curva da intensidade do estímulo registrada por decibelímetro, evidencia apenas

um aumento da energia da resposta sem alteração do perfil da curva de resposta para qualquer um dos grupos (Figuras 30 e 31).

Médias dos Grupos

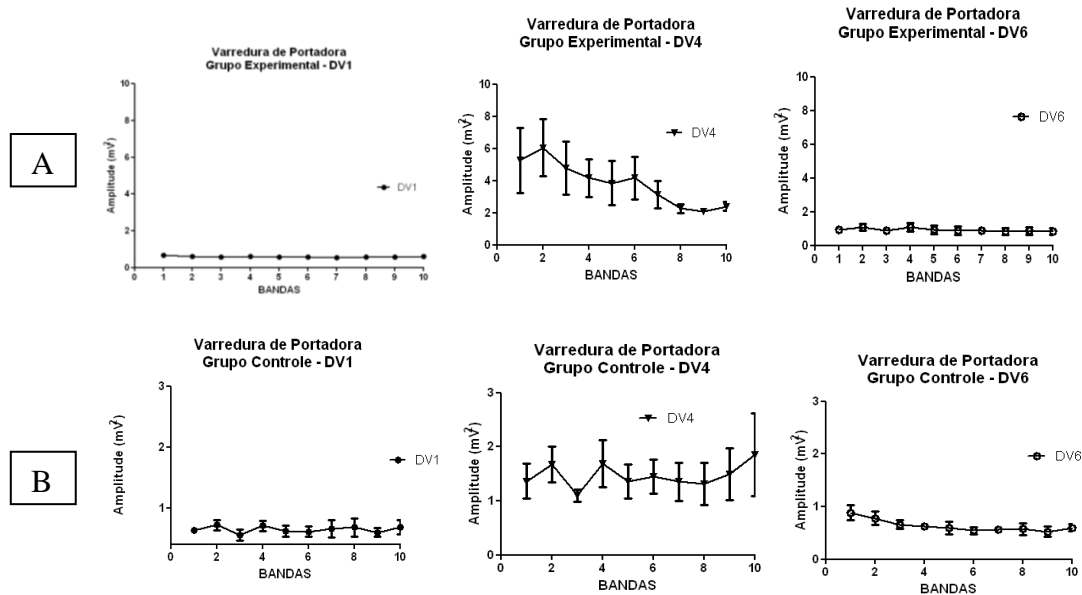


Figura 32– Média a amplitude das REARP para 10 bandas de portadora com largura de 1490Hz para a primeira, quarta e sexta posição da varredura anatômica. Na parte superior o Grupo Experimental(A) e na inferior o Controle (B). DV1, DV4, DV6: primeiro, quarto e sexto pontos de registro na varredura dorso-ventral do mesencéfalo.

Observamos uma diferença de amplitude entre o Grupo Experimental e o Controle para a quarta posição da varredura anatômica. Na primeira e na sexta posição anatômica de registro a amplitude da resposta mostrou-se semelhante entre os grupos. No Grupo Experimental frequências até 10kHz apresentaram uma maior amplitude de resposta, evidenciando a capacidade de localização de um sítio tonotópico. O que fica mais evidente se compararmos com a quarta posição de registro do Grupo Controle, em que a amplitude da resposta para as baixas frequências de modulação chegam a ser quatro vezes maior no Grupo Experimental.

Discussão

Neste protocolo esperávamos visualizar faixas de aumento da resposta para diferentes faixas de portadora entre os diferentes pontos de registro, evidenciando de forma clara as camadas tonotópicas do CI como evidenciado no trabalho de Malmierca (Malmierca *et al.* 2008).

Observamos nos animais do Grupo Experimental na posição anatômica de maior amplitude de resposta que houve uma predominância de baixas frequências de portadoras (até 10KHz). A partir de 10kHz a amplitude da resposta reduziu a níveis bem próximos do Grupo Controle. Contudo, para os animais nos quais os sítios de registro ficaram fora do CI, não foi possível demonstrar uma variação gradual da frequência característica dependente da varredura (Grupo Controle, Figura 32B). Porém, existem algumas diferenças que podem justificar os achados díspares: a resolução espacial utilizada por Malmierca foi de 0,1mm, nós utilizamos 1mm, ou seja, 100 vezes maior, ocorrendo, na maioria dos casos do grupo experimental, que apenas em um ou no máximo dois pontos da varreduras o eletrodo estar dentro do CI. Assim o eletrodo estaria próximo de uma lâmina tonotópica ou muito distante de todas, considerando que o CI tem aproximadamente 2,5mm de extensão (Faye-Lund e Osen 1985; Malmierca 2003) o que também foi confirmado pela análise histológica das posições de registro. Uma outra questão a ser levantada aqui é o ângulo de inclinação do eletrodo: utilizamos 30°, porém, foi demonstrado pelo mesmo Malmierca ainda em 1993 (Malmierca *et al.* 1993) que o melhor ângulo, ou seja, o ângulo de inclinação do eletrodo mais ortogonal à orientação predominante das lâminas de isofrequência seria 10° nas mesmas orientações que utilizamos. Como estas lâminas organizam-se de forma semelhante às camadas de uma cebola, sendo as camadas mais internas relacionadas às altas frequências e as mais externas às baixas frequências de portadoras, pode ter ocorrido de o eletrodo ter passado tangencialmente a uma lâmina tonotópica e não ortogonalmente a várias, registrando, desta forma, apenas a atividade de uma das camadas superiores. Ainda, a faixa de audição dos animais varia de 250Hz a 80kHz (Kelly e Masterton 1977; Heffner *et al.* 1994), e o estímulo apresentado varia de 100Hz a 15kHz, que foi escolhido pois seria possível detectar pelo experimentador se o sistema de áudio estava funcionando corretamente já que está dentro da faixa audível pelo ser humano. Porém, esta faixa representa uma parcela muito pequena da audição destes animais e assim, estaríamos estimulando áreas muito restritas o que dificultaria, somando-se às outras questões levantadas, a identificação de variação na amplitude da resposta entre os diferentes pontos de registro da varredura anatômica.

Um outro fato a ser levantado, é o tipo de eletrodo que utilizamos: monopolar. Nesta configuração a referência do eletrodo localiza-se muito distante (osso nasal) do sítio anatômico de registro (mesencéfalo). Assim, a capacidade de observação de variações no potencial elétrico dependente de anatomia (localizacionismo do gerador) é reduzida drasticamente.

No animal do Grupo Controle (Figura 29C) em que foi observada a resposta que esperávamos, pode ter ocorrido que entre os dois sítios anatômicos que mostraram essa variação (maior amplitude para as frequências iniciais da varredura anatômica num ponto superior e num ponto inferior maior amplitude para as altas frequências) ocasionalmente o eletrodo ficou posicionado exatamente próximo das lâminas de isofrequência relativas às frequências iniciais do estímulo e às frequências finais do estímulo respectivamente.

Pelas várias razões levantadas, sugerimos que este experimento seja realizado novamente, pois, da forma que foi realizado, o experimento foi inconclusivo. Em resumo, o eletrodo deve ser um bipolar, o passo da varredura anatômica ser reduzido, o ângulo de inclinação deve ser de 10° , e a faixa de frequência de portadora ampliada. Além disso, o sistema de áudio deve ser compatível com a produção de sons supersônicos e avaliado quanto à linearidade de resposta, ou seja, estabilidade da intensidade sonora produzida.

CONCLUSÃO

Observamos que os diferentes padrões de estímulo resultaram em diferentes padrões de resposta. O primeiro protocolo evidenciou que a REARP variou linearmente com a intensidade do estímulo. No segundo protocolo a frequência de modulação de 41,99Hz gerou uma maior amplitude de resposta, porém como o ruído de fundo do EEG é maior nesta faixa de modulação, as moduladoras maiores apresentam uma vantagem em considerando a relação sinal-ruído. No terceiro protocolo percebemos que existe uma faixa de modulação da amplitude do estímulo onde a amplitude da resposta é maior sugerindo o uso de moduladoras que se enquadrem nesta banda. No último protocolo, a localização tonotópica foi evidenciada, porém, sugerimos algumas modificações metodológicas com intuito de evidenciar ainda mais a capacidade de mapeamento tonotópico por meio da REARP

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitkin, L. (1985). *The Auditory Midbrain: Structure and Function in the Central Auditory Pathway*. Clifton, NJ, Humana.
- Aitkin, L. M., Kenyon, C. E. e Philpott, P. (1981). "The representation of the auditory and somatosensory systems in the external nucleus of the cat inferior colliculus." *J Comp Neurol* 196(1): 25-40.
- Allen, A. R. e Starr, A. (1978). "Auditory brain stem potentials in monkey (*M. mulatta*) and man." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 45(1): 53-63.
- Aoyagi, M., Suzuki, Y., Yokota, M., Furuse, H., Watanabe, T. e Ito, T. (1999). "Reliability of 80-Hz amplitude-modulation-following response detected by phase coherence." *Audiol Neurootol* 4(1): 28-37.
- Barlow, J. S. (1957). "An electronic method for detecting evoked responses of the brain and for reproducing their average waveforms." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 9(2): 340-343.
- Brazier, M. A. B. (1960). "Some uses of computers in experimental neurology." *Experimental Neurology* 2(2): 123-143.
- Brownell, W. E. (1990). "Outer hair cell electromotility and otoacoustic emissions." *Ear Hear* 11(2): 82-92.
- Buchwald, J. S. (1983). *Generators. Bases of Auditory Brain-Stem Evoked Responses*. E. J. Moore. New York, Grune & Stratton.: 157-195.
- Buchwald, J. S., Erwin, R. J., Read, S., Van Lancker, D. e Cummings, J. L. (1989). "Midlatency auditory evoked responses: differential abnormality of P1 in Alzheimer's disease." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 74(5): 378-384.
- Caird, D. (1991). *Processing in the colliculi. Neurobiology of Hearing: The Central Auditory System*. R. P. B. R A Altschuler, B M Clopton, D W Hojman. New York, Raven: 253-292.
- Celesia, G. G. e Brigell, M. G. (2005). *Auditory Evoked Potentials. Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields 5th Edition* F. L. d. S. Ernst Niedermeyer. New York, Lippincott Williams & Wilkins: 1046-1065.
- Celesia, G. G., Broughton, R. J., Rasmussen, T. e Branch, C. (1968). "Auditory evoked responses from the exposed human cortex." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 24(5): 458-466.
- Celesia, G. G. e Puletti, F. (1969). "Auditory cortical areas of man." *Neurology* 19(3): 211-220.
- Chambers, R. D., Feth, L. L. e Burns, E. M. (1986). "The relation between the human frequency-following response and the low pitch of complex tones." *J Acoust Soc Am* 80(6): 1673-1680.
- Champlin, C. A. (1992). "Method for detecting auditory steady-state potentials recorded from humans." *Hear Res* 58(1): 63-69.
- Chatrian, G. E., Petersen, M. C. e Lazarte, J. A. (1960). "Responses to clicks from the human brain: some depth electrographic observations." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 12: 479-489.
- Cody, D. T. e Bickford, R. G. (1969). "Averaged evoked myogenic responses in normal man." *Laryngoscope* 79(3): 400-416.
- Cohen, L. T., Rickards, F. W. e Clark, G. M. (1991). "A comparison of steady-state evoked potentials to modulated tones in awake and sleeping humans." *J Acoust Soc Am* 90(5): 2467-2479.
- Coleman, J. R. e Clerici, W. J. (1987). "Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat." *J Comp Neurol* 262(2): 215-226.

- Cone-Wesson, B., Dowell, R. C., Tomlin, D., Rance, G. e Ming, W. J. (2002). "The auditory steady-state response: comparisons with the auditory brainstem response." J Am Acad Audiol 13(4): 173-187; quiz 225-176.
- Cromer, A. H. (1975). Física para las ciencias de la vida. Barcelona, Reverté.
- Dallos, P. (1992). "The active cochlea." J Neurosci 12(12): 4575-4585.
- Davis-Gunter, M. J., Lowenheim, H., Gopal, K. V. e Moore, E. J. (2001). "The I' potential of the human auditory brainstem response to paired click stimuli." Scand Audiol 30(1): 50-60.
- Davis, H. (1968). "Averaged-evoked-response EEG audiometry in North America." Acta Otolaryngol 65(1): 79-85.
- Davis, H. (1976). "Principles of electric response audiometry." Ann Otol Rhinol Laryngol 85 SUPPL 28(3 Pt3): 1-96.
- Davis, H. e Hirsh, S. K. (1976). "The audiometric utility of brain stem responses to low-frequency sounds." Audiology 15(3): 181-195.
- Dawson, G. D. (1947). "Cerebral Responses to Electrical Stimulation of Peripheral Nerve in Man." Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry 10(3): 134-140.
- Dawson, G. D. (1951). "A summation technique for detecting small signals in a large irregular background." J Physiol 115(1): 2p-3p.
- Despopoulos, A. e Silbernagl, S. (2003). Color atlas of physiology. Stuttgart ; New York, Thieme.
- Dobie, R. A. (1993). "Objective response detection." Ear Hear 14(1): 31-35.
- Dobie, R. A. e Wilson, M. J. (1989). "Analysis of auditory evoked potentials by magnitude-squared coherence." Ear Hear 10(1): 2-13.
- Dobie, R. A. e Wilson, M. J. (1993). "Objective response detection in the frequency domain." Electroencephalogr Clin Neurophysiol 88(6): 516-524.
- Dobie, R. A. e Wilson, M. J. (1994a). "Objective detection of 40 Hz auditory evoked potentials: phase coherence vs. magnitude-squared coherence." Electroencephalogr Clin Neurophysiol 92(5): 405-413.
- Dobie, R. A. e Wilson, M. J. (1994b). "Phase weighting: a method to improve objective detection of steady-state evoked potentials." Hear Res 79(1-2): 94-98.
- Dobie, R. A. e Wilson, M. J. (1995a). "Comparison of objective threshold estimation procedures for 40-Hz auditory evoked potentials." Ear Hear 16(3): 299-310.
- Dobie, R. A. e Wilson, M. J. (1995b). "Objective versus human observer detection of 40-Hz auditory-evoked potentials." J Acoust Soc Am 97(5 Pt 1): 3042-3050.
- Dobie, R. A. e Wilson, M. J. (1996). "A comparison of t test, F test, and coherence methods of detecting steady-state auditory-evoked potentials, distortion-product otoacoustic emissions, or other sinusoids." J Acoust Soc Am 100(4 Pt 1): 2236-2246.
- Dobie, R. A. e Wilson, M. J. (1998). "Low-level steady-state auditory evoked potentials: effects of rate and sedation on detectability." J Acoust Soc Am 104(6): 3482-3488.
- Don, M., Elberling, C. e Waring, M. (1984). "Objective detection of averaged auditory brainstem responses." Scand Audiol 13(4): 219-228.
- Donald, H., Salvi, R. J., Boettcher, F. A. e Clock, A. E. (1999). Correlatos Neurofisiológicos da Perda Auditiva Neurosensorial. Tratado de Audiologia Clínica. J. Katz. São Paulo, Manole LTDA.
- Erwin, R. e Buchwald, J. S. (1986). "Midlatency auditory evoked responses: differential effects of sleep in the human." Electroencephalogr Clin Neurophysiol 65(5): 383-392.
- Faye-Lund, H. e Osen, K. K. (1985). "Anatomy of the inferior colliculus in rat." Anat Embryol (Berl) 171(1): 1-20.
- Felix, L. B., Moraes, J. E., de Sa, A. M. F. L. M., Yehia, H. C. e Moraes, M. F. D. (2005). "Avoiding spectral leakage in objective detection of auditory steady-state evoked responses in the inferior colliculus of rat using coherence." Journal of Neuroscience Methods 144(2): 249-255.
- Ference Jr., M., Lemon, H. B. e Stephenson, R. J., Eds. (1946). Curso de Física - Ondas (som e luz). São Paulo, Edgard Blucher Ltda.

- Ferraro, J. A. e Durrant, D. J. (1994). *Auditory Evoked Potentials: Overview and Basic Principles. Handbook of Clinical Audiology*. J. Katz. Baltimore, Williams & Wilkins: 317-338.
- Ferraz, O. B., Freitas, S. V. d. e Marchiori, L. L. d. M. (2002). "Análise das respostas obtidas por potenciais evocados auditivos de estado estável em indivíduos normais." *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 68: 480-486.
- Galambos, R., Makeig, S. e Talmachoff, P. J. (1981). "A 40-Hz auditory potential recorded from the human scalp." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(4): 2643-2647.
- Geisler, C. D. (1987). "Coding of acoustic signals on the auditory nerve." *IEEE Eng Med Biol Mag* 6(2): 22-28.
- Ginsberg, I. A. e White, T. P. (1999). *Considerações Otológicas em Audiologia. Tratado de Audiologia Clínica*. J. Katz. São Paulo, Manole LTDA.
- Hall, J. W., 3rd (1979). "Auditory brainstem frequency following responses to waveform envelope periodicity." *Science* 205(4412): 1297-1299.
- Harker, L. A., Hosick, E., Voots, R. J. e Mendel, M. I. (1977). "Influence of succinylcholine on middle component auditory evoked potentials." *Arch Otolaryngol* 103(3): 133-137.
- Hashimoto, I. (1982a). "Auditory evoked potentials from the human midbrain: slow brain stem responses." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 53(6): 652-657.
- Hashimoto, I. (1982b). "Auditory evoked potentials recorded directly from the human VIIIth nerve and brain stem: origins of their fast and slow components." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 36: 305-314.
- Hashimoto, I., Ishiyama, Y., Yoshimoto, T. e Nemoto, S. (1981). "Brain-stem auditory-evoked potentials recorded directly from human brain-stem and thalamus." *Brain* 104(Pt 4): 841-859.
- Heffner, H. E., Heffner, R. S., Contos, C. e Ott, T. (1994). "Audiogram of the hooded Norway rat." *Hear Res* 73(2): 244-247.
- Hood, J. L. (1998). *Clinical Applications of the Auditory Brainstem Response*. San Diego, Singular Publishing Group.
- Hudspeth, A. J. (2000). *Hearing. Principles of Neural Science*. E. R. Kandel, J. a. H. Schwartz e T. M. Jessel, McGraw-Hill.
- Hyde, M., Slinger, Y. S. e Don, M. (1998). "Objective Detection and Analysis of Auditory Brainstem Response: An Historical Perspective." *Semin Hear* 19(01): 97,113.
- Jacobson, G. P., Privitera, M., Neils, J. R., Grayson, A. S. e Yeh, H. S. (1990). "The effects of anterior temporal lobectomy (ATL) on the middle-latency auditory evoked potential (MLAEP)." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 75(3): 230-241.
- Jerger, J., Chmiel, R., Frost, J. D., Jr. e Coker, N. (1986). "Effect of sleep on the auditory steady state evoked potential." *Ear Hear* 7(4): 240-245.
- Jewett, D. L., Romano, M. N. e Williston, J. S. (1970). "Human auditory evoked potentials: possible brain stem components detected on the scalp." *Science* 167(924): 1517-1518.
- Jewett, D. L. e Williston, J. S. (1971). "Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans." *Brain* 94(4): 681-696.
- John, M. S. e Picton, T. W. (2000). "Human auditory steady-state responses to amplitude-modulated tones: phase and latency measurements." *Hear Res* 141(1-2): 57-79.
- Johnson, T. A. e Brown, C. J. (2001). *Preliminary results using the ERA Systems Ltd. Device to measure steady-state evoked potential thresholds: comparing audiometric, SSEP and ABR thresholds in adults*. 17th Biennial Symposium of the International Evoked Response Audiometry Study Group, University of British Columbia, Vancouver, BC.
- Joris, P. X., Schreiner, C. E. e Rees, A. (2004). "Neural processing of amplitude-modulated sounds." *Physiol Rev* 84(2): 541-577.
- Kelly, J. B. e Masterton, B. (1977). "Auditory sensitivity of the albino rat." *J Comp Physiol Psychol* 91(4): 930-936.
- Kileny, P. R. e Kemink, J. L. (1987). "Electrically evoked middle-latency auditory potentials in cochlear implant candidates." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113(10): 1072-1077.

- Kraus, N. e McGee, T. (1995). "The middle latency response generating system." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 44: 93-101.
- Kraus, N., Smith, D. I. e McGee, T. (1988). "Midline and temporal lobe MLRs in the guinea pig originate from different generator systems: a conceptual framework for new and existing data." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 70(6): 541-558.
- Kraus, N., Smith, D. I., Reed, N. L., Stein, L. K. e Cartee, C. (1985). "Auditory middle latency responses in children: effects of age and diagnostic category." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 62(5): 343-351.
- Kuwada, S., Batra, R. e Maher, V. L. (1986). "Scalp potentials of normal and hearing-impaired subjects in response to sinusoidally amplitude-modulated tones." *Hear Res* 21(2): 179-192.
- Lee, Y. S., Lueders, H., Dinner, D. S., Lesser, R. P., Hahn, J. e Klem, G. (1984). "Recording of auditory evoked potentials in man using chronic subdural electrodes." *Brain* 107 (Pt 1): 115-131.
- Legatt, A. D., Arezzo, J. C. e Vaughan, H. G., Jr. (1988). "The anatomic and physiologic bases of brain stem auditory evoked potentials." *Neurol Clin* 6(4): 681-704.
- Lent, R. (2004). *Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência*. São Paulo, Atheneu.
- Lins, O. G., Picton, T. W., Boucher, B. L., Durieux-Smith, A., Champagne, S. C., Moran, L. M., Perez-Abalo, M. C., Martin, V. e Savio, G. (1996). "Frequency-specific audiometry using steady-state responses." *Ear Hear* 17(2): 81-96.
- Malmierca, M. S. (2003). "The structure and physiology of the rat auditory system: an overview." *Int Rev Neurobiol* 56: 147-211.
- Malmierca, M. S., Blackstad, T. W., Osen, K. K., Karagulle, T. e Molowny, R. L. (1993). "The central nucleus of the inferior colliculus in rat: a Golgi and computer reconstruction study of neuronal and laminar structure." *J Comp Neurol* 333(1): 1-27.
- Malmierca, M. S., Izquierdo, M. A., Cristaudo, S., Hernandez, O., Perez-Gonzalez, D., Covey, E. e Oliver, D. L. (2008). "A Discontinuous Tonotopic Organization in the Inferior Colliculus of the Rat." *Journal of Neuroscience* 28(18): 4767-4776.
- McGee, T., Kraus, N., Comperatore, C. e Nicol, T. (1991). "Subcortical and cortical components of the MLR generating system." *Brain Res* 544(2): 211-220.
- Moller, A. R. e Jannetta, P. J. (1982). "Evoked potentials from the inferior colliculus in man." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 53(6): 612-620.
- Moller, A. R., Jannetta, P. J. e Jho, H. D. (1994). "Click-evoked responses from the cochlear nucleus: a study in human." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 92(3): 215-224.
- Moller, A. R. e Jho, H. D. (1991). "Compound action potentials recorded from the intracranial portion of the auditory nerve in man: effects of stimulus intensity and polarity." *Audiology* 30(3): 142-163.
- Naatanen, R. e Picton, T. (1987). "The N1 wave of the human electric and magnetic response to sound: a review and an analysis of the component structure." *Psychophysiology* 24(4): 375-425.
- Nussenzveig, H. M. (2002). *Curso de Física Básica* São Paulo, Edgard Blucher.
- Oliver, D. L. e Huerta, M. F. (1991). Inferior and superior colliculi. *The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy*. A. N. P. D B Webster, R R Fay. New York, Springer-Verlag: 168-221.
- Pacheco, E. A. (2003). Determinação da Banda de Máxima Resposta do Potencial Evocado Auditivo de Curta Latência por Meio da Magnitude Quadrática da Coerência. *Engenharia Biomédica*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Master.
- Parkins, C. W. (1983). "Cochlear Implant: A Sensory Prosthesis Frontier." *Engineering in Medicine and Biology Magazine* 2(2): 18-27.
- Parving, A., Salomon, G., Elberling, C., Larsen, B. e Lassen, N. A. (1980). "Middle components of the auditory evoked response in bilateral temporal lobe lesions. Report on a patient with auditory agnosia." *Scand Audiol* 9(3): 161-167.
- Paxinos, G. e Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam Elsevier.

- Picton, T. W., Dauman, R. e Aran, J. M. (1987a). "[Responses evoked in "steady state" in man by means of a sinusoidal frequency modulation]." *J Otolaryngol* 16(3): 140-145.
- Picton, T. W., Hillyard, S. A., Krausz, H. I. e Galambos, R. (1974). "Human auditory evoked potentials. I. Evaluation of components." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 36(2): 179-190.
- Picton, T. W., John, M. S., Dimitrijevic, A. e Purcell, D. (2003). "Human auditory steady-state responses." *Int J Audiol* 42(4): 177-219.
- Picton, T. W., Skinner, C. R., Champagne, S. C., Kellett, A. J. C. e Maiste, A. C. (1987b). "Potentials evoked by the sinusoidal modulation of the amplitude or frequency of a tone." *The Journal of the Acoustical Society of America* 82(1): 165-178.
- Picton, T. W., Stapells, D. R. e Perrault, N. (1984). Human event-related potentials: current perspectives. *Evoked Potentials. II*. C. B. R.H. Nodar. Boston, Butterworth: 3-24.
- Picton, T. W., Vajsar, J., Rodriguez, R. e Campbell, K. B. (1987c). "Reliability estimates for steady-state evoked potentials." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 68(2): 119-131.
- Pratt, H., Bleich, N. e Feingold, K. (1990). "Three-channel Lissajous' trajectories of auditory brainstem evoked potentials: contribution of fast and slow components to planar segment formation." *Hear Res* 43(2-3): 159-170.
- Rance, G., Rickards, F. W., Cohen, L. T., De Vidi, S. e Clark, G. M. (1995). "The automated prediction of hearing thresholds in sleeping subjects using auditory steady-state evoked potentials." *Ear Hear* 16(5): 499-507.
- Rees, A., Green, G. G. e Kay, R. H. (1986). "Steady-state evoked responses to sinusoidally amplitude-modulated sounds recorded in man." *Hear Res* 23(2): 123-133.
- Regan, D. (1989). *Human Brain Electrophysiology: evoked potentials and evoked magnetic fields in science and medicine*. Amsterdam, Elsevier.
- Rickards, F. W. e Clark, G. M. (1984). Steady-state evoked potentials to amplitude-modulated tones. *Evoked Potentials II*. C. B. R H Nodar. Boston, Butterworth: 163-168.
- Rickards, F. W., Tan, L. E., Cohen, L. T., Wilson, O. J., Drew, J. H. e Clark, G. M. (1994). "Auditory steady-state evoked potential in newborns." *Br J Audiol* 28(6): 327-337.
- Scherg, M. e von Cramon, D. (1985a). "A new interpretation of the generators of BAEP waves I-V: results of a spatio-temporal dipole model." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 62(4): 290-299.
- Scherg, M. e Von Cramon, D. (1985b). "Two bilateral sources of the late AEP as identified by a spatio-temporal dipole model." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 62(1): 32-44.
- Silva, F. L. d. (2005). *Event-Related Potentials: Methodology and Quantification. Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*. F. L. d. S. Ernst Niedermeyer, Lippincott Williams & Wilkins.
- Sininger, Y. S. (1993). "Auditory brain stem response for objective measures of hearing." *Ear Hear* 14(1): 23-30.
- Sininger, Y. S., Cone-Wesson, B., Folsom, R. C., Gorga, M. P., Vohr, B. R., Widen, J. E., Ekelid, M. e Norton, S. J. (2000). "Identification of neonatal hearing impairment: auditory brain stem responses in the perinatal period." *Ear Hear* 21(5): 383-399.
- Sininger, Y. S. e Don, M. (1989). "Effects of click rate and electrode orientation on threshold of the auditory brainstem response." *J Speech Hear Res* 32(4): 880-886.
- Skinner, P. e Glattke, T. J. (1977). "Electrophysiologic response audiometry: state of the art." *J Speech Hear Disord* 42(2): 179-198.
- Stach, B. A. (2002). "The auditory steady-state response: A primer." *The Hearing Journal* 55(9): 10-18.
- Stapells, D. R. (2000). "Threshold Estimation by the Tone-Evoked Auditory Brainstem Response: A Literature Meta-Analysis." *Journal of Speech-Language Pathology and Audiology* 24(2): 74-83.

- Stapells, D. R., Gravel, J. S. e Martin, B. A. (1995). "Thresholds for auditory brain stem responses to tones in notched noise from infants and young children with normal hearing or sensorineural hearing loss." *Ear Hear* 16(4): 361-371.
- Stapells, D. R., Linden, D., Suffield, J. B., Hamel, G. e Picton, T. W. (1984). "Human auditory steady state potentials." *Ear Hear* 5(2): 105-113.
- Stapells, D. R., Makeig, S. e Galambos, R. (1987). "Auditory steady-state responses: threshold prediction using phase coherence." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 67(3): 260-270.
- Starr, A. e Achor, J. (1975). "Auditory brain stem responses in neurological disease." *Arch Neurol* 32(11): 761-768.
- W. R. Goff, T. A., H. G. Vaughan (1978). *The functional neuroanatomy of event related potentials. Event-related Brain Potentials in Man.* P. T. E. Callaway, S.H. Koslow. New York, New York Academic Press: 1-79.
- Webster, W. R., Serviere, J., Martin, R. e Brown, M. (1985). "Uncrossed and crossed inhibition in the inferior colliculus of the cat: a combined 2-deoxyglucose and electrophysiological study." *J Neurosci* 5(7): 1820-1832.
- Woods, D. L., Clayworth, C. C., Knight, R. T., Simpson, G. V. e Naeser, M. A. (1987). "Generators of middle- and long-latency auditory evoked potentials: implications from studies of patients with bitemporal lesions." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 68(2): 132-148.
- Yamamoto, T., Williamson, S. J., Kaufman, L., Nicholson, C. e Llinas, R. (1988). "Magnetic localization of neuronal activity in the human brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22): 8732-8736.

ANEXO 1

Fenômenos Ondulatórios

Estudando os movimentos ondulatórios, estamos iniciando a discussão de grande campo de fenômenos físicos. A idéia aqui não é abordar todos os aspectos dos fenômenos ondulatórios, mas sim, proporcionar ao leitor uma revisão de conceitos fundamentais para o melhor entendimento deste trabalho. Como estudaremos respostas fisiológicas a estímulos auditivos, o entendimento da física das ondas sonoras é importantíssimo. Além disso, a atividade elétrica cerebral é registrada na forma de ondas, que representam a variação do potencial elétrico entre, pelo menos, dois pontos num intervalo de tempo.

Se pode dizer que o mundo físico é composto apenas por dois entes básicos: objetos materiais e ondas. Falando em termos gerais, uma **onda é energia pura sem massa**. O som, as ondas ultra-sônicas, a luz, os raios X, a radiação infra-vermelha, a radiação ultra-violeta, os raios gama, o radar e as ondas de rádio são todos exemplos de ondas, ainda que a natureza física de algumas destas seja muito diferente. Assim, as ondas sonoras e o ultra-som são vibrações mecânicas em um meio material, enquanto as outras são de natureza eletromagnética e não necessitam de um meio material para propagar-se. Entretanto, sem levar em consideração sua natureza fundamental, todas as ondas têm as mesmas características gerais. (Cromer 1975)

A maioria dos animais obtém informações do meio que os rodeia detectando alguns tipos de ondas e comunicam-se produzindo outros tipos de ondas. Por exemplo, o homem detecta a luz com os olhos, o som com as orelhas, a radiação infra-vermelha com a pele e comunica-se por meio da fala. Outros animais detectam e produzem outras ondas, tais como o ultra-som e a radiação ultra-violeta. (Cromer 1975)

A propriedade importante da onda é a sua capacidade de transportar energia. As ondas não transportam matéria (Fence Jr. *et al.* 1946; Cromer 1975; Nussenzweig 2002). Uma forma simples de demonstrar este conceito é imaginarmos uma fileira de dominós inicialmente colocados em pé, ao aplicar um impulso ao primeiro dominó eles vão caindo sucessivamente até o último dominó cair. Nesse exemplo, a energia do impulso é transmitida

ao longo da fileira sendo que cada um deles praticamente não sai do lugar (Nussenzveig 2002) (Figura 27).



Figura 27 – Fileira de dominós em queda após um estímulo mecânico na extremidade da esquerda. Observe que a transferência de energia ocorre praticamente sem transporte de massa.

Um dos exemplos mais utilizados no ensino da física das ondas é o de uma onda numa corda. Ao aplicarmos um impulso numa extremidade da corda, movimentando-a para cima e para baixo, o pulso se propaga como uma onda na direção X (Figura 28). Cada ponto da corda oscila para cima e para baixo, ou seja, a perturbação é um deslocamento na direção Y, perpendicular à direção de propagação da onda. Figura Uma onda com esta propriedade chama-se **onda transversal** (Nussenzveig 2002).

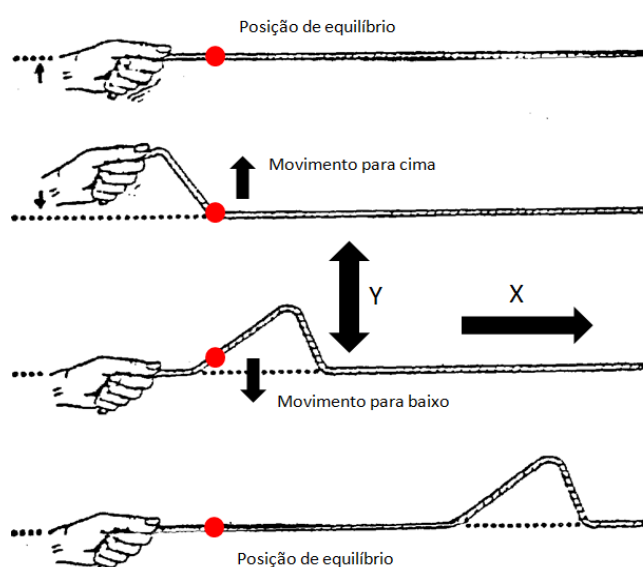


Figura 28 - Onda em uma corda ao aplicar um impulso para cima e para baixo evoluindo gradativamente na sequência de ilustrações de cima para baixo. Os pontos da corda oscilam numa direção (direção Y) perpendicular à direção de propagação da onda (direção X) caracterizando uma onda transversal.

Outro exemplo é a propagação de uma onda de compressão ao longo de uma mola, que está inicialmente em equilíbrio e, então, tem a extremidade subitamente comprimida (Figura 29). Note que logo após as espiras comprimidas, há algumas “rarefeitas”, ou seja, com espaçamento maior que na posição de equilíbrio. Assim, a onda de compressão é seguida por outra de rarefação. Se observarmos o movimento de uma dada espira, vemos que ela desloca-se para direita depois para esquerda e retorna à posição de equilíbrio. Este é um exemplo de **onda longitudinal**, onde a direção de oscilação das partículas se dá na mesma direção da propagação da energia transmitida pela onda. As ondas sonoras na atmosfera, que estudaremos mais adiante, são ondas longitudinais deste tipo, em que a perturbação consiste em compressões e rarefações da atmosfera (Nussenzveig 2002).

