

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DISTÚRBIOS DA
COMUNICAÇÃO HUMANA**

**POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS DE LONGA
LATÊNCIA E METABOLISMO OXIDATIVO EM
RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PREMATUROS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dayane Domeneghini Didoné

Santa Maria, RS, Brasil

2013

POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS DE LONGA LATÊNCIA E METABOLISMO OXIDATIVO EM RECÉM- NASCIDOS A TERMO E PREMATUROS

Dayane Domeneghini Didoné

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração em Audição e Equilíbrio: diagnóstico, habilitação, reabilitação, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana**

Orientador: Prof^o. Dr. Aron Ferreira da Silveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Vargas Garcia

Santa Maria, RS, Brasil

2013

ficha catalográfica

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação
Humana**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS DE LONGA LATÊNCIA E
METABOLISMO OXIDATIVO EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E
PREMATUROS**

elaborada por
Dayane Domeneghini Didoné

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana

Comissão Examinadora

**Aron Ferreira da Silveira, Prof^o, Dr (UFSM)
(Presidente/Orientador)**

**Michele Vargas Garcia, Prof^a, Dr^a (UFSM)
(Coorientadora)**

Eliara Pinto Vieira Biaggio, Prof^a, Dr^a (UFSM)

Jacqueline da C. E. Piccoli , Prof^a, Dr^a (UNIPAMPA)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013.

Dedicatória

*Ao meu pai Gilberto,
Minha mãe Marilene,
Minha irmã Juliana e
Amiga Jussi*

Agradecimentos

A Deus pela vida, por tudo que tenho, pelo que sou e por seu infinito amor.

Ao meu pai **Gilberto** pelo amor, pela compreensão e pelo incentivo em minha vida profissional. Essa dissertação é fruto do teu incentivo, desde que eu era criança! Te amo! Tu és o melhor pai do mundo!

À minha mãe **Marilene** pelo amor, incentivo, por me ensinar a lutar pelos objetivos e por me ensinar que é do céu que vem nossas forças! És uma guerreira! Te amo!

À minha irmã **Juliana** por me mostrar as coisas de real valor dessa vida! Te amo mais que tudo!

À minha irmã de coração **Jussi**, pela amizade, compreensão, por ser minha irmã mais velha, por estar ao meu lado em todos os momentos. A vida é mais leve e divertida com tua amizade!

Aos meus amigos, em especial à **Gabriele, Lênin, Anderson e Francieli**. Como disse Vinícius de Moraes: “Eu poderia, embora não sem dor, perder todos os meus amores, mas morreria se perdesse todos os meus amigos”. Amo vocês!

Ao meu orientador **Aron** por ter me acolhido no momento que mais precisei, pela paciência, dedicação e ensinamentos constantes.

À minha coorientadora Michele por ser minha “luz no fim do túnel”, por toda ajuda, compreensão, ensinamentos e por ter um coração enorme! Tu fostes imprescindível para conclusão dessa dissertação! Sempre serei grata!

Aos membros da banca, Prof^ª Jacqueline da Costa E. Piccoli e Prof^ª Eliara Pinto Vieira Biaggio por terem aceitado participar da banca e pelas considerações, as quais contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

À professora Eliara pelas contribuições nessa dissertação, pelo carinho, paciência e por ser um exemplo de pessoa e profissionalismo!

À professora Valdete pelo carinho e por sua alegria constante! És muito especial!

A todas minhas colegas de mestrado, em especial à Letícia Regina Kunst, pelos anos de convivência, pelo companheirismo e por ser sempre tão amiga. Te admiro muito e torço pelo teu sucesso! Conta comigo sempre!

Ao Dr. Pedro Luis Cóser pelos ensinamentos fundamentais em eletrofisiologia e por disponibilizar os protocolos para a realização dos potenciais de longa latência nos bebês dessa pesquisa. Obrigada!

Ao Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana pela oportunidade.

Ao Laboratório de Biogenômica da Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Alencar Kolinski Machado e Sabrina Homrich por toda ajuda! Obrigada de coração!

À equipe de Triagem Auditiva Neonatal do HUSM, em especial a Bruna Corrêa e Fernanda Donato Mahl por todo carinho e incentivo.

Aos bebês que participaram desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos vocês, de coração!

*“...quando a noite esconde a luz,
Deus acende as estrelas...”*
(Fábio de Melo)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana
Universidade Federal de Santa Maria

Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência e metabolismo oxidativo em recém-nascidos a termo e prematuros

Autora: Dayane Domeneghini Didoné
Orientador: Aron Ferreira da Silveira
Coorientadora: Michele Vargas Garcia

INTRODUÇÃO: A integridade e funcionamento adequado das estruturas centrais são importantes para o desenvolvimento cognitivo e linguístico, e os Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência (PEALL) permitem avaliar o processamento da informação auditiva, sendo considerados como indicadores do desenvolvimento cognitivo, principalmente em prematuros, os quais são de risco para alterações do processamento auditivo e de linguagem. Os recém-nascidos prematuros também são vulneráveis à alterações celulares, sendo que as mesmas podem causar diversas doenças no período neonatal. A pesquisa do metabolismo oxidativo por meio do Teste de Micronúcleos permite a identificação dessas alterações em nível celular. **OBJETIVO:** Avaliar os PEALL e o metabolismo oxidativo em recém-nascidos a termo e prematuros. **MATERIAL E MÉTODO:** Participaram do estudo recém-nascidos com até um mês de vida que compareceram ao Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) para realização da Triagem Auditiva Neonatal (TAN). Os neonatos foram divididos em grupo controle (GC) e grupo estudo (GE), sendo constituídos por recém-nascidos a termo e prematuros, respectivamente. A amostra foi constituída por 15 indivíduos em cada grupo para avaliação do metabolismo oxidativo, e 15 recém-nascidos a termo e 10 prematuros para avaliação dos PEALL. Para o teste de micronúcleos foram coletadas células epiteliais da mucosa oral, por meio do esfregaço da mucosa oral, com uma escova *cytobrush*. As células foram analisadas em laboratório. Os PEALL foram pesquisado de forma binaural, por meio de fones de inserção, com estímulo de fala frequente /ba/ e raro /ga/, sendo analisados apenas os potenciais exógenos (P1, N1, P2 e N2). **RESULTADOS:** De maneira geral, para a pesquisa do metabolismo oxidativo, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as análises do Teste de Micronúcleos, sendo que o número de micronúcleos e de células alteradas foi maior no grupo de prematuros quando comparados com o grupo de recém-nascidos a termo. Para os PEALL não houve diferença estatisticamente significativa para as latências dos componentes P1 e N1. **CONCLUSÕES:** A partir desse estudo pode-se concluir que os recém-nascidos prematuros apresentaram um índice maior de danos celulares a nível nuclear quando comparados com os recém-nascidos a termo. Na avaliação eletrofisiológica dos potenciais corticais, foi possível observar os componentes exógenos P1 e N1, porém não houve diferenças entre os grupos. São necessários mais estudos nessa área, a fim de se conhecer melhor as características desses potenciais em recém-nascidos e crianças pequenas.

Palavras-chave: Potenciais Evocados Auditivos. Micronúcleos. Prematuridade. Neonatos.

ABSTRACT

Master's Thesis

Post-Graduation Program in Human Communication Disorders
Universidade Federal de Santa Maria

Long latency auditory evoked potentials and oxidative metabolism in term and premature infants

Author: Dayane Domeneghini Didoné

Advisor: Aron Ferreira da Silveira

Co-advisor: Michele Vargas Garcia

INTRODUCTION: The proper integrity and functioning of the central structures are important for the linguistic and cognitive development and the Long Latency Auditory Evoked Potentials (LLAEP) allow the evaluation of the hearing information processing, considered as indicator of cognitive development, mainly in preterm infants, that present risks to alterations of hearing and language processing. The preterm infants are also vulnerable to cellular alterations. These alterations may cause several diseases during the neonatal period. The research of the oxidative metabolism through the Micronucleus Essay allows the identification of these alterations in cellular level. **PURPOSE:** To evaluate the LLAEPs and the oxidative metabolism of term and premature infants. **MATERIAL AND METHODS:** This study consisted of newborns with no more than one month old that came to the *Hospital Universitário de Santa Maria* (HUSM) to the Neonatal Hearing Screening (NHS). The infants were divided in control group (CG) and study group (SG), with term and premature infants, respectively. The sample consisted of 15 individuals in each group for the oxidative metabolism evaluation and 15 term infants and 10 premature infants for the LLAEP evaluation. For the micronucleus test, epithelial cells of the mouth mucosa were collected, with acytobrush. The cells were analyzed in a laboratory. The LLAEPs were researched in binaural form, through insertion earphones, with frequent speech stimulation /ba/ and rare /ga/, analyzing only the exogenous potentials (P1, N1, P2 e N2). **RESULTS:** In general, for the oxidative metabolism research, there was statistically significant difference between the groups in the analysis of the Micronucleus Test. The number of altered micronucleus and cells was higher for the group of premature infants when compared with the group of term infants. For the LLAEPs there was no statistically significant difference for the latencies of the members P1 and N1. **CONCLUSIONS:** After this study, it was concluded that premature infants present higher index of cellular damage in nuclear level when compared with term infants. In the electrophysiological evaluation of the cortical potential, it was possible to observe the exogenous components P1 and N1, but there was no difference between the groups. More studies in this area are necessary in order to better understand the characteristics of these potentials in newborn and young infants.

Keywords: Evoked Potentials Auditory. Micronucleus. Prematurity. Newborn.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Respostas dos PEALL em um recém-nascido na intensidade de 80dBNA no equipamento *Intelligent Hearing Systems* (IHS)32

Figura 2- Formação de micronúcleos35

ARTIGO1

Figura 1- Gráfico de dispersão entre as células normais e o total de células alteradas segundo o grupo55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores das latências dos PEALL em neonatos a termo e prematuros (dados publicados por Pasman et al.; 1992).....28

ARTIGO1

Tabela 1- Comparação dos resultados do Teste de Micronúcleos entre o grupo de recém-nascidos a termo e prematuros56

ARTIGO2

Tabela 1- Medidas descritivas para as idades gestacional e corrigida do grupo de recém-nascidos a termo e prematuros70

Tabela 2- Comparação da latência dos componentes P1 e N1 para orelha direita e orelha esquerda entre o grupo de recém-nascidos a termo e prematuros71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alguns estudos de Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência em neonatos e crianças pequenas	33
---	----

LISTA DE REDUÇÕES

dB- Decibel

dBNA- Decibel nível de audição

dBNPS- Decibel nível de pressão sonora

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EROs- Espécies reativas de oxigênio

MN- Micronúcleos

MMN – Mismatch negativity

BN- Binucleada

PN- Ponte nucleoplasmática

BUDS- Buds nucleares

PEAs- Potenciais Evocados Auditivos

PEALL- Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência

RPM- Rotações por minuto

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	– Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	90
----------------	---	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	92
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos:	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Potenciais Evocados Auditivos	23
3.2 Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência	24
3.3 Características do estímulo gerador dos PEALL	25
3.4 Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência em recém-nascidos	27
3.5 Metabolismo oxidativo	34
3.6 Metabolismo oxidativo em recém-nascidos a termo e prematuros	39
4 METODOLOGIA GERAL	43
4.1 Delineamento da pesquisa	43
4.2 Considerações éticas	43
4.3 Amostra	43
4.4 Critérios de inclusão	44
4.5 Critérios de exclusão	44
4.6 Procedimentos	45
4.6.1 Triagem Auditiva Neonatal	45
4.6.2 Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência	46
4.6.3 Teste de Micronúcleos	47
4.6.4 Análise estatística	47
5 ARTIGO 1 GENOTOXICIDADE POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEOS EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PREMATUROS	49
6 ARTIGO 2 POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE LONGA LATÊNCIA EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PREMATUROS	63
7 DISCUSSÃO GERAL	78
8 CONCLUSÕES	81
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS	82
ANEXO I	90
APÊNDICE A	92

1 INTRODUÇÃO

O estudo da eletrofisiologia da audição tem sido destaque nos últimos anos, principalmente por se tratar de exames objetivos, nos quais pode-se mensurar os limiares eletrofisiológicos da audição, sendo muito utilizados na avaliação de recém-nascidos e de crianças pequenas que não cooperam nas avaliações comportamentais.

Os potenciais evocados auditivos (PEAs) fornecem informações sobre a audição e a condução neural ao longo das vias auditivas (JIANG et al., 2005), e permitem avaliar a atividade neuroelétrica até o córtex cerebral. São classificados em potências de curta, média e longa latência, dependendo do tempo em que as respostas são geradas após a apresentação do estímulo acústico (HOOD, 1998).

Até o momento, os exames eletrofisiológicos mais utilizados em recém-nascidos são os Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE) e o Potencial Evocado Auditivo de Estado Estável (PEAEE), os quais tem por principal objetivo a determinação dos limiares eletrofisiológicos.

Os limiares auditivos são de fundamental importância para o desenvolvimento linguístico, mas, além disso, a integridade e funcionamento adequado das estruturas centrais também merecem destaque no desenvolvimento infantil. Pensando nisso, alguns autores tem feito uso do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência (PEALL) para avaliar o processamento da informação auditiva.

Os Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência (PEALL) refletem a atividade elétrica desde o sistema auditivo periférico até as vias auditivas centrais, e tem como objetivo verificar o processamento da informação auditiva em nível cortical e em função do tempo (REIS; FRIZZO, 2011).

Fazem parte dos PEALL as ondas positivo 1 (P1), negativo 1 (N1), positivo 2 (P2), negativo 2 (N2) e positivo 3 (P3), sendo subdivididas em potenciais exógenos (P1, N1, P2, N2), os quais são influenciados pelas características físicas do estímulo, como intensidade, duração e frequência, e potencial endógeno (P3), influenciado predominantemente por eventos relacionados às habilidades cognitivas (DUARTE et al., 2009).

Alguns estudiosos referem que a habilidade de discriminação auditiva já pode ser mensurada ao nascimento por meio de avaliações eletrofisiológicas, já que essa

habilidade está presente no segundo trimestre de vida intra-uterina (CHEOUR; LEPPANEN, KRAUS, 2000).

A pesquisa dos PEALL em neonatos é um tema recente e controverso devido à maturação das estruturas corticais, mas alguns estudos já referem que esses potenciais podem ser evidenciados nessa faixa etária, sendo considerados indicadores do desenvolvimento cognitivo, principalmente em prematuros, os quais são de risco para alterações do processamento auditivo e de linguagem (KUSHNERENKO, 2003; FELLMAN et al., 2004; CHOUDHURY; BENASICH, 2010).

Os recém-nascidos prematuros também são vulneráveis à diversas doenças no período neonatal. Por conta disso, novos estudos na área de genotoxicidade permitiram identificar o metabolismo oxidativo dessa população, a qual é de risco para o desenvolvimento de alterações celulares. O metabolismo oxidativo pode ser avaliado por meio da pesquisa da genotoxicidade utilizando o Teste de Micronúcleos, o qual pode inferir indiretamente sobre os níveis de estresse oxidativo, já que concentrações elevadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) aumentam o número de alterações celulares.

O estresse oxidativo é definido como um aumento dos níveis fisiológicos das EROs, podendo causar destruição das membranas celulares. Essa condição é resultante da diminuição do sistema antioxidante, composto de enzimas e outras substâncias, ou da elevada produção das EROs (HARGRAVES; HENTALL, 2005).

O nascimento ocasiona um estresse oxidativo fisiológico, já que ocorre a transição do recém-nascido de um ambiente intrauterino, pobre em oxigênio, para o extrauterino, rico em oxigênio. Naturalmente, ocorre um aumento da produção de EROs e um desequilíbrio no sistema antioxidante, (GOMES; SAUNDERS; ACCIOL, 2005).

Os recém-nascidos a termo possuem um sistema de defesa antioxidante adequado para combater o estresse oxidativo fisiológico. Já os recém-nascidos pré-termo são vulneráveis às condições de estresse oxidativo, já que as concentrações antioxidantes só estão adequadas no final da gestação (ROBLES; PALOMINO; ROBLES, 2001). Além disso, o uso terapêutico do oxigênio nos prematuros e o uso de medicamentos pode aumentar os níveis de EROs e, conseqüentemente, acarretar em alterações celulares (BIANCHI; ANTUNES, 1999; ROBLES; PALOMINO; ROBLES, 2001).

A justificativa desse trabalho está centrada na necessidade de conhecer as características dos PEALL em neonatos a termo e prematuros e as possíveis alterações celulares decorrentes da prematuridade, visto que esse tema é pouco estudado nessa faixa etária.

É necessário ressaltar que a integridade e funcionalidade das vias auditivas centrais são fundamentais para o desenvolvimento das habilidades auditivas, as quais vão proporcionar à criança o aprendizado da linguagem e, conseqüentemente, os aprendizados futuros que dependem da mesma. Além disso, o biomonitoramento dos recém-nascidos prematuros também é fundamental, podendo predizer sobre diversas doenças no período neonatal.

Sendo assim, este estudo teve por finalidade o estudo dos PEALL e do metabolismo oxidativo em recém-nascidos a termo e prematuros.