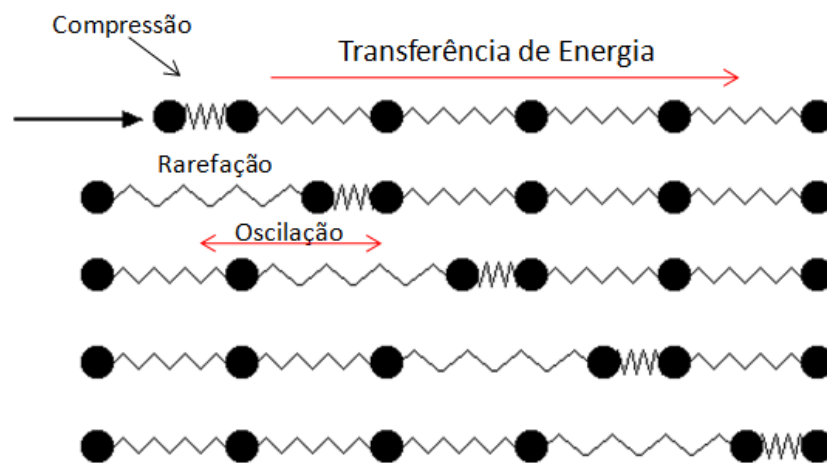


Figura 29 - Conjunto de esferas conectadas por meio de molas e seu comportamento em movimentos sucessivos, seqüência de imagens de cima para baixo. Ao aplicar-se uma força em uma das esferas, ocorre um deslocamento na direção e sentido da força aplicada que se propagará pelas outras esferas. Observe que as esferas movimentam-se para frente e para trás retornando à sua posição de equilíbrio e que logo após uma compressão ocorre uma rarefação. Neste caso a energia propaga-se na mesma direção e sentido da força aplicada, sendo portanto chamada de onda longitudinal.

Sobreposição de ondas

Em um meio pode haver mais de uma onda ao mesmo tempo e no mesmo ponto. Esta propriedade das ondas as distingue claramente dos objetos materiais. Por exemplo, as duas

vibrações da Figura 30a, que encontram-se uma frente a outra na corda, passam uma através da outra sem experimentar nenhuma alteração (Figura 30b). Os objetos materiais não se penetram mutuamente deste modo. Todavia, uma onda não é um objeto material. É uma configuração de deslocamentos de pontos que autopropaga em um meio material. Uma onda é uma entidade física real, mesmo não sendo um objeto material. Movimenta-se, transporta energia, e interage com objetos materiais. Assim sendo, as ondas e os objetos materiais são os dois conceitos físicos básicos em função dos quais se descreve o mundo físico (Cromer 1975).

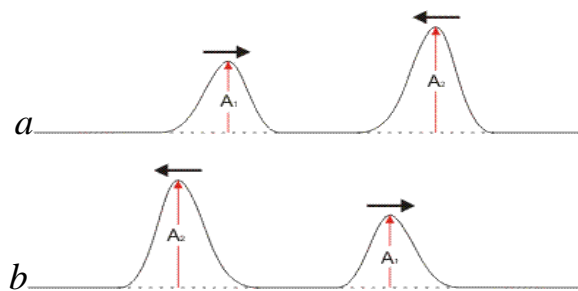


Figura 30 – a: Ondas viajantes sentidos contrários. b: Após o encontro delas permanecem as mesmas características de cada uma.

Se em qualquer instante existem duas ou mais ondas simultaneamente em um ponto, o deslocamento do ponto é a soma dos deslocamentos que o ponto teria com cada onda separadamente. Este é o **Princípio da Sobreposição** (Cromer 1975). A figura mostra como se aplica este princípio às vibrações da figura a e b quando uma penetra dentro da outra. As linhas pontilhadas representam os deslocamentos que a corda sofreria devido a cada onda individualmente. Suponhamos que o deslocamento A_1 seja igual a 5cm e o deslocamento A_2 seja 10cm, o deslocamento resultante é igual a 15cm quando os picos das ondas se sobrepõem (Figura 31) .

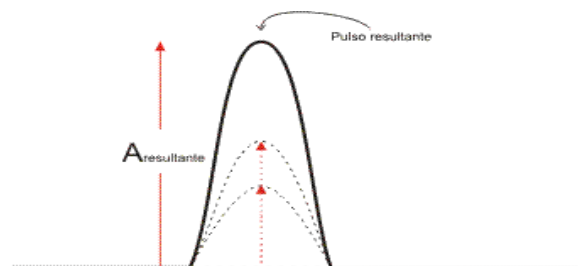


Figura 31 - Sobreposição das ondas ao passar uma pela outra num mesmo ponto.

Vimos o princípio de sobreposição aplicado a duas ondas que viajam de um mesmo lado da corda, ou seja, do mesmo lado da posição de equilíbrio. Ao aplicarmos este princípio os deslocamentos de um mesmo lado da corda são considerados positivos e os deslocamentos do outro lado são considerados negativos, independente do sentido do deslocamento (Cromer 1975) (Figura 32).

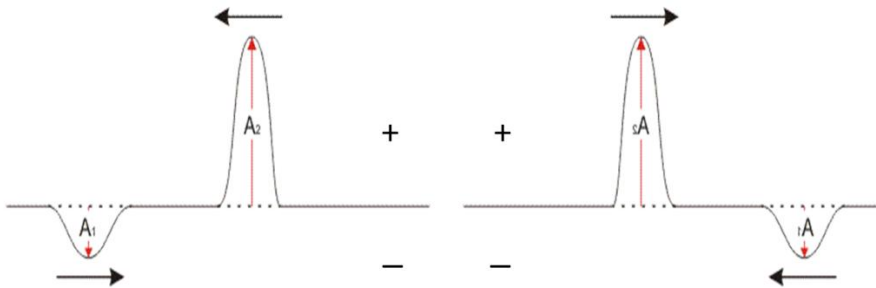


Figura 32 - Ondas viajantes em sentido contrário e deslocamentos positivo e negativo.

A figura mostra a sobreposição mútua de uma onda positiva e outra negativa. Assim, pelo princípio da sobreposição, a soma de um deslocamento positivo e outro negativo de módulos diferentes é igual à diferença do deslocamento das duas ondas (Cromer 1975) (Figura 33).

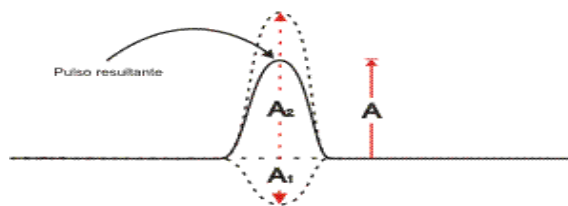


Figura 33 - Sobreposição das ondas positiva e negativa ao passar uma pela outra num mesmo ponto.

Após o encontro, cada um segue na sua direção inicial, com suas características iniciais conservadas.

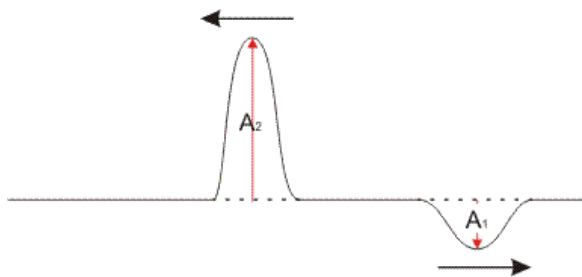


Figura 34 – Após a sobreposição as ondas positiva e negativa contrérias mantém as mesmas propriedades.

O princípio da sobreposição torna possível expressar uma onda complexa como a soma de várias ondas simples. Assim sendo, é possível expressar qualquer onda, por complexa que seja, como a soma de ondas de formato especialmente simples chamadas **ondas senoidais** (Cromer 1975). Discutiremos isto mais adiante quando falarmos sobre o Teorema de Fourier.

Ondas Senoidais

Uma onda senoidal é uma configuração de onda particular, na qual as vibrações positivas e negativas alternam-se sucessivamente (Cromer 1975). As partículas do meio vibram de modo regular em torno de uma posição de equilíbrio, realizando um movimento harmônico simples. O perfil desta onda é uma função seno, e as ondas são chamadas **harmônicas** (Nussenzveig 2002) **ou senoidais** (Cromer 1975). Assim, ao movimentarmos a extremidade de uma corda, por exemplo, para cima e para baixo, num movimento harmônico simples, geramos em uma corda uma onda senoidal (Figura 35).

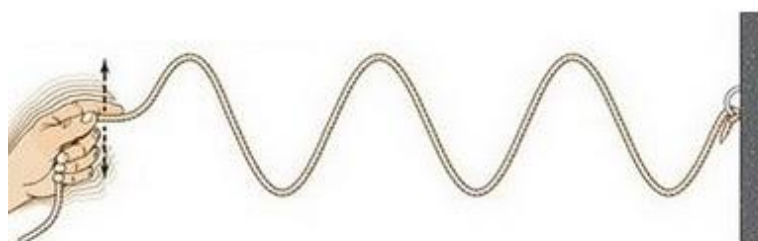


Figura 35 - Onda senoidal. Ao movimentar a extremidade de uma corda num movimento harmônico simples para cima e para baixo, ocorre a formação de uma onda com perfil senoidal. Assim as partículas da corda movimentam-se para cima e para baixo realizando um movimento harmônico simples.

A distância entre picos positivos vizinhos é uma constante, chamada **comprimento de onda (λ)** (Cromer 1975) e é medido em metros(m). Assim sendo, os deslocamentos, em relação à posição de equilíbrio, de dois pontos quaisquer separados por um comprimento de onda são os mesmos (Cromer 1975) numa dada onda, tais como os pontos P_1 e P_2 (Figura 36). Esta classe de configuração ondulatória é chamada periódica porque a configuração se repete exatamente a intervalos de λ .

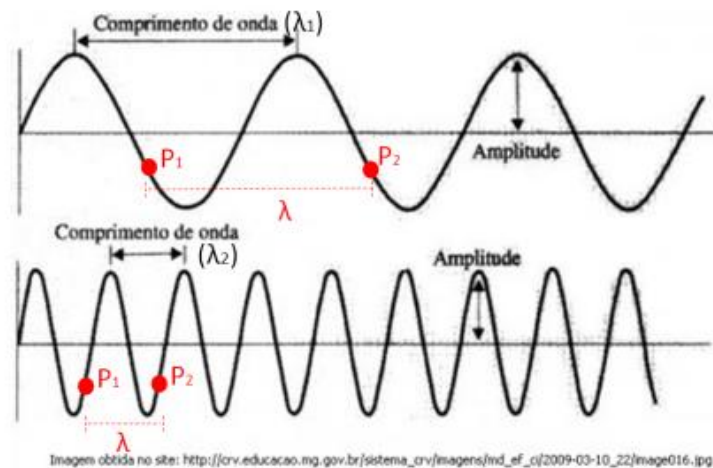


Figura 36 – Ondas senoidais em uma corda com diferentes comprimentos de onda.

O deslocamento máximo de uma onda senoidal em relação à posição de equilíbrio é chamado de amplitude (A), e é o mesmo, tanto para os deslocamentos positivos quanto para os negativos (Cromer 1975).

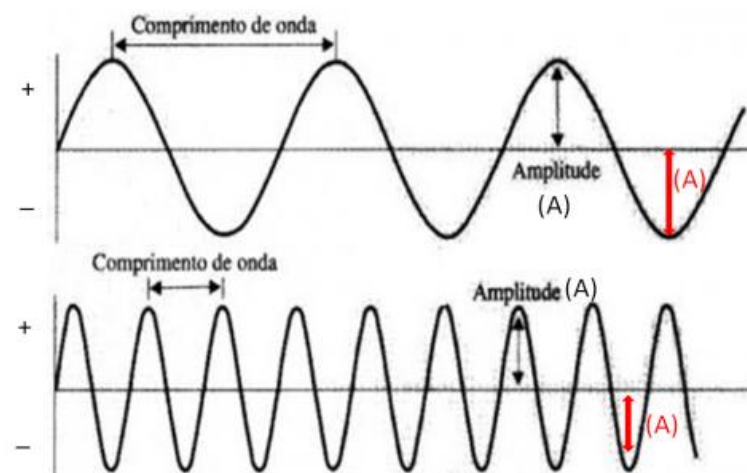


Figura 37– Ondas senoidais de diferentes amplitudes em uma corda. A amplitude da onda é representada por A_0 e representa o máximo deslocamento da onda em relação ao eixo das ordenadas (eixo y).

Cada ponto da corda realiza um movimento harmônico simples em relação ao eixo x, para cima e para baixo. O tempo em que um ponto leva para se deslocar de uma crista para um vale e retornar para uma crista é chamado **período** (T) da onda, e é medido em segundos (s). É a mesma definição usada para período de um movimento harmônico simples, isto é, o tempo T para uma vibração completa, ou um ciclo completo (Ferençe Jr. *et al.* 1946), e corresponde a 1 comprimento de onda. A **frequência** (f) dessas vibrações é o número de vibrações completas por segundo (Ferençe Jr. *et al.* 1946), e é medida em Hertz (Hz), de modo que:

$$f = \frac{1}{T} \quad \text{ou} \quad T = \frac{1}{f}$$

Na figura podemos observar ondas de mesma amplitude, porém, de diferentes frequências. Note, que a frequência diminui à medida que o número de ciclos completos num determinado intervalo de tempo diminui. Este conceito é importante, pois, ondas sonoras de diferentes frequências possuem significados psicofisiológicos diferentes (Cromer 1975).

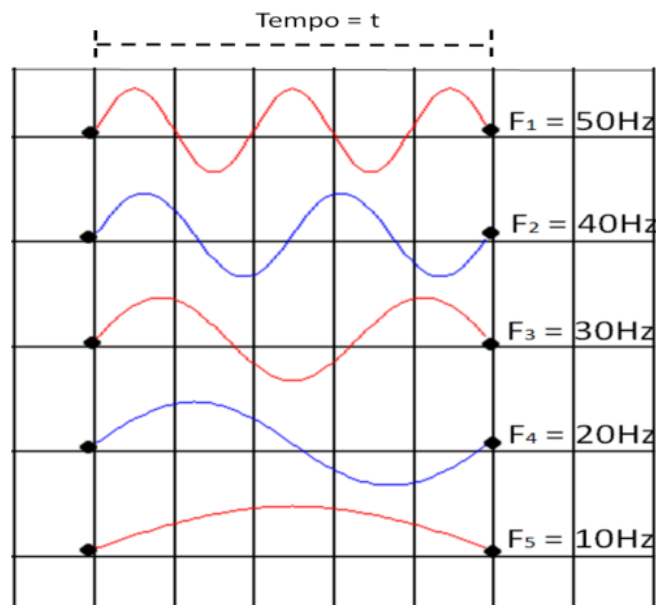


Figura 38 – Ondas senoidais de diferentes frequências.

Como dito anteriormente, a forma real de uma onda senoidal está relacionada com o seno trigonométrico. Assim, é natural que se associem os pontos em 1 comprimento de onda (λ) de uma onda senoidal aos pontos sobre uma circunferência, pois, uma onda senoidal repete-se depois de 1 comprimento de onda, o mesmo que a circunferência que repete-se após 360° (Cromer 1975) (Figura 39).

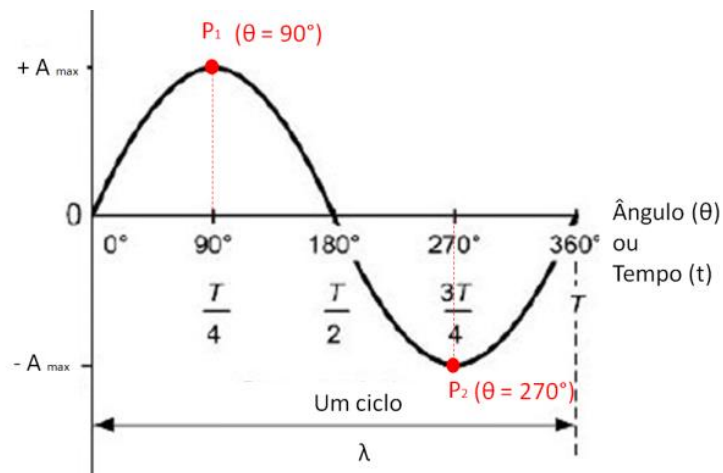


Figura 39 - Representação de uma onda senoidal em graus. Assim como a circunferência que repete-se a cada 360° a onda senoidal repete-se a cada comprimento de onda.

Assim, podemos determinar a posição, em graus, de um ponto de uma onda senoidal, considerando apenas um ciclo (1 comprimento de onda), o que chamamos de **fase**. Observando a figura afirmamos que o ponto P_1 está em 90° e o ponto P_2 está em 270° , em relação ao início do ciclo (0°). E que a **diferença de fase** entre eles é de 180° .

Quando consideramos mais de uma onda, tomamos uma como referência e a consideramos estar a 0° , a partir desta, medimos a diferença de fase das outras. Note que o ponto escolhido na onda referência deve ser correspondente nas outras ondas, ou seja, se escolhermos um ponto no eixo x com amplitude 0 (zero), seguido por uma crista, devemos escolher o primeiro ponto com estas mesmas características nas outras ondas. Na Figura 40, a onda de cor preta foi escolhida como a onda a 0° , a vermelha está atrasada 120° em relação à preta, e a azul, 240° em relação à preta.

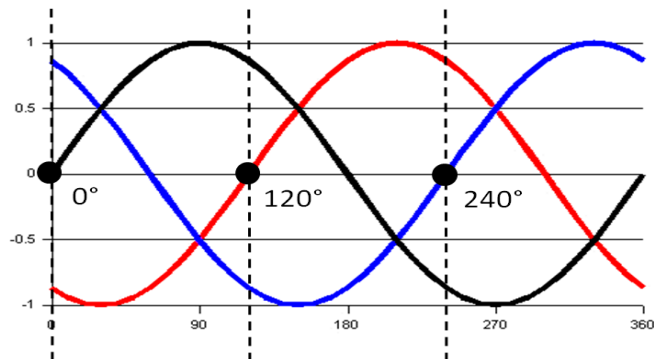


Figura 40 - Três ondas senoidais com mesma amplitude e frequência, porém diferem em fase entre si. A onda de cor preta foi tomada como referência e considerada como fase a 0° , escolhemos um ponto na onda referência e a partir dele medimos a diferença de fase em relação aos pontos correspondentes nas outras duas ondas (de cores vermelha e azul). Neste exemplo, escolhemos um ponto da onda referência que está sobre o eixo x com amplitude 0 (zero) e seguido por uma crista, assim, devemos medir a diferença de fase, entre as ondas, escolhendo o primeiro ponto, das outras duas ondas, que satisfazem estas características. Então, as ondas de cores vermelha e azul estão atrasadas em fase em 120° e 240° , respectivamente, em relação à onda de cor preta.

Teorema de Fourier

Qualquer onda, tenha o formato que tenha, pode ser expressa de maneira única como a sobreposição (soma) de ondas senoidais de comprimentos de onda e amplitudes definidas (Cromer 1975).

Por exemplo, de acordo com este teorema, a configuração bem mais complexa da onda (a de cor preta) na figura é igual à sobreposição de ondas senoidais (Cromer 1975). Estas ondas senoidais, que denominam-se **componentes de Fourier** da configuração complexa (Cromer 1975), se mostram por meio das ondas coloridas ao fundo na Figura 41.

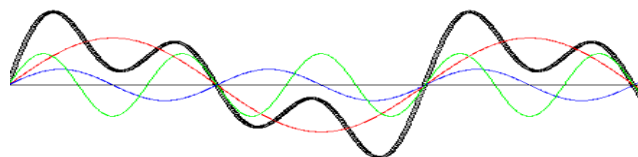


Figura 41 - Onda periódica complexa (cor negra) produzida pela sobreposição de três ondas senoidais de diferentes amplitudes e comprimentos de onda (coloridas).

Estas ondas são únicas, ou seja, apenas ondas senoidais com estes comprimentos de onda e esta amplitude combinam até resultar a configuração dada (Cromer 1975) (Figura 42a). Podemos representar esta onda complexa da figura a por meio de um gráfico da frequência pela amplitude, chamada representação no **domínio da frequência** (Observação: quando usamos um gráfico de amplitude versus tempo, dizemos que a onda está representada no **domínio do tempo**. (Figura 42b). Assim, na representação no domínio da frequência, cada componente de Fourier pode ser representada por meio de uma barra colocada no eixo horizontal sobre seu respectivo valor de frequência e altura correspondente à sua amplitude (Figura 42c).

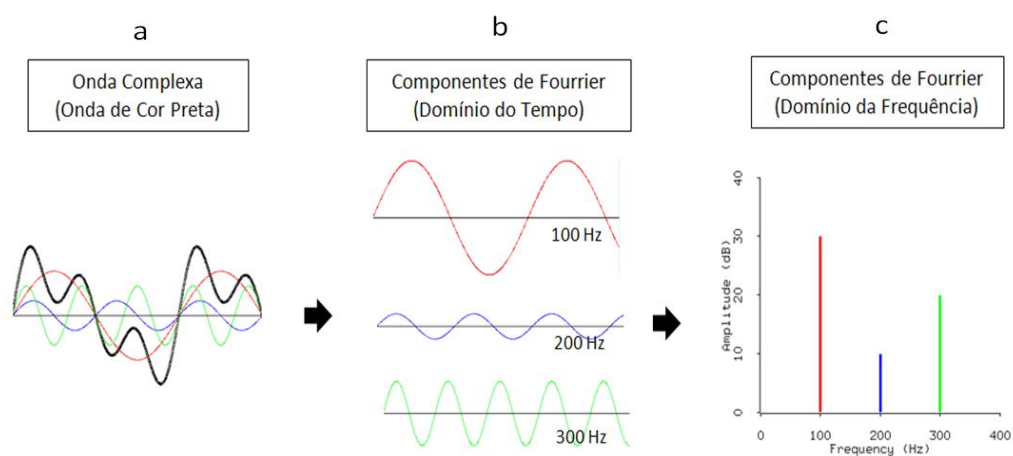


Figura 42 - Onda senoidal complexa (a) e suas componentes de Fourier no domínio do tempo (b) e no domínio da frequência (c).

Qualquer configuração de onda, não importa a complexidade, é analogamente igual à soma de ondas senoidais, ainda que seja necessária a sobreposição de muitas destas ondas para se igualar à configuração complexa (Figuras 43 e 44).

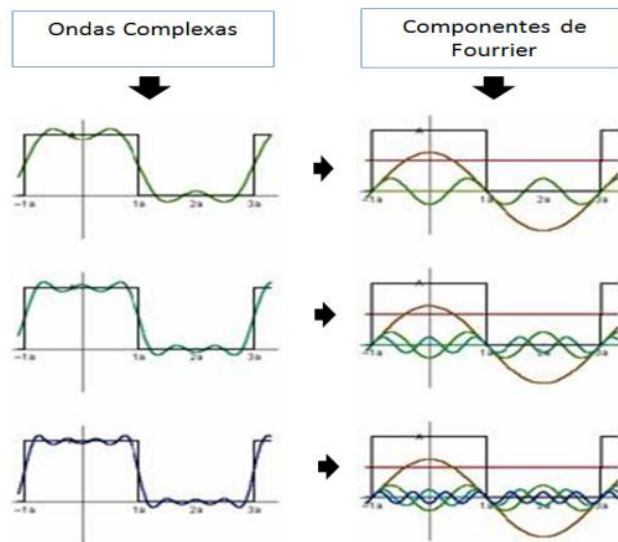


Figura 43 - Ondas complexas e suas diferentes componentes de Fourier.

A representação no domínio da frequência, também é chamada de **espectro da onda** como a das Figuras 42c e 44. É uma forma conveniente de especificar uma onda (Cromer 1975). A figura abaixo mostra várias ondas complexas com seus espectros correspondentes.

As configurações de ondas complexas podem ser periódicas ou aperiódicas. Uma onda periódica, como uma onda senoidal simples, repete sua configuração exatamente a intervalos de comprimento de onda λ . Uma onda aperiódica nunca repete sua configuração. A onda da figura abaixo c é aperiódica e a onda da figura abaixo a e b são periódicas. O espectro da onda aperiódica contém uma distribuição contínua de frequências, enquanto o espectro de uma onda periódica é discreto (descontínuo) (Cromer 1975).

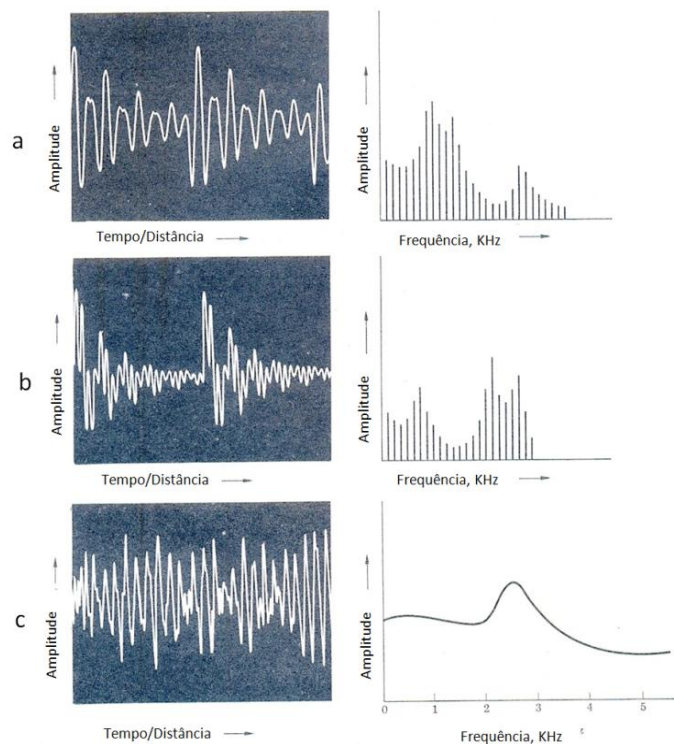


Figura 44 – Ondas periódicas e aperiódicas e seus respectivos espectros de frequência. Adaptado de (Cromer 1975).

O espectro de uma onda periódica é discreto porque para que uma onda seja periódica com comprimento de onda λ_x , os comprimentos de onda de suas componentes de Fourier têm que ser membros da sequência de frações ($1/2 \lambda_x$; $1/3 \lambda_x$; $1/4 \lambda_x \dots 1/n \lambda_x$), onde n é um número inteiro ($n=1,2,3,\dots$). Assim como todas as ondas são as mesmas no início e no fim do intervalo, a soma se repete após este intervalo (Cromer 1975). Tal sequência de frequências é chamada **sucessão harmônica** (Cromer 1975), pois, toda harmônica é uma onda senoidal cuja frequência é um múltiplo inteiro de uma determinada frequência chamada **frequência fundamental** (f_1). Por exemplo, uma onda de 60Hz (f_1) tem como harmônicas ondas de 120Hz ($2f_1$), 180Hz ($3f_1$), e 300hz ($5f_1$).

Ondas Sonoras

As ondas **sonoras** constituem um movimento regular e sistemático das moléculas de um meio transmissor (gasoso, líquido ou sólido, por exemplo: ar, água e aço), superposto ao movimento térmico dessas moléculas. Elas se afastam da fonte sonora, produzindo em nossos ouvidos efeitos mecânicos, que estimulando os nervos sensoriais do sistema auditivo, são interpretadas como som pelo nosso cérebro.(FERENCE Jr. *et al.* 1946)

As ondas sonoras são ondas mecânicas longitudinais, ou seja, ondas em que a direção de oscilação das moléculas do meio é a mesma direção de propagação da onda.



Figura 45 - Ondas mecânicas longitudinais.

Em geral, as ondas sonoras têm sua origem em alguma espécie de vibração mecânica causada por batidas, atrito e outras formas de dissipação de energia em arranjos mecânicos, naturais ou artificiais (Ferenca Jr. *et al.* 1946).



Figura 46 - Onda sonora vista bidimensionalmente produzida pela vibração de uma lâmina.

O exemplo utilizado anteriormente considerava a propagação de ondas longitudinais em uma mola, que é uma onda unidimensional, porém, é preciso expandir este conceito agora, pois, as ondas sonoras são ondas tridimensionais, sendo superfícies esféricas que se expandem a partir da fonte sonora. (Ferenca Jr. *et al.* 1946)

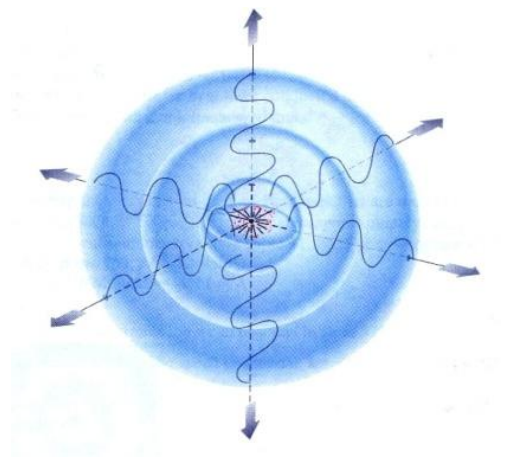


Figura 47 - Ondas de som em formato tridimensional. Observe as bandas de compressão e rarefação.

Em secções limitadas do meio material tais como hastes ou colunas de sólidos, líquidos ou gases, as ondas sonoras são obrigadas a caminhar somente em uma direção e podem ser tratadas como unidimensionais. Formas de vibrações de cordas, hastes e colunas de ar formam assim os tipos de problemas analíticos mais simples e servem para ilustrar os princípios das ondas sonoras (FERENCE JR. *et al.* 1946). Podemos fazer uma analogia com o exemplo de onda longitudinal em uma mola apresentado anteriormente. Porém, ao invés de espiras da mola que se comprimem e se distendem, são as moléculas do meio transmissor que oscilam em torno de uma posição de equilíbrio (ora para frente ora para trás), tornando-se ora condensadas e ora rarefeitas.

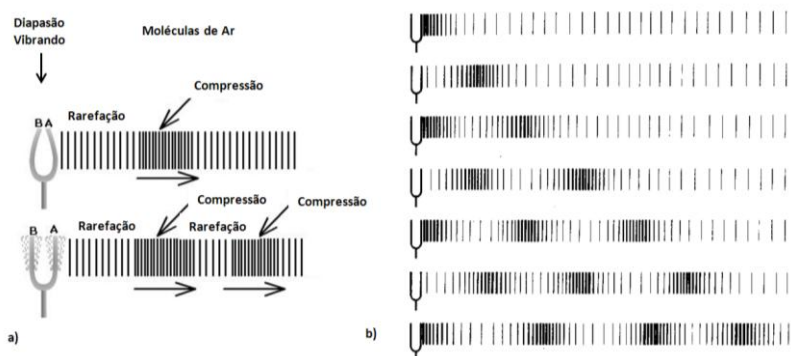


Figura 48 – Evolução de uma onda sonora em uma secção limitada de um meio material e as regiões de compressão e rarefação das partículas do meio.

Também demonstramos as ondas sonoras em um gráfico (x,y). Isso nos permite uma abordagem matemática. Assim, fica mais fácil estudar as propriedades gerais das ondas. Valores de amplitude mais altos (picos) representam áreas de compressão das moléculas do meio transmissor, e valores de amplitude mais baixos (vales) representam áreas de rarefação das moléculas do meio transmissor.

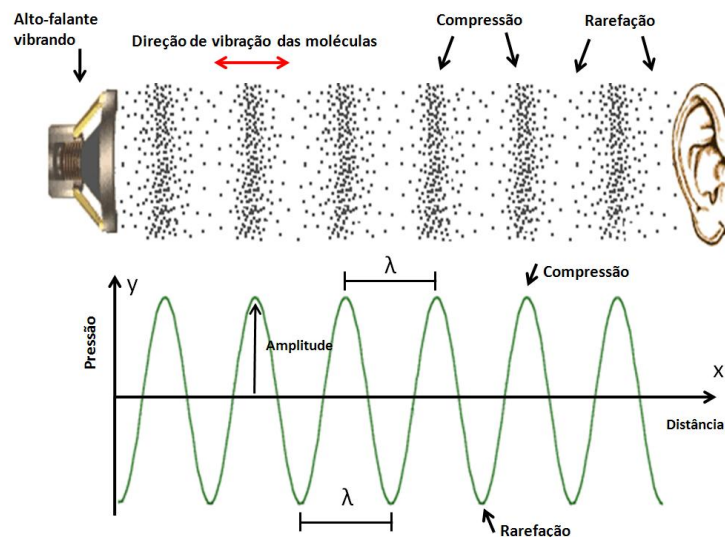


Figura 49 – Representação de uma onda sonora por meio de um gráfico xy.

Para entendimento deste trabalho será necessário entender também duas características básicas das ondas sonoras: **altura e intensidade**.

Altura refere-se à frequência da onda, onde encontramos altas frequências e baixas frequências. Sons **graves (ou baixos)**, como o som emitido por tambores, são sons de baixa frequência. E sons **agudos (ou altos)**, como o som emitido por uma guitarra, são sons de alta frequência. Aqui cabe o conceito de **tom**. Os tons são ondas periódicas, que podem ser puras ou complexas. Os tons puros são, então, ondas senoidais simples, composta por uma única frequência (figura abaixo a), enquanto os tons complexos são ondas complexas formadas pelo somatório da onda senoidal fundamental e seus harmônicos: um somatório de ondas de diferentes frequências (figura abaixo b).

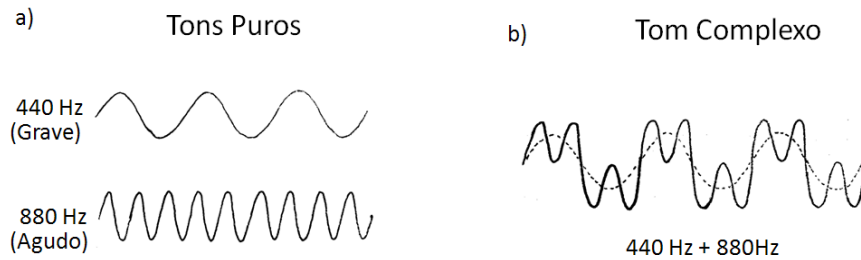


Figura 50 – Tons puros (a) e complexos(b).

O ouvido humano pode detectar ondas mecânicas longitudinais numa faixa de 20Hz a 20.000Hz. As ondas que estão dentro deste intervalo audível são chamadas ondas sonoras, ou som. As ondas com frequência acima de 20.000Hz chamam-se ultrassônicas e as abaixo de 20Hz, infrassônicas. Como esta classificação depende do sistema auditivo humano, não têm significado físico fundamental. Entretanto, têm significação prática, pois, para detectar ondas ultrassônicas ou infrassônicas é necessário um equipamento próprio (Cromer 1975).

Entende-se por “intensidade” de uma onda, a quantidade de energia que a onda transmite cada segundo através de uma área unitária perpendicular à direção de propagação da onda (Ferenca Jr. *et al.* 1946). Ela está relacionada com a amplitude da onda. Assim, ondas com altas amplitudes, possuem maior intensidade, e estes sons são chamados **fortes (ou intensos)**. E ondas com baixas amplitudes, possuem menor intensidade, e estes sons são chamados **fracos**.

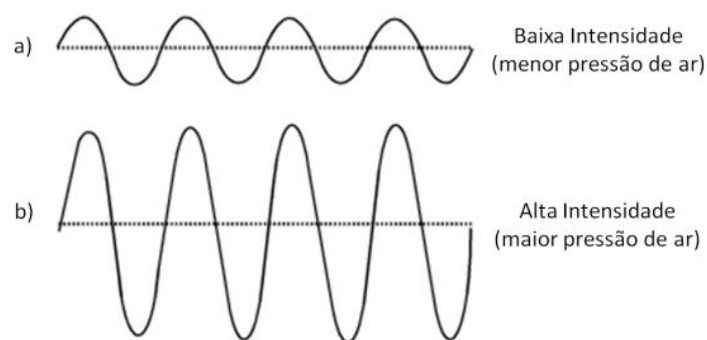


Figura 51 – Tons de mesma frequência e diferentes intensidades. (a): tom fraco; (b) tom forte.

Uma forma incorreta de se falar sobre intensidade do som, é quando dizemos que o “volume do som está alto”, neste caso o correto seria dizer que a “intensidade do som está

forte ou o som é intenso”. Pois, som é onda, ou seja: energia, sendo assim, não possui massa e por isto não pode ter volume. E o termo “alto” ou “baixo” refere-se à frequência do som.

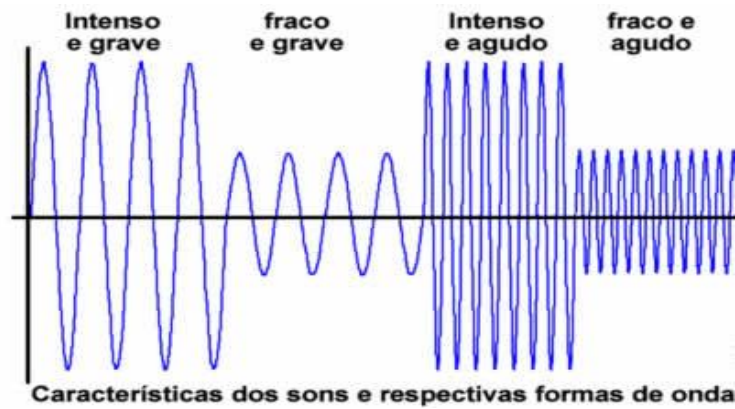


Figura 52 – Tons de diferentes frequências e intensidades.

A “força” (ou sonoridade) de um som é uma impressão subjetiva que o observador atribui a um som particular, enquanto a energia da onda sonora é uma grandeza física objetiva (Cromer 1975). Ainda que a sonoridade como que se percebe um som aumenta com sua intensidade, a relação entre sonoridade e intensidade está longe de ser linear. Por exemplo, em uma sala de conferências, a intensidade da voz de um apresentador pode ser 100 vezes maior próximo ao palco do que no fundo da sala, entretanto, um ouvinte que se desloca da frente para o fundo da sala experimenta somente uma ligeira diminuição da sonoridade (Cromer 1975). Isso ocorre porque, o ouvido humano consegue perceber alterações de intensidade em escala logarítmica, chamada escala decibélica (dB). Assim, os limiares de audição variam de 0dB a 120dB. A intensidades acima de 120dB, a sensação deixa de ser de um som para ser uma sensação dolorosa (limiar da sensação dolorosa). Ou seja, as ondas acima de 120dB doem mais do que se ouve (Cromer 1975).

ANEXO 2

Sistema Eletrônico Básico de Geração de Som

Uma forma simples de visualizar qualquer sistema de áudio é dividi-lo em três partes: a fonte, o processador e a saída de som.

A **fonte** é onde um sinal elétrico de áudio é gerado. Como exemplo temos um instrumento musical elétrico, um tocador de disco de vinil, um toca-fitas, um leitor de *compact disc* (CD), um tocador de mp3 (arquivo digital de som). Este sinal elétrico, que nada mais é do que uma onda elétrica, em última instância fará com que o alto falante oscile seguindo o perfil da onda.

O **processador** é onde o sinal é manipulado, por exemplo, um amplificador. O amplificador tem por finalidade aumentar a amplitude de uma onda elétrica. Aumentando assim a energia do sinal e consequentemente a intensidade do som que será gerado.

A **saída de som** é onde o sinal elétrico (a onda elétrica) é convertido em ondas sonoras. Este processo é realizado pelos alto-falantes. As ondas elétricas fazem com que o diafragma de um alto-falante oscile para frente e para trás ora comprimindo, ora decomprimindo, a massa de ar à sua frente e assim gerando ondas sonoras (Figura 53).

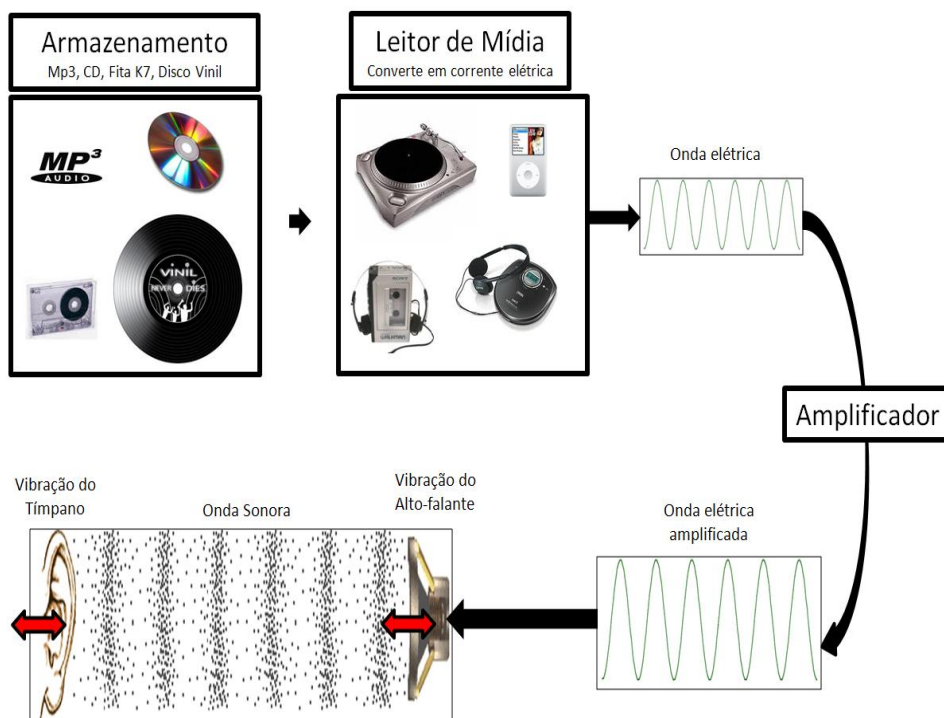


Figura 53 - Sistema eletrônico básico de geração de som.

BIBLIOGRAFIA DOS ANEXOS

Cromer, A. H. (1975). Física para las ciencias de la vida. Barcelona, Reverté.

Ference Jr., M., Lemon, H. B. e Stephenson, R. J., Eds. (1946). Curso de Física - Ondas (som e luz). São Paulo, Edgard Blucher Ltda.

Nussenzeig, H. M. (2002). Curso de Física Básica São Paulo, Edgard Blucher.

ANEXO 3

Figuras ampliadas

Espectrograma Varredura de Intensidade de Estímulo

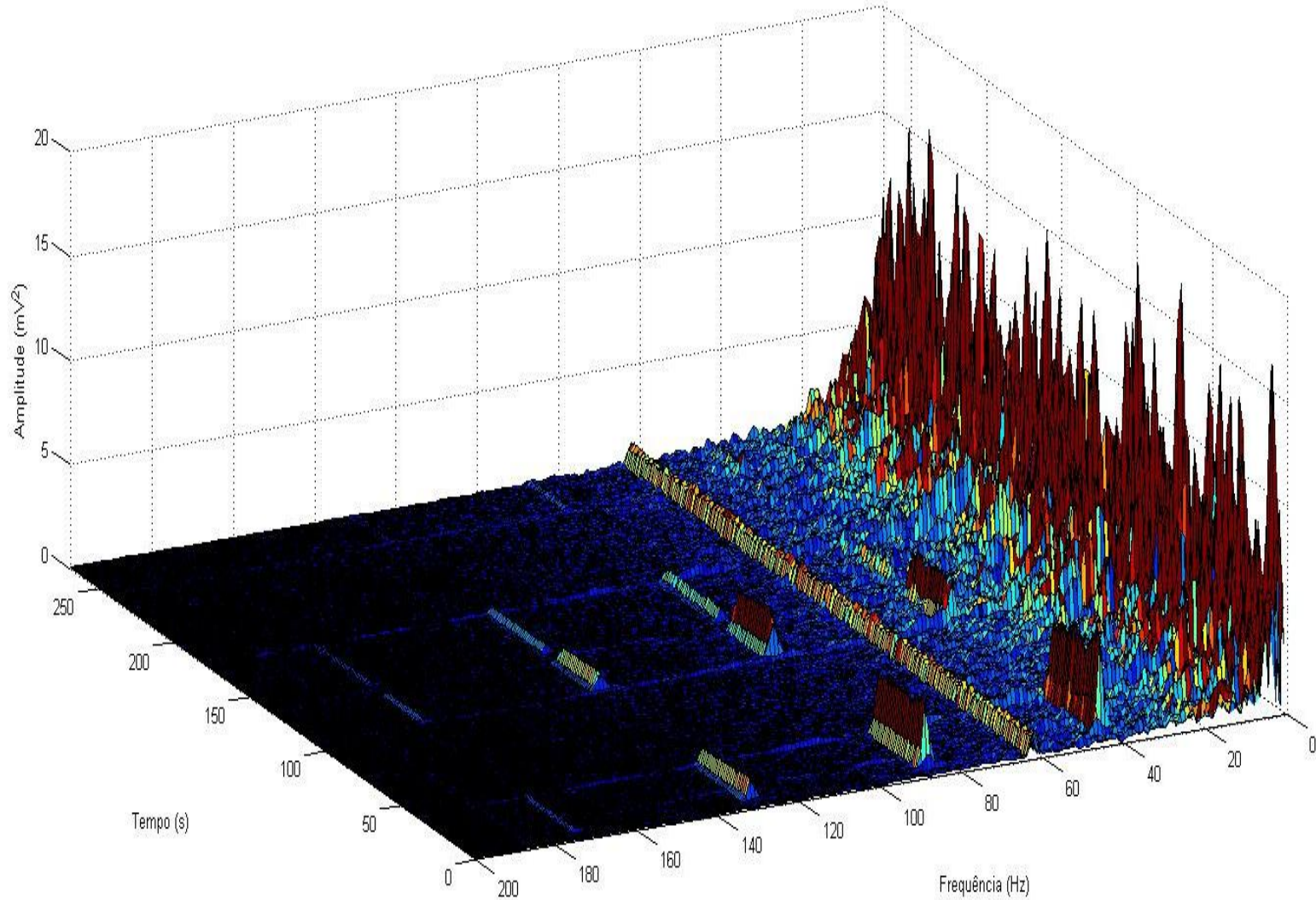


FIGURA 10

Figura 10– Espectrograma do EEG durante todo o período de registro apresentando o espectro até 200Hz. Observe os picos na frequência de modulação (41.99 Hz) e nas suas harmônicas para as diferentes intensidades de apresentação do estímulo.

FIGURA 11

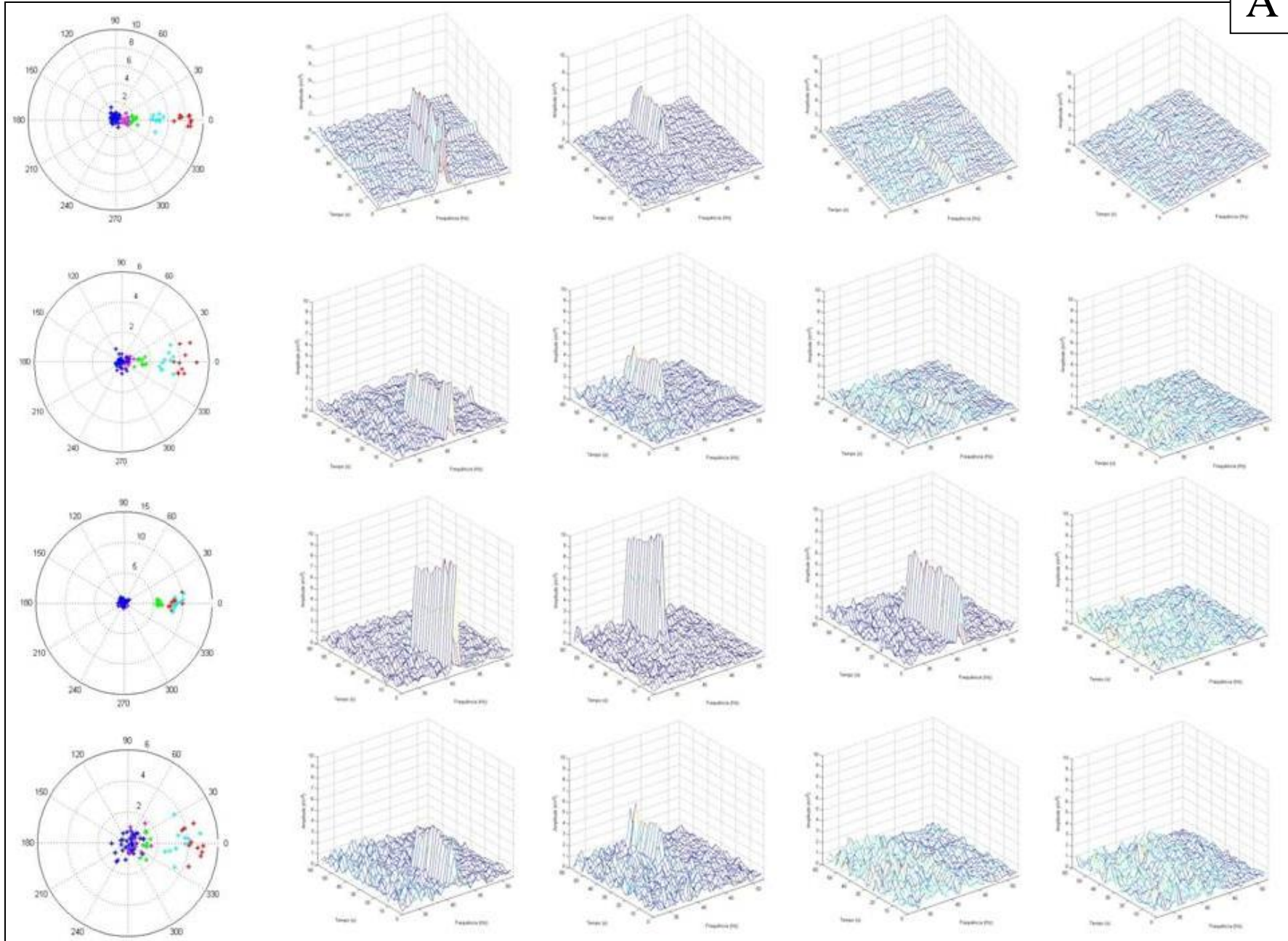


FIGURA 11

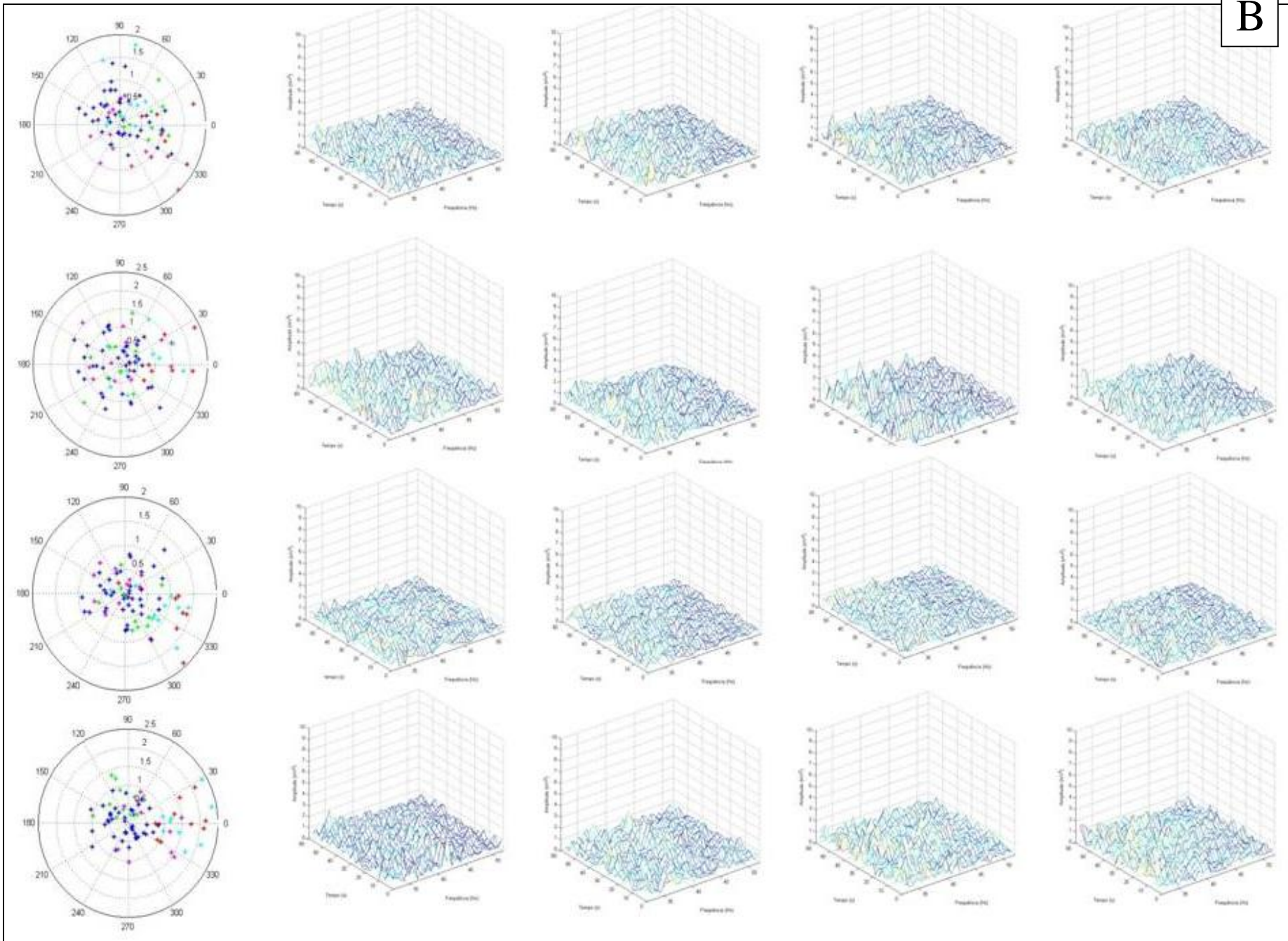
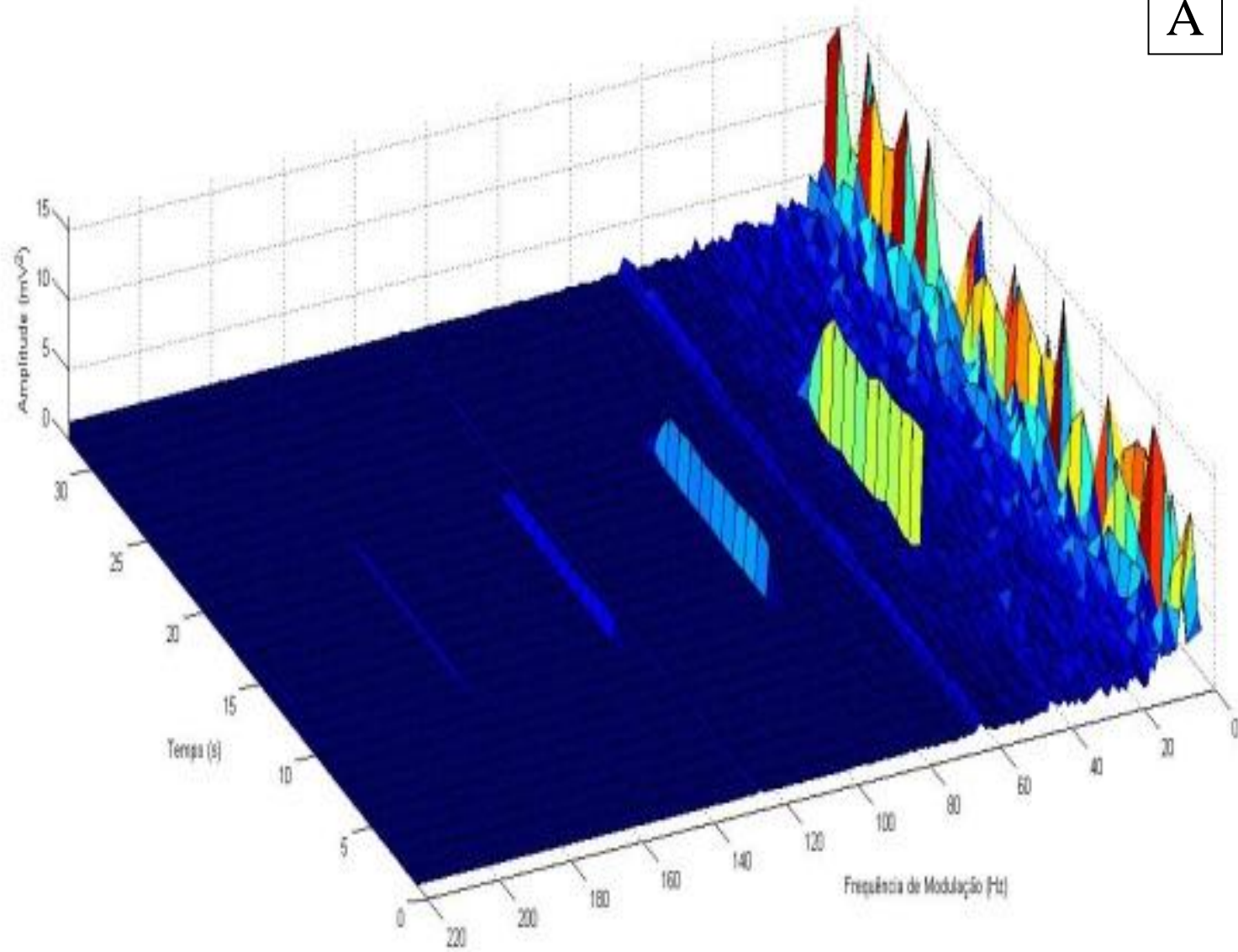


Figura 11– Representação da amplitude das respostas por meio do gráfico polar e espectrograma, para os períodos em que o tubo permanece aberto e ocluído em cada intensidade de apresentação do estímulo. Cada conjunto horizontal representa os dados de um animal. Os quatro animais superiores representam o Grupo Experimental e os quatro inferiores o Grupo Controle. À esquerda, os gráficos polares, cada cor representa uma intensidade (vermelho: 77.24dB; azul-claro: 67.5dB; verde: 55.88dB; rosa: 53,78dB; azul-marinho: tubo ocluído para todos as intensidades) e a distância em relação ao centro, a amplitude da resposta na frequência de modulação. Para o Grupo Experimental observe o agrupamento dos pontos significando estarem em fase, o que não é observado no Grupo Controle. À direita dos gráficos polares estão os espectrogramas do sinal recortado entre as frequências de 32Hz e 52Hz representados para os 60s de duração de cada estímulo, cada coluna de espectrogramas representa uma intensidade de estímulo decrescendo da esquerda para direita. Observe o aparecimento dos picos de resposta na frequência de modulação do estímulo, e o decaimento de sua amplitude diretamente proporcional ao decaimento da intensidade do estímulo, e a inexistência destes picos para o Grupo Controle.

FIGURA 14



A

FIGURA 14

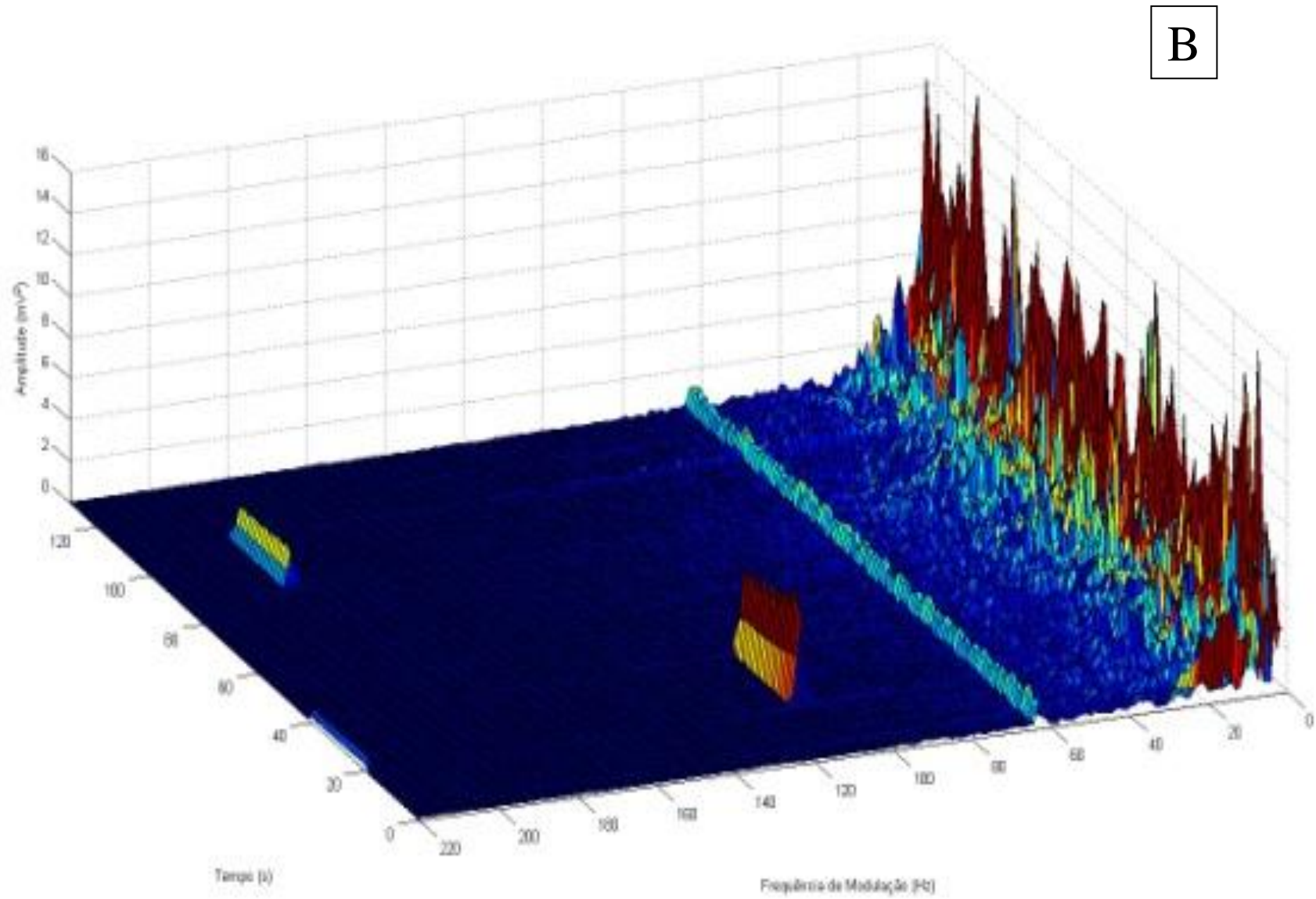


Figura 14– Espectrograma do EEG para as diferentes frequências de modulação no sítio anatômico de melhor resposta em um determinado sujeito experimental. Na figura à esquerda,(A) o espectro do EEG evidencia o pico da resposta para a menor moduladora (41,99Hz) e suas harmônicas. À direita,(B) observamos os picos da resposta para as moduladoras 106,45Hz e 186,52Hz.

A

FIGURA 15

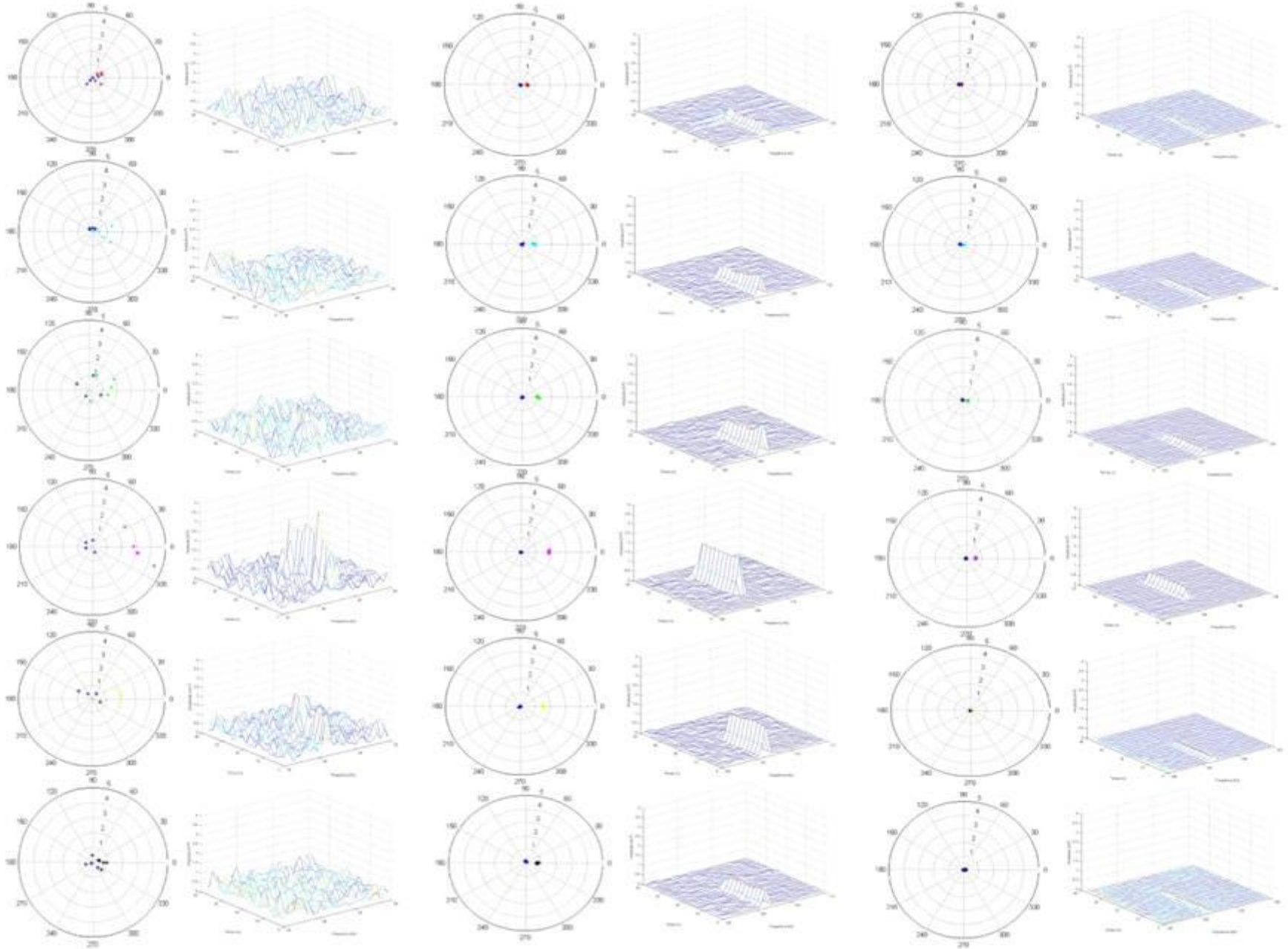


FIGURA 15

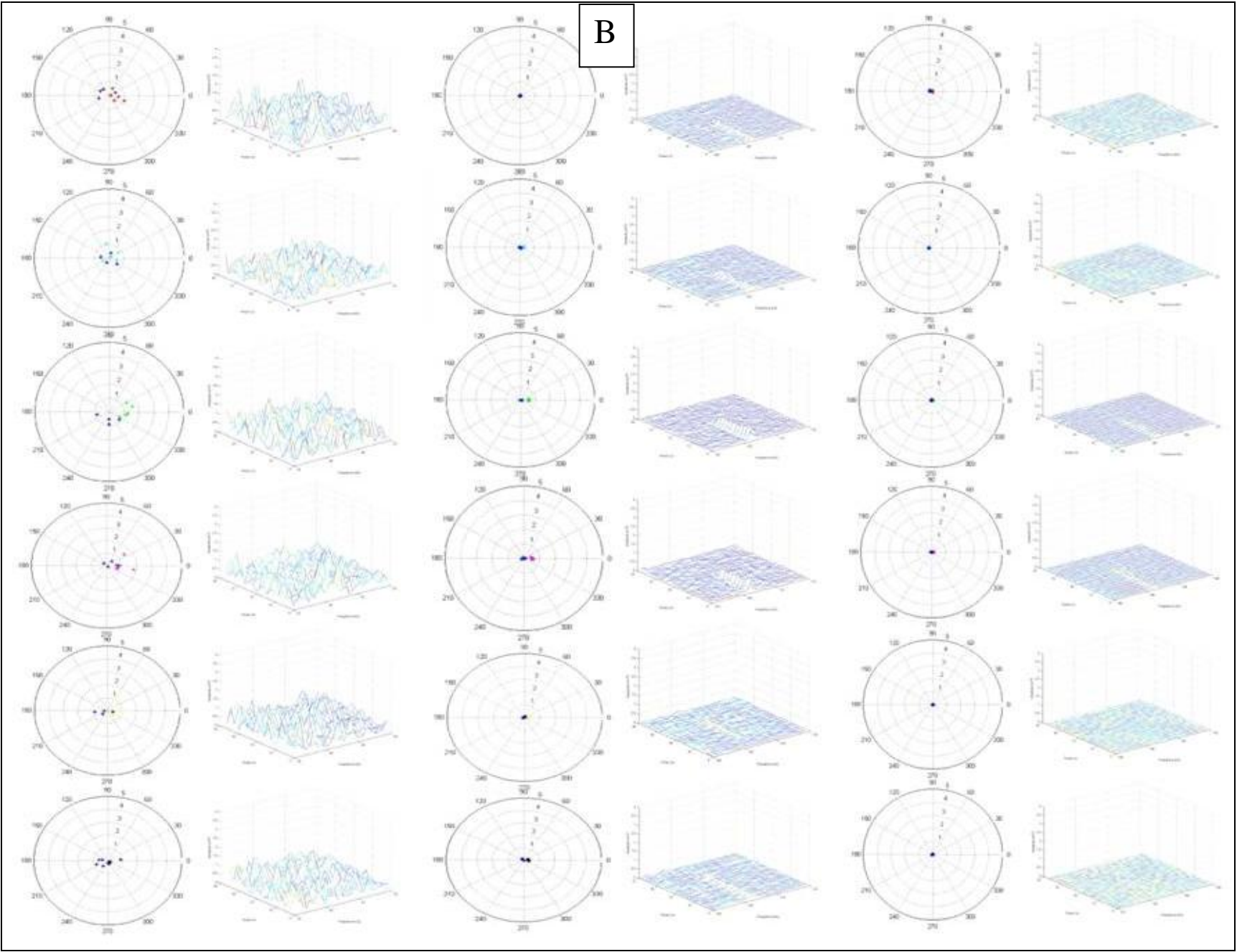
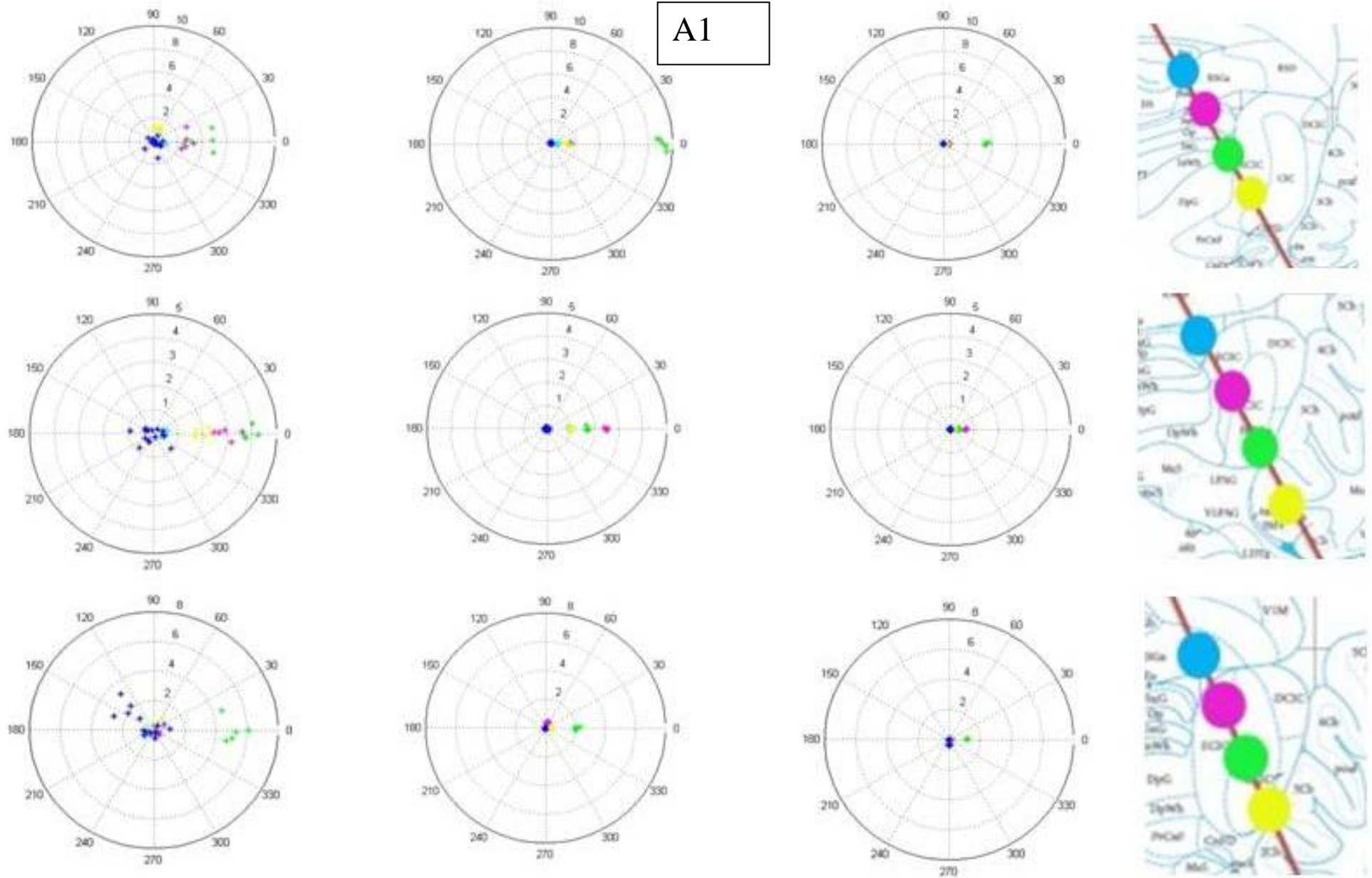


Figura 15 - Gráficos polares e espectrogramas da resposta evocada para cada frequência de modulação nas seis posições da varredura anatômica. O bloco superior (A) representa um dos animais do grupo Experimental e o inferior (B), do grupo Controle. Cada coluna representa uma frequência de modulação (da esquerda para direita: 41,99Hz; 106,45Hz; 186,52Hz) e cada linha uma posição da varredura anatômica.