Essa dissertação foi desenvolvida no modelo alternativo subdividindo-se nos seguintes capítulos: Introdução, Objetivos, Metodologia geral, Revisão de literatura, Artigo de pesquisa 1, Artigo de pesquisa 2, Discussão geral e Conclusões.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar e comparar as características dos Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência em recém-nascidos a termo e prematuros, assim como verificar o metabolismo oxidativo dessas populações.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar a presença/ausência das ondas P1, N1, P2 e N2 em recém-nascidos a termo e prematuros.
- Analisar as latências das ondas P1, N1, P2 e N2 dos PEALL em recém-nascidos a termo e prematuros.
- Analisar o metabolismo oxidativo em recém-nascidos a termo e prematuros.
- Comparar os resultados da avaliação dos PEALL entre recém-nascidos a termo e prematuros.
- Comparar o metabolismo oxidativo entre recém-nascidos a termo e prematuros.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Potenciais Evocados Auditivos

Em 1939 Davis e colaboradores (apud MATAS; MAGLIARO, 2011) descreveram pela primeira vez alterações no encefalograma geradas por estímulos auditivos. Essas respostas eram de baixa amplitude e apareciam misturadas às atividades elétricas do próprio encefalograma, o que dificultava a análise das respostas.

Em 1958, Clark desenvolveu o computador de respostas mediadas, o qual melhorou a relação das respostas auditivas com o ruído da atividade cerebral permitindo grande avanço na eletrofisiologia da audição (apud SOUZA et al., 2008).

Os potenciais evocados auditivos podem ser classificados de acordo com a latência, origem anatômica, relação entre estímulo e resposta (transitória/contínua versus endógena/exógena) e o posicionamento dos eletrodos (campo próximo ou distante) (GOLDSTEIN et al., 1979).

Hood (1998) define potencial evocado como uma resposta complexa de estimulação externa, representando a atividade neural de diferentes lugares do sistema nervoso.

A classificação mais utilizada é referente à latência, ou seja, o tempo necessário para o estímulo auditivo gerar a atividade neuroelétrica, sendo que quanto mais próximo da periferia estiver a fonte geradora da atividade bioelétrica, menor será o tempo de resposta. De acordo com esse parâmetro, os potenciais podem ser divididos em: potenciais de curta latência, os quais surgem nos primeiros 10 a 12 ms, potenciais de média latência, os quais ocorrem entre 12 e 50 ms, e os potenciais de longa latência, os quais surgem entre 50 e 600 ms (PICTON et al., 1974 apud MATAS; MAGLIARO, 2011).

3.2 Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência

Para Hall (1990) os potenciais de longa latência apresentam múltiplos geradores, como formação reticular, lemnisco, colículo inferior, tálamo, córtex primário, córtex frontal, córtex centro parietal, córtex temporal e hipocampo.

Os potenciais corticais são divididos em exógenos e endógenos. Os potenciais exógenos são obtidos por meio de um estímulo acústico repetitivo, e representam a capacidade do córtex auditivo em detectar o estímulo. Em adultos os componentes exógenos geralmente ocorrem entre 100 e 200ms após a apresentação do estímulo e são influenciados pela frequência, intensidade e duração do estímulo acústico. São representados pelas ondas P1, N1, P2 e N2. Já o potencial endógeno (P3) ocorre após 100-200 ms e refletem a atividade mental e intencional para detecção dos estímulos raros em uma série de estímulos frequentes (NAATANEN, 1992).

Kraus e McGee (1994) acrescentam que os potenciais de longa latência envolvem a participação de estruturas corticais como o córtex frontal, centroparietal e córtex auditivo.

Molfese e Molfese (1997) referem que os potenciais corticais são úteis para predizer sobre possíveis alterações cognitivas. Os autores estudaram crianças com risco para alterações de linguagem e verificaram que as crianças com potenciais corticais alterados durante o período neonatal desenvolveram alterações linguísticas.

Segundo Groenen et al (2001) o componente P3 é eliciado quando um estímulo raro ocorre dentro de uma série de estímulos esperados, o qual é decorrente da discriminação do indivíduo sobre o estímulo raro. Os componentes exógenos P1, N1, P2, N2 não dependem da atenção aos estímulos acústicos, enquanto que o componente endógeno P3 depende da discriminação do indivíduo ao estímulo raro. Segundo os autores a amplitude do P3 é maior do que os demais componentes, e depende de habilidades como atenção, discriminação e memória, representando a atividade cortical.

Para Kraus e Mcgee (2002) a latência do componente N1 está entre 80 e 250 ms, de P2 por volta de 200 ms, de N2 entre 200 e 400 ms, e de P3 entre 250 e 350 ms em indivíduos adultos.

Sobre os sítios geradores específicos dos componentes exógenos, acredita-se que o componente P1 seja originado no giro de *Heschl* ou na área de associação auditiva secundária, o N1 no lobo frontal, embora as áreas de geração desse componente não sejam claras, o P2 no giro temporal superior anterior e o N2 próximo a regiões supratemporais, incluindo córtex frontal (KUSHNERENKO, 2003).

Ventura, Alvarenga e Filho (2009) definem os PEALL como uma série de mudanças elétricas que ocorrem no sistema nervoso central, a qual é decorrente da estimulação da via auditiva. Esses potenciais possuem múltiplos geradores, envolvendo as vias auditivas tálamo-corticais e córtico-corticais, córtex auditivo primário e áreas corticais associativas. Os PEALL são representados por uma série de picos positivos e negativos, que incluem os componentes P1, N1, P2, N2 e P3.

Choudhury e Benasich (2010) referem que os PEALL podem ser visualizados em bebês, sendo que os valores de latência dos componentes encontram-se aumentados quando comparados com indivíduos adultos. Os autores destacam os seguintes valores de latência para bebês de seis meses: P1 ao redor de 160 ms, N1 ao redor de 260 ms, P2 ao redor de 331 ms e N2 ao redor de 450 ms.

Massa et al (2011) acrescentam que os PEALL consistem em uma série de picos positivos e negativos que ocorrem acima de 50 ms após o início do estímulo, podendo ser utilizados para investigação dos mecanismos neurais do córtex auditivo.

3.3 Características do estímulo gerador dos PEALL

3.3.1 Tipo de estímulo

Quanto ao tipo de estímulo utilizado para avaliação dos PEALL, utilizam-se, rotineiramente, tons puros (*tone burst*). Porém, uma série de diferentes estímulos,

como contrastes de vogais, de sílabas, palavras e até mesmo sentenças podem ser utilizados para evocar esses potenciais (GROENEN et al., 2001; KORCZAK; KURTZBERG; STAPPELLS, 2005) sendo que os estímulos complexos de fala são ideais para o estudo das bases neurais da detecção e discriminação da mesma (KRAUS; NICOL, 2003).

3.3.2 Intensidade do estímulo

Os PEALL são influenciados pela intensidade, sendo que quanto maior a intensidade menor são as latências e maior a amplitude dos componentes (PICTON; HILLYARD; GALAMBOS, 1976).

O maior aumento da amplitude acontece entre 20 e 30 dB acima do limiar e se estabiliza ao redor de 75 dB (HALL, 2006).

3.3.3 Velocidade do estímulo

A velocidade de apresentação do estímulo produz pouca alteração na latência e na amplitude das ondas dos PEALL. Porém, a amplitude dos componentes P1, N1, P2, pode aumentar conforme diminui a taxa de estimulação (MARTIN; TREMBLAY; STAPPELLS, 2007).

A taxa de estimulação recomendada é em torno de 0,5 a 2,9 estímulos por segundo. Valores acima de 2,9 estímulos por segundo diminuem a amplitude dos potenciais (MCPHERSON; BALLACHANDA; KAF, 2008).

3.3.4 Probabilidade do número de estímulos

Hall (2006) refere que em geral 20 estímulos raros são necessários para eliciar as respostas dos PEALL, mais especificamente do P3. Os estímulos devem

ser apresentados de forma aleatória, sendo que 15 a 20% dos estímulos apresentados devem ser raros e de 75 a 80% devem ser frequentes, sendo esses últimos os que eliciam os componentes P1, N1, P2 e N2.

3.4 Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência em recém-nascidos

Os PEALL em recém-nascidos e crianças jovens não tem semelhança com os potenciais corticais obtidos em adultos. Novak et al. (1989) referem que os componentes P1, N1, P2 e N2 podem ser visualizados durante o primeiro ano de vida. Os autores avaliaram a maturação dos potenciais corticais utilizando estímulos de fala em crianças recém-nascidas até os seis meses de idade. Verificaram que o complexo P2-N2, obtido logo ao nascimento, mudou suas características aos três meses de idade. O componente N1, o qual foi obtido entre 160 e 200 ms, foi visível aos seis meses de idade. Durante os seis meses foi verificada diminuição da latência e aumento da amplitude para os componentes P1 e P2, evidenciando a maturação das estruturas centrais.

Courchesne (1990) refere que os componentes P50, N100 e P200 (denominados de acordo com a latência) não são facilmente identificados em crianças com idade inferior a dez anos. Outros estudos referem que em crianças esses potenciais são referidos como P100, N250 e P450, sendo sua denominação de acordo com o tempo em que surgem (KORPILAHTI; LANG, 1994, CEPONIENÉ et al., 2001).

Vaughan e Kurtzberg (1992) referem que os potenciais acima de 200 ms variam muito mais em amplitude e latência quando comparados com os mais precoces. Ressaltam também que a amplitude dos potenciais é proporcional à magnitude das sinapses.

Pasman et al. (1992) estudaram os potenciais evocados auditivos de 33 neonatos nascidos a termo, com mais de 39 semanas de idade gestacional, 40 prematuros, entre 27 e 34 semanas de gestação. Todos os neonatos foram avaliados quando completaram 40 semanas de idade gestacional e após três meses da primeira avaliação. Os potenciais N1, P2 e N2 foram pesquisados nos lactentes

de 40 a 52 semanas de idade gestacional e o componente P3 nos lactentes de 52 semanas. Verificaram diferenças na latência, amplitude e morfologia dos componentes entre o grupo de prematuros e a termo. A morfologia dos componentes foi melhor evidenciada nos lactentes a termo nos dois momentos de avaliação. Sobre a latência, aos três meses de idade os prematuros apresentaram valores superiores, para a maioria dos componentes, quando comparados com os lactentes a termo (tabela 1).

Tabela 1. Valores das latências dos PEALL em neonatos a termo e prematuros com 40 semanas de idade gestacional e com três meses de idade

	40 semanas de idade gestacional		Três meses de idade	
	Termos	Prematuros	Termos	Prematuros
	Média da latência (ms)	Média da latência (ms)	Média da latência (ms)	Média da latência (ms)
N1	140	128	115	119
P2	209	187	174	191
N2	344	347	294	292
P3	Não analisado	Não analisado	375	389

Fonte: dados publicados por Pasman et al., 1992

Cheour, Leppanen, Kraus (2000) afirmam que a habilidade de discriminação da informação acústica já está presente a partir do segundo trimestre de vida intrauterina, sendo que esta capacidade pode ser mensurada por avaliações eletrofisiológicas no nascimento, inclusive os potenciais corticais. Os autores referem que os potenciais evocados podem ser obtidos em neonatos durante o sono ativo, sendo que a morfologia das ondas é semelhante ao estado de vigília, tornando o exame útil, sem qualquer necessidade de resposta da criança.

Embora a maturação das estruturas corticais seja incompleta nos primeiros anos de vida, as maiores modificações em relação ao número de sinapses, ocorrem durante os dois primeiros anos de vida, e se estendem até a adolescência (JOHNSON, 2001).

Kushnerenko et al. (2002) afirmam que os PEALL em neonatos apresentam características diferentes quando comparados com indivíduos adultos, embora já

possam ser visualizados logo nos primeiros dias de vida. Os autores avaliaram os PEALL em 15 recém-nascidos a termo dos 2-4 dias até os 12 meses, com intervalos de três meses entre as avaliações. Os estímulos foram apresentados por meio de alto-falantes na intensidade de 70 dBNPS. Para realização do exame, os recém-nascidos permaneceram em sono natural e os neonatos maiores em vigília. Nos recém-nascidos de 2-4 dias observou-se as ondas P150, N250, P350 e N450, nomeadas de acordo com a latência. O estudo mostrou que a amplitude do P150, N250 e N450 aumentou progressivamente ao longo das avaliações. A latência do P150 e N450 diminuiu conforme a maturação, e do componente N250 permaneceu estável. O P350 mostrou um aumento da amplitude entre o nascimento e o terceiro mês de vida, e um decréscimo entre seis e 12 meses. Os valores de latência do P350 permaneceram estáveis ao longo das avaliações. Os autores sugerem que os componentes dos PEALL apresentam diferentes características no processo maturacional.

Ceponiene, Rinne e Naatanen (2002) também afirmam que as características dos PEALL são diferentes em crianças e adultos. Os autores compararam as respostas dos potenciais P1 e N2 em crianças de quatro e nove anos de idade com adultos entre 18 e 39 anos. Os estímulos foram apresentados por alto-falantes, numa intensidade de aproximadamente 65 dBNPS. Para pesquisa dos componentes de longa latência os participantes foram orientados a ignorar os estímulos, enquanto eram distraídos por um vídeo. Os pesquisadores relataram que a amplitude do P1 e N2 foi menor nos adultos quando comparados com as crianças de quatro e nove anos. As latências dos componentes P1 e N2 diminuíram apenas entre a faixa etária dos nove anos até a idade adulta. Não foram encontradas diferenças entre as latências de P1 e N2 do grupo de quatro a nove anos.

Para Kushnerenko (2003), em neonatos com menos de um mês de idade os componentes predominantes no traçado dos potenciais corticais são o P2 e N2, podendo o componente P1 estar presente em alguns neonatos ao redor de 60 a 80 ms, seguido do componente N1. Os autores avaliaram 15 neonatos desde os primeiros dias de vida até os 12 meses com intervalos de três meses entre cada avaliação. Verificaram que os potenciais verificados aos 12 meses já estavam presentes ao nascimento. Entre o primeiro e terceiro mês a principal mudança que evidenciou a maturação foi o crescimento da amplitude dos componentes P150 e P350. Dos três aos seis meses o componente N250 ficou mais robusto. Dos seis aos

12 meses a maturação ficou evidente pela melhora da morfologia dos componentes N250 e N450, acompanhada pela diminuição da amplitude do P350. A latência do P350 diminuiu dos três aos seis meses e dos seis aos nove meses. Já a latência do N250 permaneceu estável entre 230-270 ms, enquanto que a latência do N450 diminuiu ao longo do estudo. Ao longo da maturação, ocorre uma melhor definição dos picos dos potenciais e aumento da amplitude. Apesar da visualização desses potenciais, os autores referem que no nascimento os PEALL são predominantemente caracterizados por um pico positivo ao redor de 300ms, seguido de uma pequena deflexão entre 450-600ms, os quais são representados pelos componentes P2, N2, respectivamente. Contudo, ressaltam que a denominação desses potenciais em neonatos pode não ser a mesma dos adultos, sendo variável na literatura.

Fellman et al. (2004) referiram que os potenciais evocados auditivos podem ser utilizados precocemente como um indicador do desenvolvimento cognitivo em prematuros. Para isso, estudaram os PEALL em neonatos prematuros pequenos para idade gestacional, adequados para idade gestacional e bebês a termo. Os prematuros foram avaliados com 40 semanas de idade gestacional, aos seis e aos 12 meses de idade corrigida, e os bebês a termo avaliados com dois a quatro dias, com três, seis, nove, 12 e 15 meses de idade. Os autores identificaram os componentes P1 e P3 com latências semelhantes no grupo de prematuros avaliados com 40 semanas de idade pós-concepcional e no grupo dos bebês a termo avaliados entre 2 a 4 dias de vida, sendo que a latência de P1 ficou entre 150 a 250 ms e P3 entre 250 e 350 ms em ambos os grupos. Já o componente N250 foi observado apenas nos bebês a termo e nos prematuros adequados para a idade gestacional entre seis e nove meses de idade. Os estudiosos compararam os bebês prematuros com 40 semanas de idade pós-concepcional com os bebês a termo com 2-4 dias e verificaram que o P3 foi similar no grupo dos prematuros e a termo. Contudo, quando avaliados com três meses de idade, a amplitude desse componente foi menor no grupo dos prematuros quando comparados com o grupo controle. Já as características do componente P1 foi similar em ambos os grupos aos três meses. Os autores referem que a prematuridade associada com ausência dos potenciais pode ser um fator de risco para futuras alterações cognitivas.