FIGURA 16

A1



A2

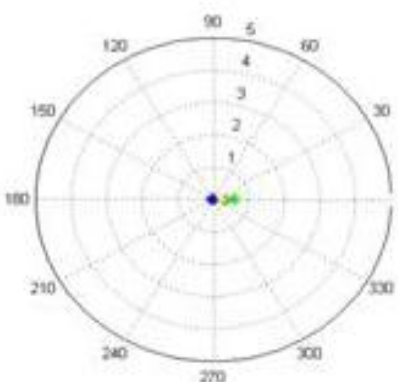
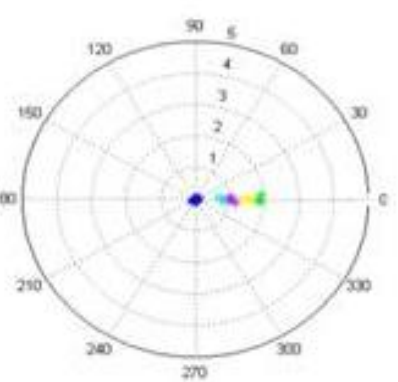
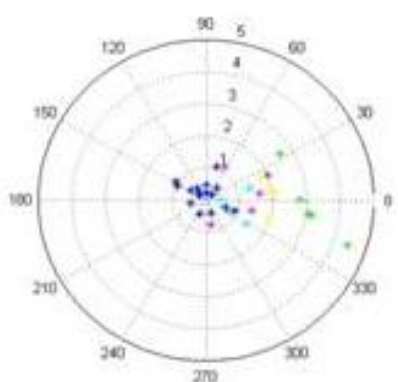
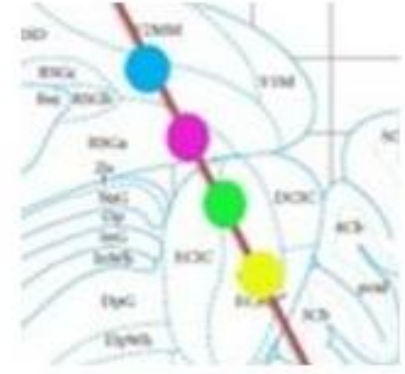
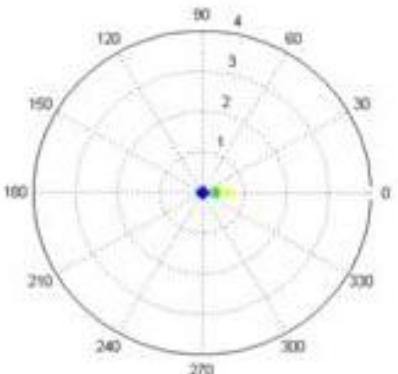
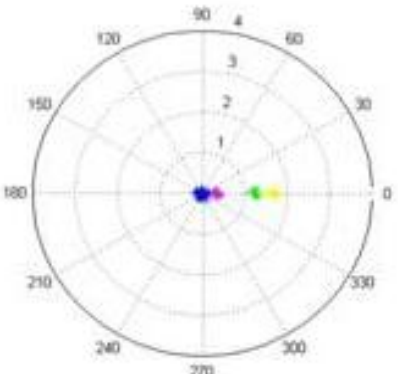
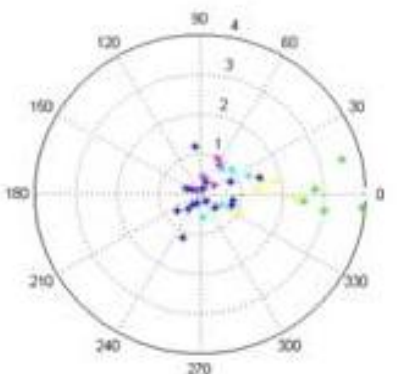
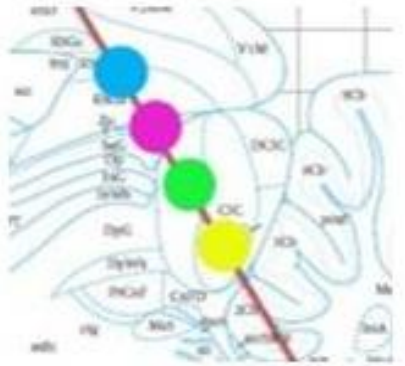
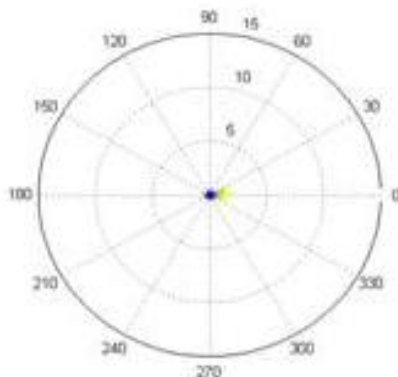
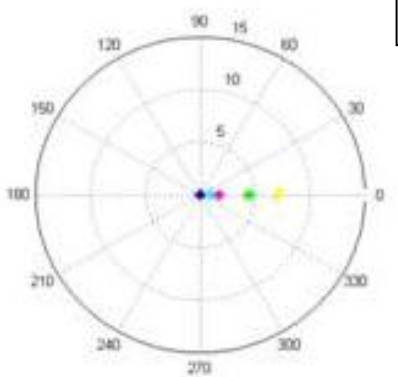
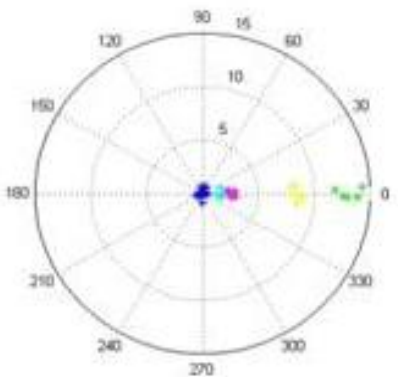


FIGURA 16

FIGURA 16

B

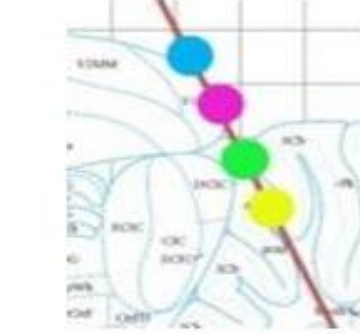
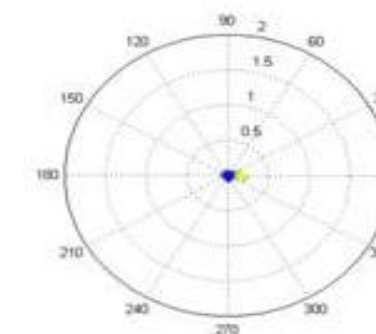
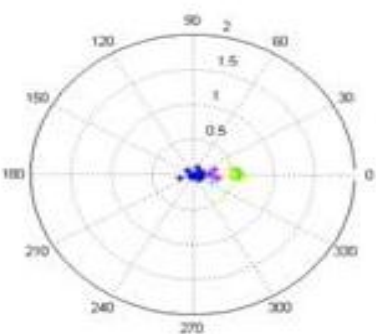
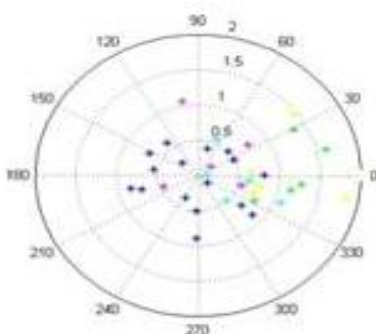
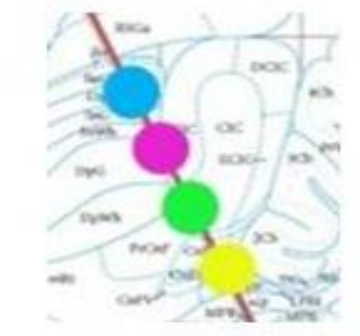
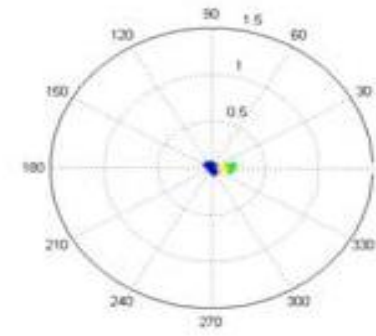
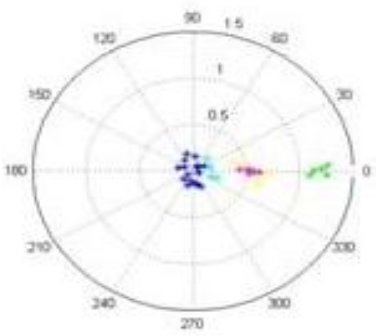
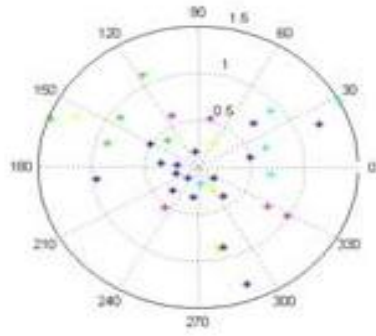
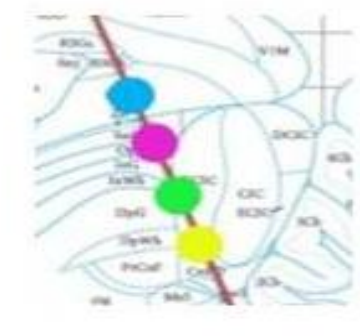
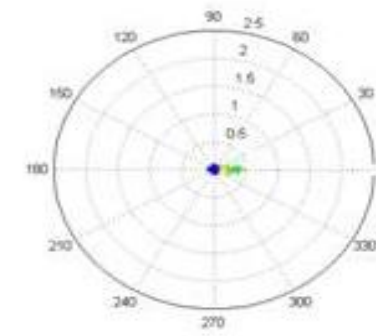
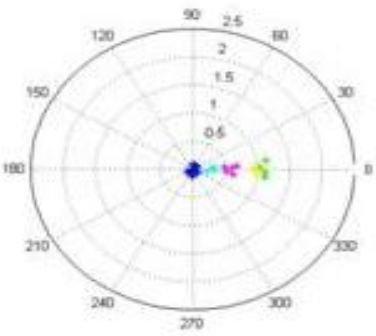
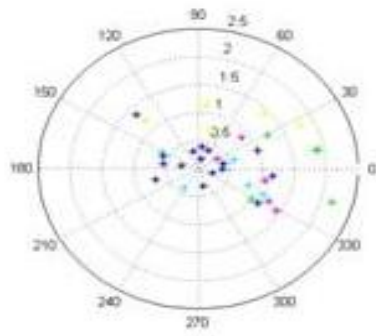
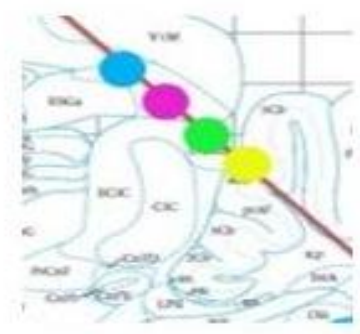
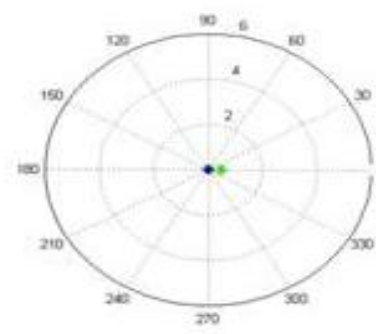
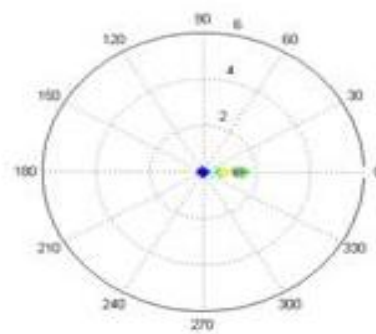
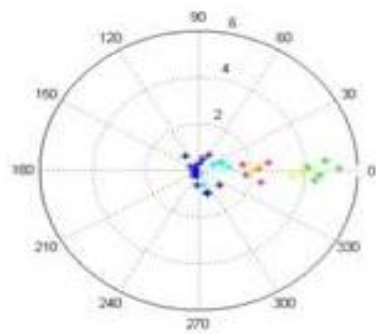


Figura 16- Representação da amplitude e dispersão de fase das respostas por meio do gráfico polar e suas respectivas posições anatômicas, para os períodos em que o tubo permanece aberto e ocluído em cada intensidade de apresentação do estímulo. Cada conjunto horizontal representa os dados de um animal. Os seis animais superiores (figuras A1 e A2) representam o Grupo Experimental e os quatro inferiores o Grupo Controle (figuras B). Nos gráficos polares, cada cor representa uma posição anatômica (azul-claro: posição 2; rosa: posição 3; verde: posição 4; amarelo: posição 5; azul-marinho: tubo ocluído para todas as posições anatômicas) e a distância dos pontos em relação ao centro, a amplitude da resposta na frequência de modulação. Cada coluna de gráficos correlaciona-se a uma frequência de modulação, respectivamente, da esquerda para direita: FM1=43Hz (corrigida para 41,99Hz); FM2=109Hz (corrigida para 106,45Hz); e, FM3=199Hz (corrigida para 186,52 Hz). No Grupo Experimental as respostas apresentaram maior amplitude e uma menor dispersão de fase em relação ao Grupo Controle. À direita dos gráficos polares estão as correlações histológicas da posição anatômica dos eletrodos para cada animal.

FIGURA 19

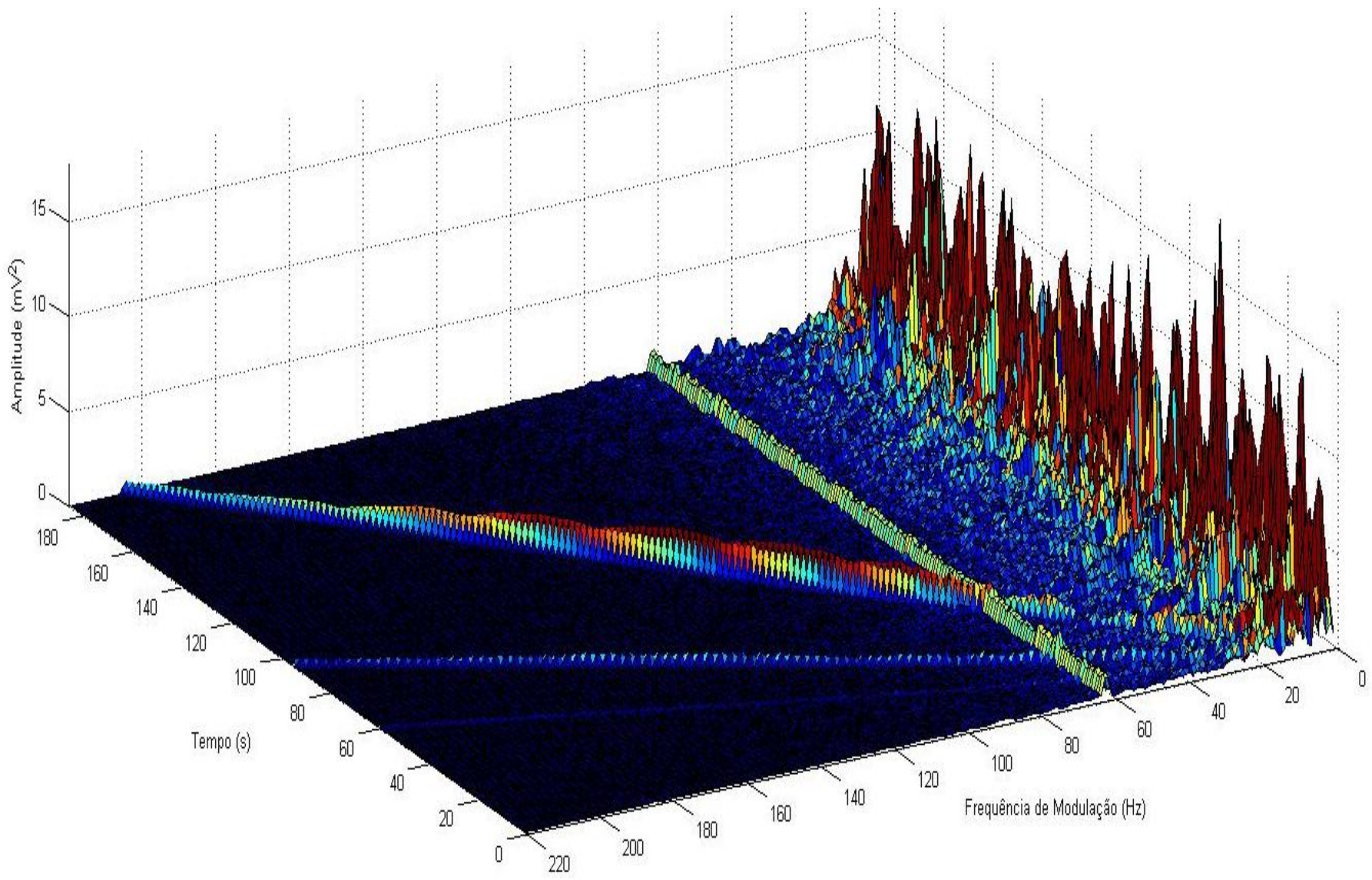


Figura 19– Espectrograma do EEG para varredura contínua de modulação. Durante o período de estimulação a REARP apresenta-se como um pico que se estende diagonalmente mostrando a variação do espectro de modulação da portadora num determinado ponto da varredura anatômica em um dos sujeitos experimentais.

FIGURA 20

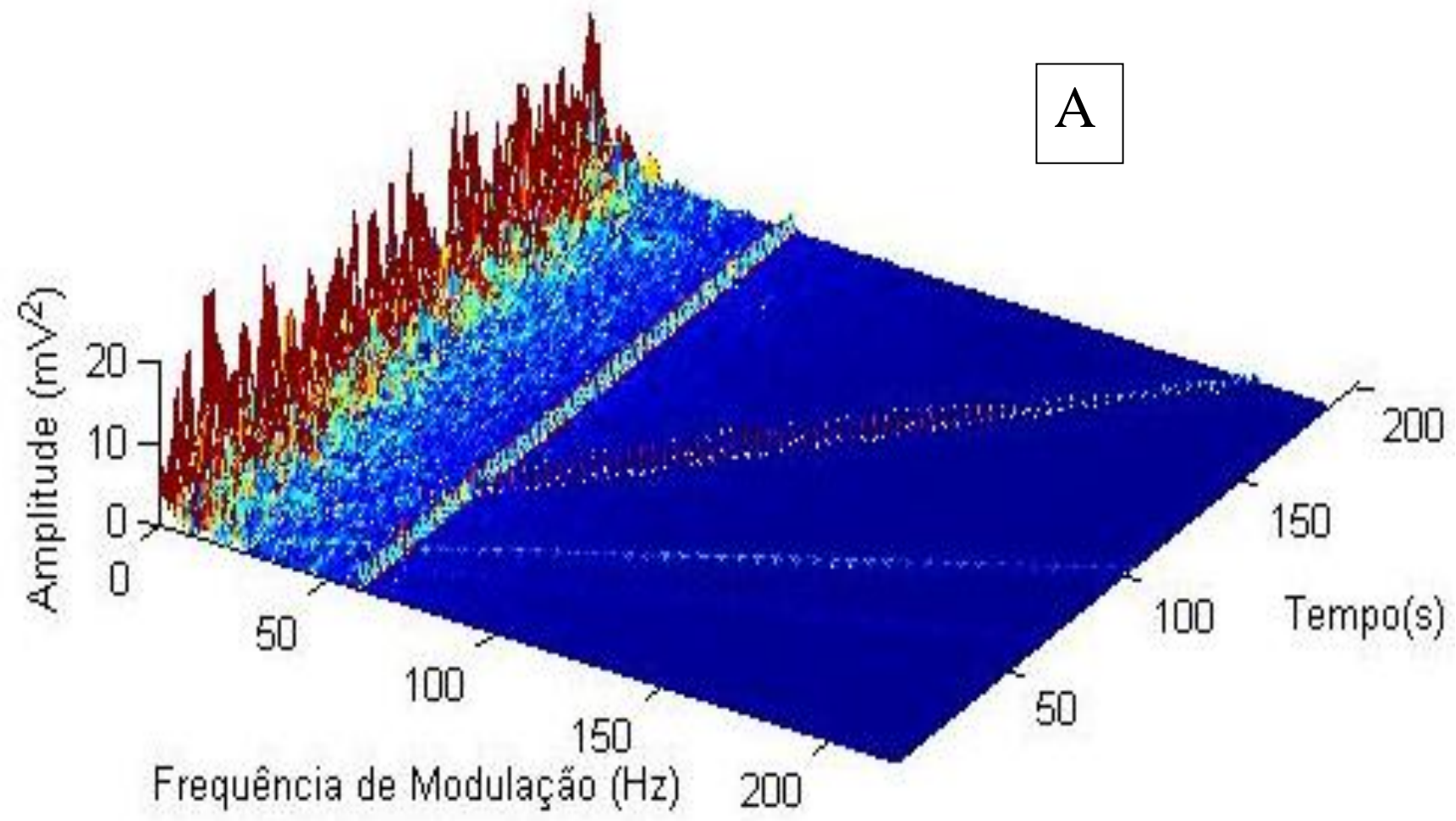


FIGURA 20

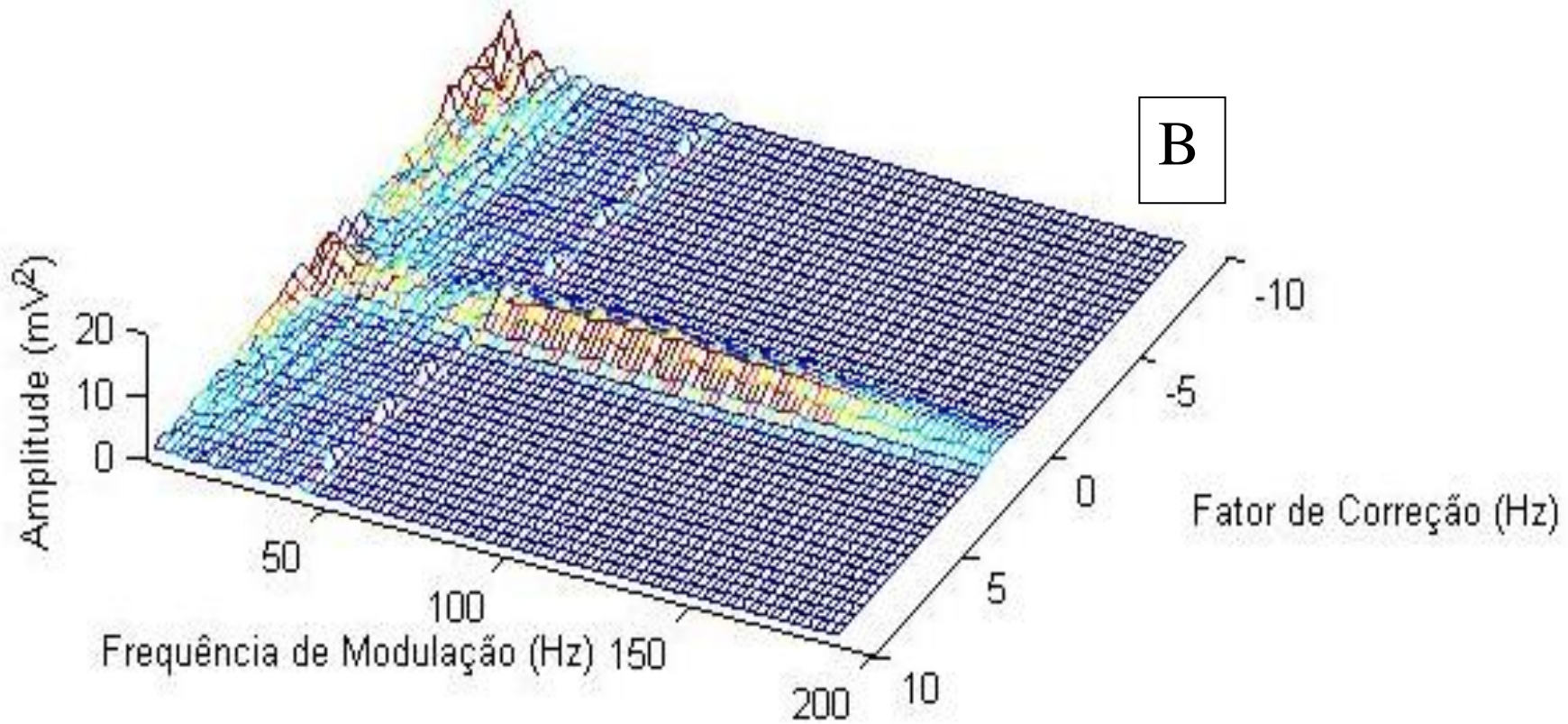


Figura 20 – Espectrogramas do EEG para varredura contínua de modulação. Na figura superior (A) observamos a FFT do registro original, com os picos da REARP aparecendo de forma diagonal no espectrograma do sinal o que ocorre devido a um aumento linear da moduladora a 1Hz/s. Assim ao longo do tempo o pico da resposta se desloca para o próximo valor inteiro na taxa de 1 por segundo resultando numa diagonal. Na figura inferior (B) representamos o mesmo espectrograma recortado desde o início da estimulação até o final sendo os limites superiores e inferiores em torno da frequência de modulação iguais a $FM \pm 10\text{Hz}$. No eixo da “Frequência de Modulação” o zero representa 10Hz, que é a frequência inicial da varredura contínua de moduladora. A resposta

aparece como picos no centro da figura perdendo a aparência diagonal. Dessa forma é possível traçar o perfil da onda de resposta e comparar entre os diferentes pontos de registro e entre os diferentes animais.

FIGURA 21

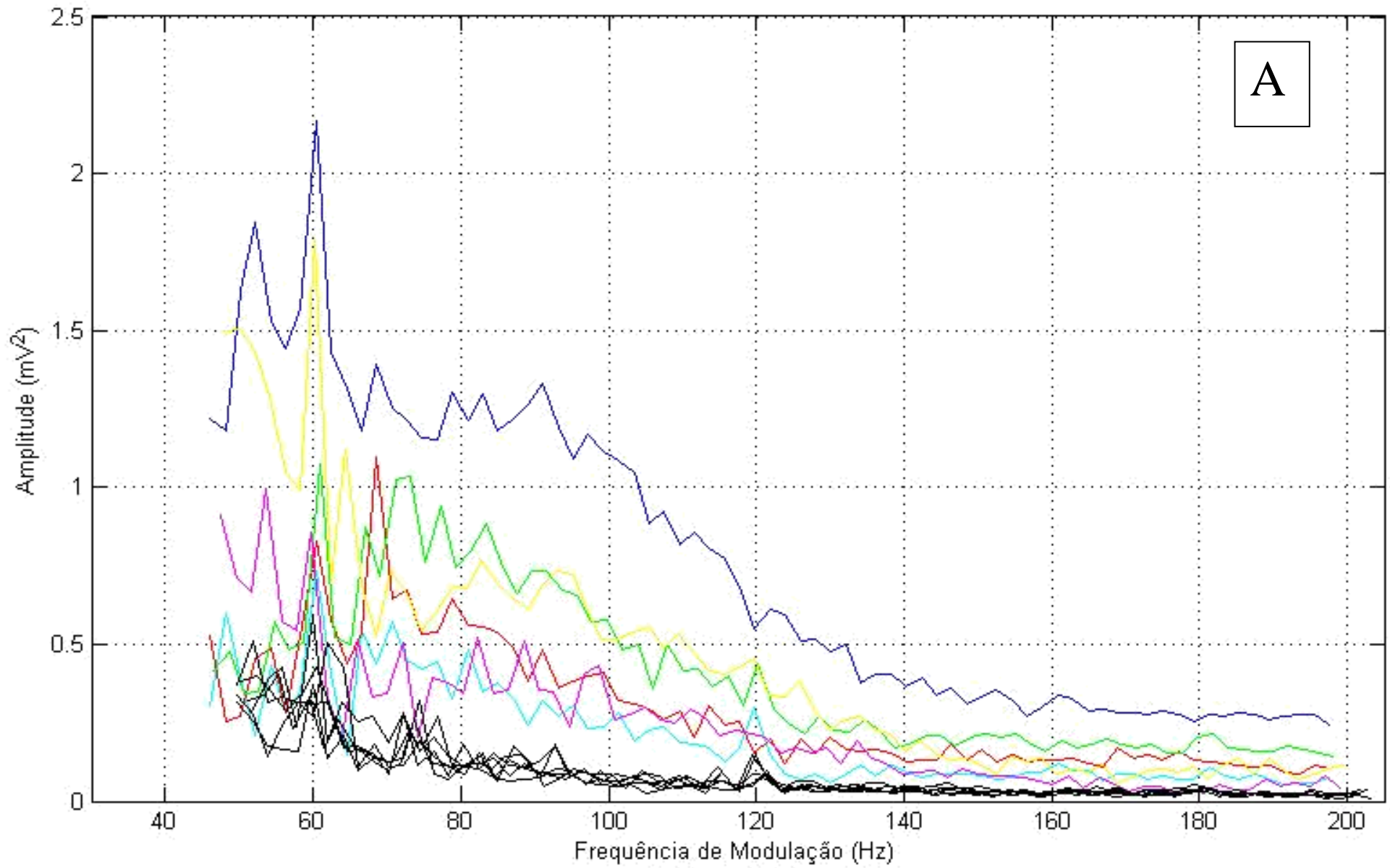
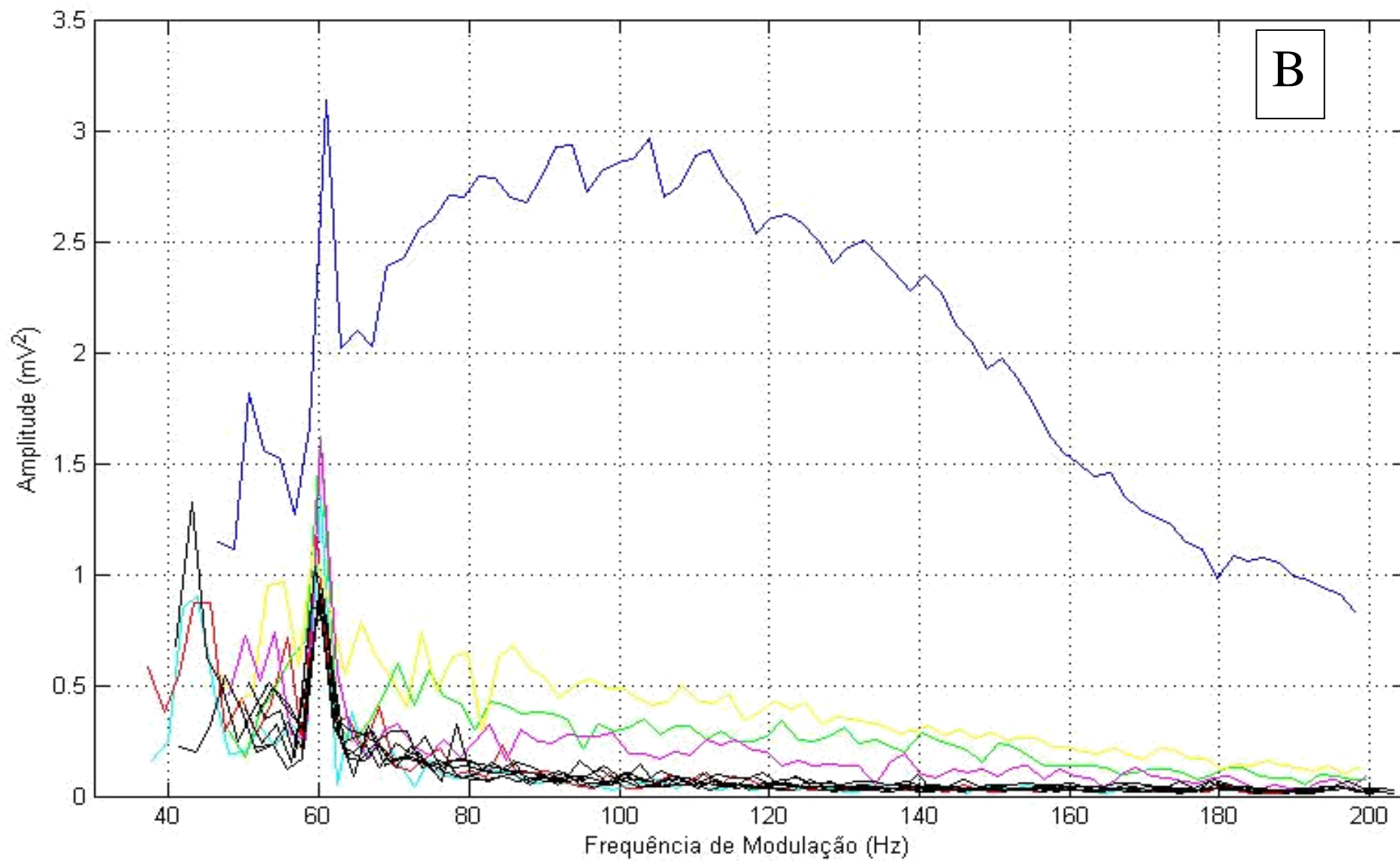


FIGURA 21



B

FIGURA 21

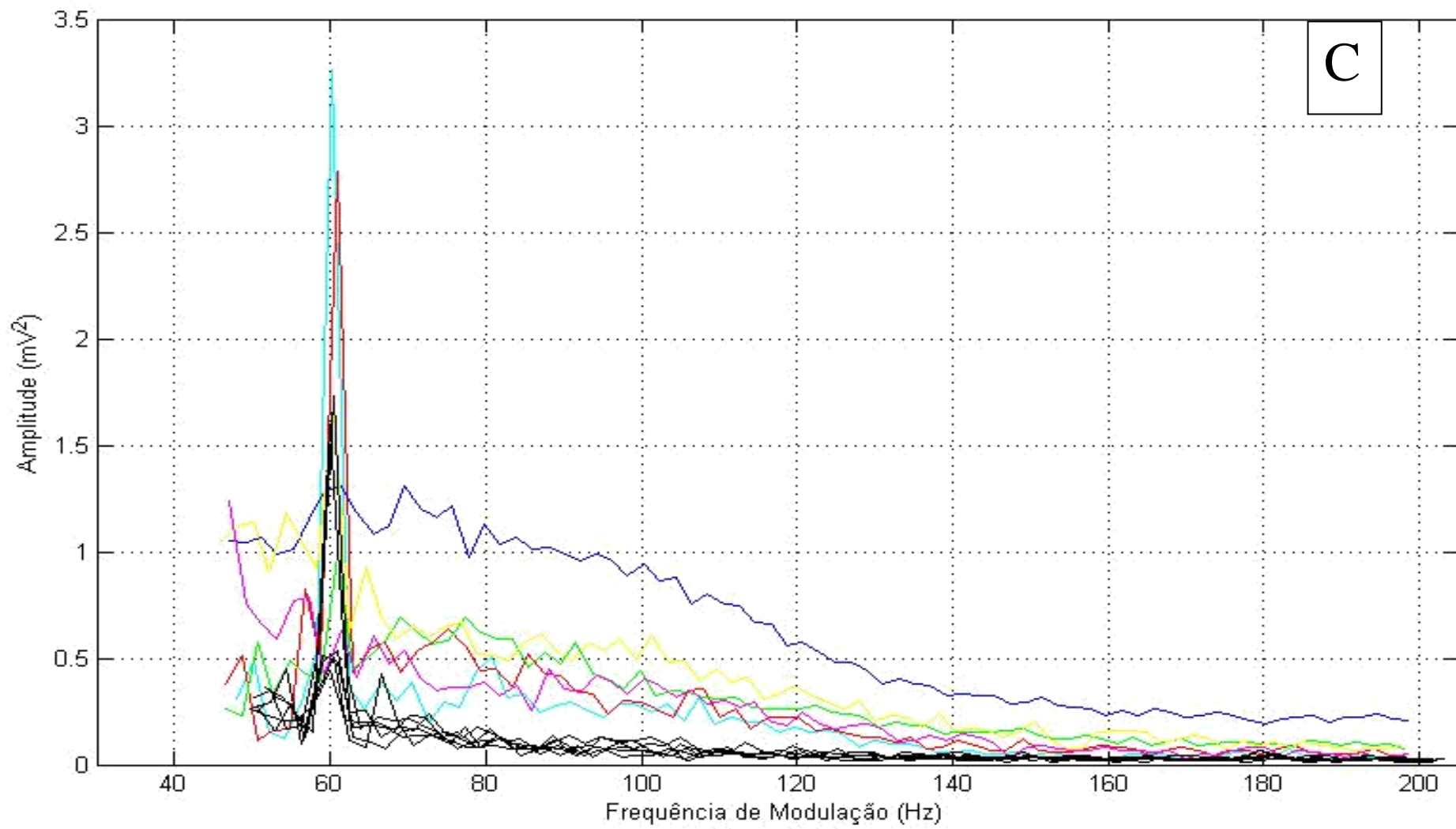
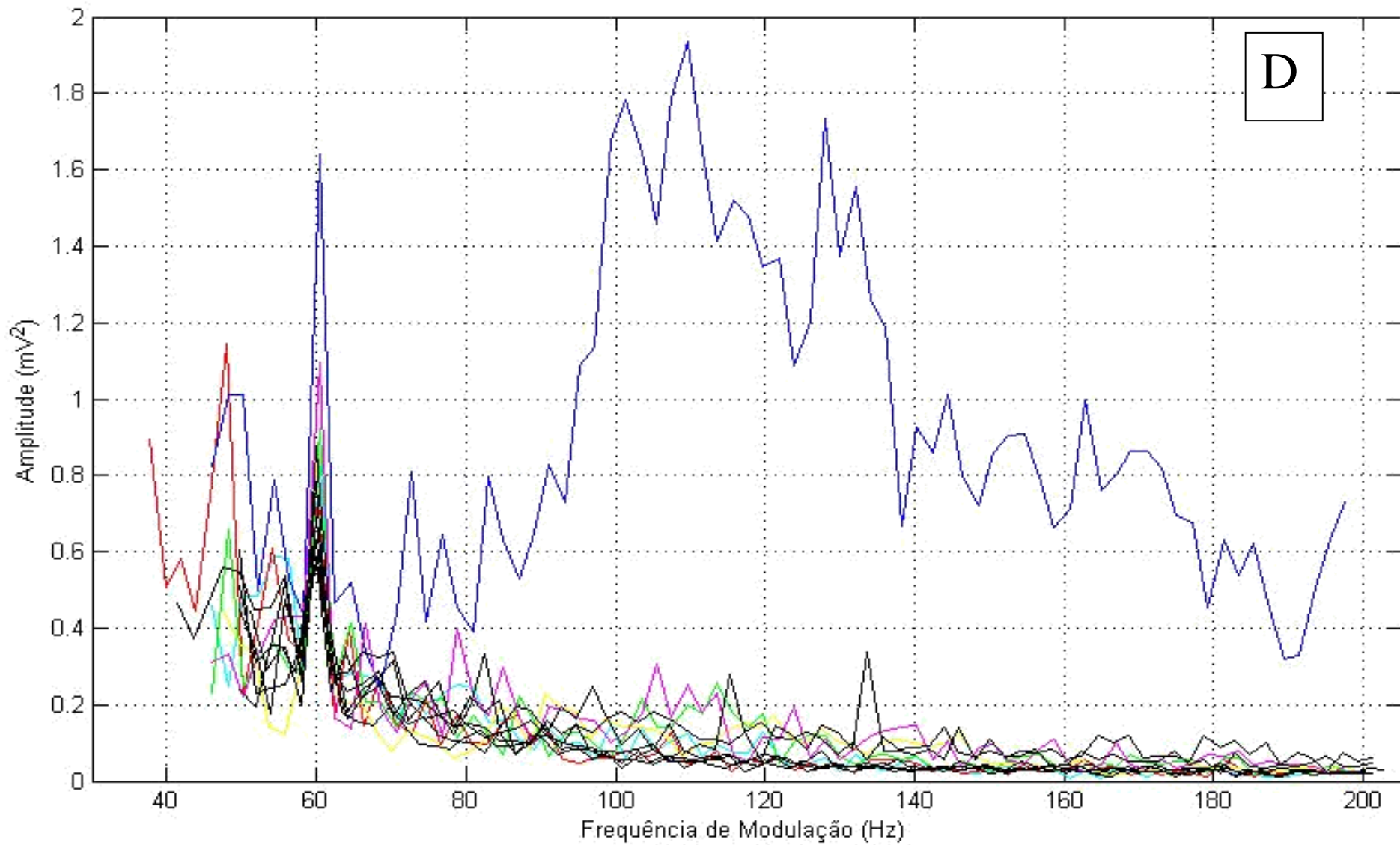


FIGURA 21



D

FIGURA 21

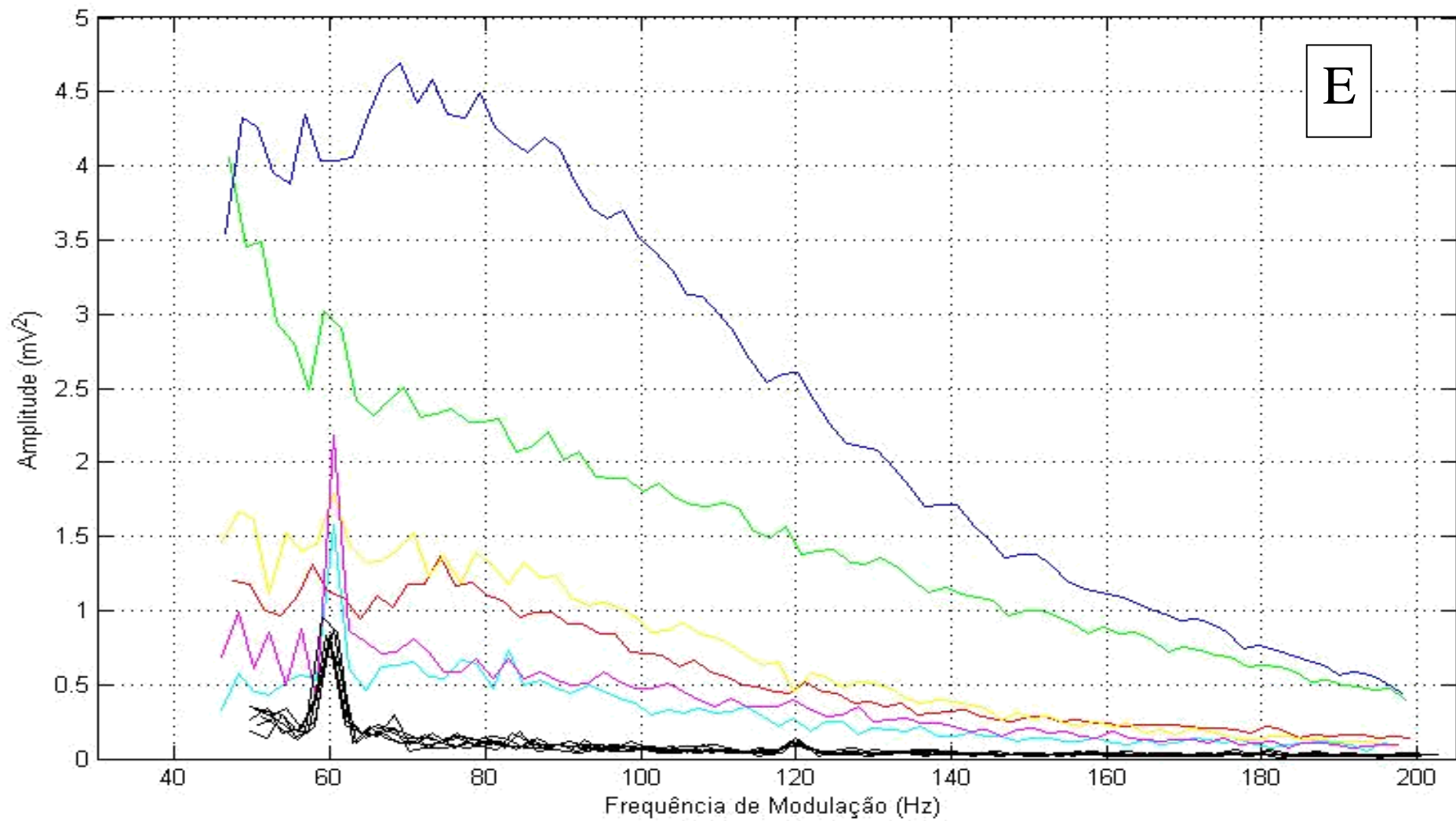


FIGURA 21

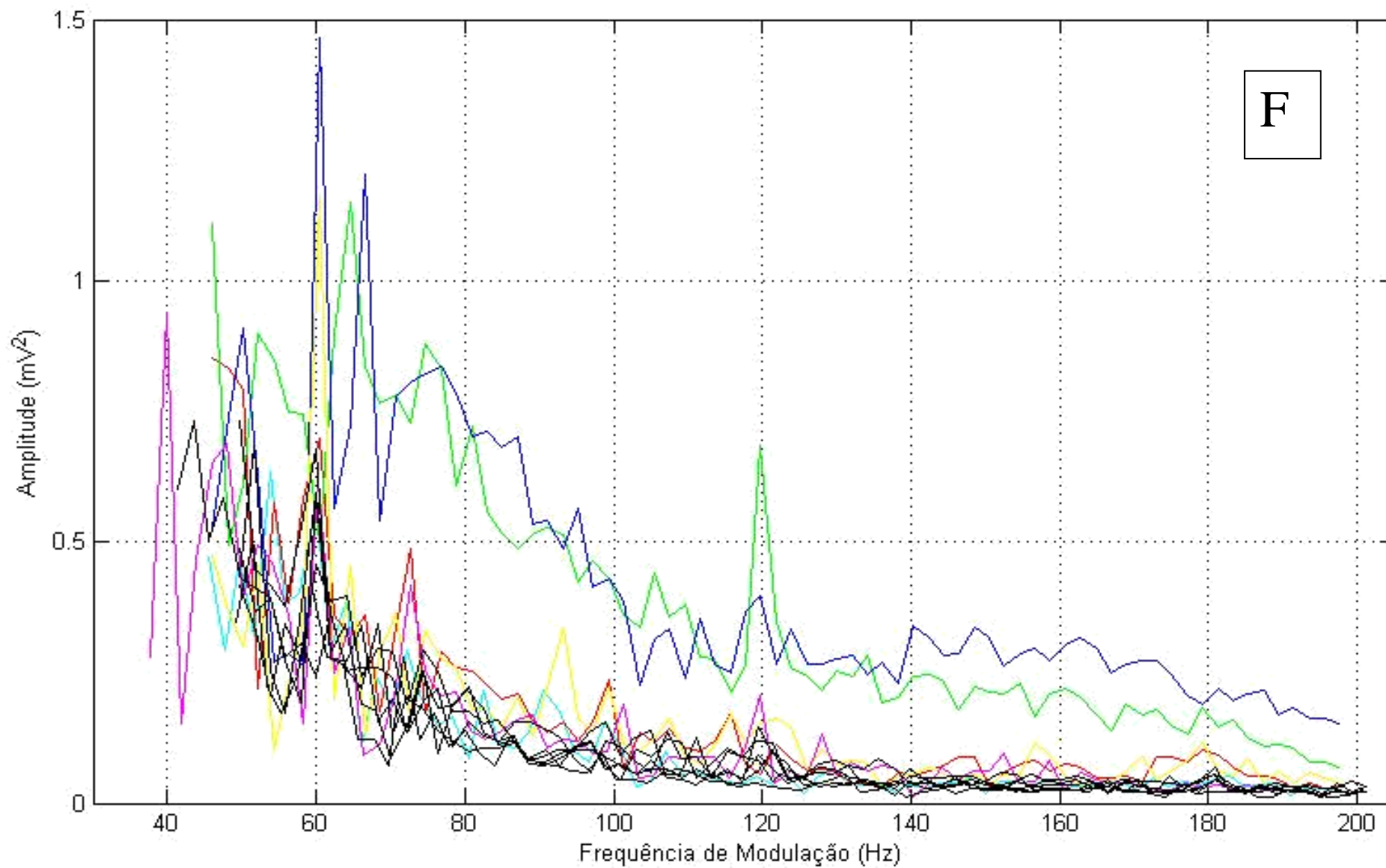


Figura 21 – Perfil de resposta na varredura de modulação contínua para os animais do Grupo Experimental (A,B, C, D, E, F). Cada curva representa o perfil de resposta após a o recorte do espectrograma da resposta original. Cada curva do gráfico representa um animal do grupo, e cada linha colorida representa a amplitude da resposta para cada valor da moduladora. As linhas negras são utilizadas como controle do algoritmo de recorte e representam os valores da amplitude do sinal nas frequências imediatamente acima e abaixo da moduladora.

FIGURA 23

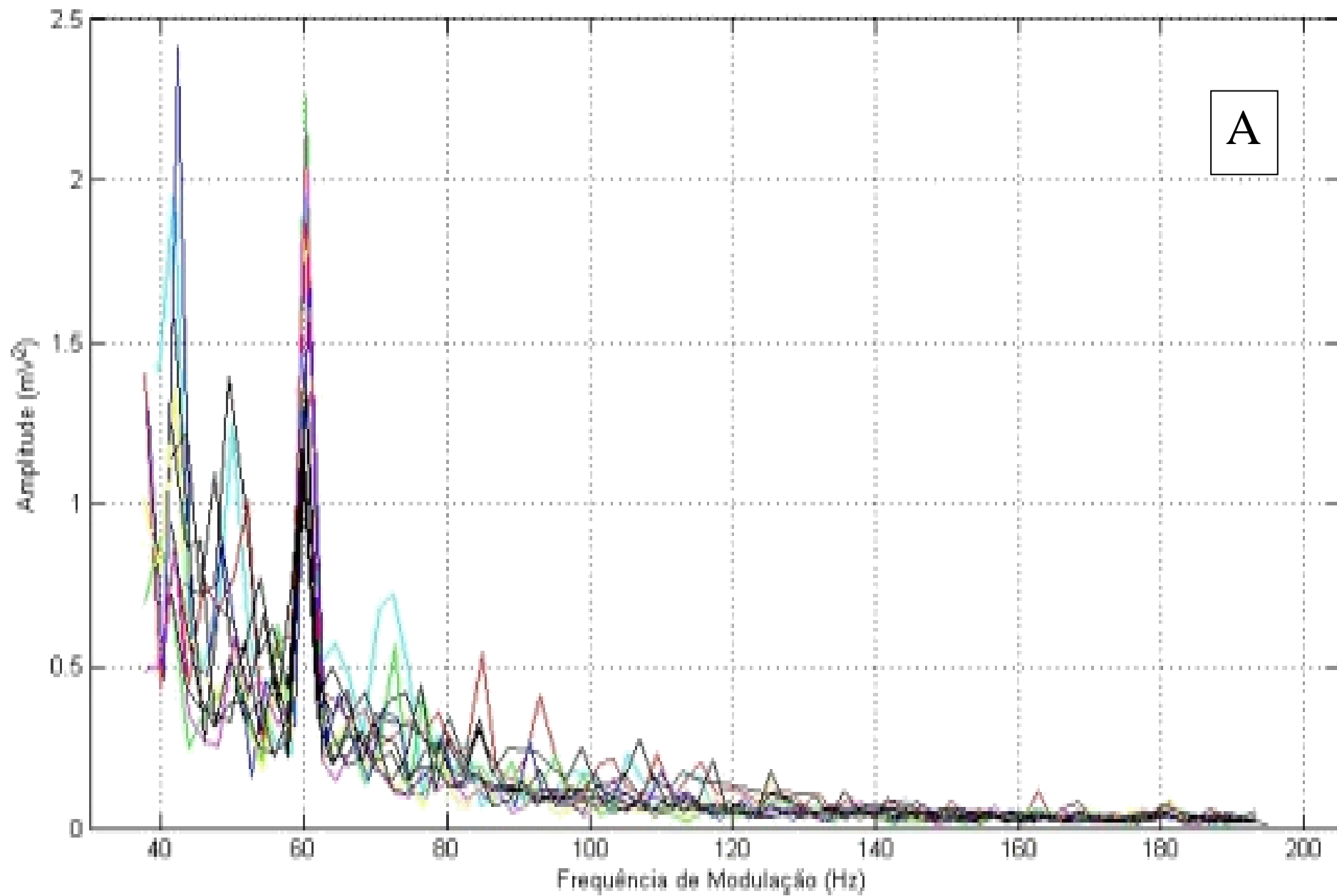


FIGURA 23

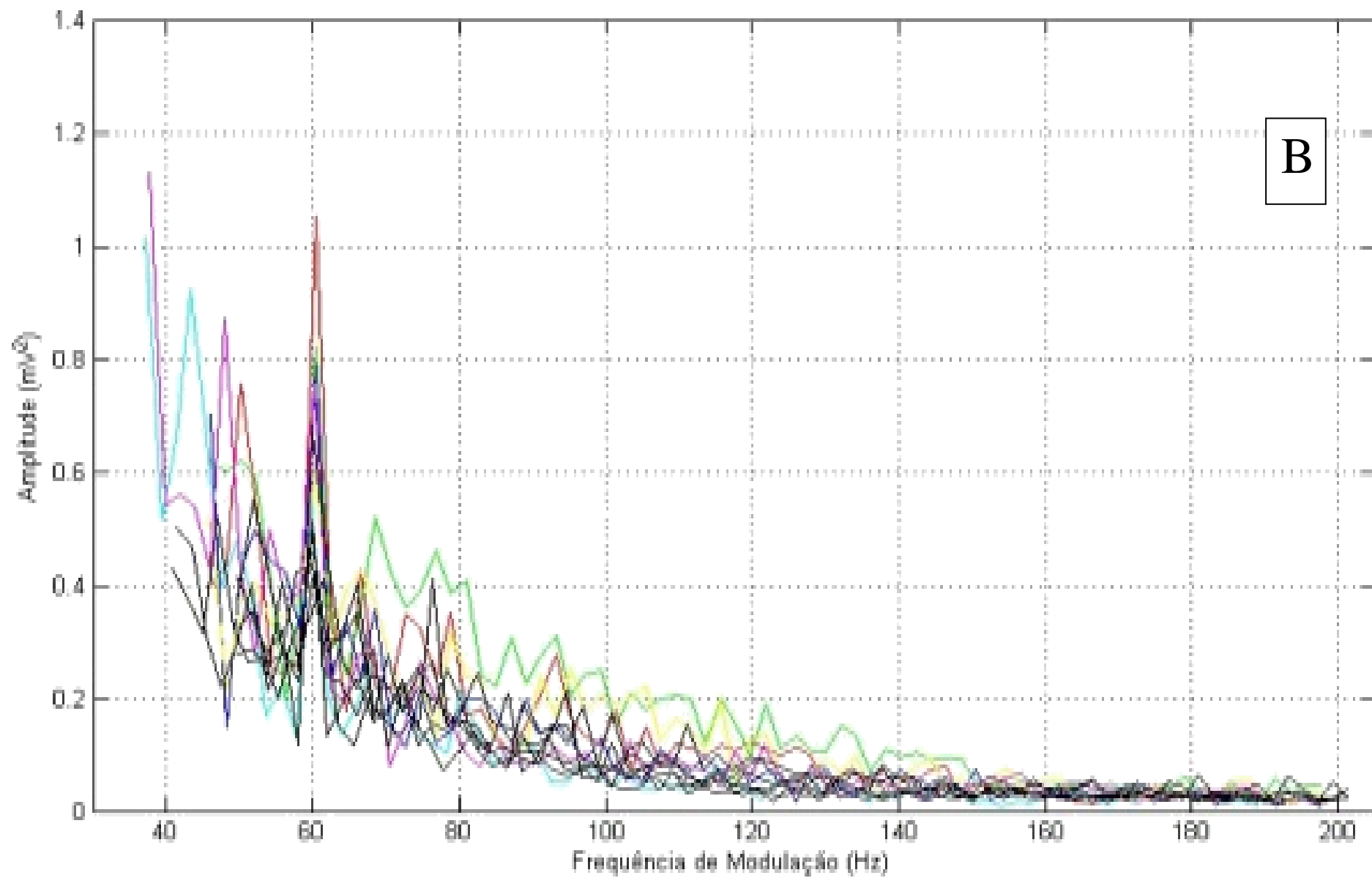


FIGURA 23

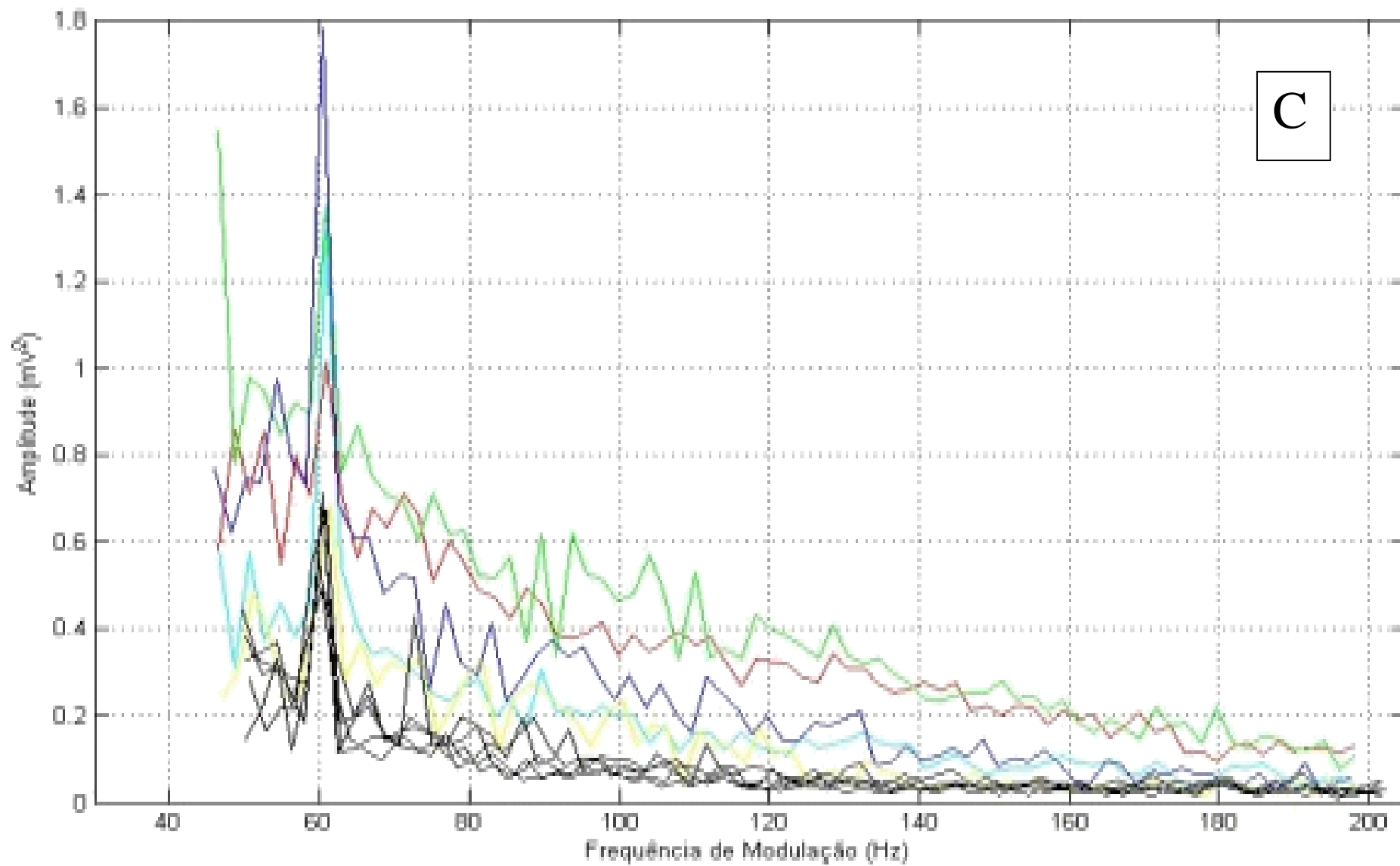


FIGURA 23

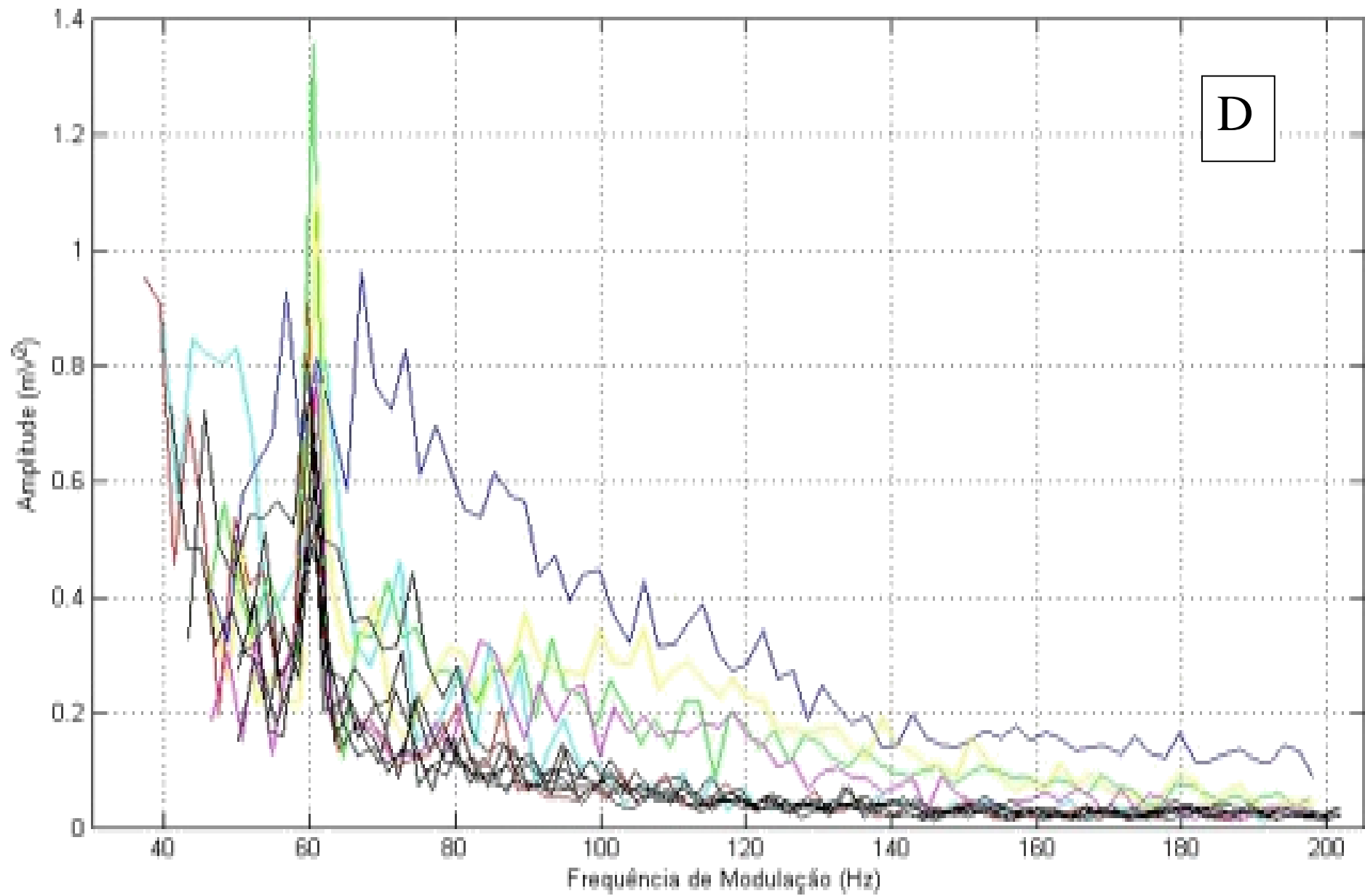


Figura 23 - Perfil da onda re resposta na varredura de modulação contínua. Para os animais do Grupo Control (A, B, C, D). Cada curva representa o perfil da onda de resposta após a o recorte do espectrograma da resposta original. Cada curva do gráfico representa um animal do grupo. E cada linha colorida representa a amplitude da resposta para cada valor da moduladora. As linhas negras são utilizadas como controle do algoritmo de recorte e representam os valores da amplitude do sinal nas frequências imediatamente acima e abaixo da moduladora.