Wunderlich, Cone-Wesson e Shepherd (2006) avaliaram os PEALL com estímulos de fala e *tone burst* em 49 crianças, desde os dois dias de vida até os seis

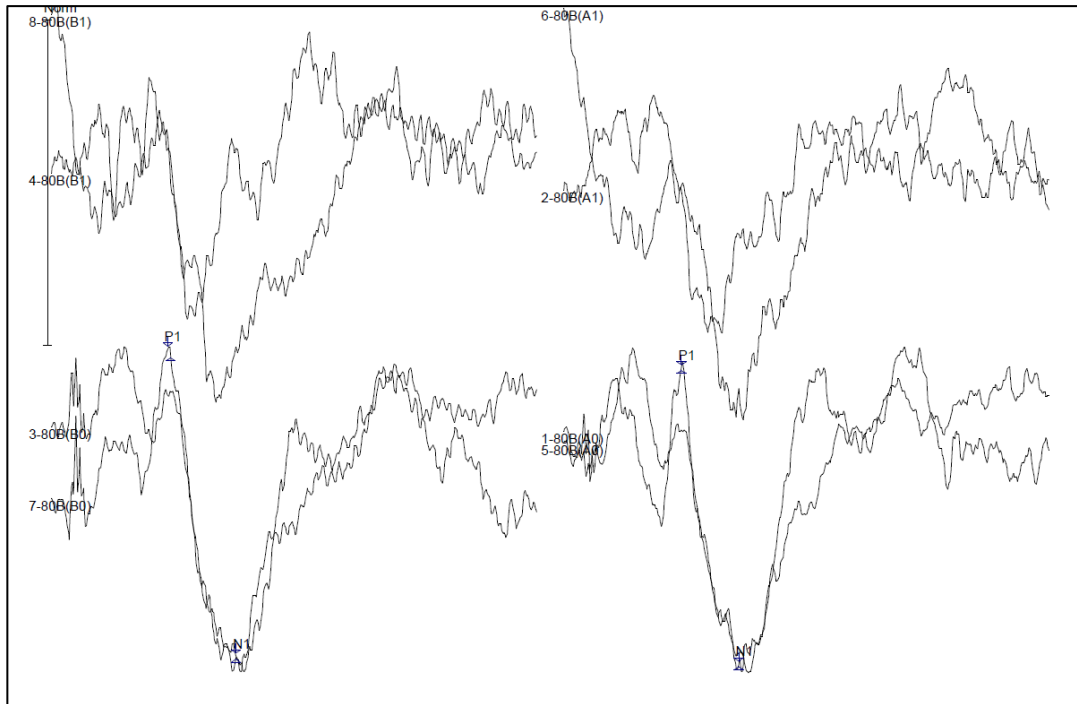
anos de idade e compararam as respostas com indivíduos adultos. Os recém-nascidos permaneceram em sono natural e as crianças maiores e adultos assistindo um vídeo. Para os recém-nascidos evidenciaram predominantemente o componente P2 ao redor de 250ms e N2 ao redor de 400 a 500ms. Os autores relataram que as latências dos PEALL são relativamente estáveis do nascimento até os seis anos, sendo que decrescem em indivíduos adultos por conta da maturação. Demonstraram também que os estímulos de fala evocam melhores respostas nos recém nascidos, não sendo tão significativo nas outras faixas etárias.

Ventura, Alvarenga e Filho (2009) estudaram o processo maturacional nos PEALL N1, P1 e P2 em 56 indivíduos de ambos os sexos, sendo 46 da faixa etária entre três a 12 anos, e 10 adultos entre 20 e aproximadamente 30 anos de idade. Verificaram que a maturação das estruturas melhorou a morfologia e diminuiu as latências dos componentes N1, P1 e P2. A amplitude do componente P1 diminuiu com o avanço da idade, e a amplitude dos componentes N1 e P2 não sofreu modificação.

Por conta da escassez de trabalhos com PEALL durante a infância, Choudhury e Benasich (2010) estudaram a maturação dos PEALL em crianças de seis a 48 meses de idade, sem e com risco para desenvolvimento de alterações de linguagem. Descreveram o desenvolvimento dos potenciais P1, N1, P2 e N2, os quais estão relacionados apenas com a percepção auditiva, e o potencial MMN, o qual está relacionado com a discriminação. Observaram que os potenciais P1, N1, P2 e N2 estavam presentes aos seis meses, em ambos os grupos, com latências de aproximadamente 160, 260, 331 e 450 ms. Os autores verificaram que conforme ocorre a mielinização e melhora da eficiência sináptica das estruturas centrais, as latências diminuíram e as amplitudes aumentaram dos seis aos 48 meses, em ambos os grupos. Na comparação entre os grupos das diferentes faixas etárias, os autores encontraram diferenças nas respostas dos componentes N2 e MMN no referente à maturação e as habilidades de processamento temporal entre os hemisférios.

A figura 1. Ilustra um exemplo das respostas dos PEALL na intensidade de 80 dBNA no equipamento *Intelligent Hearing Systems* (IHS) em um recém-nascido. Os traçados superiores correspondem ao estímulo raro, o qual não foi analisado nesse estudo, e os inferiores aos estímulos frequentes, os quais eliciaram os componentes exógenos (analisados neste estudo).

Figura 1. Respostas dos PEALL em um recém-nascido da pesquisa na intensidade de 80dBNA no equipamento *Intelligent Hearing Systems* (IHS).



Autores	Idade dos indivíduos avaliados	Ondas pesquisadas #	Latências encontradas	Posicionamento de eletrodos	Tipo de estímulo	Intensidade
Pasman et al. (1992)	Neonatos a termo e prematuros com 40 semanas de idade gestacional (IG) e com três meses	N1, P2, N2, P3	Termos e prematuros com 40 semanas de IG: N1: 140ms, P2: 209ms, N2: 344ms; N1: 128ms, P2: 187ms, N2: 347 ms, respectivamente. Termos e prematuros com três meses: N1: 115ms, P2: 174ms, N2: 294ms, P3: 375; N1: 119ms, P2: 191ms, N2: 292 ms, P3: 389ms, respectivamente	Cz, C4', C3', A2, A1, Fz	*	70 dBNPS
Kushnerenko et al. (2002)	Recém-nascidos a termo dos 2-4 dias até os 12 meses	P150, N250, P350 e N450	P150 (150ms), N250 (250ms), (350ms) e N450 (450ms). A latência do P150 e N450 diminuiu conforme a maturação, e do componente N250 e P350 permaneceram estáveis	F3, F4, C3, C4, P3, P4, T3, e T4	Tons de 500, 625 e 750Hz	70 dBNPS
Kushnerenko (2003)	Neonatos desde os primeiros dias de vida até os 12 meses	P150, N250, P350, N450	Neonatos recém-nascidos e aos 12 meses apresentaram os mesmos potenciais: P150 (150ms), N250 (250ms), P350 (350ms) e N450 (450ms). Contudo o que predomina nos recém-nascidos é um pico positivo ao redor de 300ms e uma deflexão entre 450-600ms (poderiam ser os potenciais P2 e N2 do adulto)	F3, F4, C3, C4, Cz, T3, T4, P3, P4	Tons de 500, 1000 e 1500Hz	70 dBNPS
Fellman et al. (2004)	Prematuros pequenos para idade gestacional avaliados em diferentes faixas etárias (até os 15 meses de idade)	P150, N250, P350	P150 (150 a 250 ms), N250 (250ms) (observado apenas entre seis e nove meses), P350 (250 a 350 ms) em ambos os grupos	F3, F4, C3, C4, P3, P4, T3 e T4	Tons 500 e 750Hz	70dBNPS
Wunderlich, Cone-Wesson e Shepherd (2006)	Dois dias de vida até os seis anos de idade	P2, N2	P2 (250ms) e N2 (400 a 500ms) (potenciais estáveis do nascimento aos seis anos).	Fz, Cz, Pz, C4, T4, C3, T3	Estímulos de fala (/bad/)e <i>tone burst</i> (400 e 3000Hz)	400Hz: 75dBNPS 3000Hz: 71dBNPS Fala: 85dBNPS
Choudhury e Benasich (2010)	Crianças de seis a 48 meses de idade sem e com risco para desenvolvimento de alterações de linguagem	P1, N1, P2 e N2	P1 (160ms), N1(260ms) P2 (331ms) e N2 (450ms) presentes a partir dos seis meses, em ambos os grupos. Diminuição das latências de acordo com a maturação	F3, F4, Fc3, Fcz, Fc4, C3, Cz e C4.	Tons complexos com frequências fundamentais entre 100 e 300Hz.	75 dBNPS

Quadro 1 - Alguns estudos de PEALL em neonatos e crianças pequenas

#Potenciais nomeados de acordo com as latências; *Não informado pelos autores

3.4.1 Estado do recém-nascido durante o exame

O estado dos neonatos durante o exame (sono ativo ou vigília) ainda é questão de debate na literatura, já que alguns estudos avaliaram os neonatos durante o sono ativo, outros com as crianças acordadas, e outros nas duas formas. Porém, autores como Kushnerenko (2003) referem não existir diferenças no traçado dos componentes dos potenciais corticais nas duas formas de avaliação.

O sono ativo faz parte do sono REM, e é definido como o estado em que o neonato está de olhos fechados, com respiração irregular e sem movimentos grosseiros. Este estado de sono pode ser identificado com observação do comportamento do neonato (KHAN; RAYA; NUNES, 2009).

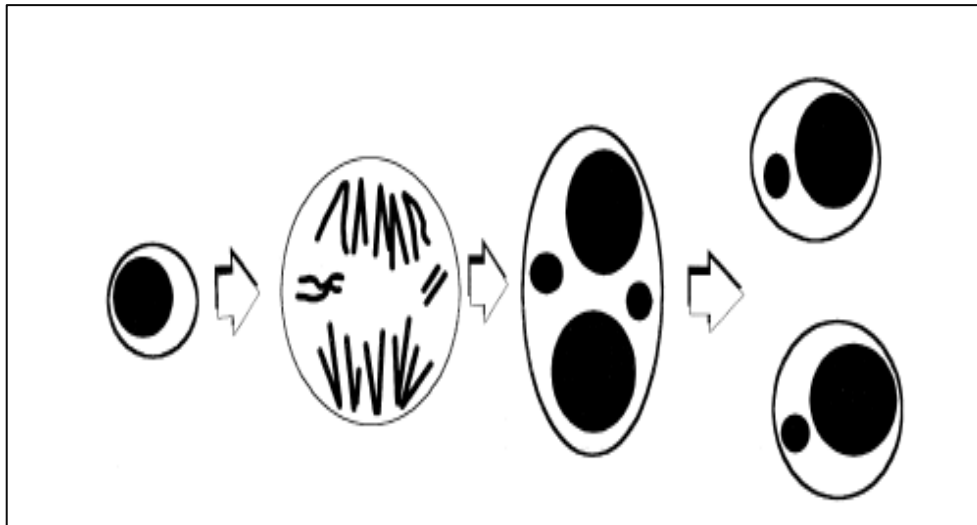
3.5 Metabolismo oxidativo

O teste de micronúcleos (MN) foi descrito pela primeira vez em 1973 por Heddle, em células da medula óssea de camundongos. Em 1976, Countryman e Heddle mostraram a possibilidade de se medir os danos cromossômicos através dos linfócitos do sangue periférico humano.

Freman e Crapo (1982) referiram que as reações de oxidação desempenham um importante papel nos processos biológicos do nosso organismo, mas podem ser lesivas às células, rompendo com a membrana lipoprotéica das células, destruindo as funções enzimáticas celulares e alterando o DNA, levando à morte celular.

Os micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros visíveis no citoplasma das células, que por não se ligaram às fibras do fuso no processo de divisão celular, acabam não sendo incluídas no núcleo das células filhas (Heddle et al.; 1983) (figura 2).

Figura 2. Formação de micronúcleos.



Fonte: Fenech et al. (1999)

Cross et al. (1987) afirmam que cerca de 95% do oxigênio do nosso organismo é consumido pelas mitocôndrias das células, a fim de gerar energia e água. Os restantes 5% são metabolizados como espécies reativas de oxigênio, chamados de radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila.

Heffner e Repine (1989) relatam que o organismo possui um sistema de defesa antioxidante composto por enzimas como o superóxido, dismutase, catalase e glutatona peroxidase, e um sistema não-enzimático, sendo composto por vitaminas E, C, ácido úrico e bilirrubina.

Para Friel et al. (1993) os prematuros podem apresentar maior susceptibilidade dos micronúcleos ao estresse oxidativo, devido à imaturidade do sistema antioxidante ocasionado pela curta gestação

Ferreira e Matsubara (1997) definem radical livre como um átomo ou molécula altamente reativa e que possui número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, sendo que o não emparelhamento de elétrons na última camada é o que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas.

Yoshie (1997) refere que em adultos e crianças saudáveis o número de micronúcleos é praticamente zero. Contudo, alguns fatores, considerados tóxicos

para as células, como os medicamentos, podem aumentar o número de micronúcleos.

Para Fenech (1998) o teste de micronúcleos permite identificar eventual aumento na frequência de mutação em células que são expostas à agentes genotóxicos, sendo capaz de expressar os danos citogenéticos, ou seja, referente ao material genético, DNA, da célula.

Bianchi e Antunes (1999) destacam que além das espécies reativas serem formadas por mecanismos endógenos, fatores exógenos como ozônio, radiações gama e ultra-violeta, os medicamentos, tabagismo, alimentação, entre outros, também contribuem para o desencadeamento de estresse oxidativo.

O estudo dos MN tem sido utilizado não apenas para verificar dano no DNA, mas também para verificar o potencial genotóxico de algumas substâncias. Em organismos saudáveis a quantidade de células com micronúcleos varia de 1 a 3 em cada 1000 células. A idade e gênero são as principais variáveis que afetam os micronúcleos, e em geral a quantidade de micronúcleos é maior nas mulheres quando comparadas com os homens (Fenech et al., 1999).

Polidori, Caro e Massi (2000) referem que os radicais livres são importantes para o organismo, pois eles agem como um sistema de defesa, quando, por exemplo, as células são agredidas por algum agente estressor e acabam produzindo radicais livres para combater estes agentes.

Garaj-Vrhova e Zeljezic (2002) relatam que o teste de MN apresenta algumas vantagens quando comparados com outros testes citogenéticos, tais como baixo custo, rapidez de análise para triagem, é capaz de avaliar as diferentes fases de danos causados por drogas e apresenta reprodutibilidade satisfatória.

Scandalios et al. (2005) afirmam que as EROs são produzidas em todos organismos aeróbicos, e existem nas células em equilíbrio com o sistema antioxidante. Quando esse equilíbrio é interrompido, desencadeia-se o estresse oxidativo, devido a depleção de antioxidantes ou ao acúmulo de EROs, levando ao dano celular e ocasionando disfunção fisiológica e morte das células. Os autores acrescentam que o sistema enzimático antioxidante protege o organismo contra radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, convertendo-os em espécies menos reativas.

Para Barreiros, David e David (2006) a oxidação faz parte do metabolismo de seres aeróbicos, sendo que os radicais livres são produzidos naturalmente ou por

alguma disfunção biológica. Esses radicais livres, são denominados EROs, já que o elétron desemparelhado encontra-se centrado nesses átomos. O excesso de radicais livres é combatido pelo sistema antioxidante, sendo composto por enzimas ou por moléculas, as quais são produzidas pelo organismo ou absorvido pela dieta. Segundos os autores, antioxidante é uma substância capaz de diminuir ou inibir a oxidação mesmo presente em baixas concentrações em relação ao seu substrato.

Kern (2006) refere que as duas principais técnicas de análise dos MN são por meio dos linfócitos sanguíneos ou por meio de células epiteliais descamadas. As células epiteliais possuem um grande potencial para biomonitoramento de humanos expostas à agentes genotóxicos, já que sua coleta é extremamente fácil. A mucosa epitelial da boca, nariz e da bexiga são exemplos de regiões em que as células podem ser coletadas. A coleta é realizada de forma não-invasiva com o auxílio de uma pequena escova de cerdas macias (*cytobrush*), que é levemente friccionada na região da coleta.

Para Margarita et al (2006) o teste de micronúcleos detecta danos no DNA, que em algumas patologias aumentam o número de eritrócitos micronucleados devido à produção de radicais livres. Os autores compararam a quantidade de micronúcleos de recém-nascidos prematuros cujas mães tiveram alguma doença gestacional com recém-nascidos de mães sem intercorrências durante a gestação. Os resultados mostraram que a quantidade de micronúcleos foi maior nos prematuros de mães com alguma doença gestacional. Os autores referem que esse aumento está relacionado com o estresse oxidativo causado pelas doenças.

Para Vasconcelos et al. (2007) o estresse oxidativo causa desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante. O dano às células resulta do ataque das EROs sobre as macromoléculas, tais como açúcares, DNA, proteínas e lipídeos.

Para Csiszar et al. (2009), as células do corpo humano dependem de um fornecimento adequado de oxigênio e nutrientes para manterem sua função, tendo como consequência a produção de energia para que o organismo execute suas atividades metabólicas. A cadeia respiratória mitocondrial é responsável por essa produção de energia. Contudo, cerca de 5% do oxigênio que é inspirado ao invés de ser utilizado na produção de energia, gera espécies ativas de oxigênio, os chamados radicais livres. Essas moléculas são reativas com outras moléculas e podem causar diversos danos fisiológicos e doenças caso não sejam controladas.

O teste de micronúcleos pode identificar danos no DNA das células, podendo ser um aviso precoce de possíveis problemas futuros de saúde (CORRÊA et al., 2009).

Em recém-nascidos e crianças pequenas o teste de MN também pode ser empregado como uma técnica de avaliação de danos genotóxicos, devido a sua confiabilidade. Alguns fatores como exposição ao tabaco, radiação iônica, quimioterapia e radioterapia aumentam a taxa de MN (HOLLAND et al., 2011).