A

FIGURA 27

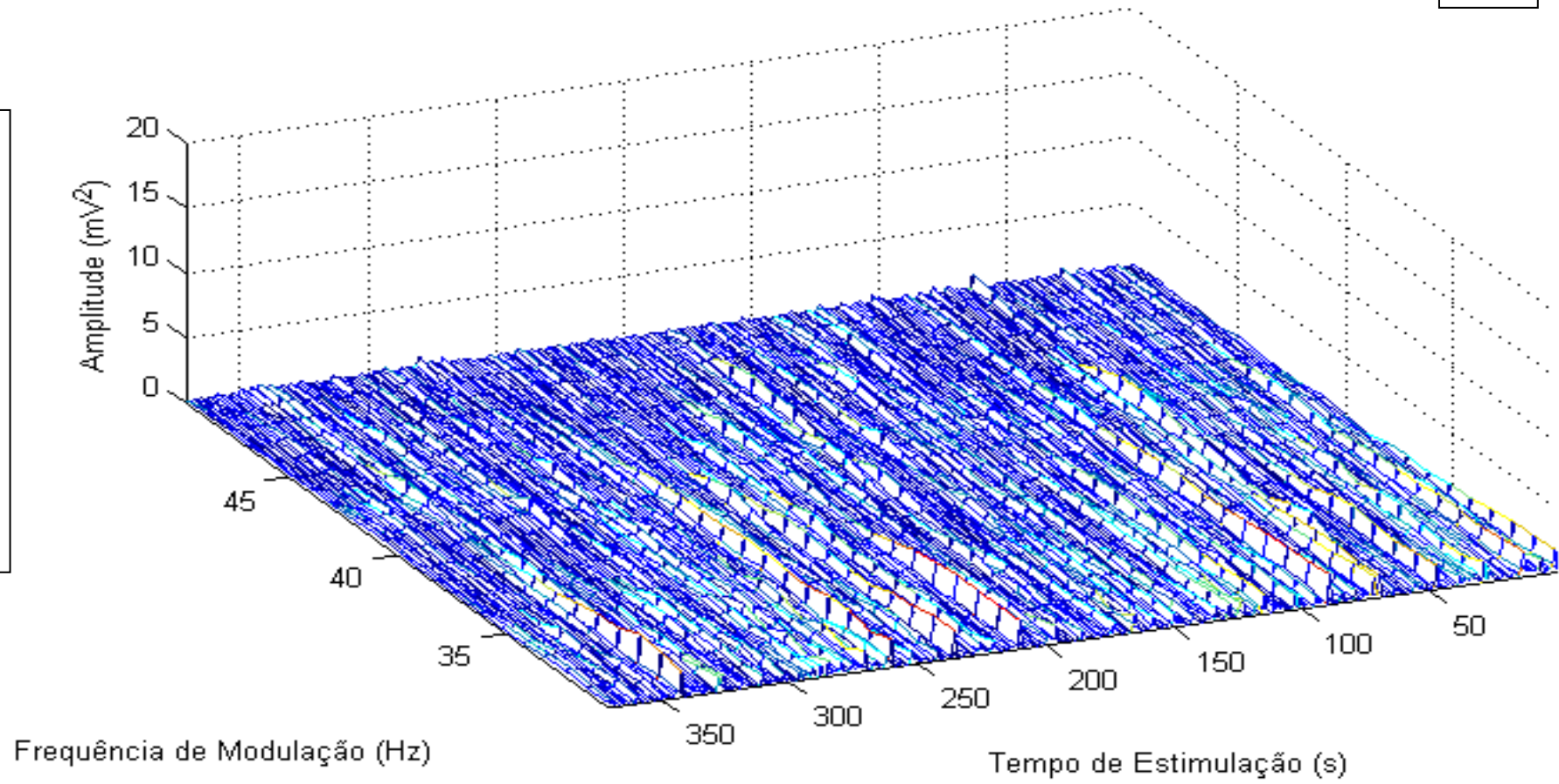


FIGURA 27

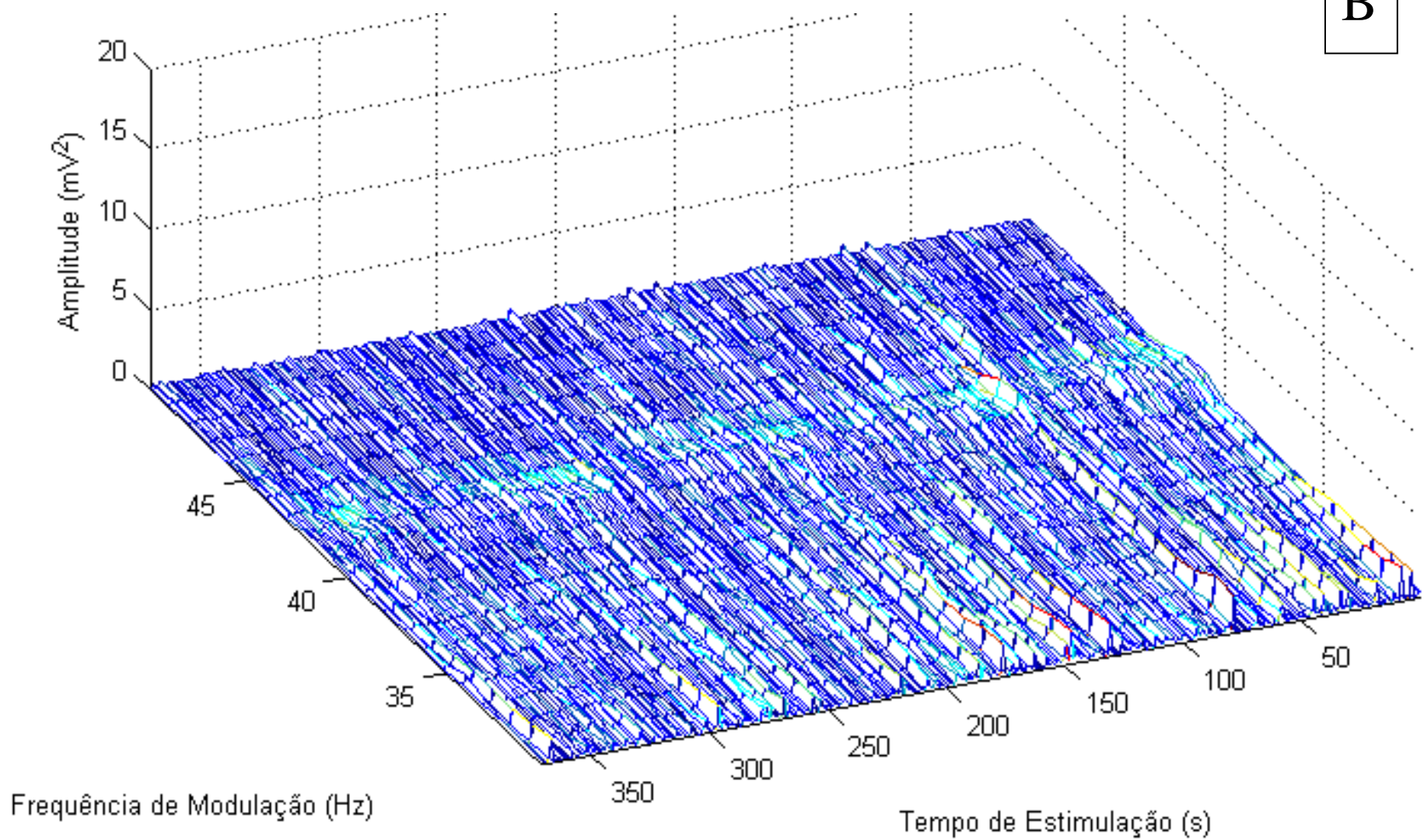


FIGURA 27

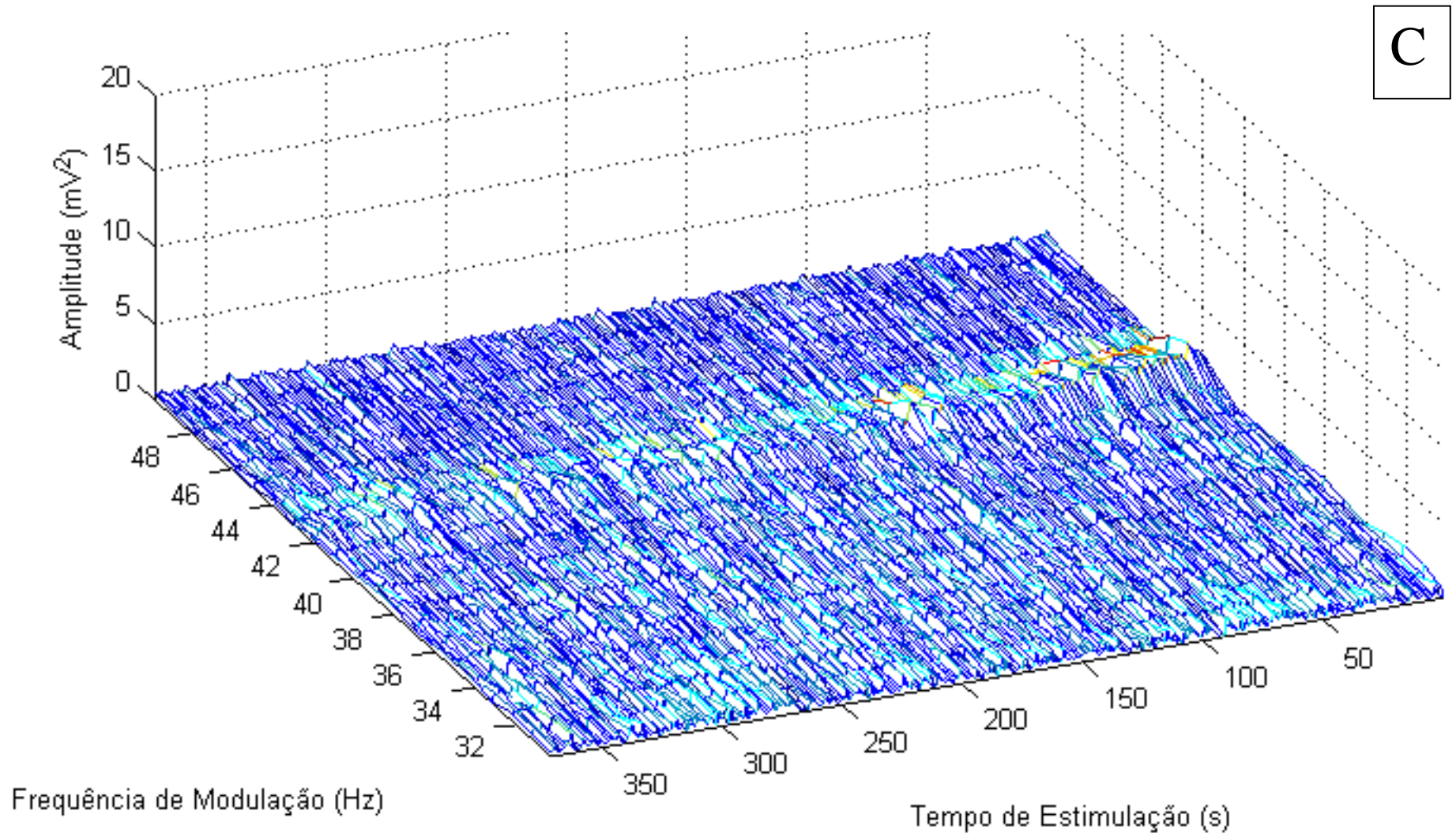


FIGURA 27

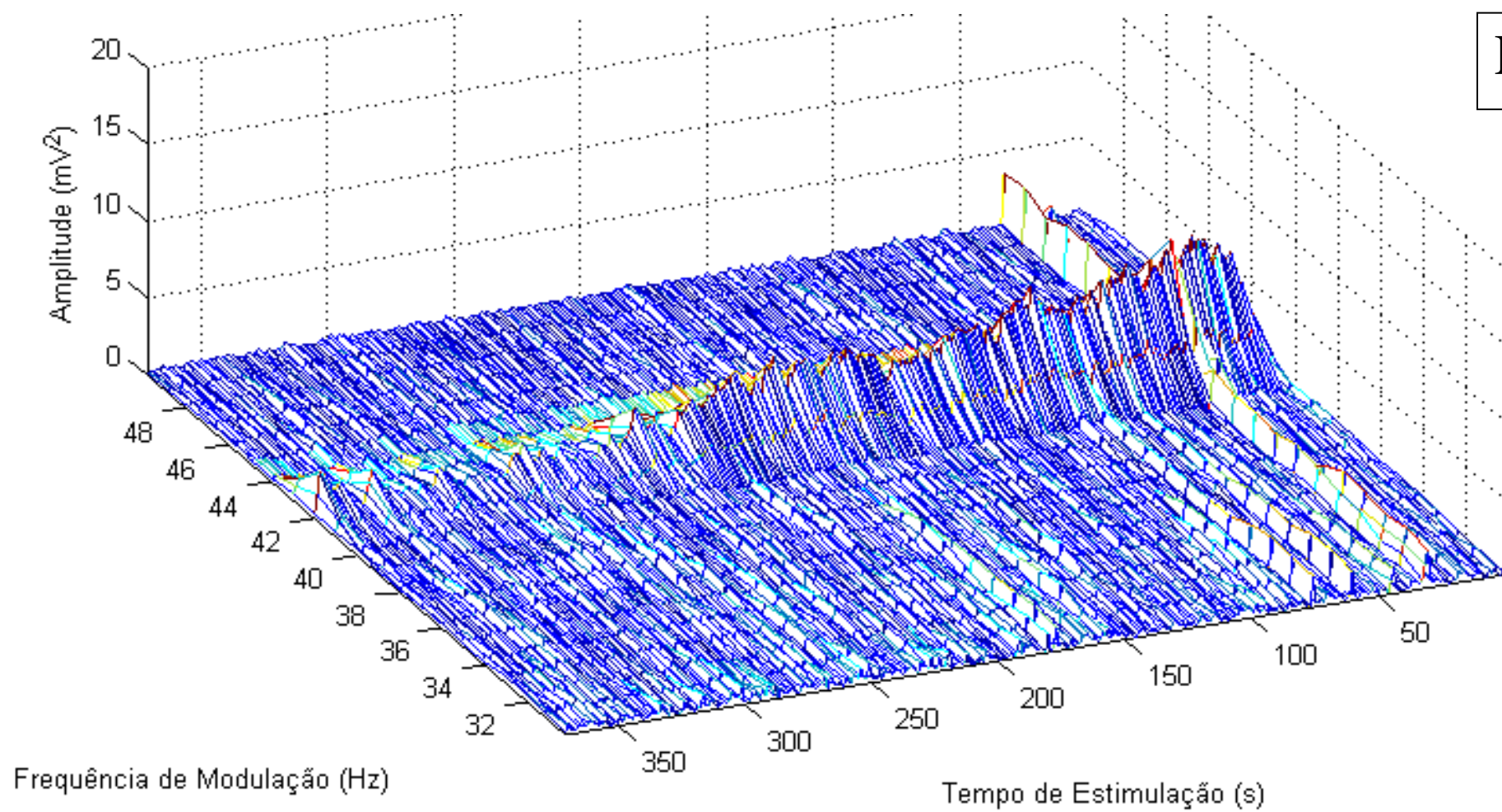


FIGURA 27

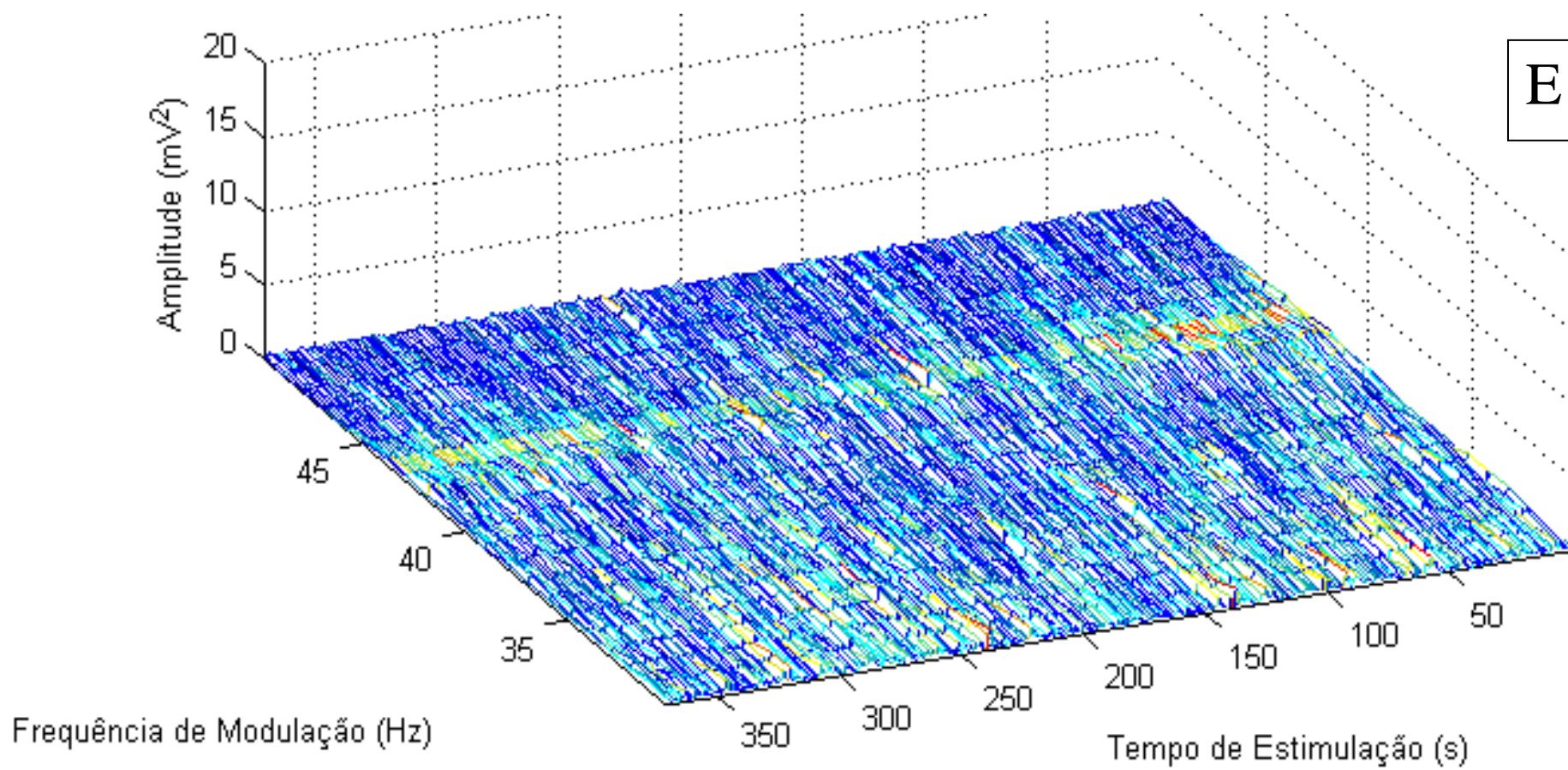


FIGURA 27

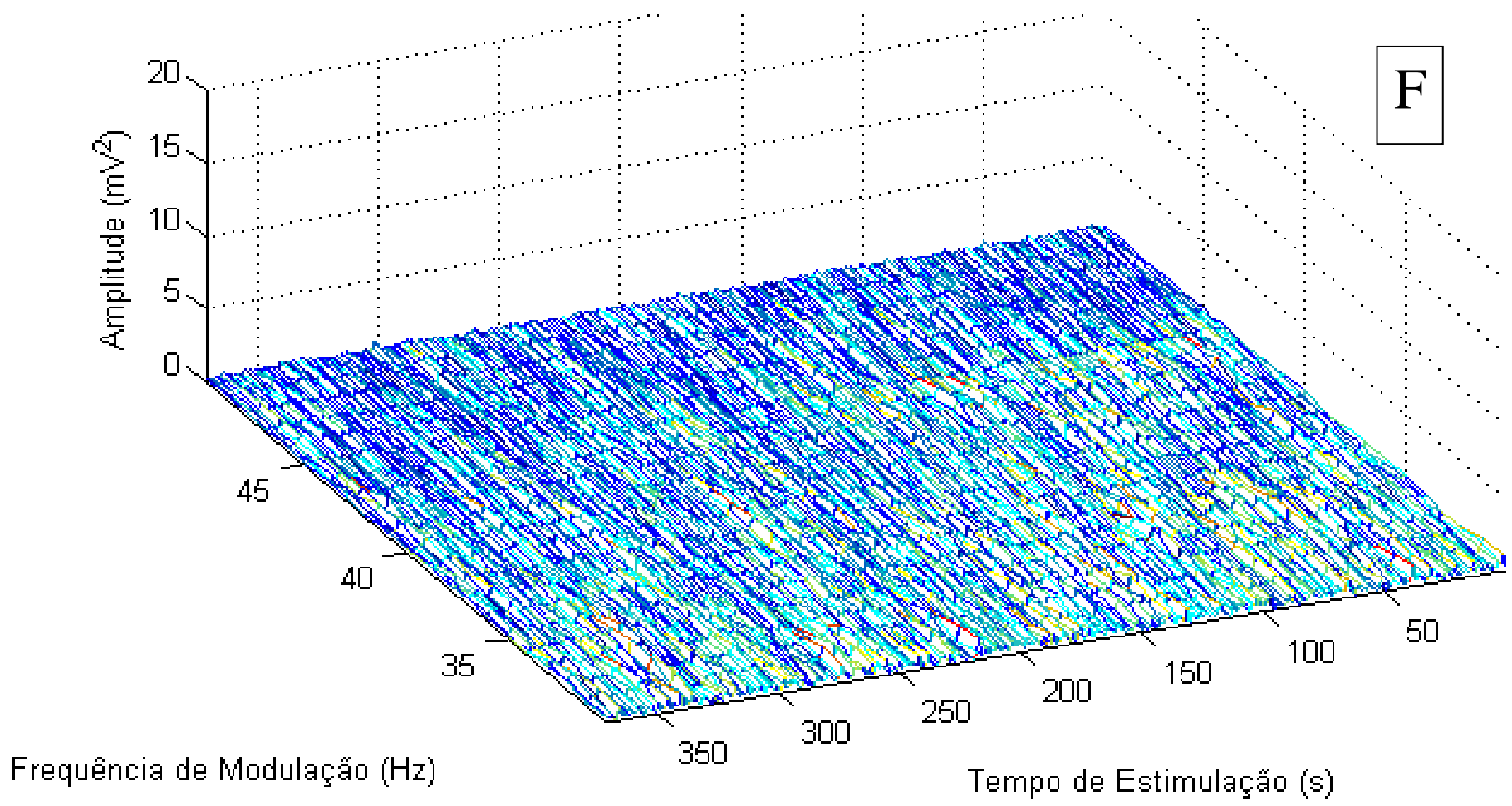


Figura 27 – Espectrograma do EEG para o estímulo de varredura contínua de portadora. Cada espectrograma corresponde a uma posição dorso-ventral da varredura anatômica de cima para baixo na sequência do primeiro ponto de registro intra-encefálico ao

sexto ponto para um dos animais do Grupo Experimenta com diferença de 1mm entre eles. Observe o pico de resposta na faixa da moduladora no quarto ponto de varredura anatômica e uma maior quantidade de energia no início da estimulação, ou seja, para baixas frequências de portadora.

FIGURA 28

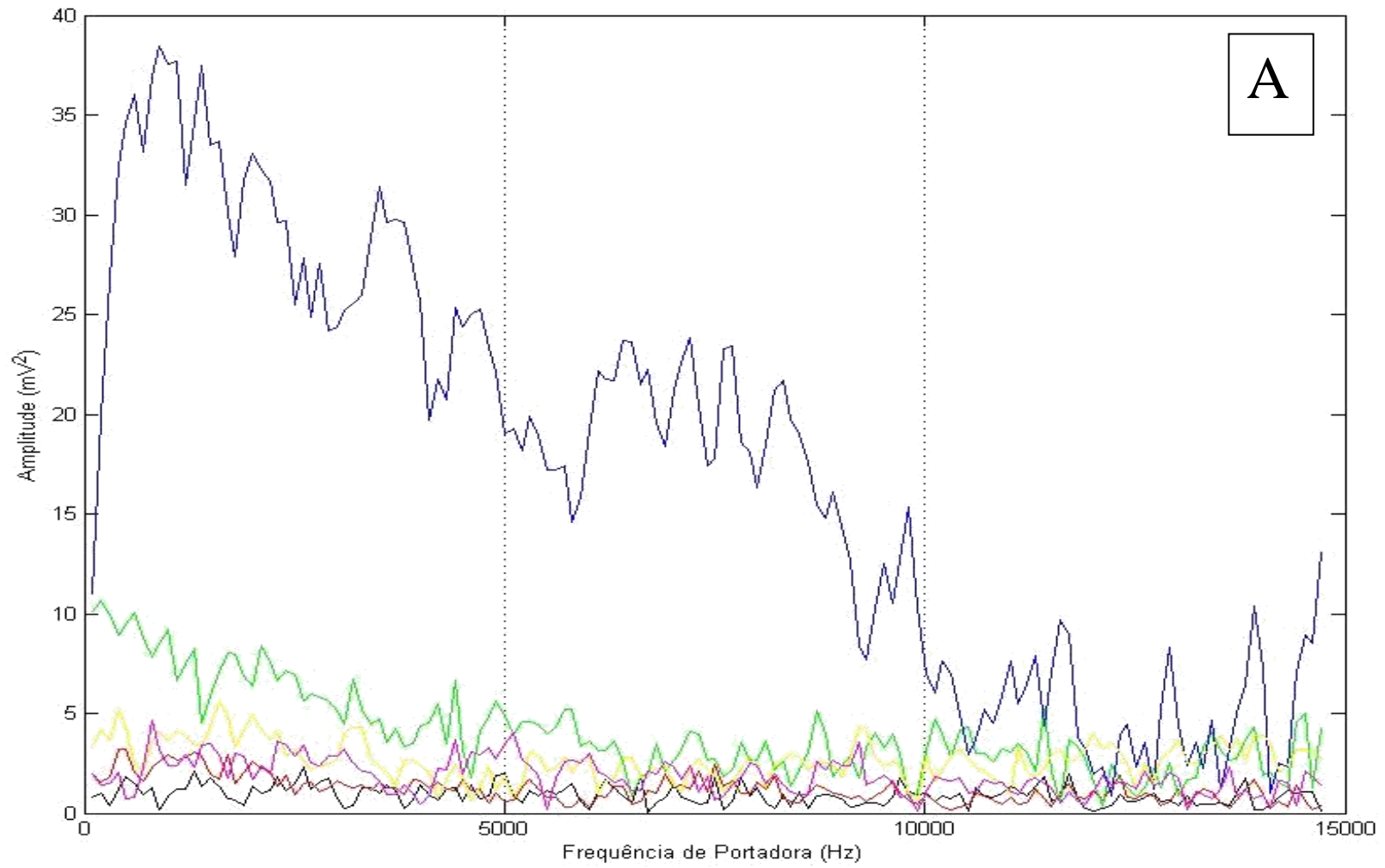


FIGURA 28

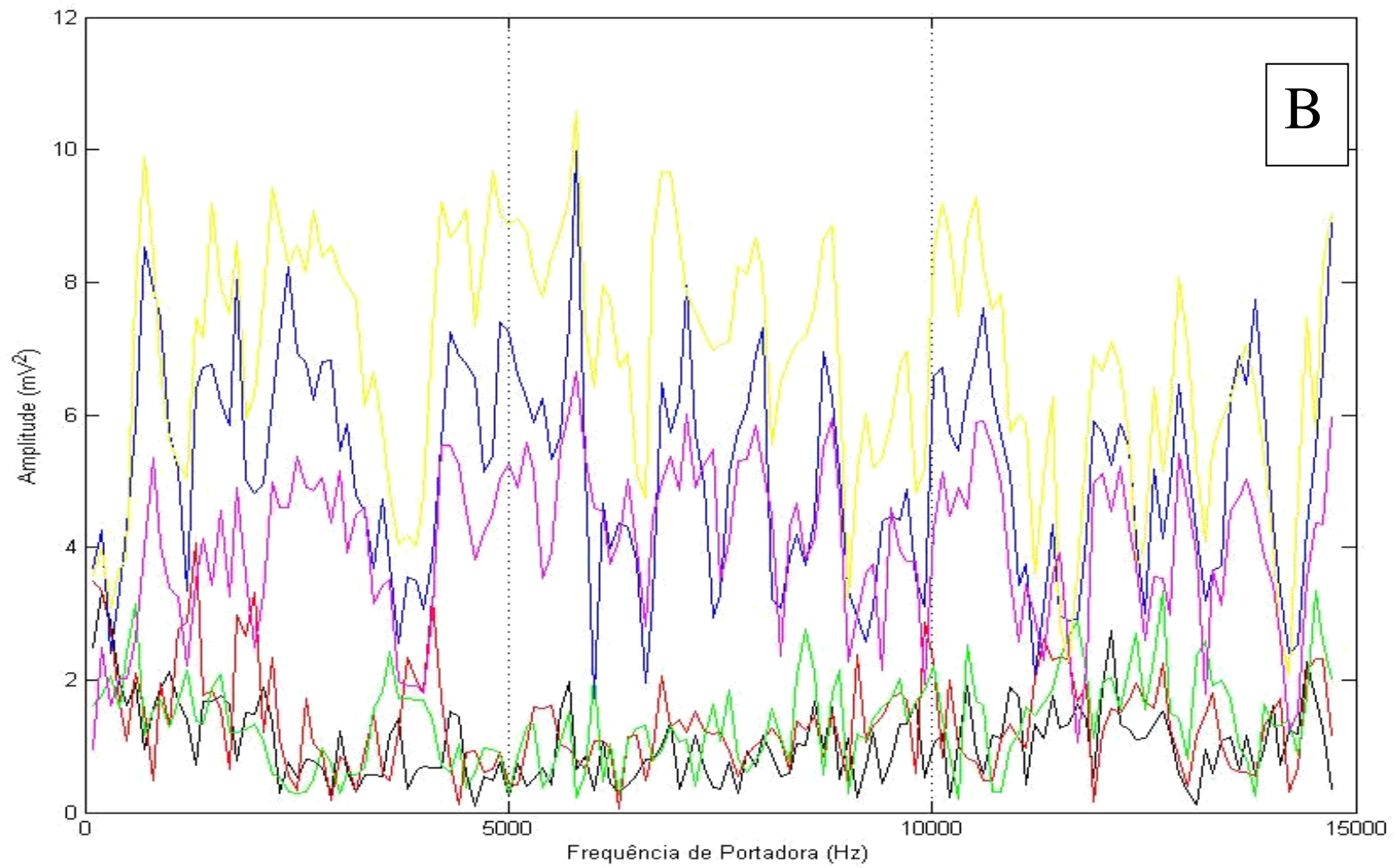


FIGURA 28

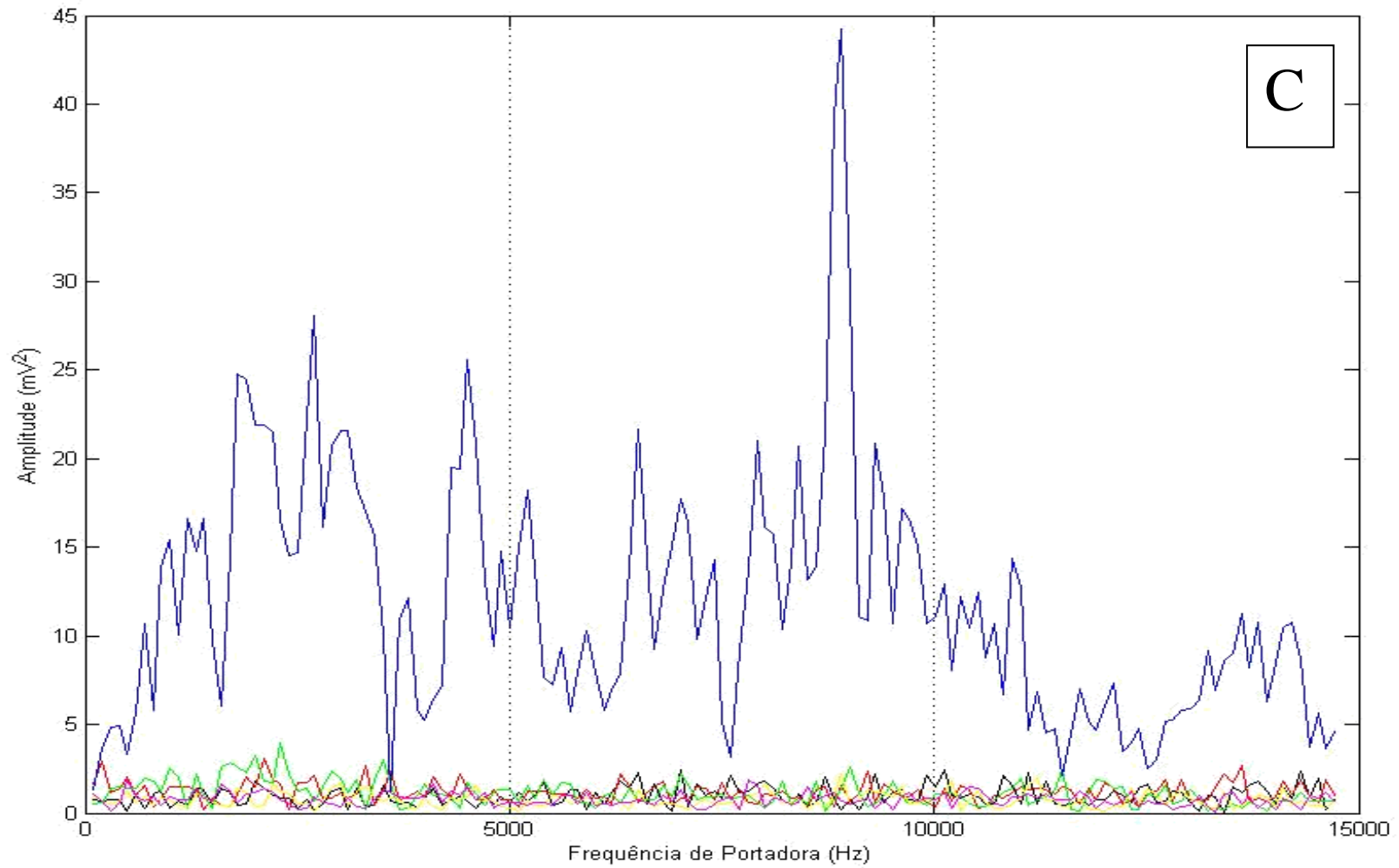


FIGURA 28

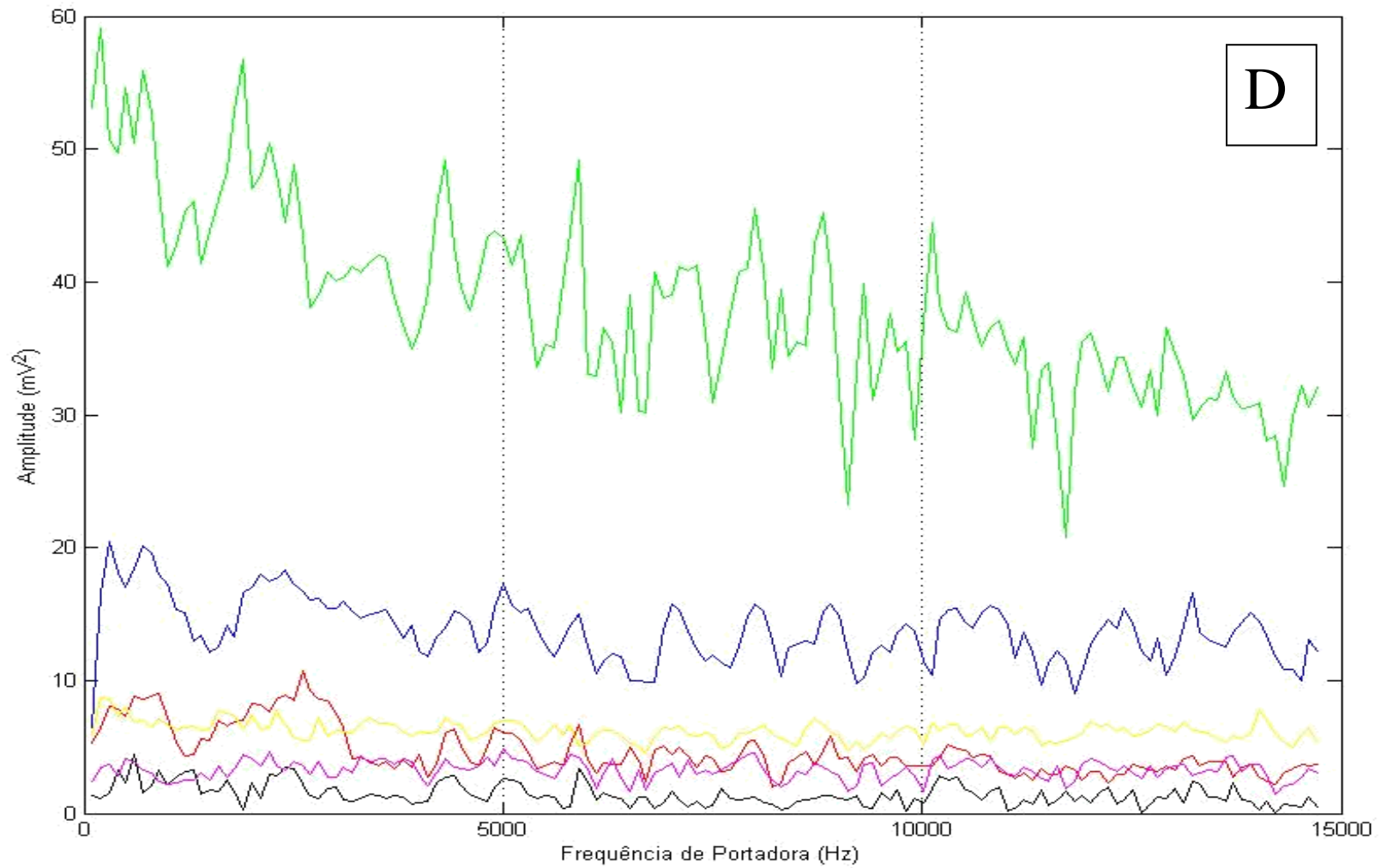


FIGURA 28

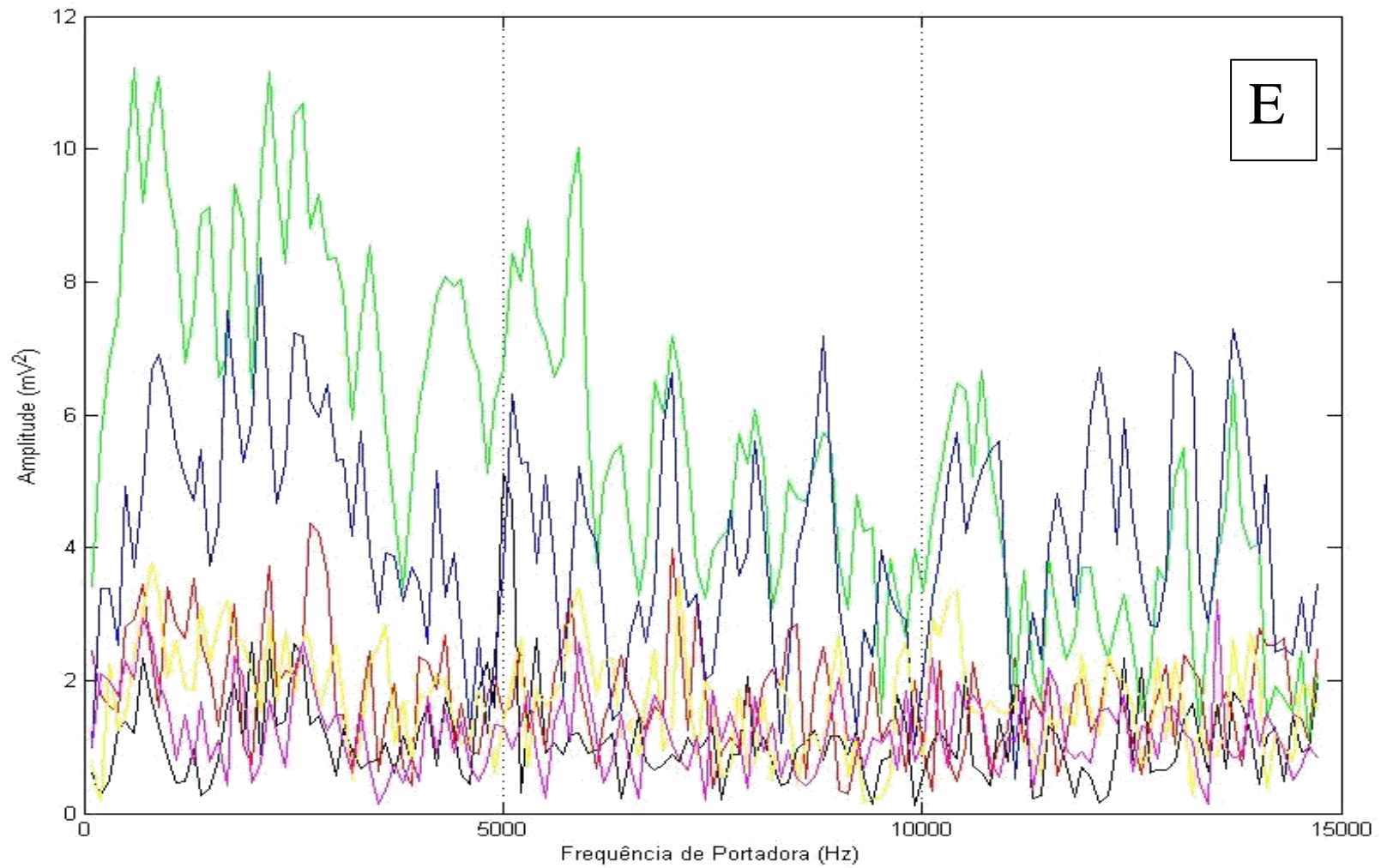


FIGURA 28

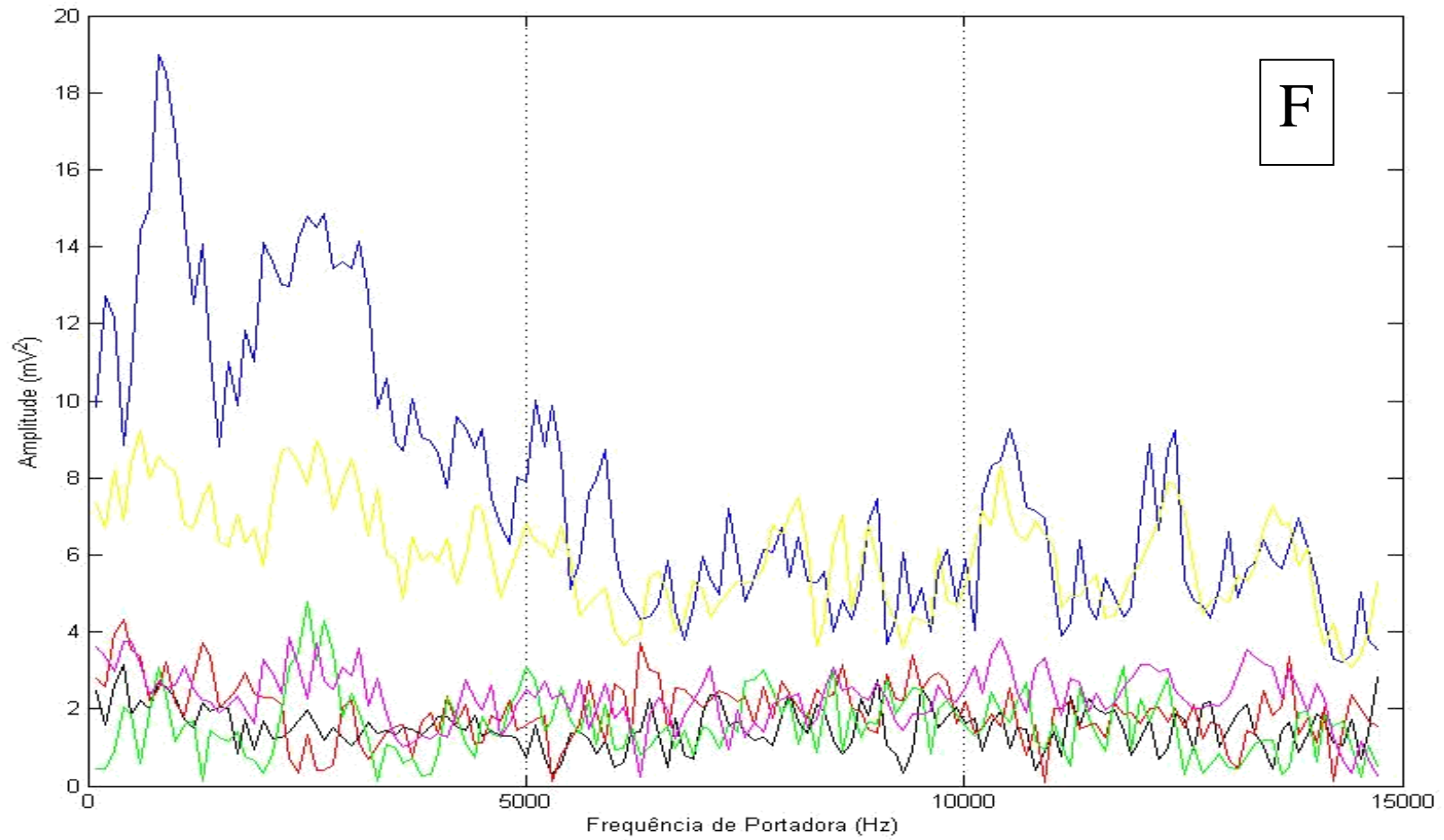


Figura 28 - Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Experimental. Cada gráfico representa um animal. Cada cor está relacionada a um dos seis pontos da varredura anatômica. Nas abscissas estão as frequências de portadora (kHz) e nas ordenadas a amplitude da resposta (mV^2). Observamos uma grande variação da amplitude e do perfil da resposta entre os animais. Na maioria deles a maior amplitude de resposta corresponde a baixas frequências de portadora.

FIGURA 29

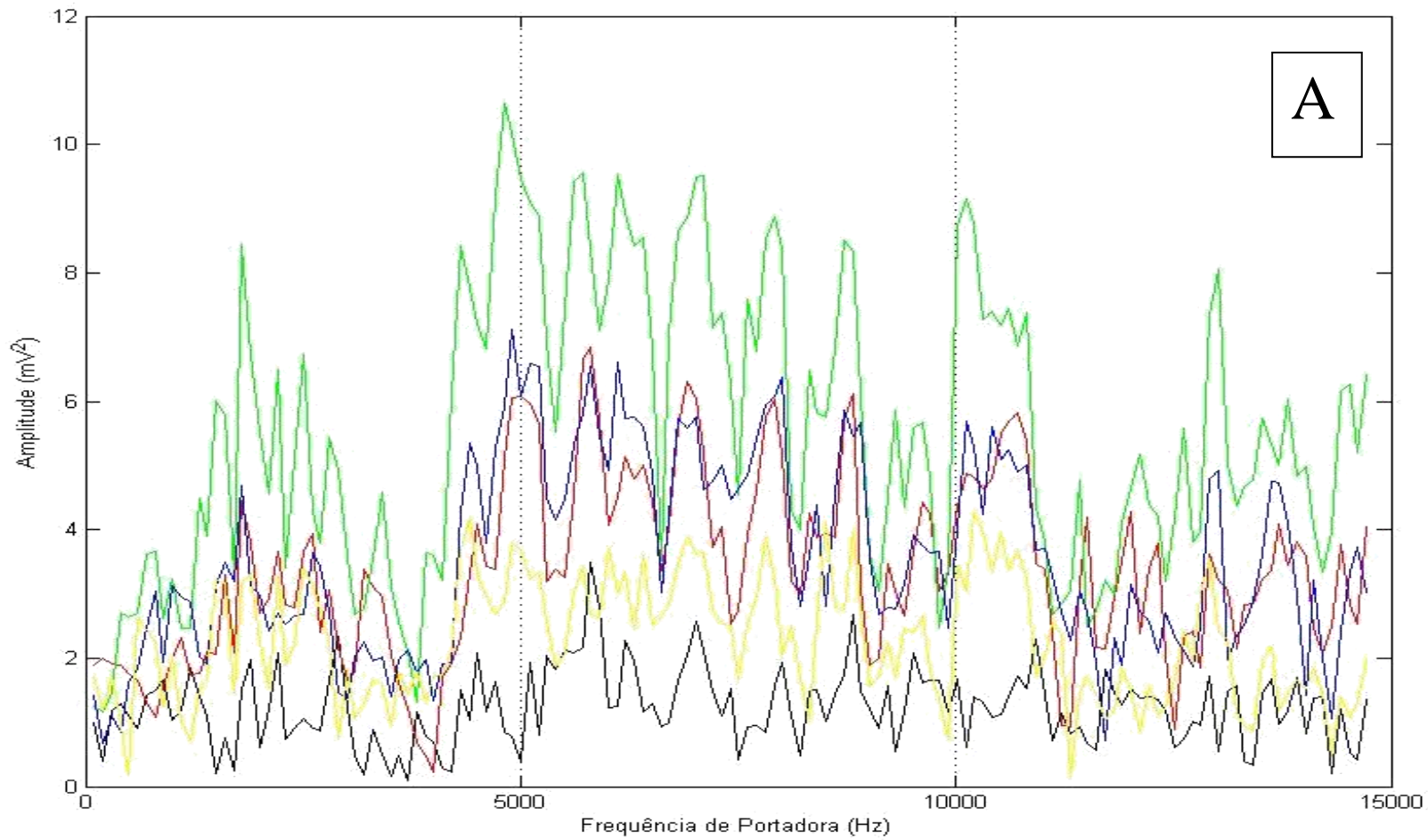


FIGURA 29

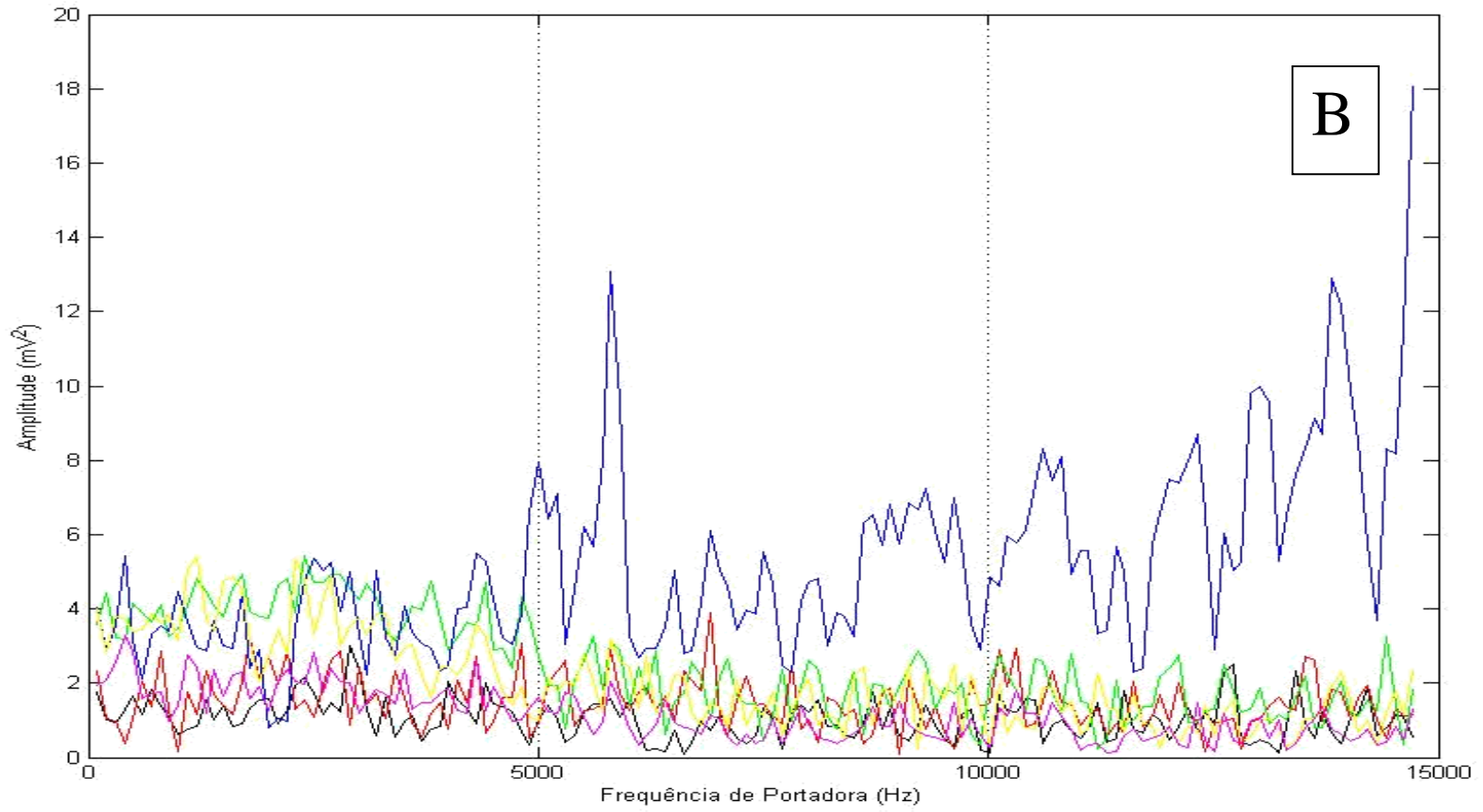
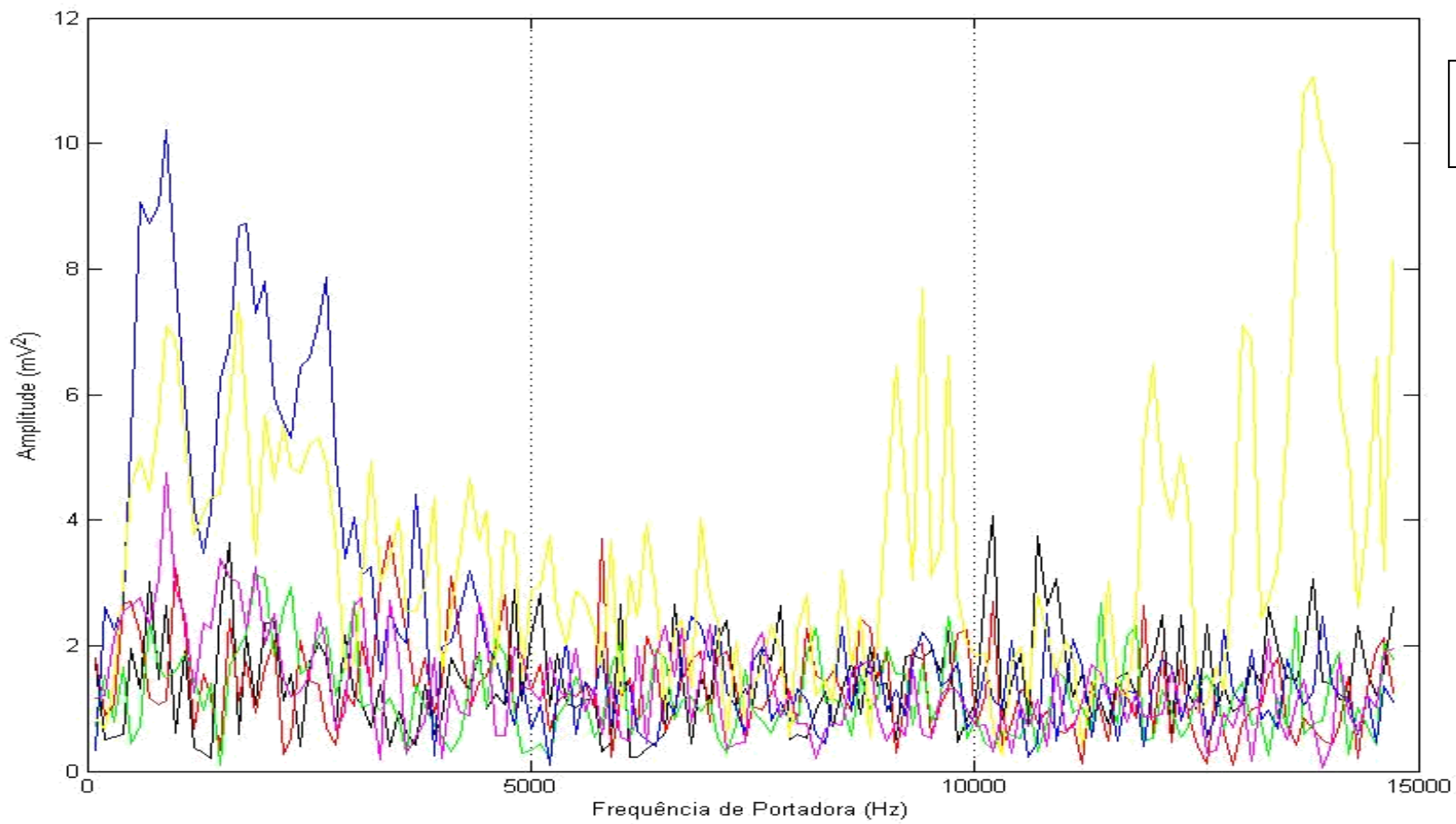
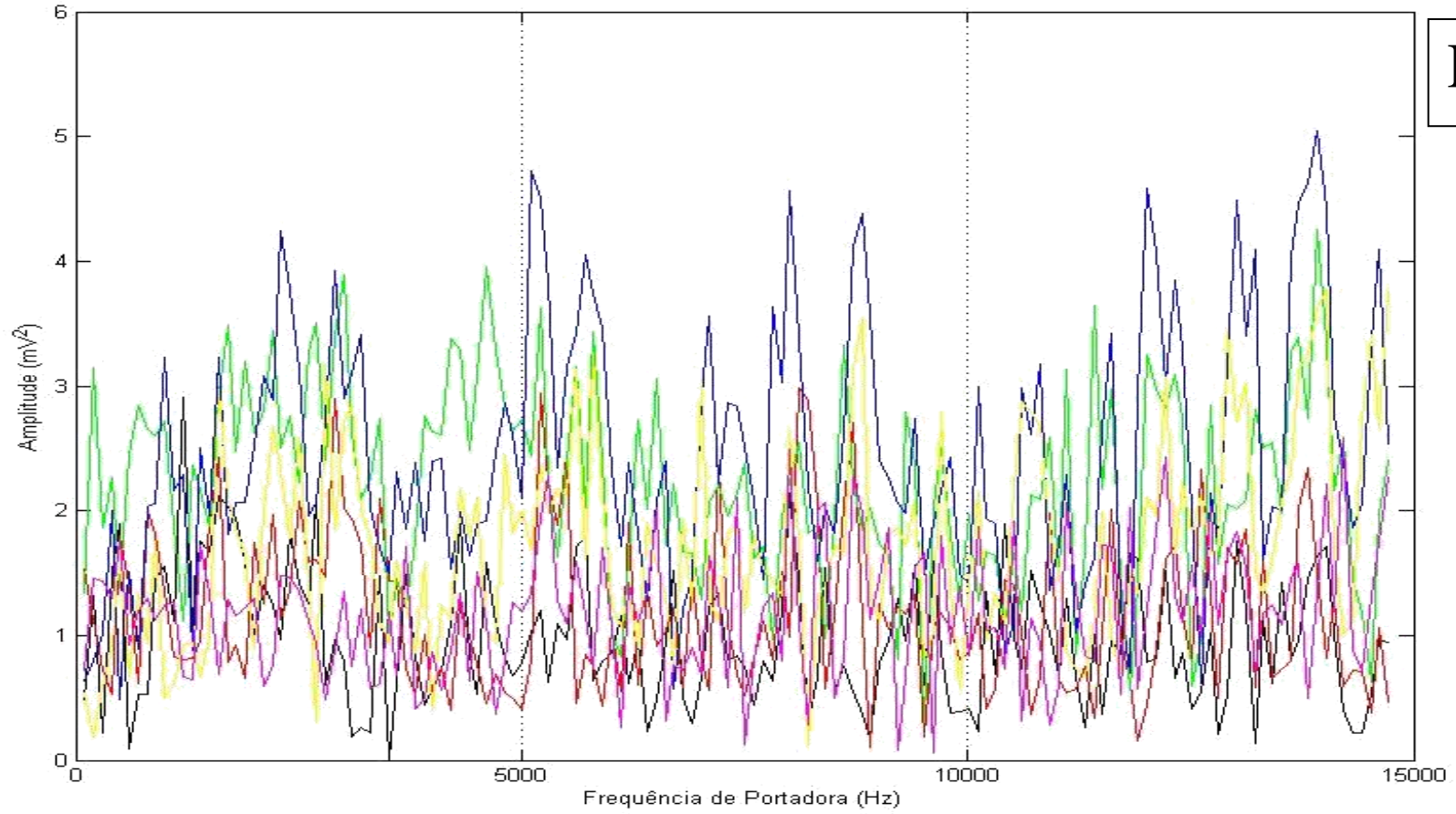


FIGURA 29



C

FIGURA 29

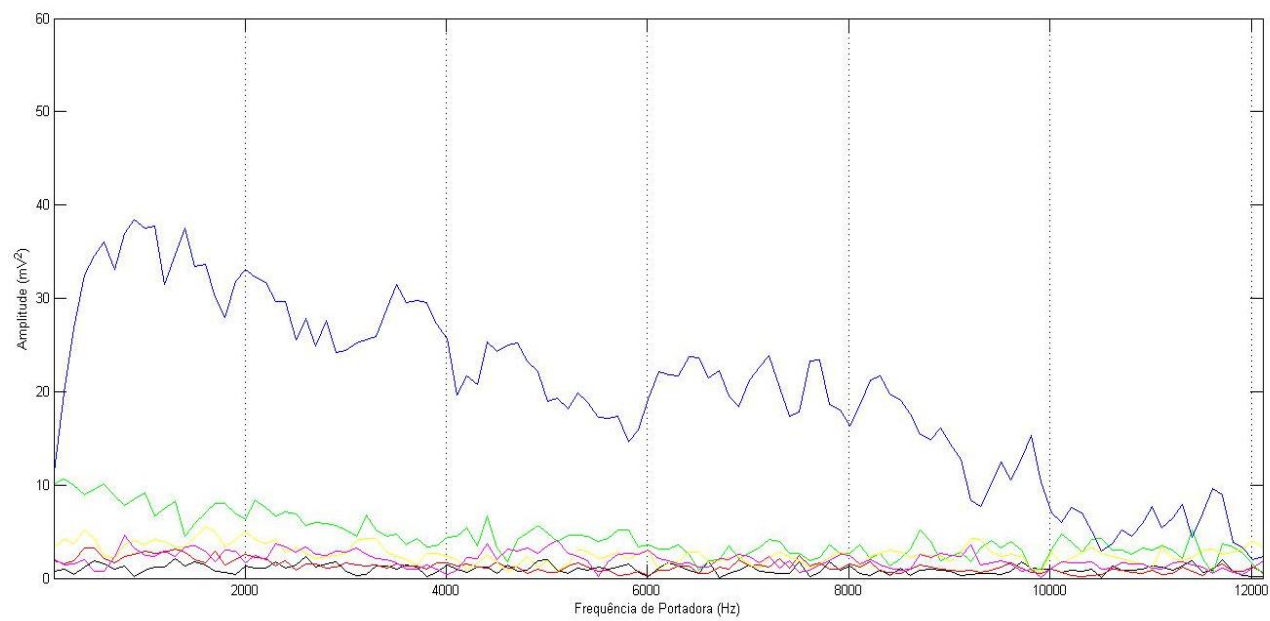


D

Figura 29- Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Controle. Cada gráfico (A, B, C, D) representa um animal. Cada cor está relacionada a uma das seis posições da varredura anatômica.

FIGURA 30

A1



A2

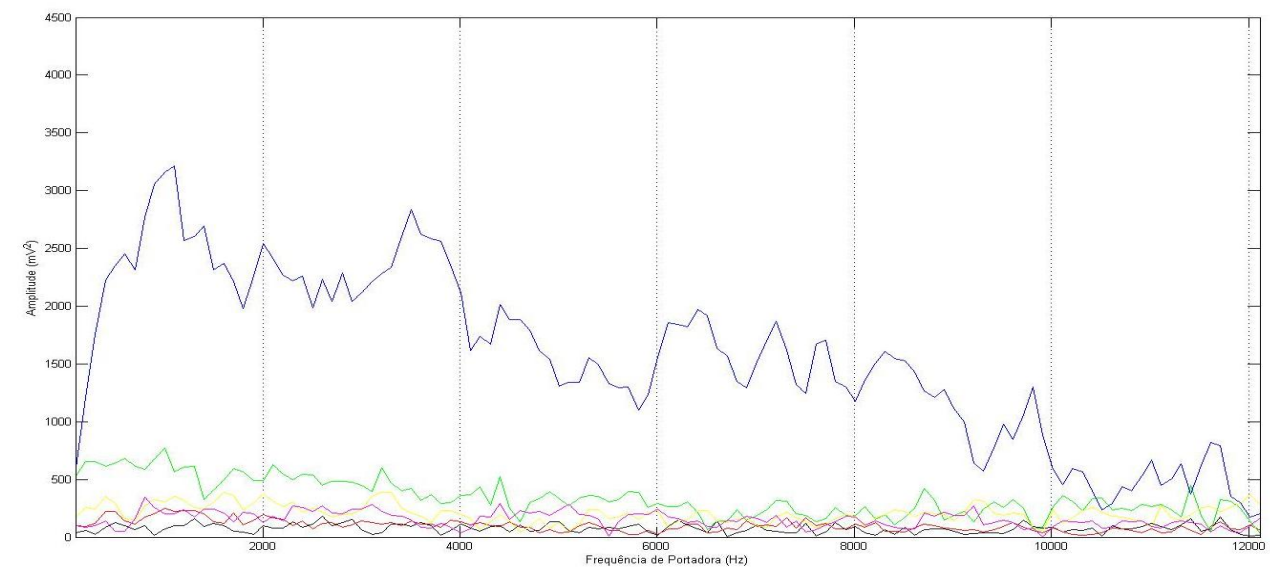
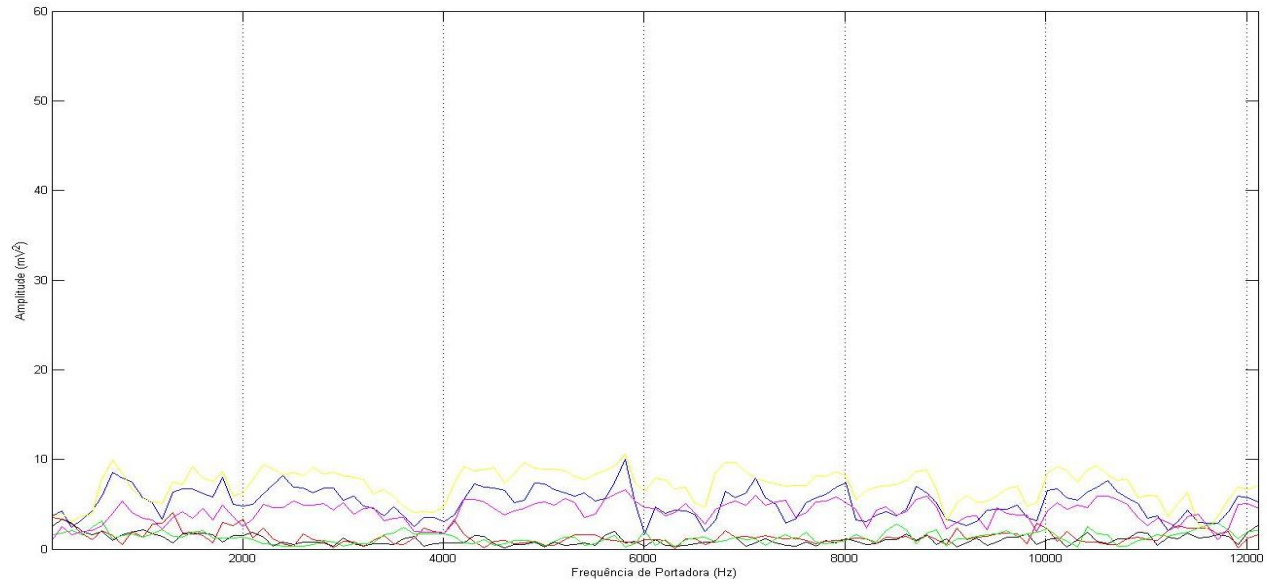


FIGURA 30

B1



B2

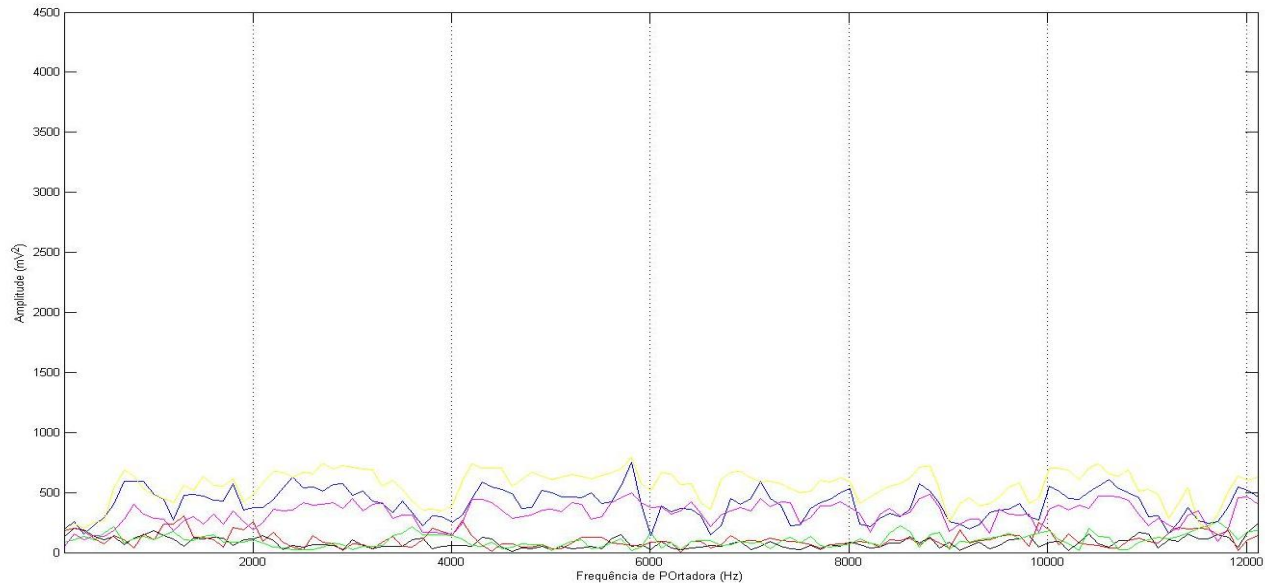
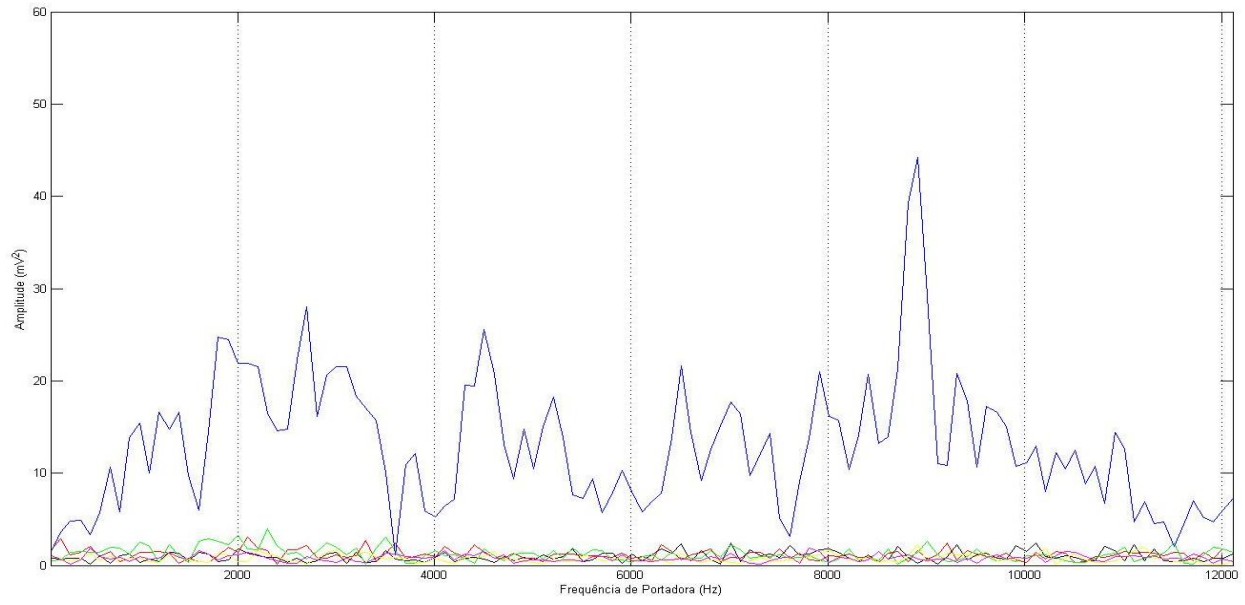