Na análise das células, podemos encontrar alterações distintas, como os micronúcleos, as células binucleadas, as pontes nucleoplasmáticas e os *buds* nucleares (PALAZZO; MALUF, 2011).

3.5.1 Células com micronúcleos

Alguns critérios para análise dos micronúcleos devem ser seguidos, tais como: o diâmetro geralmente varia entre 1/16 e 1/3 do núcleo principal, tem formato oval ou redondo, não apresentam conexão com o núcleo principal, podem estar ao lado do núcleo principal, sem haver sobreposição, a coloração é igual a do núcleo principal (FENECH, 2000).

Os micronúcleos são formados a partir de fragmentos de cromossomos ou de cromossomos inteiros que foram perdidos durante a anáfase da divisão celular. São formados por falhas no fuso acromático, por danos nas subestruturas cromossômicas, por alterações na fisiologia celular e alterações mecânicas (PALAZZO; MALUF, 2011).

3.5.2 Células binucleadas

De acordo com Fenech et al. (1999) para se considerar uma célula binucleada os dois núcleos devem estar situados no mesmo limite do citoplasma, as membranas nucleares devem estar intactas, o tamanho dos núcleos devem ser semelhantes, a coloração dos núcleos deve ser igual, e os dois núcleos podem estar

em contato, devendo ser considerada apenas se o limite de cada núcleo for distinguível.

3.5.3 Pontes nucleoplasmáticas

Devem ser consideradas quando: for de espessura fina, não devendo ultrapassar a espessura de $\frac{1}{4}$ do diâmetro do núcleo e devem apresentar a mesma coloração do núcleo da célula (FENECH et al., 1999). Uma célula binucleada, com pontes nucleoplasmáticas também pode apresentar micronúcleos (FENECH, 2000).

As pontes nucleoplasmáticas ocorrem quando os centrômeros de cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são tracionados para os polos opostos da célula durante a divisão celular (PALAZZO; MALUF, 2011).

3.5.4 *Buds* nucleares

Os *buds* apresentam os mesmos critérios de análise dos micronúcleos, contudo são conectados ao núcleo por uma conexão nucleoplasmática (FENECH et al., 1999).

Os *buds* são morfologicamente similares aos micronúcleos, porém a conexão nucleoplasmática se liga ao núcleo, podendo ser espessa ou fina. Podem ser observados em células normais, contudo são mais raros do que os micronúcleos (PALAZZO; MALUF, 2011).

3.6 Metabolismo oxidativo em recém-nascidos a termo e prematuros

Frank e Groseclosed (1984) relatam que o recém-nascido prematuro, além de estar exposto à maior produção de radicais livres, não apresenta seu sistema de

defesa antioxidante totalmente desenvolvido no nascimento. Em estudos com animais, os autores observaram um aumento progressivo na atividade das enzimas antioxidantes no final da gestação, e relataram que o nascimento prematuro pode provocar falhas na formação do sistema antioxidante.

Sullivan e Newton (1988) avaliaram a atividade antioxidante de recém-nascidos a termo e prematuros. Observaram baixa concentração de antioxidantes em recém-nascidos, principalmente nos prematuros.

Para Schlenzig et al. (1993) o estresse oxidativo atua como mecanismo patogênico em diversas doenças no período neonatal, como asfixia perinatal, displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, enterite necrosante, hemorragia intracraniana, hipertensão arterial, entre outras.

Rodrigues (1998) atenta para o uso de oxigênio no período neonatal, que embora seja necessário para sobrevivência de alguns neonatos, pode ser potencialmente tóxico para diversos tecidos e órgãos do organismo. Nesses casos o organismo do neonato precisa desenvolver o sistema antioxidante para combater a citotoxicidade do uso de oxigênio. O autor sugere também que a deficiência enzimática nos primeiros dias de vida pode estar envolvida na destruição dos eritrócitos.

Para Ortiz (2000) a formação de estresse oxidativo está envolvida na ação de muitos medicamentos, causando quebras no DNA e, conseqüentemente aumento dos micronúcleos.

Robles, Palomino e Robles (2001) afirmam que o nascimento ocasiona um estresse oxidativo que resulta em redução da capacidade antioxidante, levando a um aumento da produção de radicais livres. Os recém-nascidos a termo possuem um sistema antioxidante capaz de resistir ao estresse fisiológico. Contudo, os recém-nascidos pré-termo são vulneráveis às condições de estresse oxidativo, já que as concentrações antioxidantes só estão adequadas no final da gestação. Além disso, o uso terapêutico de oxigênio contribui para o aumento dos radicais livres. Os autores estudaram o estado de oxidação de dez recém-nascidos prematuros e dez a termo, no momento do nascimento e durante os primeiros dias de vida. Verificaram que ao nascimento os marcadores de estresse oxidativo estavam elevados em todos os recém-nascidos, e que o sistema de defesa antioxidante era menor nos neonatos prematuros quando comparados com os a termo. Os estudiosos relatam também que o nível de estresse oxidativo é maior conforme diminui a idade gestacional.

Zúñiga-González (2001) afirmam que em recém-nascidos o sistema retículo endotelial remove os eritrócitos micronucleados livres na circulação. Porém, nos prematuros esse sistema não é tão eficiente, o que acarreta aumento de micronúcleos.

Gomes, Sauders e Accioly (2005) relatam que o próprio nascimento ocasiona um estresse oxidativo fisiológico, já que ocorre a transição do recém-nascido de um ambiente intrauterino, pobre em oxigênio, para o extrauterino, rico em oxigênio. Naturalmente, ocorre um aumento da produção de EROs e um desequilíbrio no sistema antioxidante.

Tsopmo e Friel (2007) também relatam que os prematuros são vulneráveis a diversas doenças no período neonatal. Muitos prematuros, com hipóxia neonatal, necessitam de uso de oxigênio, por conta da imaturidade pulmonar e, devido ao nível elevado de oxigênio no organismo, acabam produzindo espécies reativas de oxigênio, que podem provocar alterações celulares como, por exemplo, no DNA. O estresse oxidativo também pode comprometer o desenvolvimento cerebral, principalmente nos prematuros de baixo peso. Portanto, os prematuros são susceptíveis à doenças provocadas pelo elevado nível e estresse oxidativo.

Aycicek et al. (2008) referem que quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem provocar quebras no DNA das células. Os autores avaliaram 65 recém-nascidos, de 38 a 41 semanas de idade gestacional, entre o terceiro e o décimo dia de vida. Dos recém-nascidos, 23 foram expostos à fototerapia intensiva, 23 à fototerapia convencional por pelo menos 48 horas e 19 fazem parte do grupo controle. A fototerapia convencional consistia de seis lâmpadas fluorescentes brancas posicionadas 40 cm acima do recém-nascido, e a fototerapia intensiva consistia de 12 lâmpadas fluorescentes azuis posicionadas 20 cm acima e abaixo do recém-nascido. Verificaram que os danos no DNA e os níveis de estresse oxidativo foram significativamente maiores no grupo de recém-nascidos expostos à fototerapia intensiva e convencional quando comparados com o grupo controle.

Negi et al. (2011) referem que o dano nas células ocasionados pelo estresse oxidativo elevado pode provocar inúmeras doenças. Os autores estudaram o estresse oxidativo de 55 prematuros com idade gestacional inferior a 37 semanas e 24 recém-nascidos a termo com idade gestacional maior que 37 semanas. O sangue foi coletado do cordão umbilical dos recém-nascidos. O estudo demonstrou níveis

elevados de estresse oxidativo e danos no DNA em recém-nascidos prematuros e de baixo peso quando comparados ao grupo controle.

Dessa forma, o biomonitoramento de populações consideradas de risco para alterações celulares torna-se importante para predizer sobre possíveis problemas de saúde.

4 METODOLOGIA GERAL

4.1 Delineamento da pesquisa

Estudo transversal, prospectivo, contemporâneo e comparativo.

4.2 Considerações éticas

As avaliações deste projeto foram realizadas no Ambulatório de Eletrofisiologia da Audição do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e no Laboratório de Biogenômica do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com autorização prévia dos locais.

Participaram deste estudo somente os bebês, cujos pais ou responsáveis, após receberem informações sobre os objetivos e a metodologia da pesquisa, concordaram com os procedimentos a serem realizados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

Os dados de identificação foram sigilosos. Este projeto só foi executado após autorização formal da Direção de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital Universitário de Santa Maria (DEPE/HUSM) e registro e aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFSM sob o 05704712.8.0000.5346 (ANEXO 1).

4.3 Amostra

Participaram do estudo recém-nascidos a termo e prematuros, de ambos os gêneros, que comparecerem ao HUSM para realização da Triagem Auditiva Neonatal (TAN) durante o primeiro mês de vida. Foram considerados prematuros os bebês com idade gestacional abaixo 37 semanas, segundo a classificação da *World Health Organization* (1974). Os neonatos foram divididos em grupo controle (GC) e

grupo estudo (GE), sendo constituídos por recém-nascidos a termo e prematuros, respectivamente. A amostra foi constituída por 15 indivíduos em cada grupo para avaliação do metabolismo oxidativo, e 15 recém-nascidos a termo e 10 prematuros para avaliação dos PEALL. A diferença do arranjo amostral para a pesquisa dos PEALL explica-se pelo fato de ter ocorrido interferência elétrica na realização de alguns exames, por isso alguns neonatos tiveram de ser excluídos da pesquisa.

4.4 Critérios de inclusão

- **GC:** recém-nascidos, com 37 semanas ou mais de idade gestacional, sem indicadores de risco para perda auditiva, com presença de emissões otoacústicas transientes (EOAT) e reflexo cócleo-palpebral (RCP) na ocasião da TAN, cujos pais autorizaram a participação na pesquisa.
- **GE:** recém-nascidos abaixo de 37 semanas de idade gestacional, sem e com indicadores de risco para perda auditiva, com presença de EOAT na ocasião da TAN, com RCP, cujos pais autorizaram a participação na pesquisa.

4.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os recém-nascidos com alterações neurológicas evidentes, com ausência de RCP e com mais de um mês de idade e com ausência de EOAT.

4.6 Procedimentos

Inicialmente, os recém-nascidos de ambos os grupos foram submetidos à TAN, sendo pesquisadas as EOAT, o RCP e os indicadores de risco para perda auditiva, segundo o *Joint Committee on Infant Hearing* (JCIH, 2007). Em outro momento, foram pesquisados PEALL e o metabolismo oxidativo por meio do teste de micronúcleos. Ressalta-se que a pesquisa das EOAT teve por objetivo garantir que os recém-nascidos não apresentassem perda auditiva coclear. A pesquisa dos PEALL foi realizada pela autora do estudo. Sobre o Teste de Micronúcleos, a coleta do material celular foi realizada pela pesquisadora, a preparação do material por um profissional especializado do Laboratório de Biogenômica e a análise microscópica do material pela autora da pesquisa e profissionais especializados do referido laboratório.

4.6.1 Triagem Auditiva Neonatal

As EOAT foram pesquisadas em ambas as orelhas com estímulo *click* não-linear, janela de 20 ms, nas frequências de 1000, 1500, 2000, 3000 e 4000 Hz, com intensidade de aproximadamente 80 dBNPS. As EOAT foram consideradas presentes quando a relação sinal/ruído for maior ou igual a 3 dB para a frequência de 1000Hz e 6 dB para as demais frequências, em pelo menos três das cinco frequências pesquisadas. O registro das EOAT foi realizado em local silencioso com o equipamento *Intelligent Hearing Systems* (IHS), módulo *SmartTrOAE*.

O RCP foi pesquisado por meio do instrumento agogô, campânula grande, numa intensidade de aproximadamente 90 dBNPS.

A informação sobre os indicadores de risco para perda auditiva (JCIH, 2007) foi obtida por meio da anamnese com os responsáveis pelos recém-nascidos.

4.6.2 Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência

Para pesquisa dos PEALL foi utilizado o equipamento IHS, módulo *SmartEP*, de dois canais.

Para a avaliação eletrofisiológica os bebês permaneceram em sono natural no colo do responsável. Não foi possível avaliar os recém-nascidos em vigília, pois a movimentação dos mesmos alterava a estabilidade elétrica do exame e a confiabilidade das respostas.

Após a limpeza da pele com pasta abrasiva, os eletrodos foram fixados com pasta condutiva eletrolítica e esparadrapo, sendo o eletrodo ativo colocado na fronte (Fz), o terra (Fpz) na fronte, e os de referência na mastóide esquerda (M1) e mastóide direita (M2). A impedância individual dos eletrodos foi igual a 1Kohm para todas as avaliações.

Os PEALL foram pesquisados de forma binaural, por meio de fones de inserção, com estímulo de fala frequente /ba/ e raro /ga/, de polaridade rarefeita, envelope trapezoidal, raise/fall de 10000 *usec*, duração de 50000 *usec*, na intensidade de 80 dBNA. Os estímulos frequentes totalizaram 80% (cerca de 120 estímulos) das apresentações e os raros 20% (cerca de 30 estímulos). Os estímulos foram apresentados de forma randomizada. A taxa de apresentação foi de um estímulo por segundo, estando dentro da faixa recomendada por McPherson, Ballachanda e Kaf (2008) e o intervalo entre os estímulos também foi de um segundo, conforme Polich (1991).

Para garantir a confiabilidade dos exames, foi realizada a replicação do traçado.

Como resultados da avaliação dos PEALL foram consideradas a presença ou ausência dos componentes, P1, N1, P2 e N2 no traçado correspondente aos estímulos frequentes (sílabas /ba/), assim como a latência dos mesmos.

4.6.3 Teste de Micronúcleos

Para este teste foram coletadas células epiteliais da mucosa oral, por meio do esfregaço da mucosa oral, com uma espátula de madeira. A espátula contendo material celular foi colocada em um tubo de ensaio cônico, contendo de 2 ml de Solução Fisiológica 0,9%NaCl (cloreto de sódio) resfriada a 6°C.

Em seguida, os tubos de ensaio foram levados ao laboratório de Biogenômica e centrifugados por 10 minutos a 1000 (rotações por minuto). Para lavagem das células, a solução fisiológica foi trocada, cuidando para que não fossem retiradas as células contidas no fundo do tubo de ensaio. A solução foi homogeneizada com as células, utilizando pipeta *Pasteur* e centrifugada novamente. O procedimento de lavagem das células/centrifugação foi repetido duas vezes. Em seguida, foi acrescentado 1ml de solução fisiológica, homogeneizado e distribuído em duas lâminas (500µL em cada), pois foram confeccionadas em duplicata para cada indivíduo da amostra. As lâminas secaram em temperatura ambiente. Depois, foi realizada a coloração das mesmas, utilizando o Kit Panótico de Coloração da marca Laborclin®.

Após seco, o material foi observado em microscópio óptico binocular da marca Olympus®, modelo CX40, com magnificação de 400x para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. Foram contadas 1000 células (500 por lâmina) e as células classificadas em: normais, com micronúcleos, binucleadas, com *Buds* ou com pontes citoplasmáticas.

4.6.4 Análise estatística

Após o levantamento dos dados os resultados foram dispostos em planilhas, utilizando o programa Microsoft *Excel* para posterior análise e comparação. O tratamento estatístico foi realizado por um profissional da área, sendo considerados resultados significantes quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

Para a análise do Teste de Micronúcleos entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: Teste t-Student para grupo independentes assumindo igualdade e heterogeneidade de variâncias; Teste Exato de Fisher por simulação Monte Carlo; e teste de Mann Whitney.

Para análise dos PEALL foram utilizados os testes t-Student, *Wilcoxon* e de *Mann Whitney*.

A análise estatística foi feita com o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 para Windows.

5 ARTIGO 1

GENOTOXICIDADE POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEOS EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PREMATUROS

Resumo:

Introdução: Os recém-nascidos prematuros são considerados de risco para o desenvolvimento de diversas doenças no período neonatal. O teste de Micronúcleos permite a identificação de alterações celulares e pode ser utilizado como uma técnica de biomonitoramento para essa população. **Objetivo:** Avaliar a genotoxicidade por meio do teste de micronúcleos em recém-nascidos prematuros e a termo. **Material e Método:** Foram avaliados 30 recém-nascidos durante o primeiro mês de vida, sendo 15 prematuros e 15 a termo. Foram considerados prematuros os bebês com idade gestacional abaixo de 37 semanas, segundo a classificação da *World Health Organization* (1974). Foram coletadas células epiteliais da mucosa oral. O material celular foi colocada em um tubo de ensaio, contendo de 2 ml de Solução Fisiológica 0,9%NaCl (cloreto de sódio) resfriada a 6°C. Os tubos de ensaio foram centrifugados por 10 minutos a 1000 RPM (rotações por minuto). Foi acrescentado 1ml de solução fixadora metanol:ácido acético (3:1), centrifugado novamente e o *pellet* de células foi homogeneizado e distribuído em duas lâminas. Foram contadas 1000 células para cada lâmina. **Resultados:** Foi evidenciado diferença estatisticamente significativa para a análise dos micronúcleos entre os grupos, sendo que a quantidade de micronúcleos foi maior nos prematuros. Para as células binucleadas, *Buds* e pontes nucleoplasmáticas não houve diferença entre os grupos. A análise de correlação entre o total de células normais e alteradas intra-grupos mostrou significância estatisticamente significativa em ambos os grupos, sendo que o total de células normais foi muito maior quando comparado com o total de células alteradas. Na comparação entre os grupos foi detectada diferença estatisticamente significativa, o grupo de prematuros apresentou um número maior de células alteradas. **Conclusão:** Os recém-nascidos prematuros apresentaram um índice maior de danos genotóxicos.

Palavras-chaves: Micronúcleos. Prematuridade. Recém-nascidos.

ARTICLE 1

GENOTOXICITY THROUGH MICRONUCLEUS ESSAY IN TERM AND PREMATURE INFANTS

Abstract:

Introduction: Being a premature infant is considered a risk to the development of several diseases during the neonatal period. The micronucleus essay allows the identification of cellular alterations and it may be used as a biomonitoring technique for this population. **Purpose:** To evaluate genotoxicity through the micronucleus test in term and premature infants. **Material and Methods:** Thirty newborn infants were evaluated during their first month of life, 15 premature and 15 term infants. The infants were considered as term when the gestational age was lower than 37 weeks, according to the classification by the World Health Organization (1974). Epithelial cells of the mouth mucosa were collected. The cellular material was placed in a test tube with 2 ml of isotonic saline solution 0.9% NaCl (sodium chlorite) cooled to 6°C. The test tubes were centrifuged for ten minutes, 1000 RPM (rotations per minute). It was added 1 ml of fixative solution methanol: acetic acid (3:1), centrifuged again and the cells pellet was homogenized and distributed in two blades. It was counted 1000 cells for each blade. **Results:** It was evidenced statistically significant difference for the micronucleus analysis between the groups. The micronucleus amount was higher in premature infants. For the binucleated cells, Buds and nucleoplasmic bridges there was no difference between the groups. The correlation analysis between the total of normal and altered cells between the groups demonstrated statistically significant difference in both groups. The total of normal cells was higher when compared with the total of altered cells. In the comparison between the groups, it was detected statistically significant difference and the group of premature infants presented higher number of altered cells. **Conclusion:** The premature infants presented higher index of genotoxic damage.

Keywords: Micronucleus. Prematurity. Newborn.

INTRODUÇÃO

Os progressos na área da neonatologia contribuíram para a sobrevivência de recém-nascidos prematuros, diminuindo o índice de mortalidade dessa população. Apesar disso, esses recém-nascidos são considerados de risco para alterações no decorrer do desenvolvimento.

O estudo dos radicais livres tem despertado grande interesse nas últimas décadas pelo papel desempenhado por essas moléculas em várias situações clínicas (ANDRADE JUNIOR et al., 2005), incluindo a prematuridade.

Os radicais livres são moléculas que apresentam elétrons não pareados em sua órbita externa, capazes de transformar outras moléculas com as quais se encontram, como proteínas, carboidratos, lipídeos e o ácido desoxirribonucleico, sendo responsáveis pelas reações de estresse oxidativo e, conseqüentemente de danos celulares. Este processo de dano celular ocasionado pelo estresse oxidativo também pode ser definido como genotoxicidade.

Como forma de combater os radicais livres, o organismo possui um sistema antioxidante, sendo classificado em enzimático e não-enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx). O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathione (GSH), tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno (VASCONCELOS et al., 2007).

O nascimento ocasiona um estresse oxidativo que resulta em redução da capacidade antioxidante. Os recém-nascidos a termo possuem um sistema antioxidante capaz de resistir ao estresse fisiológico. Contudo, os recém-nascidos prematuros são vulneráveis às condições de estresse oxidativo, já que as concentrações antioxidantes só estão adequadas no final da gestação (PALOMINO; ROBLES, 2001).

Scancalios (2005) afirmam que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em todos os organismos aeróbicos, e existem nas células em equilíbrio com o sistema antioxidante. Quando esse equilíbrio é interrompido, desencadeia-se o estresse oxidativo, devido a depleção de antioxidantes ou ao acúmulo de EROs, levando ao dano celular e ocasionando disfunção fisiológica.

Por conta do aumento dos níveis de estresse oxidativo, os prematuros são suscetíveis a diversas doenças no período neonatal (NEGI et al., 2011). Fatores adicionais como uso de oxigênio e medicação aumentam ainda mais as espécies reativas de oxigênio, podendo provocar alterações celulares como quebras no DNA (TSOPMO; FRIEL, 2007; AYCECEK et al., 2008).

O teste de micronúcleos permite avaliar o dano celular, a nível nuclear, que em situações específicas, como no caso da prematuridade, infere de maneira indireta sobre os níveis de estresse oxidativo, já que níveis elevados aumentam o número de alterações celulares (MARGARITA et al., 2006, CORRÊA et al., 2009). Portanto, as alterações celulares encontradas através deste teste podem predizer sobre possíveis problemas de saúde em neonatos e lactentes (CORRÊA et al., 2009), tais como como asfixia perinatal, displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, enterite necrosante, hemorragia intracraniana, hipertensão arterial, entre outras (SCHLENZIG et al., 1993).

Na análise das células, por meio do teste de micronúcleos, podemos encontrar alterações distintas além dos micronúcleos propriamente ditos, tais como as células binucleadas, pontes nucleoplasmáticas e os *Buds* nucleares (PALAZZO; MALUF, 2011).

Com base no exposto, e pela necessidade de biomonitoramento dessa população, a qual é considerada de risco para determinadas doenças no período neonatal, o objetivo desse trabalho foi avaliar a genotoxicidade por meio do teste de micronúcleos em recém-nascidos prematuros e a termo.

METODOLOGIA

Esta pesquisa está vinculada ao projeto intitulado “Metabolismo oxidativo e maturação das vias auditivas em prematuros” registrado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria sob o número 05704712.8.0000.5346.

Trata-se de um estudo transversal, prospectivo, contemporâneo e comparativo.

As avaliações deste estudo foram realizadas no Ambulatório de Fonoaudiologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e no Laboratório de Biogenômica do Departamento de Morfologia da universidade.

Participaram desta pesquisa somente os bebês, cujos pais ou responsáveis, após receberem informações sobre os objetivos e a metodologia da pesquisa, concordaram com os procedimentos a serem realizados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Fizeram parte da amostra 30 recém-nascidos, sendo 15 a termo e 15 prematuros, de ambos os gêneros, que compareceram ao HUSM para realização da Triagem Auditiva Neonatal (TAN) durante o primeiro mês de vida. Foram considerados prematuros os bebês com idade gestacional abaixo 37 semanas, segundo a classificação da *World Health Organization* (1974).

Para o teste de micronúcleos foram coletadas células epiteliais da mucosa oral, por meio do esfregaço da mucosa oral, com uma escova *cytobrush* ou *swab*. A escova de coleta contendo material celular foi colocada em um tubo de ensaio cônico de 15mL, tipo Falcon, contendo de 2 ml de Solução Fisiológica 0,9%NaCl (cloreto de sódio) resfriada a 6°C.

Em seguida, os tubos de ensaio foram centrifugados por 10 minutos a 1000 RPM (rotações por minuto). Para lavagem das células, a solução fisiológica foi trocada, cuidando para não retirar o *pellet* de células contidas no fundo do tubo. A solução foi homogeneizada com as células, utilizando pipeta *Pasteur* e centrifugada novamente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 1ml de solução fixadora metanol: ácido acético (3:1), realizando nova centrifugação a 1000 RPM durante 2 minutos. Removeu-se o sobrenadante e o *pellet* celular foi homogeneizado e depositado em duas lâminas limpas e previamente identificadas,

pois foram confeccionadas em duplicata para cada indivíduo da amostra. As lâminas secaram em temperatura ambiente. Depois, foi realizada a coloração das mesmas, utilizando o Kit Panótico de Coloração da marca *Laborclin*®.

Após secagem, o material foi analisado em microscópio óptico binocular da marca Olympus®, modelo CX40, com magnificação de 400x para contagem das possíveis alterações presentes e posterior análise dos dados. Foram contadas 1000 células para cada lâmina. As células foram classificadas em normais, com presença de micronúcleos, binucleadas, com pontes nucleoplasmáticas ou com *buds* nucleares.

Os dados foram dispostos em planilhas, utilizando o programa *Microsoft Excel* e analisados estatisticamente, sendo considerados resultados significantes quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

Os testes estatísticos utilizados para as análises entre os grupos foram: Teste t-Student para grupo independentes assumindo igualdade e heterogeneidade de variâncias; Teste Exato de Fisher por simulação Monte Carlo; e teste de Mann Whitney.

RESULTADOS

A média de idade gestacional para os recém-nascidos prematuros foi de 33 semanas, enquanto que para os recém-nascidos a termo foi de 39 semanas.

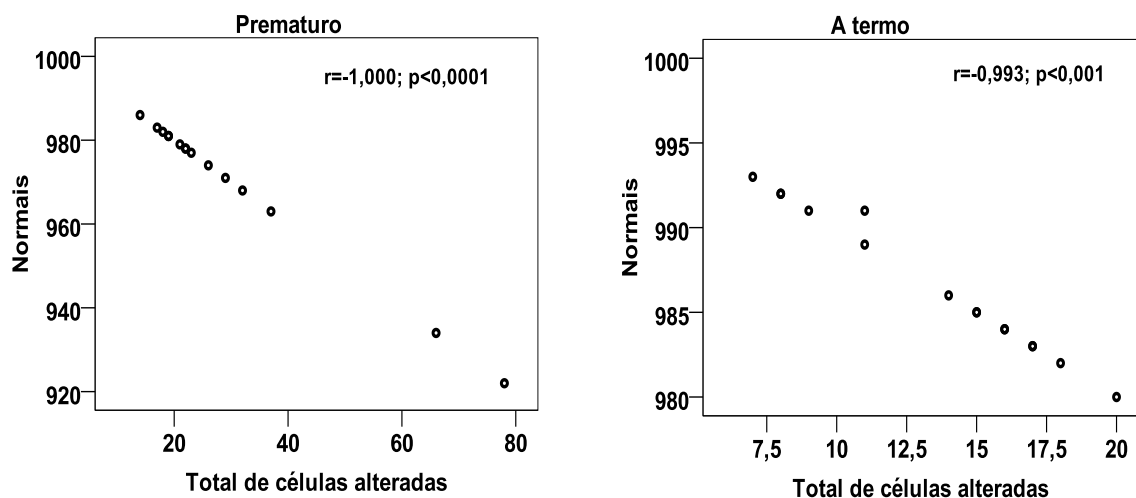
Para a análise referente aos micronúcleos entre o grupo de prematuros e a termo, foi evidenciada diferença estatisticamente significativa ($p=0,011$), já que a mediana no grupo de prematuros (Mediana: 16; 1^o-3^o quartil: 9-26) mostrou-se mais elevada quando comparada com o grupo a termo (Mediana: 7; 1^o-3^o quartil: 5 – 9).

No que se refere às células binucleadas, as variações observadas entre as médias dos grupos prematuro ($6,27 \pm 4,6$) e a termo ($5,67 \pm 3,49$) não se mostraram relevantes o suficiente para serem definidas como significativas.

Na comparação entre o número de *Buds* e de pontes entre os grupos, também não houve diferença estatisticamente significativa.

A análise de correlação entre o total de células normais e alteradas intra-grupos mostrou significância estatística, tanto no grupo controle quanto no grupo estudo, ou seja, o total de células normais foi muito maior quando comparado com o total de células alteradas, em ambos os grupos (Figura 1).

Figura 1: Gráfico de dispersão entre as células normais e o total de células alteradas segundo o grupo



Contudo, na comparação entre os grupos, em relação ao total de células normais e de células alteradas, foi detectada diferença estatisticamente significativa, ou seja, o grupo de prematuros apresentou um número menor de células normais ($970,47 \pm 18,39$) quando comparado com o grupo de recém-nascidos a termo ($986,67 \pm 4,2$) ($p=0,004$).

Todos os resultados das comparações entre os grupos encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1- Comparação dos resultados do Teste de Micronúcleos entre o grupo de recém-nascidos a termo e prematuros

Células	Grupo		p(value)
	Prematuro (n=15)	A termo (n=15)	
Normais			
Média \pm desvio padrão	970,47 \pm 18,39	986,67 \pm 4,2	0,004¥
Mínimo – máximo	922 - 986	980 - 993	
Total de células alteradas			
Média \pm desvio padrão	29,53 \pm 18,39	13,47 \pm 4,1	0,005¥
Mediana (Q ₁ – Q ₃)	22 (19 – 32)	15 (9 – 17)	
Mínimo – máximo	14 – 78	7 – 20	
Normais x alteradas			
Correlação	-1,000 ($p<0,0001$)	-0,993 ($p<0,001$)	---
Micronúcleos £			
Média \pm desvio padrão	22,33 \pm 19,89	7,13 \pm 2,97	0,011 ₣
Mediana (Q ₁ – Q ₃)	16 (9 – 26)	7 (5 – 9)	
Mínimo – máximo	5 - 76	2 – 13	
Binucleadas £			
Média \pm desvio padrão	6,27 \pm 4,6	5,67 \pm 3,49	0,692 ₣
Mediana (Q ₁ – Q ₃)	6 (2 – 9)	6 (3 – 8)	
Mínimo – máximo	0 – 15	0 – 14	
BUDS *			
0	11 (73,3)	13 (86,7)	
1	1 (6,7)	1 (6,7)	0,791§
2	2 (13,3)	1 (6,7)	
3	1 (6,7)		
BUDS			
Mediana (Q ₁ – Q ₃)	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	0,327₣

(continuação)

Tabela 1- Comparação dos resultados do Teste de Micronúcleos entre o grupo de recém-nascidos a termo e prematuros

Pontes			
0	10 (66,7)	10 (66,7)	
1	4 (26,7)	3 (20,0)	
2	1 (6,7)	2 (13,3)	
Pontes			
Mediana (Q ₁ – Q ₃)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0,327 Φ

* Valores apresentados da forma n(%) com percentual obtido com base no total de casos de cada grupo; £: Variável com distribuição assimétrica; Φ : Teste t-Student para grupos independentes assumindo igualdade de variâncias; Ψ : Teste t-Student para grupos independentes assumindo heterogeneidade de variâncias; \S : teste Exato de Fisher por simulação de Monte Carlo; Υ : Teste de Mann Whitney;

DISCUSSÃO

O teste de micronúcleos (MN) é uma forma simples de detectar danos ao DNA, sendo viável para o biomonitoramento de populações consideradas de risco para desenvolver determinadas doenças, como é o caso dos recém-nascidos prematuros. Por meio deste teste, pode-se detectar alterações celulares como os micronúcleos propriamente ditos, as células binucleadas, os *Buds* e as pontes nucleoplasmáticas, as quais podem ser decorrentes do estresse oxidativo.

Nesse estudo, as alterações celulares são correlacionadas de maneira indireta com os níveis de estresse oxidativo, já que elevadas concentrações de radicais livres causam quebras no DNA celular, e tais alterações podem ser observadas no teste de micronúcleos (MARGARITA et al., 2006).

Os micronúcleos são formados a partir de fragmentos de cromossomos ou de cromossomos inteiros que foram perdidos durante a anáfase da divisão celular. São formados por falhas no fuso acromático, por danos nas subestruturas cromossômicas, por alterações na fisiologia celular e alterações mecânicas (PALAZZO; MALUF, 2011). Neste estudo, a quantidade de micronúcleos foi maior para o grupo de prematuros quando comparados com o grupo de recém-nascidos a termo, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Nossos resultados se assemelham com o estudo de Friel et al. (1993), os quais relataram que os prematuros podem apresentar maior quantidade de micronúcleos devido ao estresse oxidativo ocasionado pela imaturidade do sistema antioxidante, o qual é decorrente da curta gestação desses recém-nascidos.

As células binucleadas são consideradas quando dois núcleos estão situados no mesmo limite do citoplasma (FENECH et al., 1999). As pontes nucleoplasmáticas ocorrem quando os centrômeros de cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são tracionados para os polos opostos da célula durante a divisão celular; e os *buds* são morfológicamente similares aos micronúcleos, porém a conexão nucleoplasmática se liga ao núcleo, podendo ser espessa ou fina. Podem ser observados em células normais, contudo são mais raros do que os micronúcleos (PALAZZO; MALUF, 2011). Neste trabalho, observamos também que a quantidade de células binucleadas foi maior para o grupo de prematuros, embora sem diferença estatisticamente significativa. Contudo, a evidência de *Buds* e de pontes

nucleoplasmáticas foi praticamente igual para ambos os grupos. Isso pode ser explicado pelo fato da ocorrência de tais alterações celulares ser menor quando comparada com os micronúcleos e células binucleadas.

Quando considerou-se o total de alterações celulares entre os grupos, foi evidenciado que o grupo de prematuros apresentou quantidades maiores de células alteradas em relação ao grupo de recém-nascidos a termo. Esses resultados concordam com o estudo de Negi et al. (2011), os quais estudaram o estresse oxidativo de 55 prematuros com idade gestacional inferior a 37 semanas e 24 recém-nascidos a termo, com idade gestacional maior que 37 semanas. O estudo demonstrou níveis elevados de estresse oxidativo e danos no DNA em recém-nascidos prematuros e de baixo peso quando comparados ao grupo controle.