FIGURA 30

C1



C2

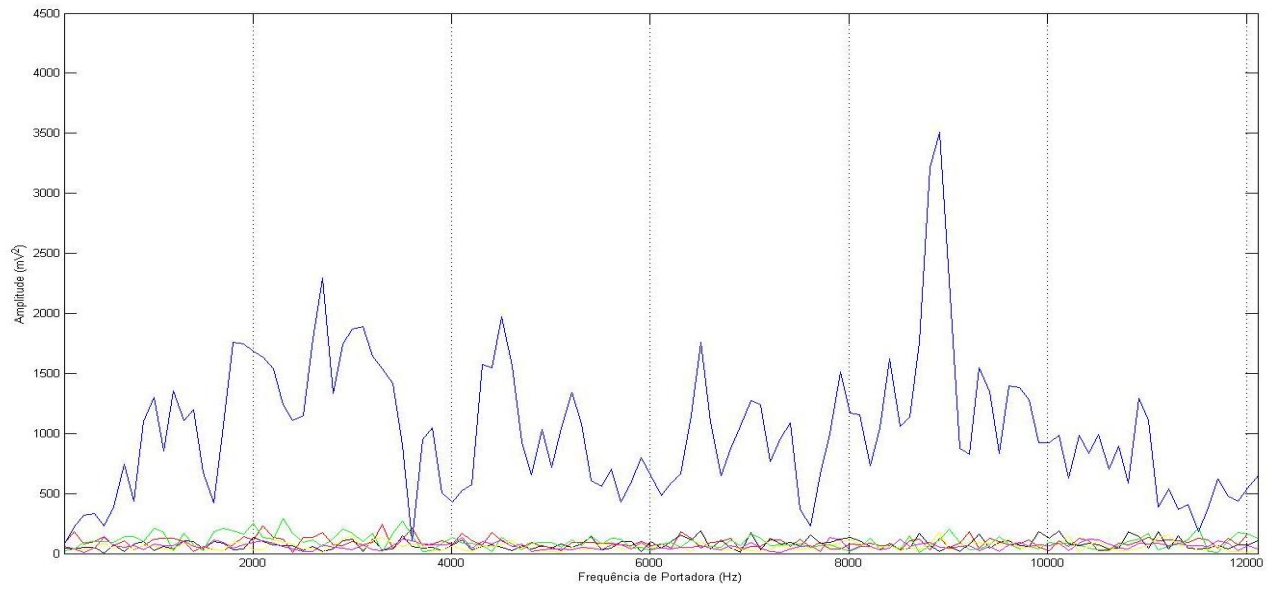


FIGURA 30

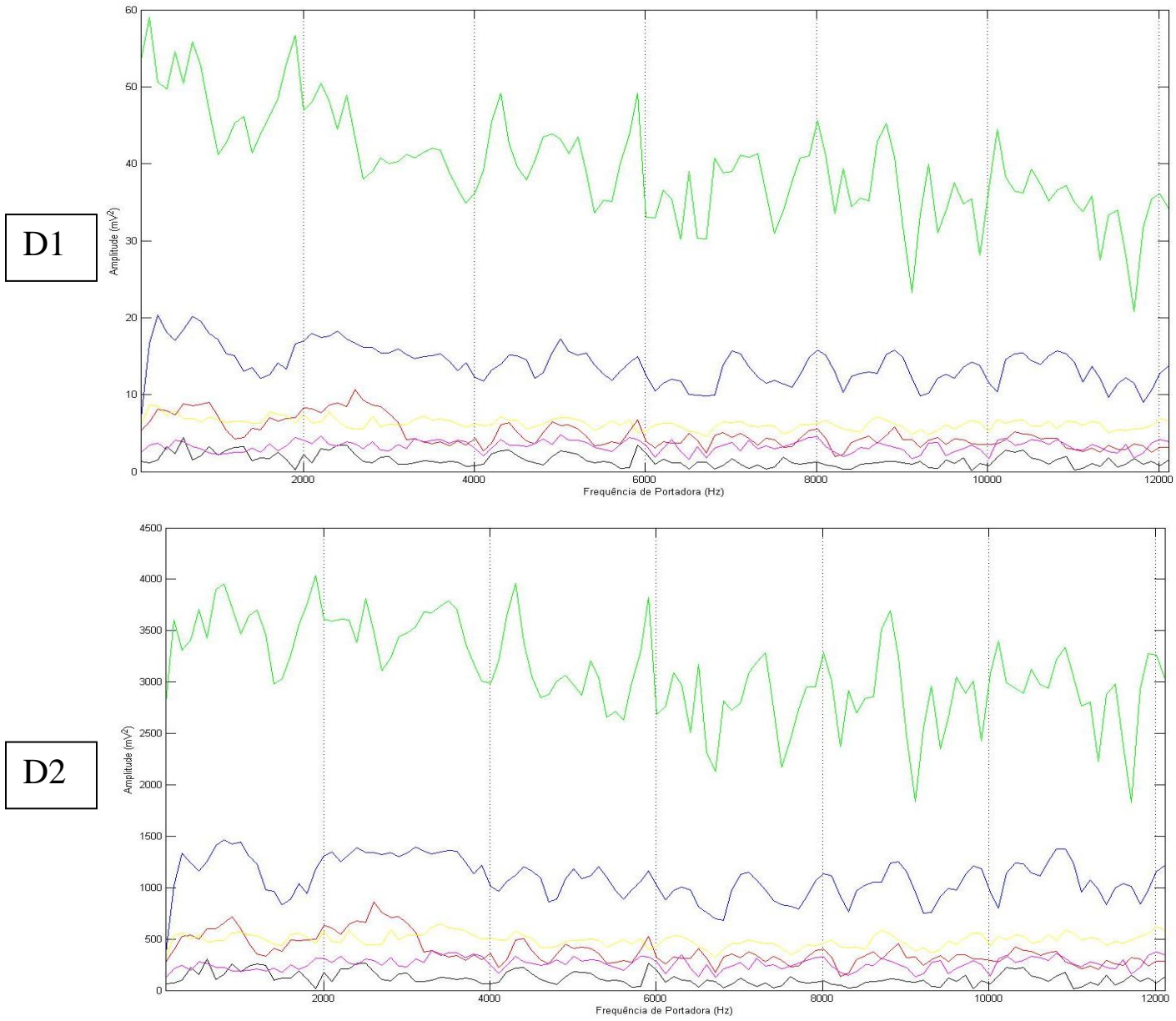
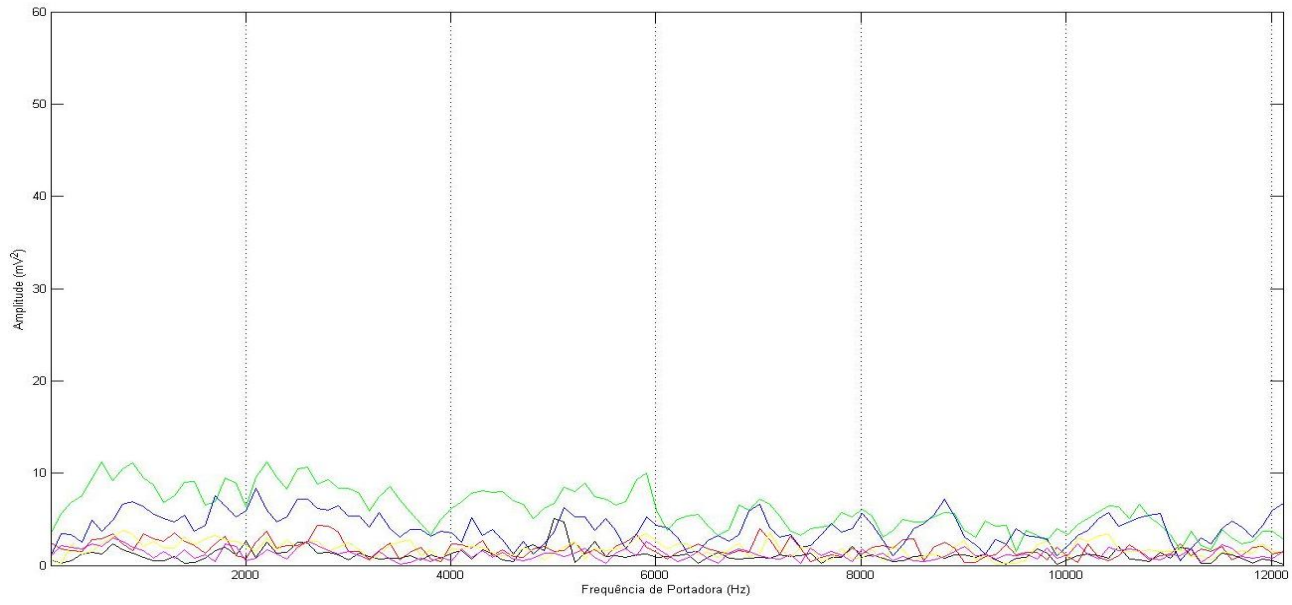


FIGURA 30

E1



E2

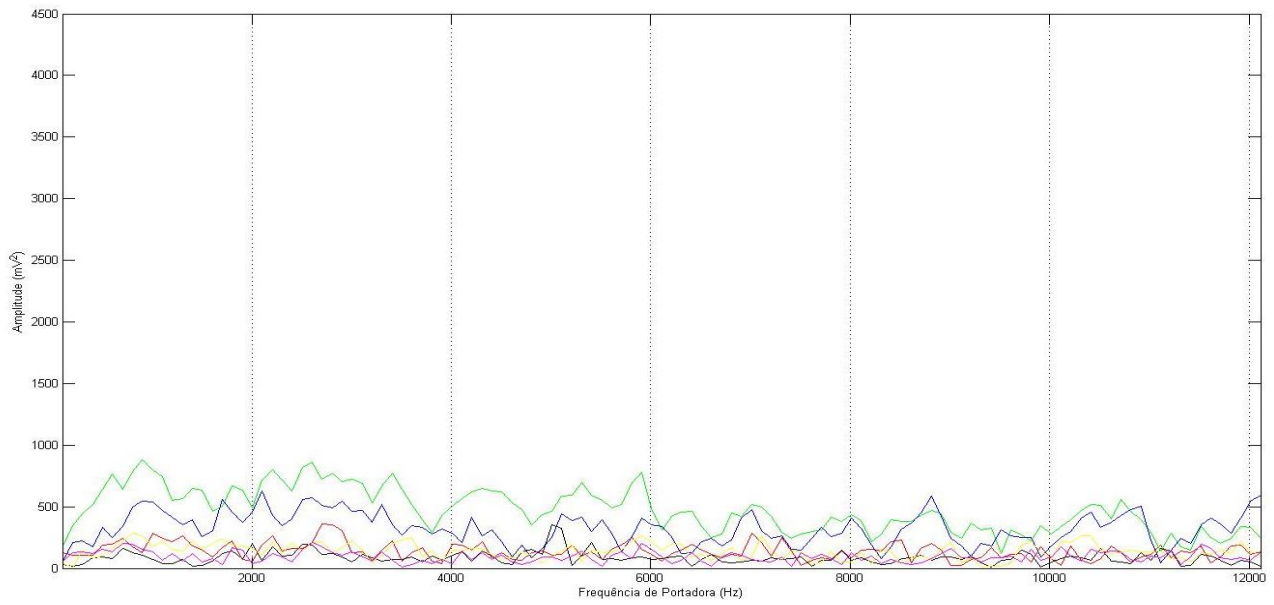
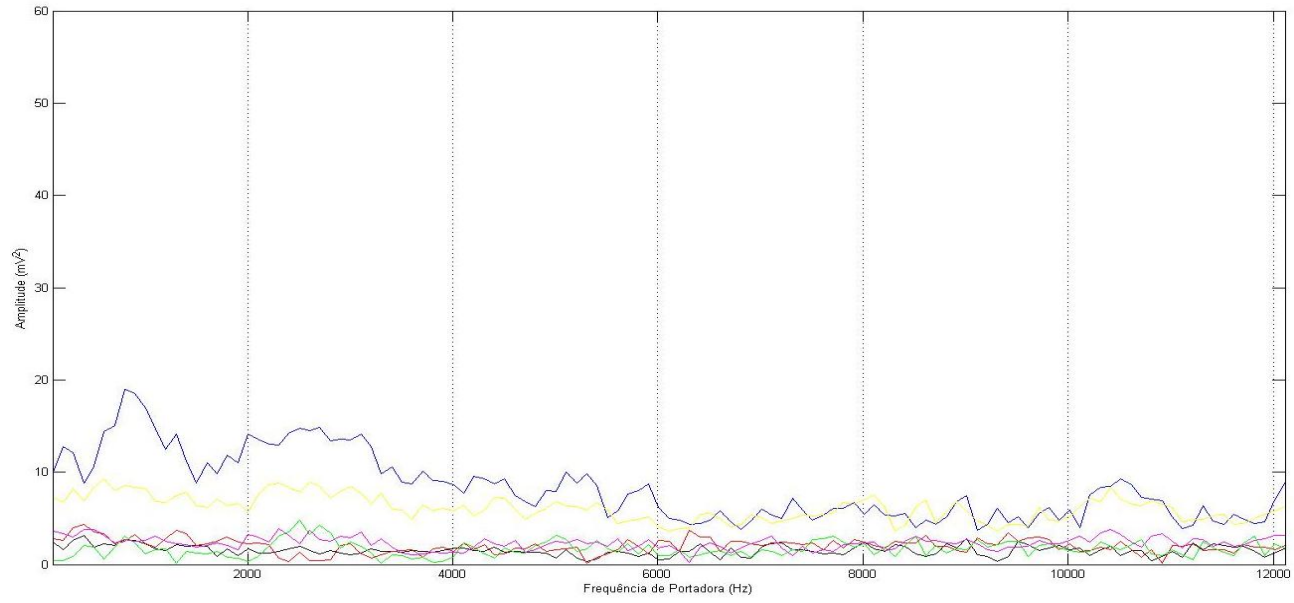


FIGURA 30

F1



F2

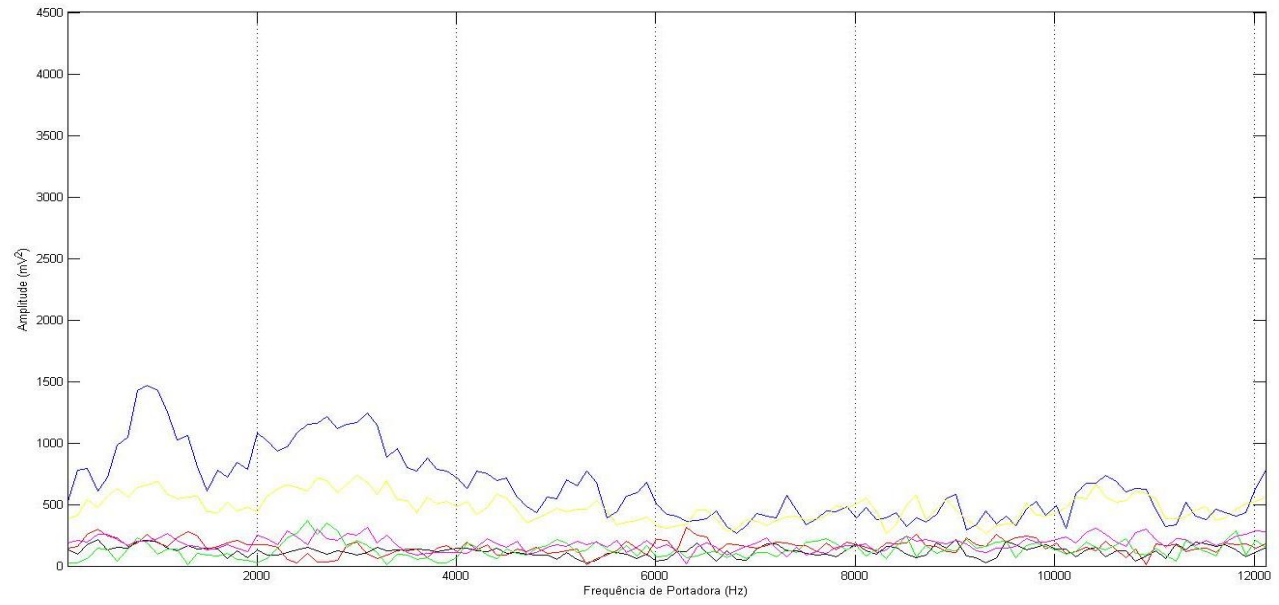
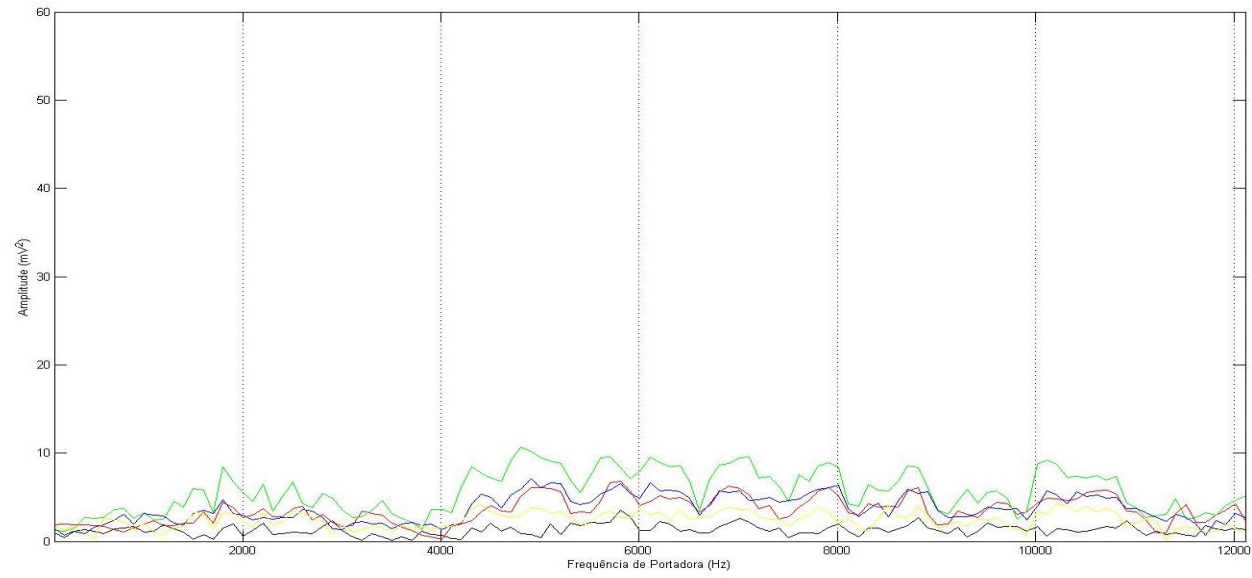


Figura 30- Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Experimental (A, B, C, D, E, F), à esquerda (1) sem correção da intensidade da resposta pela curva da intensidade do estímulo, e à direita (2) com correção para o mesmo animal. Cada cor está relacionada a uma posição da varredura anatômica. Observe que não houve alteração no perfil da onda, porém, houve apenas alteração na escala da onda de resposta.

FIGURA 31

A1



A2

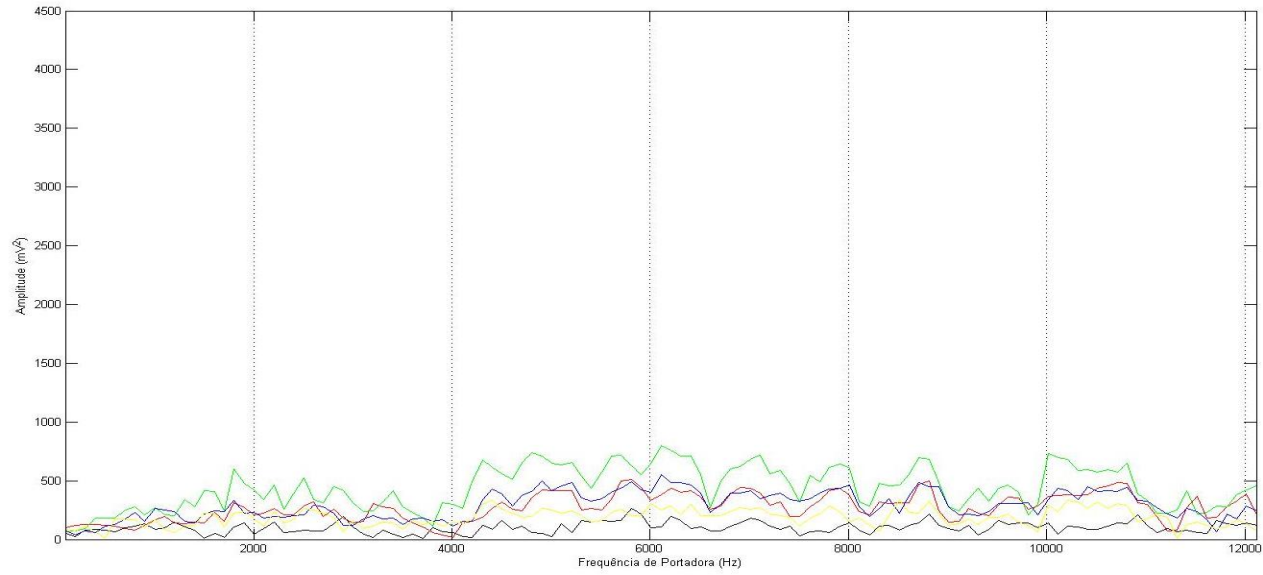
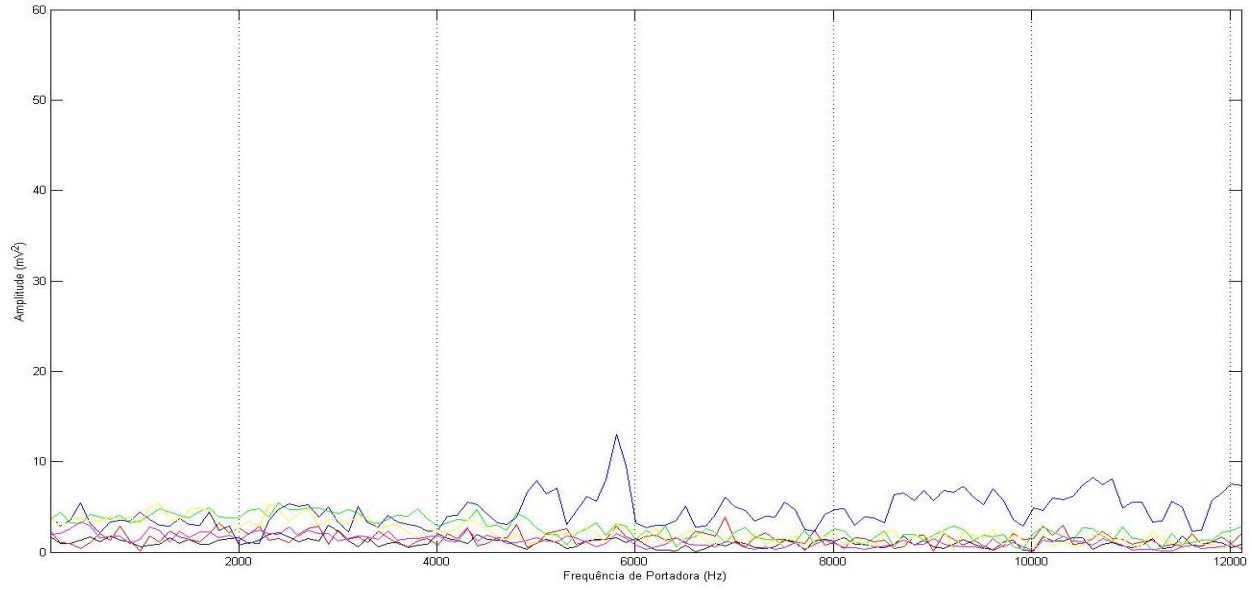


FIGURA 31

B1



B2

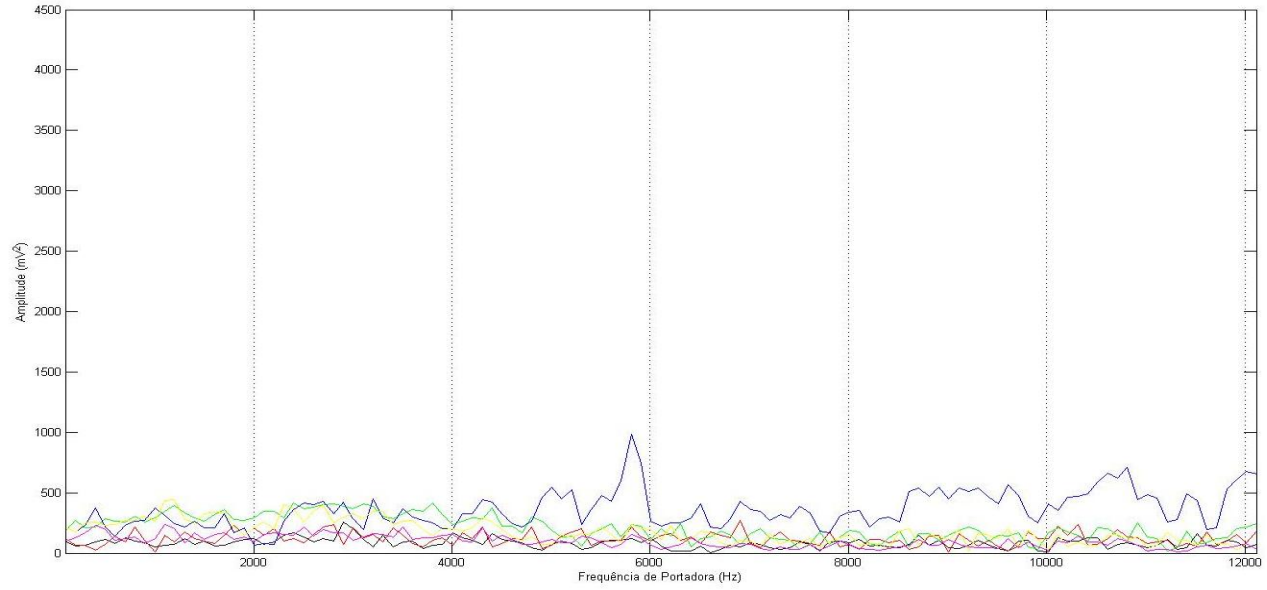
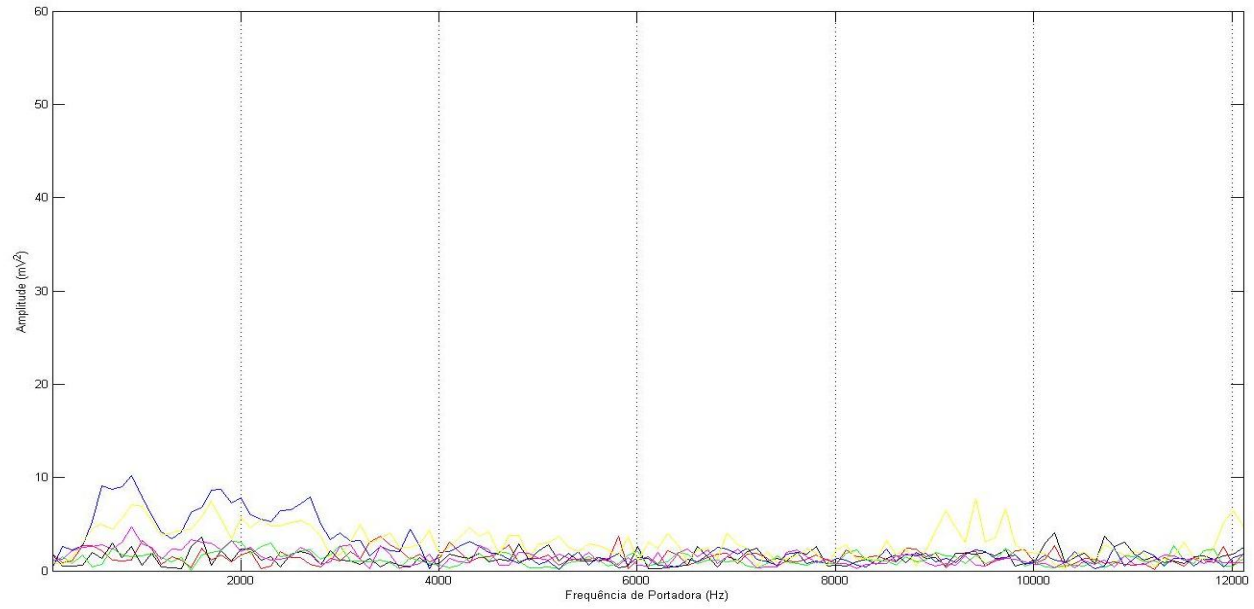


FIGURA 31

C1



C2

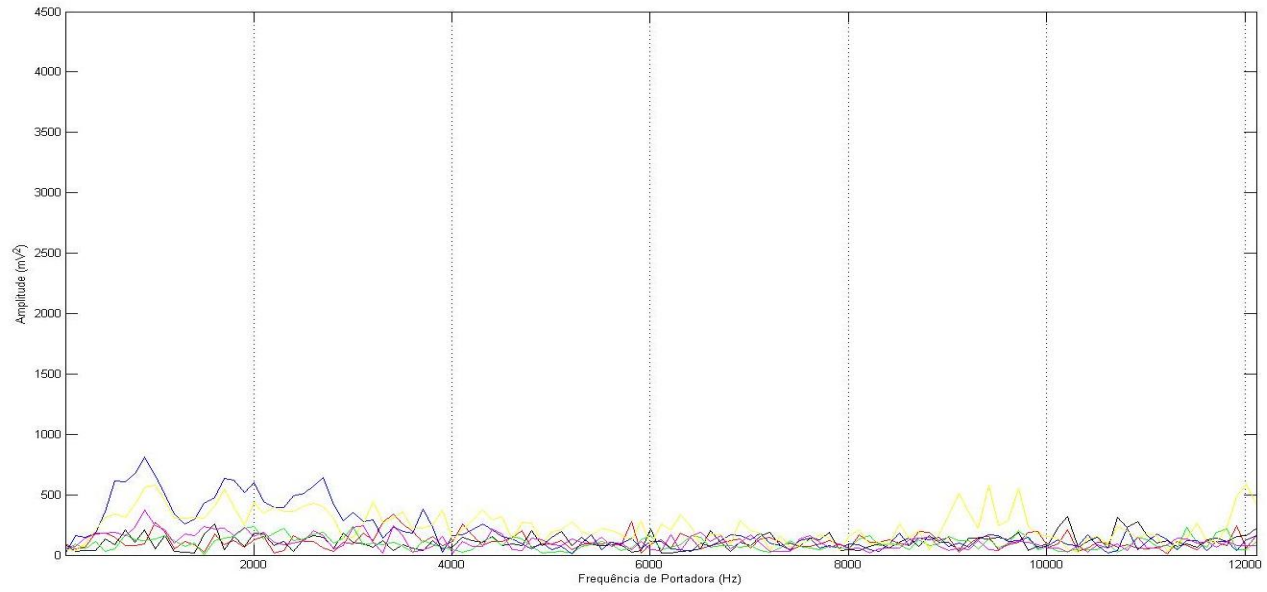
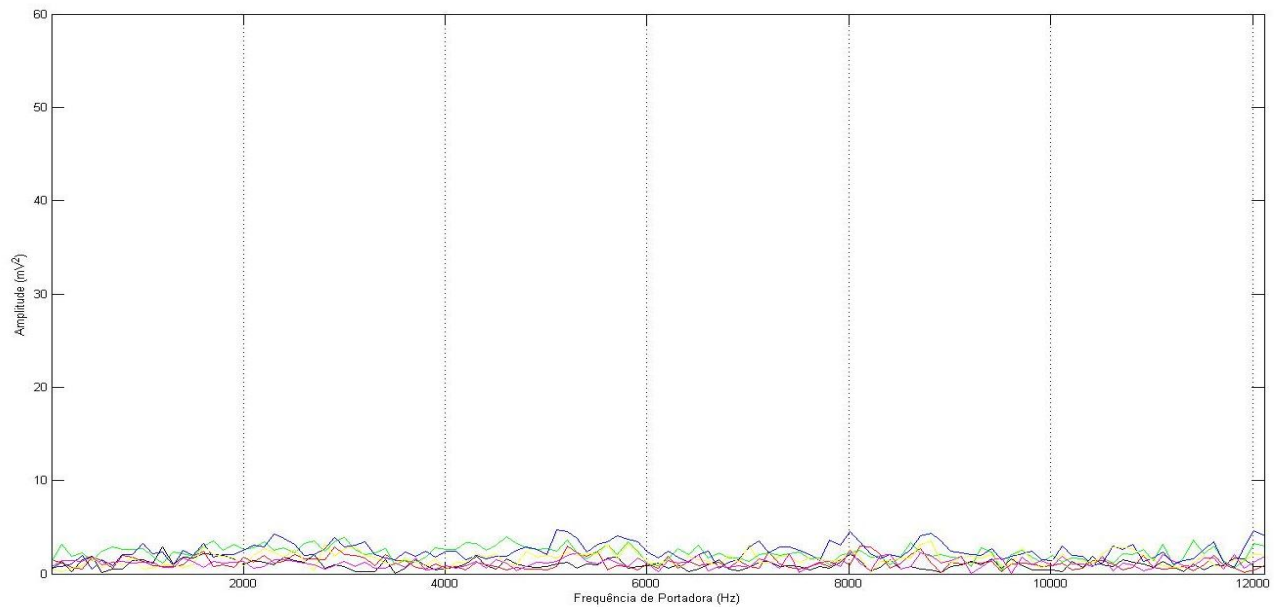


FIGURA 31

D1



D2

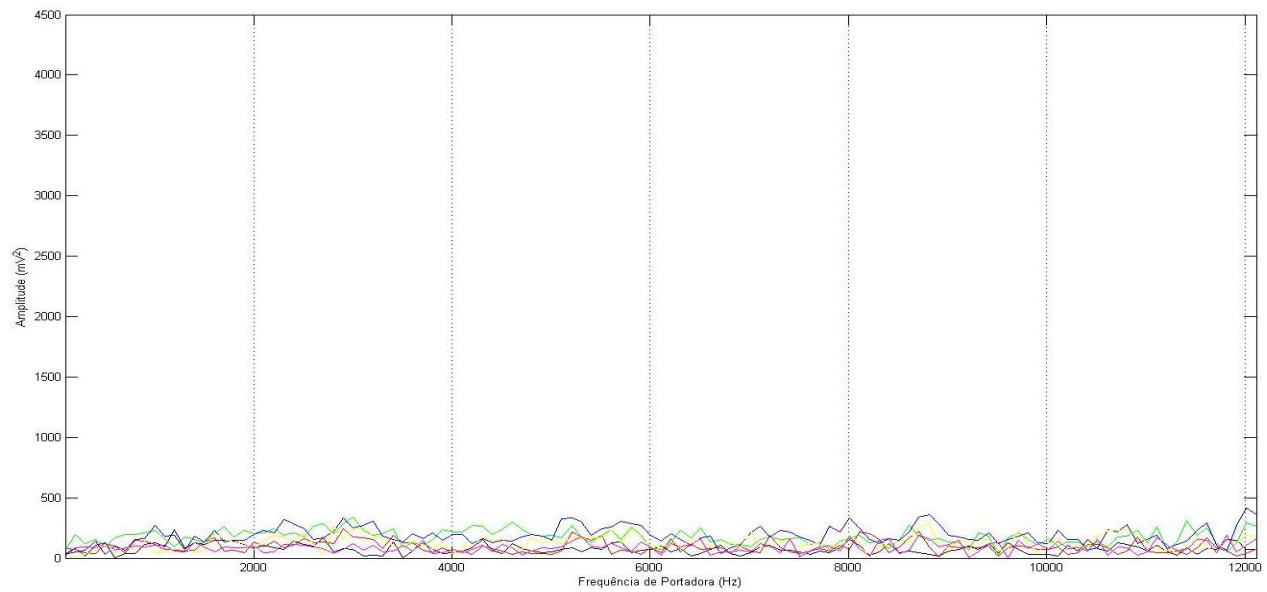


Figura 31- Perfil da REARP nos diferentes pontos da varredura anatômica para cada animal do Grupo Controle (A, B, C, D), à esquerda (1) sem correção da intensidade da resposta pela curva da intensidade do estímulo, e à direita (2) com correção para o mesmo animal. Cada cor está relacionada a uma posição da varredura anatômica. Observe que não houve alteração no perfil da onda, porém, houve apenas alteração na escala da onda de resposta.