Embora este estudo tenha inferido sobre o estresse oxidativo de maneira indireta por meio do teste de Micronúcleos, os resultados concordam com as afirmações de Robles, Palomino e Robles (2001), os quais relatam que os recém-nascidos prematuros são vulneráveis às condições de estresse oxidativo, já que os sistemas antioxidantes só estão adequados no final da gestação. Estes pesquisadores estudaram o estado de oxidação de dez recém-nascidos prematuros e dez a termo, no momento do nascimento e durante os primeiros dias de vida, sendo verificado que ao nascimento os marcadores de estresse oxidativo estavam elevados em todos os recém-nascidos, e que o sistema de defesa antioxidante era menor nos neonatos prematuros quando comparados com os a termo, sendo que o nível de estresse oxidativo foi maior conforme a diminuição da idade gestacional.

A quantidade elevada de células alteradas no grupo de prematuros encontrada nesse estudo também pode ser correlacionada com o uso de medicações e oxigênio, os quais estão frequentemente associados à prematuridade, concordando com alguns autores como Rodrigues (1988) e Ortiz (2000), os quais atentam para a formação de estresse oxidativo e conseqüentemente aumento das alterações celulares, por estes fatores adicionais à prematuridade.

O teste de Micronúcleos mostrou ser uma técnica pouco invasiva, de rapidez para triagens em populações de risco, como é o caso de recém-nascidos prematuros, e eficiente para predizer sobre possíveis problemas futuros de saúde, concordando com estudos como de Garaj-Vrhova e Zeljezic, 2002; Corrêa et al., 2009; Holland et al., 2011.

CONCLUSÃO

A partir deste estudo, pode-se observar que os recém-nascidos prematuros apresentaram um índice maior de danos celulares a nível nuclear. O teste de Micronúcleos mostrou-se uma técnica eficiente para o biomonitoramento dessa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE JUNIOR, D. R. de et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. bras. pneumol.**, São Paulo, v. 31, n. 1, fev. 2005.

AYCICEK, A.; KOCYIGIT, A.; EREL, O.; SENTURKS, H. Fototerapia causa danos ao DNA de leucócitos mononucleares periféricos em recém-nascidos a termo. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 2, 2008.

CORREA, N. S.; BASSAN, J. S.; CUNHA, C. J.; FERNÁNDEZ, R. R.; BACHETTINI, P. S.; GARCIAS, G. L.; MARITONO-ROTH, M. G. Monitoramento da ação genotóxica em trabalhadores de sapatarias através do teste de micronúcleos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2251-2260, 2009.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human micronucleus project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat Res**, v. 428, p. 271-83, 1999.

FRIEL, J. K.; ANDREWS, W. L.; LONG, D. R.; LABBÉ, M. R. Selenium status of very low birth weight infants. **Pediatr Res**, v. 34, n. 3, p. 293-6, 1993.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticideproduction by chromosomal aberration analysis micronucleus assay and Comet assay. **J Appl Toxicol**, v. 22, p. 255, 2002.

HOLLAND, N.; FUCIC, A.; MERLO, D. F.; SRAM, R.; KIRSCH-VOLDERS, M. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 51-56, 2011.

MARGARITA, B. G. C.; CORONA-RIVERA, J. R.; GÓMEZ-MEDA, B. C.; ZAMORA-PEREZ, A. L. IBARRA, M. L.; GONZÁLEZ, G. M. Z. **Eritrocitos micronucleados en recién nacidos prematuros y su relación con la patología materna**. Participación de la mujer en la ciencia, III encuentro. 2006.

NEGI, R.; PANDE, D.; KURNAR, A.; BASU, S.; KHANNA, R. S.; KHANNA, H. D. In vivo oxidative DNA damage, protein oxidation and lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress in preterm low birth weight infants. **J med sci**, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2011.

ORTIZ, G. G. Genotoxicity of paraquat: micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. **Mutat Res**, v. 464, p. 239-245, 2000.
PALAZZO, R. P.; MALUF, S. W. Técnica micronúcleos com bloqueio da citocinese celular. In: MALUF, S. W.; RIEGEL, M. et al. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ROBLES, R.; PALOMINO, N.; ROBLES, A. Oxidative stress in the neonate. **Early Hum Dev**, v. 65, p. 75-81, 2001.

RODRIGUES, F. P. Importância dos radicais livres de oxigênio no período neonatal. **J Pediatr**, v. 74, n. 2, p. 91-8, 1998.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHLENZIG, J. S.; BERVOETS, K.; LOEWENICH, V.; BÖHLES, H. Urinary malondialdehyde concentration in preterm neonates: is there a relationship to disease entities of neonatal intensive care? **Acta Paediatr**, v. 82, p. 202-5, 1993.

TSOPMO, A.; FRIEL, J. K. Human Milk has Anti-Oxidant Properties to Protect Premature Infants. **Current Pediatric Reviews**, v. 3, p. 45-51, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, Oct. 2007.

World Health Organization Scientist Group on Health Statistics Methodology Related to Perinatal Events. Who, Genebra, 1974, p.32. In: COSTA, SMB.; COSTA FILHO, AO. O estudo dos potenciais evocados acusticamente de tronco cerebral em recém-nascidos pré-termo. **Rev. Bras. de Otorrinolaringol**, v. 64, p. 231-8, 1998.

6 ARTIGO 2 POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE LONGA LATÊNCIA EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PREMATUROS

Resumo

Introdução: A pesquisa dos potenciais evocados auditivos de longa latência (PEALL) em neonatos é um tema recente e controverso devido à maturação das estruturas corticais, mas alguns estudos já referem que esses potenciais podem ser evidenciados nessa faixa etária, sendo considerados indicadores do desenvolvimento cognitivo, principalmente em prematuros, os quais são de risco para alterações do processamento auditivo e de linguagem. Em bebês a obtenção dos potenciais exógenos (P1, N1, P2 e N2) está fundamentada no fato desses potenciais representarem a capacidade cortical de detecção do estímulo acústico, e por não dependerem da atenção do indivíduo.

Objetivo: Pesquisar os potenciais exógenos em neonatos a termo e prematuros durante o primeiro mês de vida, assim como comparar a latência dos mesmos entre os grupos.

Material e método: Fizeram parte da amostra 25 recém-nascidos, sendo 15 a termo (grupo controle) e 10 prematuros (grupo estudo), de ambos os gêneros. Foram considerados prematuros os bebês com idade gestacional abaixo 37 semanas, segundo a classificação da *World Health Organization* (1974). Para a avaliação dos potenciais corticais os bebês permaneceram em sono natural no colo do responsável. Os PEALL foram pesquisados de forma binaural, por meio de fones de inserção, com estímulo de fala frequente /ba/ e raro /ga/, na intensidade de 80 dBNA. Os estímulos frequentes totalizaram 80% (cerca de 200 estímulos) das apresentações e os raros 20% (cerca de 40 estímulos). Foi realizada a replicação do traçado. Os dados foram analisados estatisticamente sendo considerados significantes quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** A média de idade gestacional para o grupo de recém-nascidos a termo foi de 38 semanas ($\pm 1,3$) e para o grupo de prematuros foi de 33 semanas ($\pm 1,6$). Foi possível observar apenas os potenciais P1 e N1 em ambos os grupos, porém não foi verificada diferença estatisticamente significativa para as latências dos componentes P1 e N1 ($p > 0,05$) entre os grupos. **Conclusão:** Foi possível observar os componentes exógenos P1 e N1 dos potenciais corticais em recém-nascidos com até um mês de vida, tanto em bebês a termo quanto prematuros, porém não houve diferenças entre os grupos.

Palavras-chaves: Potenciais Evocados Auditivos, Prematuridade, Recém-nascidos.

ARTICLE 2

LONG LATENCY AUDITORY EVOKES POTENTIAL IN TERM AND PREMATURE INFANTS

Abstract

Introduction: The research of the long latency auditory evokes potentials (LLAEP) in newborns is a recent and controversial issue because of the cortical structure maturation, but studies refer that these potentials may be evidenced in this age, being considered as indicators of the cognitive development, mainly in premature infants, which present risks of auditory and language processing alterations. In infants, the acquisition of exogenous potentials (P1, N1, P2 and N2) is based in the fact that these potentials represent the cortical ability to detect the acoustic stimulation, and in the fact that they do not depend on the individual's attention. **Purpose:** To research the exogenous potentials in term and premature infants during their first month of life, as well as to compare the latency of them between the groups. **Material and Method:** The sample consisted of 25 newborns, 15 term (control group) and 10 premature (study group) infants, male and female. The infants with gestational age under 37 weeks were considered as premature, according to the classification by the World Health Organization (1974). To evaluate the cortical potentials, the infants remained in natural sleep into an adult's arm. The LLAEPs were researched in binaural way, through insertion earphones, with frequent /ba/ and rare /ga/ speech stimuli, in the intensity of 80 dBNA. The frequent stimuli presented a total of 80% (about 200 stimuli) of the presentations and the rare were 20% (about 40 stimuli). It was performed tracing replication. The data were statistically analyzed and considered as significant when $p < 0.05$, with confidence interval of 95%. **Results:** The average of gestational age for the term infants was 38 weeks (± 1.3) and for the premature group it was 33 weeks (± 1.6). It was possible to observe only the potentials P1 and N1 in both groups, but it was not verified statistically significant difference for the latencies of the components P1 and N1 ($p > 0.05$) between the groups. **Conclusion:** It was possible to observe the exogenous components P1 and N1 of the cortical potentials in newborns with no more than one month of life, as in term as in premature infants. However, there was no difference between the groups.

Keywords: Evoked Potentials Auditory, Prematurity, Newborn

INTRODUÇÃO

O estudo da eletrofisiologia da audição tem sido destaque nos últimos anos, principalmente por se tratar de exames objetivos, nos quais pode-se mensurar os limiares eletrofisiológicos da audição, sendo muito utilizados na avaliação de recém-nascidos e de crianças pequenas que não cooperam nas avaliações comportamentais.

Até o momento, os exames eletrofisiológicos mais utilizados em recém-nascidos são os Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE) e o Potencial Evocado Auditivo de Estado Estável (PEAEE), os quais tem por principal objetivo a determinação dos limiares eletrofisiológicos.

Os limiares auditivos são de fundamental importância para o desenvolvimento linguístico, mas, além disso, a integridade e funcionamento adequado das estruturas centrais também merecem destaque no desenvolvimento infantil. Pensando nisso, alguns autores tem feito uso do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência (PEALL) para avaliar o processamento da informação auditiva.

A pesquisa dos PEALL em neonatos é um tema recente e controverso devido à maturação das estruturas corticais, mas alguns estudos já referem que esses potenciais podem ser evidenciados nessa faixa etária, sendo considerados indicadores do desenvolvimento cognitivo, principalmente em prematuros, os quais são de risco para alterações do processamento auditivo e de linguagem (KUSHNERENKO, 2003; FELLMAN et al., 2004; CHOUDHURY; BENASICH, 2010). Estudos verificaram que crianças com potenciais corticais alterados durante o período neonatal, desenvolveram alterações linguísticas (MOLFESE; MOLFESE, 1997).

Os Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência (PEALL) refletem a atividade elétrica desde o sistema auditivo periférico até as vias auditivas centrais, e tem como objetivo verificar o processamento da informação auditiva em nível cortical e em função do tempo (REIS; FRIZZO, 2011).

Fazem parte dos PEALL as ondas positivo 1 (P1), negativo 1 (N1), positivo 2 (P2), negativo 2 (N2) e positivo 3 (P3), sendo subdivididas em potenciais exógenos (P1, N1, P2, N2), os quais são influenciados pelas características físicas do

estímulo, como intensidade, duração e frequência, e potencial endógeno (P3), influenciado predominantemente por eventos relacionados às habilidades cognitivas (DUARTE et al., 2009).

Em bebês a obtenção dos potenciais exógenos (P1, N1, P2 e N2) está fundamentada no fato desses potenciais representarem a capacidade cortical de detecção do estímulo acústico, e por não dependerem da atenção do indivíduo.

Sobre os sítios geradores específicos dos componentes exógenos, acredita-se que o componente P1 seja originado no giro de *Heschl* ou na área de associação auditiva secundária, o N1 no lobo frontal, embora as áreas de geração desse componente não sejam claras, o P2 no giro temporal superior anterior e o N2 próximo a regiões supratemporais, incluindo córtex frontal (KUSHNERENKO, 2003).

Com base no exposto, e pela necessidade de conhecer as características dos PEALL em recém-nascidos, este estudo teve por objetivo a pesquisa dos potenciais exógenos em neonatos a termo e prematuros durante o primeiro mês de vida, assim como comparar a latência dos mesmos entre os grupos.

METODOLOGIA

Esta pesquisa está vinculada ao projeto intitulado “Metabolismo oxidativo e maturação das vias auditivas em prematuros” registrado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria sob o número 05704712.8.0000.5346.

Trata-se de um estudo transversal, prospectivo, contemporâneo e comparativo.

As avaliações deste projeto foram realizadas no setor de Eletrofisiologia da Audição do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Participaram deste estudo somente os bebês, cujos pais ou responsáveis, após receberem informações sobre os objetivos e a metodologia da pesquisa, concordaram com os procedimentos a serem realizados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Fizeram parte da amostra 25 recém-nascidos, sendo 15 a termo (grupo controle) e 10 prematuros (grupo estudo), de ambos os gêneros, que compareceram ao HUSM para realização da Triagem Auditiva Neonatal (TAN) durante o primeiro mês de vida. Foram considerados prematuros os bebês com idade gestacional abaixo 37 semanas, segundo a classificação da *World Health Organization* (1974).

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão:

- Recém-nascidos a termo (grupo controle): recém-nascidos, com 37 semanas ou mais de idade gestacional, sem indicadores de risco para perda auditiva, com presença de emissões otoacústicas transientes (EOAT) em ambas as orelhas e reflexo cócleo-palpebral (RCP) na ocasião da TAN.
- Recém-nascidos prematuros (grupo estudo) recém-nascidos abaixo de 37 semanas de idade gestacional, sem e com indicadores de risco para perda auditiva, com presença de EOAT em ambas as orelhas na ocasião da TAN, sem ou com RCP.

Foram excluídos do estudo os recém-nascidos com alterações neurológicas evidentes, com ausência de RCP e com mais de um mês de idade e com ausência de EOAT.

As EOAT foram pesquisadas em ambas as orelhas com estímulo *click* não-linear, janela de 20 ms, nas frequências de 1000, 1500, 2000, 3000 e 4000 Hz, com intensidade de aproximadamente 80 dBNPS. As EOAT foram consideradas presentes quando a relação sinal/ruído for maior ou igual a 3 dB para a frequência de 1000Hz e 6 dB para as demais frequências, em pelo menos três das cinco frequências pesquisadas. O registro das EOAT foi realizado em local silencioso com o equipamento *Intelligent Hearing Systems (IHS)*, módulo *SmartTrOAE*.

O RCP foi pesquisado por meio do instrumento agogô, campânula grande, numa intensidade de aproximadamente 90 dBNPS.

Ressalta-se que a pesquisa das EOAT teve como objetivo a exclusão de recém-nascidos com perda auditiva coclear.

Para pesquisa dos PEALL foi utilizado o equipamento IHS, módulo *SmartEP*, de dois canais.

Para a avaliação eletrofisiológica os bebês permaneceram em sono natural no colo do responsável. Não foi possível avaliar os recém-nascidos em vigília, pois a movimentação dos mesmos alterava a estabilidade elétrica do exame e a confiabilidade das respostas.

Após a limpeza da pele com pasta abrasiva e álcool, os eletrodos foram fixados com pasta condutiva eletrolítica e esparadrapo, sendo o eletrodo ativo colocado na frente (Fz), o terra (Fpz) na frente, e os de referência na mastóide esquerda (M1) e mastóide direita (M2). A impedância individual dos eletrodos foi igual a 1 *Kohm* para todas as avaliações.

Os PEALL foram pesquisados de forma binaural, por meio de fones de inserção, com estímulo de fala frequente /ba/ e raro /ga/, de polaridade rarefeita, envelope trapezoidal, raise/fall de 10000 *usec*, duração de 50000 *usec*, na intensidade de 80 dBNA. Os estímulos frequentes totalizaram 80% (cerca de 120 estímulos) das apresentações e os raros 20% (cerca de 30 estímulos). Os estímulos foram apresentados de forma randomizada. A taxa de apresentação foi de um estímulo por segundo, estando dentro da faixa recomendada por McPherson, Ballachanda e Kaf (2008) e o intervalo entre os estímulos também foi de um

segundo, conforme Polich (1991). Para garantir a confiabilidade dos exames, foi realizada a replicação do traçado.

Como resultados da avaliação dos PEALL foram consideradas a presença ou ausência dos componentes, P1, N1, P2 e N2 nos traçados correspondente aos estímulos frequentes (sílabas /ba/), assim como a latência dos mesmos.

Os dados foram dispostos em planilhas, utilizando o programa *Microsoft Excel* e analisados estatisticamente, sendo considerados resultados significantes quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

A metodologia estatística utilizada para a análise dos dados foi baseada no teste t-Student para comparação de médias em amostras emparelhadas e amostras independentes, bem como os testes de *Wilcoxon* e de *Mann Whitney*.

O nível de significância adotado na conclusão dos testes foi de 0,05, ou seja, o nível de significância mínimo a ser adotado para se rejeitar a hipótese nula (H_0). A análise estatística foi feita com o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 para Windows.

RESULTADOS

A média de idade gestacional para o grupo de recém-nascidos a termo foi de 38 semanas ($\pm 1,3$) e para o grupo de prematuros foi de 33 semanas ($\pm 1,6$). A média de idade corrigida no momento da avaliação foi de 9,9 dias para o grupo de termos e de 15,7 dias para os prematuros. As análises descritivas relacionadas às idades dos grupos encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1: Medidas descritivas para as idades gestacional e corrigida segundo o grupo

Idades (dias)	Grupos						p§
	A termo (n=15)			Prematuro (n=10)			
	Média	Desvio padrão	Mediana	Média	Desvio padrão	Mediana	
Gestacional	38,9	1,3	39,0	33,9	1,6	34,0	<0,001§
Corrigida	9,9	11,3	2,0	15,7	9,1	18,0	0,186ε

§: Teste t-Student para grupos independentes; ε: Teste de Mann Whitney

Em nosso estudo foi possível observar um grande pico ao redor de 230 ms para o grupo controle e ao redor de 201 ms para o grupo estudo, e uma grande deflexão ao redor de 341 ms para o grupo controle e de 302 ms para o grupo estudo. O componente P2 foi observado em apenas um recém-nascido a termo, pico ao redor de 270ms, e em dois recém-nascidos prematuros, pico ao redor de 290ms, não sendo analisados estatisticamente.

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa na comparação das latências dos componentes P1 e N1 para orelha direita e orelha esquerda intra grupos.

Na comparação entre o grupo de recém-nascidos a termo e prematuros, também não foi verificada diferença estatisticamente significativa para as latências dos componentes P1 e N1.

Os resultados das comparações intra e entre os grupos encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2: Comparação da latência dos componentes P1 e N1 para orelha direita e orelha esquerda, segundo os grupos

Idades (dias)	Grupos						p§
	A termo (n=15)			Prematuro (n=10)			
	Média	Desvio padrão	Mediana	Média	Desvio padrão	Mediana	
Latencia onda P1							
Orelha esquerda	230,4	58,8	254,0	201,8	72,7	209,0	0,289§
Orelha direita	229,3	57,7	262,0	205,0	73,8	210,0	0,365§
p£		0,807			0,220		
Latencia onda N1							
Orelha esquerda	341,2	84,1	386,0	302,8	102,7	355,0	0,335£
Orelha direita	336,6	85,7	386,0	298,2	101,8	349,0	0,337£
p¶		0,398			0,454		

§: Teste t-Student para grupos independentes; £: Teste de Mann Whitney; £: Teste t-Student para dados pareados; ¶: Teste de Wilcoxon;

DISCUSSÃO

Por ser um tema recente, a pesquisa dos potenciais de longa latência em bebês gera controvérsias, principalmente pelo fato da maturação das estruturas corticais ocorrerem apenas na idade adulta. Apesar disso, alguns autores acreditam que é possível sua aplicação em crianças pequenas (Kushnerenko et al., 2002; Kushnerenko, 2003; Fellman et al., 2004; Wunderlich, Cone-Wesson e Shepherd, 2006; Choudhury e Benasich, 2010) já que as maiores modificações sinápticas ocorrem nos primeiros anos de vida. Portanto, acredita-se que os potenciais corticais possam ser úteis para prever sobre possíveis alterações cognitivas e de linguagem.

No presente trabalho foi possível evidenciar os componentes exógenos dos potenciais corticais em neonatos, concordando com outros estudos como de Pasma et al. (1992), Kushnerenko et al. (2002), Kushnerenko (2003), Fellman et al. (2004), Wunderlich, Cone-Wesson e Shepherd (2006), Choudhury e Benasich (2010). Os componentes exógenos são respostas corticais para a detecção do estímulo acústico, não sendo tão dependentes da habilidade de atenção, por isso da possibilidade de captação em bebês.

Em nosso estudo foi possível observar um grande pico ao redor de 230 ms para o grupo controle e ao redor de 201 ms para o grupo estudo, e uma grande deflexão ao redor de 341 ms para o grupo controle e de 302 ms para o grupo estudo. Optou-se por denominar o pico e a deflexão de P1 e N1, respectivamente, pois acreditamos que o pico positivo e a deflexão possam corresponder a esses potenciais, porém com latências aumentadas por conta da imaturidade das estruturas corticais.

A existência de um grande pico e de uma grande deflexão no traçado de recém-nascidos com até um mês de vida concorda com outros estudos como de Pasma et al., 1992, Kushnerenko, 2003, Wunderlich e Cone-Wesson e Shepherd, 2006. Contudo, esses autores denominaram esses componentes como sendo P2 e N2, diferente da denominação utilizada nessa pesquisa (P1 e N1). Acredita-se que a denominação utilizada pelos autores tenha sido por conta da latência dos potenciais, sendo que nesses estudos o grande pico foi redor de 300ms e a deflexão por volta

de 600ms, e os componentes P2 e N2 correspondem aos de maior latência. Kushnerenko (2003) também chama atenção para a denominação dos potenciais em bebês, relatando que a mesma é variável na literatura. Ceponienė et al., 2001 também utilizaram a latência dos potenciais para a denominação dos mesmos, P100, N250 e P450, não correspondendo a nomenclatura utilizada para adultos.

No presente trabalho não houve diferença estatisticamente significativa entre a latência dos componentes P1 e N1 entre o grupo de recém-nascidos a termo e prematuros. Esses resultados diferem do estudo de Pasma et al. (1992), em que o potencial P2 (pico ao redor de 200ms, correspondendo ao P1 para a presente pesquisa) mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Contudo os resultados do presente trabalho concordam com o estudo de Fellman et al. (2004), onde a latência dos componentes avaliados foi semelhante no grupo de recém-nascidos a termo e prematuros. Os mesmos autores alertam que a prematuridade associada com ausência dos potenciais corticais pode ser um fator de risco para futuras alterações cognitivas.

O estado dos neonatos durante o exame ainda é questão de debate na literatura, já que alguns estudos avaliaram os neonatos durante o sono ativo, outros com as crianças acordadas, e outros nas duas formas. Porém, autores como Kushnerenko (2003) referem não existir diferenças no traçado dos componentes dos potenciais corticais nas duas formas de avaliação.

O sono ativo faz parte do sono REM, e é definido como o estado em que o neonato está de olhos fechados, com respiração irregular e sem movimentos grosseiros. Este estado de sono pode ser identificado com observação do comportamento do neonato (KHAN; RAYA; NUNES, 2009). Cheour, Leppanen, Kraus (2000) afirmam que os potenciais evocados podem ser obtidos em neonatos durante o sono ativo, sendo que a morfologia das ondas é semelhante ao estado de vigília, tornando o exame útil, sem qualquer necessidade de resposta da criança. De Weerd (1995), também refere não haver diferenças no eletroencefalograma de um recém-nascido durante o sono ativo e durante o estado de alerta, e que por esse motivo os PEALL podem ser pesquisados com o bebê dormindo, tornando o exame bastante útil.

No presente estudo foi possível obter resultados com os neonatos em sono natural, concordando com Cheour, Leppanen, Kraus (2000), Kushnerenko et al. (2002), Kushnerenko (2003), Wunderlich, Cone-Wesson e Shepherd (2006).

Ressalta-se que nesses estudos a avaliação em sono natural foi realizada apenas com recém-nascidos com até um mês de vida. Bebês maiores foram avaliados em estado de vigília.

A partir dessa pesquisa pode-se evidenciar que a aplicação dos potenciais corticais em bebês é recente e gera controvérsias, principalmente devido à maturação das estruturas corticais e do estado do neonato durante a avaliação. Além disso, a denominação dos potenciais em bebês também é diversificada na literatura. Sendo assim, pesquisas ainda serão necessárias para que este exame se torne útil para prever sobre possíveis alterações corticais em recém-nascidos e, conseqüentemente se tornar uma avaliação de detecção precoce das alterações cognitivas e de linguagem.

CONCLUSÃO

Foi possível observar os componentes exógenos P1 e N1 dos potenciais corticais em recém-nascidos com até um mês de vida, tanto em bebês a termo quanto prematuros.

A pesquisa dos PEALL em neonatos é recente, sendo necessários mais estudos nessa área, a fim de se conhecer melhor as características desses potenciais em recém-nascidos e crianças pequenas, para que futuramente possam ser utilizados como preditivos de alterações cognitivas e linguísticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CEPONIEN, R.; SHESTAKOVA, A.; BALAN, P.; ALKU, P.; YAGUCHI, K.; NÄÄTÄNEN, R. Children's auditory event-related potentials index stimulus complexity and "speechness". **International Journal of Neuroscience**, v. 109, n. 3-4, p. 245-260, 2001.
- CHEOUR, M.; LEPPANEN, P. H.; KRAUS, N. Mismatch negativity (MMN) as a tool for investigating auditory discrimination and sensory memory in infants and children. **Clin. Neurophysiol**, v. 111, n.1, p. 4-16, 2000.
- CHOU DHURY, N.; BENASICH, A. A. Maturation of auditory evoked potentials from 6 to 48 months: Prediction to 3 and 4 year language and cognitive abilities. **Clinical Neurophysiology**, v. 122, n. 2, p. 320-38, 2010.
- CHOU DHURY, N.; BENASICH, A. A. Maturation of auditory evoked potentials from 6 to 48 months: Prediction to 3 and 4 year language and cognitive abilities. **Clinical Neurophysiology**, v. 122, n. 2, p. 320-38, 2010.
- DE WEERD, A. W. **Atlas of EEG in the first months of life**. Amsterdam: Elsevier, 1995.
- DUARTE, J. L.; ALVARENGA, K. F.; BANHARA, M. R.; MELLO, A. D. P.; SÁS, R. M.; FILHO, O. A. C. Potencial evocado auditivo de longa latência-P300 em indivíduos normais: valor do registro simultâneo em Fz e Cz. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 75, n. 2, p. 231-6, 2009.
- FELMAN, E. K.; MIKKOLA, R. C.; LEIPALA, J.; NAATANEN, R. Atypical auditory event-related potentials in preterm infants during the first year of life: a possible sign of cognitive dysfunction? **Pediatric Research**, v. 56, n. 2, p. 291-297, 2004.
- KHAN, R. L.; RAYA, J. P.; NUNES, M. L. Avaliação do estado comportamental durante o sono em recém-nascidos. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 15, n. 1, p. 25-29, 2009.
- KUSHNERENKO, E. V. **Maturation of the cortical auditory eventrelated brain potentials in infancy** .2003. 97 f. Academic dissertation (Department of Psychology)- University of Helsinki Finland, 2003.

KUSHNERENKO, E.; CEPONIENE, R.; BALAN, P.; FELLMAN, V.; HUOTILAINEN, M.; NAATANEN, R. Maturation of the auditory event-related potentials during the first year of life. **Cognitive neuroscience and neuropsychology**, v. 13, n. 1, p. 47-51, 2002.

MCPHERSON, D. L.; BALLACHANDA, B. B.; KAF, W. Middle and Longa Latency evoked potential. In: ROESER, R. J.; VALENTE, M.; DUNN, H. H. **Audiology: diagnosis**. New York: Thieme, 2008. p. 443-477.

MOLFESE, D. L.; MOLFESE, V. J. Discrimination of language skills at five years-of-age using event-related potentials recorded at birth. **Dev Neuropsychol**, v. 13, n. 2, p. 135-156, 1997.

PASMAN, J. W.; ROTTEVEELB, J. J.; GRAAF, R.; STEGEMAN, D. F.; VISCOA, Y, M. The effect of preterm birth on brainstem, middle latency and cortical auditory evoked responses (BMC AERs). **Early Human Development**, v. 31, n. 2, p. 113-129, 1992.

POLICH, J. P300 in clinical applications: meaning, method and measurement. **Am. J. EEG Technol**, v. 31, p. 201-31, 1991.

REIS, A. C. M. B. R.; FRIZZO, A. C. F. Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência. In: BEVILACQUA, M. C.; MARTINEZ, M. A. N.; BALEN, S. A.; PUPU, A. C.; REIS, A. C. M. B.; FROTA, S. **Tratado de Audiologia**. São Paulo: Santos, 2011. p. 231-260.

World Health Organization Scientist Group on Health Statistics Methodology Related to Perinatal Events. Who, Genebra, 1974, p.32. In: COSTA, SMB.; COSTA FILHO, AO. O estudo dos potenciais evocados acusticamente de tronco cerebral em recém-nascidos pré-termo. **Rev. Bras. de Otorrinolaringol**, v. 64, n. 3, p. 231-8, 1998.

WUNDERLICH, J. L.; CONE-WESSON, B. K.; SHEPHERD, R. Maturation of the cortical auditory evoked potential in infants and young children. **Hearing Research**, v. 212, n. 1-2, p. 185–202, 2006.

7 DISCUSSÃO GERAL

O estudo do metabolismo oxidativo e dos Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência (PEALL) em neonatos a termo e prematuros realizados neste estudo permitiram a análise das condições celulares e das vias auditivas centrais dessas populações.

Os recém-nascidos prematuros necessitam de avaliações diversificadas, já que são considerados de risco para o desenvolvimento de alterações celulares, neurológicas e/ou sensoriais, incluindo alterações nas vias auditivas centrais, o que repercute negativamente no processo de aquisição da linguagem e do desenvolvimento cognitivo. As alterações celulares podem predispor essa população a doenças como asfixia perinatal, displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, enterite necrosante, hemorragia intracraniana, hipertensão arterial, entre outras.

Para a análise das condições celulares foi utilizado o Teste de Micronúcleos (MN), sendo possível identificar alterações como os micronúcleos propriamente ditos, as células binucleadas, os *Buds* e as pontes nucleoplasmáticas. Todas essas modificações celulares podem ser decorrentes do estresse oxidativo, já que elevadas concentrações de radicais livres causam quebras no DNA celular, e tais alterações podem ser observadas no teste de micronúcleos (MARGARITA et al., 2006).

De maneira geral, a quantidade de micronúcleos foi maior para o grupo de prematuros quando comparados com o grupo de recém-nascidos a termo, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Esses resultados concordam com Friel et al. (1993), os quais relataram que os prematuros podem apresentar maior quantidade de micronúcleos devido ao estresse oxidativo ocasionado pela imaturidade do sistema antioxidante, o qual é decorrente da curta gestação desses recém-nascidos.

Em relação às demais alterações celulares detectadas no Teste de Micronúcleos, a quantidade de células binucleadas foi maior para o grupo de prematuros, embora sem diferença estatisticamente significativa. Contudo, a evidência de *Buds* e de pontes nucleoplasmáticas foi praticamente igual para ambos

os grupos. Isso pode ser explicado pelo fato da ocorrência de tais alterações celulares ser menor quando comparada com os micronúcleos e células binucleadas.

Embora este estudo tenha inferido sobre o estresse oxidativo de maneira indireta por meio do teste de Micronúcleos, os resultados concordam com as afirmações de Robles, Palomino e Robles (2001), os quais relatam que os recém-nascidos prematuros são vulneráveis às condições de estresse oxidativo, já que os sistemas antioxidantes só estão adequadas no final da gestação.

A análise das vias auditivas centrais pode ser feita por meio da avaliação eletrofisiológica dos PEALL. Embora sua aplicação em recém-nascidos seja um tema recente e controverso por conta da maturação das estruturas corticais, acredita-se que essa avaliação possa ser útil para prever sobre possíveis alterações cognitivas e de linguagem, principalmente em prematuros, os quais são de risco para tais alterações.

Em bebês a obtenção dos potenciais exógenos (P1, N1, P2 e N2) está fundamentada no fato desses potenciais representarem a capacidade cortical de detecção do estímulo acústico, e por não dependerem da atenção do indivíduo.

Em nosso estudo foi possível observar um grande pico ao redor de 230 ms para o grupo controle e ao redor de 201 ms para o grupo estudo, e uma grande deflexão ao redor de 341 ms para o grupo controle e de 302 ms para o grupo estudo. A existência de um pico e de uma deflexão no traçado de recém-nascidos com até um mês de vida concorda com outros estudos como de Pasma et al., 1992, Kushnerenko, 2003, Wunderlich e Cone-Wesson e Shepherd, 2006.

A denominação utilizada para os potenciais visualizados foi P1 e N1, diferente de outros estudos em que a denominação foi de P2 e N2. Kushnerenko (2003) chama atenção para a denominação dos potenciais em bebês, relatando que a mesma é variável na literatura, já que alguns autores classificam os potenciais de acordo com a latência, não sendo correspondente à utilizada para adultos.

No presente trabalho não houve diferença estatisticamente significativa entre a latência dos componentes P1 e N1 entre o grupo de recém-nascidos a termo e prematuros. Esses resultados diferem do estudo de Pasma et al. (1992), em que o potencial P2 (pico ao redor de 200ms, correspondendo ao P1 para a presente pesquisa) mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Contudo os resultados do presente trabalho concordam com o estudo de Fellman et al. (2004), onde a latência dos componentes avaliados foi semelhante no grupo de

recém-nascidos a termo e prematuros. Os mesmos autores alertam que a prematuridade associada com ausência dos potenciais corticais pode ser um fator de risco para futuras alterações cognitivas.

As avaliações de genotoxicidade (condições celulares) por meio do Teste de Micronúcleos e dos PEALL nos recém-nascidos a termo e prematuros realizadas neste estudo permitiram avaliações interdisciplinares, correspondendo à aspectos de desenvolvimento das estruturas centrais, as quais são de fundamental importância para o desenvolvimento cognitivo e de linguagem, e às condições celulares, as quais são importantes para o biomonitoramento dos bebês prematuros, já que as alterações em nível celular predispõem o organismo à diversas doenças.

A partir dessa pesquisa, pode-se concluir que o Teste de Micronúcleos é útil para avaliação das condições celulares de recém-nascidos, sendo uma técnica de aplicação rápida e indolor, a qual pode predizer sobre diferentes doenças no período neonatal. Além disso, a pesquisa dos PEALL, apesar de ser recente em neonatos, também é útil, podendo oferecer indícios precoces sobre as condições das vias auditivas centrais.

8 CONCLUSÕES

A partir desse estudo pode-se concluir que os recém-nascidos prematuros apresentaram um índice maior de danos celulares a nível nuclear quando comparados com os recém-nascidos a termo. O biomonitoramento celular é importante para prever possíveis doenças nessa população.

Na avaliação eletrofisiológica dos potenciais corticais, foi possível observar os componentes exógenos P1 e N1 em recém-nascidos com até um mês de vida, tanto em bebês a termo quanto prematuros. Ressalta-se que são necessários mais estudos nessa área, a fim de se conhecer melhor as características desses potenciais em recém-nascidos e crianças pequenas, para que futuramente possam ser utilizados como preditivos de alterações cognitivas e linguísticas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

ANDRADE JUNIOR, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. bras. pneumol**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 60-8, 2005.

AYCICEK, A.; KOCYIGIT, A.; EREL, O.; SENTURKS, H. Fototerapia causa danos ao DNA de leucócitos mononucleares periféricos em recém-nascidos a termo. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 2, p. 141-6, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

CEPONIEN, R.; SHESTAKOVA, A.; BALAN, P.; ALKU, P.; YAGUCHI, K.; NÄÄTÄNEN, R. Children's auditory event-related potentials index stimulus complexity and "speechness". **International Journal of Neuroscience**, v. 109, n. 3-4, p. 245-260, 2001.

CEPONIENE, R.; RINNE, T.; NAATANEN, R. Maturation of cortical sound processing as indexed by event-related potentials. **Clinical Neurophysiology**, v. 113, n. 6, p. 870-882, 2002.

CHEOUR, M.; LEPPANEN, P. H.; KRAUS, N. Mismatch negativity (MMN) as a tool for investigating auditory discrimination and sensory memory in infants and children. **Clin. Neurophysiol**, v. 111, n.1, p. 4-16, 2000.

CHOUDHURY, N.; BENASICH, A. A. Maturation of auditory evoked potentials from 6 to 48 months: Prediction to 3 and 4 year language and cognitive abilities. **Clinical Neurophysiology**, v. 122, n. 2, p. 320-38, 2010.

CORREA, N. S.; BASSAN, J. S.; CUNHA, C. J.; FERNÁNDEZ, R. R.; BACHETTINI, P. S.; GARCÍAS, G. L.; MARITONO-ROTH, M. G. Monitoramento da ação genotóxica em trabalhadores de sapatarias através do teste de micronúcleos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2251-60, 2009.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat Res**, v, 41, n. 2-3, p. 321-32, 1976.

COURCHESNE, E. Chronology of postnatal human brain development: event-related potential, positron emission tomography, myelinogenesis, and synaptogenesis studies. In: ROHRBAUGH, R.; PARASUROMAN.; JOHNSON. **Event-Related Brain Potentials. Basic Issue and Applications**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 210-241.

CROSS, C. E.; HALLIWELL, B.; BORISH, E. T.; PRYOR, W. A.; AMES, B. N.; SAUL, R. L.; MCCORD, J. M.; HARMAN, D. Oxygen radicals and human disease. **Ann Int Med**, v. 107, n. 4, p. 526-45, 1987.

CSISZAR, A.; PODLUTSKY, A.; WOLIN, M. S.; LOSONCZY, G.; PACHER, P.; UNGVARI, Z. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. **Front Biosci**, v. 14, n. 1, p. 3128-44, 2009.

DE WEERD, A. W. **Atlas of EEG in the first months of life**. Amsterdam: Elsevier, 1995.

DUARTE, J. L.; ALVARENGA, K. F.; BANHARA, M. R.; MELLO, A. D. P.; SÁS, R. M.; FILHO, O. A. C. Potencial evocado auditivo de longa latência-P300 em indivíduos normais: valor do registro simultâneo em Fz e Cz. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 75, n. 2, p. 231-6, 2009.

FENECH, M. Important variables that influence base-linee micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. **Mut Res**, v. 404, n.3, p. 155-165, 1998.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human micronucleus project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat Res**, v. 428, n. 1-2, p. 271-83, 1999.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FELMAN, E. K.; MIKKOLA, R. C.; LEIPALA, J.; NAATANEN, R. Atypical auditory event-related potentials in preterm infants during the first year of life: a possible sign of cognitive dysfunction? **Pediatric Research**, v. 56, n. 2, p. 291-297, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v.43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FRANK, L.; GROSECLOSE, E. E. Preparation for birth into an O₂-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. **Pediatr Res**, v. 18, n. 3, p. 240-4, 1984.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of Disease: free radicals and tissue injury. **Laboratory Invest**, v. 47, n. 5, p. 412-26, 1982.

FRIEL, J. K.; ANDREWS, W. L.; LONG, D. R.; LABBÉ, M. R. Selenium status of very low birth weight infants. **Pediatr Res**, v. 34, n. 3, p. 293-6, 1993.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis micronucleus assay and Comet assay. **J Appl Toxicol**, v. 22, n. 4, p. 249- 255, 2002.

GOLDSTEIN, P. J.; KRUMHOLZ, A.; FELIX, J. K.; SHANNON, D.; CARR, R. F. Brain stem-evoked response in neonates. **Am J Obstet Gynecol**, v. 135, n. 5, p. 622-628, 1979.

GOMES, M. M.; SAUNDERS, C.; ACCIOLY, E. Vitamin A role preventing oxidative stress in newborns. **Rev Bras Saude Matern Infant**, v. 5, n. 3, p. 275-82, 2005.

GROENEN, P. A. P.; BEYNON, A. J.; SNIK, A. F. M.; VAN, B. P. Speech evoked cortical potentials and speech recognition in cochlear implant users. **Scand Audiol**, v. 30, n. 1, p. 31-40, 2001.

HALL, J. W. **Handbook of auditory evoked responses**. Massachusetts: Allyn and Bacon, 1990.

HALL, J. **New handbook of auditory evoked responses**. Boston: Allyn and Bacon, 2006.

HARGRAVES, W. A.; HENTALL, I. D. Analgesic effects of dietary caloric restriction in adult mice. **Pain**, v. 114, n. 3, p. 455-61, 2005.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. A report on the environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 123, n. 2-3, p. 61-118, 1983.

HEFFNER, J. E.; REPINE, J. E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. **Am Rev Respir Dis**, v. 140, n. 2, p. 531-54, 1989.

HOOD, L. J. **Clinical Applications of the Auditory Brainstem Response – Introduction and Overview** – Singular Publishing. San Diego; London, 1998.

HOLLAND, N.; FUCIC, A.; MERLO, D. F.; SRAM, R.; KIRSCH-VOLDERS, M. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 51–56, 2011.

JIANG, Z. D.; BROS, I. D. M.; LI, Z. H.; CHEN, C.; WILKINSON, A. R. Brainstem Auditory Function at Term in Preterm Babies With and Without Perinatal Complications. **Pediatric Research**, v. 58, n. 6, p. 1164-1169, 2005.

Joint Committee on Infant Hearing (JCIH). Year 2007 Position statement: principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. **Pediatrics**, v. 120, n. 4, p. 898-921, 2007.

JOHNSON, M. H. Functional brain development in humans. **Nature Reviews**, v. 2, n. 7, p. 475-483, 2001.

KERN, R. **Avaliação dos micronucleus em células epiteliais bucais de estudantes de odontologia**. 2006. 66 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Odontologia)-Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

KHAN, R. L.; RAYA, J. P.; NUNES, M. L. Avaliação do estado comportamental durante o sono em recém-nascidos. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 15, n. 1, p. 25-29, 2009.

KORCZAK P. A.; KURTZBERG, D.; STAPPELLS, D. R. Effects of sensori-neural hearing loss and personal hearing aids on cortical event-related potential and behavioral measures of speech-sound processing. **Ear Hear**. v. 26, n. 2, p. 165–85. 2005.

KORPILAHTI, P.; LANG, H. A. Auditory ERP components and mismatch negativity in dysphasic children. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, v. 91, n. 4, p. 256-264, 1994.

KRAUS, N.; MCGEE, T. Auditory event-related potentials. In: KATZ, J. **Handbook of clinical audiology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.

KRAUS, N.; MCGEE, T. Potenciais Auditivos Evocados de Longa Latência. In: KATZ, J. **Tratado de Audiologia Clínica**. 4ª edição. São Paulo: Manoele, 2002.

KRAUS, N.; NICOL, T. Aggregate neural responses to speech sounds in the central auditory system. **Speech Communication**. v. 41, n. 1, p. 35-47. 2003

KUSHNERENKO, E. V. **Maturation of the cortical auditory eventrelated brain potentials in infancy** .2003. 97 f. Academic dissertation (Department of Psychology)- University of Helsinki Finland, 2003.

KUSHNERENKO, E.; CEPONIENE, R.; BALAN, P.; FELLMAN, V.; HUOTILAINEN, M.; NAATANEN, R. Maturation of the auditory event-related potentials during the first year of life. **Cognitive neuroscience and neuropsychology**, v. 13, n. 1, p. 47-51, 2002.

MARGARITA, B. G. C.; CORONA-RIVERA, J. R.; GÓMEZ-MEDA, B. C.; ZAMORA-PEREZ, A. L. IBARRA, M. L.; GONZÁLEZ, G. M. Z. **Eritrocitos micronucleados en recién nacidos prematuros y su relación con la patología materna**. Participación de la mujer en la ciencia, III encuentro. 2006

MASSA, C. G. P.; RABELO, C. M.; MATAS, C. G.; SCHOCHAT, E.; SAMELLI, A. G. P300 with verbal and nonverbal stimuli in normal hearing adults. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 77, n. 6, p. 686-90, 2011.

MATAS, C. G; MAGLIARO, F. C. L. Introdução aos Potenciais Evocados Auditivos e Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico. In: BEVILACQUA, M. C.; MARTINEZ, M. A. N.; BALEN, S. A.; PUPU, A. C.; REIS, A. C. M. B.; FROTA, S. **Tratado de Audiologia**. São Paulo: Santos, 2011. p. 181-195.

MARTIN, D. A.; TREMBLAY, K. L.; STAPELLS, D. R. Principles and applications of cortical auditory evoked potentials. In: BURKAD, R. F.; DON, M.; EGGERMONT, J. J. **Auditory evoked potentials: basic principles and clinical application**. Baltimore: Lippincott Williams e Wilkins, 2007. p. 482-507.

MCPHERSON, D. L.; BALLACHANDA, B. B.; KAF, W. Middle and Longa Latency evoked potential. In: ROESER, R. J.; VALENTE, M.; DUNN, H. H. **Audiology: diagnosis**. New York: Thieme, 2008. p. 443-477.

MOLFESE, D. L.; MOLFESE, V. J. Discrimination of language skills at five years-of-age using event-related potentials recorded at birth. **Dev Neuropsychol**, v. 13, n. 2, p. 135-156, 1997.

NÄÄTÄNEN, R. **Attention and Brain Function**. Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, 1992.

NEGI, R.; PANDE, D.; KURNAR, A.; BASU, S.; KHANNA, R. S.; KHANNA, H. D. In vivo oxidative DNA damage, protein oxidation and lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress in preterm low birth weight infants. **J med sci**, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2011.

NOVAK, G. P.; KURZBERG, D.; KREUZER, J. A.; VAUGHAN, H. G. J. Cortical responses to speech sounds and their formants in normal infants: maturational sequence and spatiotemporal analysis. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, v. 73, n. 4, p. 295-305, 1989.

ORTIZ, G. G. Genotoxicity of paraquat: micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. **Mutat Res**, v. 464, n. 2, p. 239-245, 2000.

PALAZZO, R. P.; MALUF, S. W. Técnica micronúcleos com bloqueio da citocinese celular. In: MALUF, S. W.; RIEGEL, M.; colaboradores. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PASMAN, J. W.; ROTTEVEELB, J. J.; GRAAF, R.; STEGEMAN, D. F.; VISCOA, Y, M. The effect of preterm birth on brainstem, middle latency and cortical auditory evoked responses (BMC AERs). **Early Human Development**, v. 31, n. 2, p. 113-129, 1992.

PICTON, T.W; HILYARD, S. A.; KRAUZ, H. I.; GALAMBOS, R. Human auditory evoked potentials. In: In: BEVILACQUA, M. C.; MARTINEZ, M. A. N.; BALEN, S. A.; PUPU, A. C.; REIS, A. C. M. B.; FROTA, S. **Tratado de Audiologia**. São Paulo: Santos, 2011. p. 181-195.

PICTON, T. W.; HILLYARD, S. A.; GALAMBOS, R. Habituation and attention in the auditory system. In: KEIDEL, W.; NEFF, W. **Handbook of sensory physiology: the auditory system**. Berlin: Springer, 1976; 345-89.

POLICH, J. P300 in clinical applications: meaning, method and measurement. **Am. J. EEG Technol**, v. 31, p. 201-31, 1991.

POLIDORI, C.; CARO, G.; MASSI, M. The hyperphagic effect of nociceptin/or phanin FQ in rats. **Peptides**, v. 21, n. 7, p. 1051-1062, 2000.

REIS, S. R. A.; SOARES, L. P.; ROCHA, D.; SETUBAL, M. G. Avaliação da presença de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através dos métodos de Feulgen e Papanicolau. **Revista Odonto Ciência**, v. 10, n. 46, p. 367-371, 2004.

REIS, A. C. M. B. R.; FRIZZO, A. C. F. Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência. In: BEVILACQUA, M. C.; MARTINEZ, M. A. N.; BALEN, S. A.; PUPU, A. C.; REIS, A. C. M. B.; FROTA, S. **Tratado de Audiologia**. São Paulo: Santos, 2011. p. 231-260.

ROBLES, R.; PALOMINO, N.; ROBLES, A. Oxidative stress in the neonate. **Early Hum Dev**, v. 65, n. 2, p. 75-81, 2001.

RODRIGUES, F. P. Importância dos radicais livres de oxigênio no período neonatal. **J Pediatr**, v. 74, n. 2, p. 91-8, 1998.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHLENZIG, J. S.; BERVOETS, K.; LOEWENICH, V.; BÖHLES, H. Urinary malondialdehyde concentration in preterm neonates: is there a relationship to disease entities of neonatal intensive care? **Acta Paediatr**, v. 82, n. 2, p. 202-5, 1993.

SOUZA L. C. A.; PIZA, M. R. T.; ALVARENGA, K. F.; COSER, P. L. **Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas: princípios e aplicações clínicas**. São Paulo: Tecmedd, 2008.

SULLIVAN, J. L.; NEWTON, R. B. Serum antioxidant activity in neonates. **Arch Dis Child**, v. 63, n. 7, p. 748-57, 1988.

TSOPMO, A.; FRIEL, J. K. Human Milk has Anti-Oxidant Properties to Protect Premature Infants. **Current Pediatric Reviews**, v. 3, n. 1, p. 45-51, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VAUGHAN Jr, H. G.; KURTZBERG, D. Electrophysiologic indices of human brain maturation and cognitive development. Minnesota Symposia on Child Psychology. Erlbaum, Hillsdale. 1992. p. 1-36

VENTURA, L. M. P.; ALVARENGA, K. F.; FILHO, O. A. C. Protocolo para captação dos potenciais evocados auditivos de longa latência. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 75, n. 6, p. 879-83, 2009.

VENTURA, L. M. P.; COSTA FILHO, O. A.; ALVARENGA, K. F. Maturação do sistema auditivo central em crianças ouvintes normais. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica**, v. 21, n. 2, p.101-6, 2009.

World Health Organization Scientist Group on Health Statistics Methodology Related to Perinatal Events. Who, Genebra, 1974, p.32. In: COSTA, SMB.; COSTA FILHO, AO. O estudo dos potenciais evocados acusticamente de tronco cerebral em recém-nascidos pré-termo. **Rev. Bras. de Otorrinolaringol**, v. 64, n. 3, p. 231-8, 1998.

WUNDERLICH, J. L.; CONE-WESSON, B. K.; SHEPHERD, R. Maturation of the cortical auditory evoked potential in infants and young children. **Hearing Research**, v. 212, n. 1-2, p. 185–202, 2006.

YOSHIE, Y. Synergistic induction of DNA strands breakage by cigarette tar and nitric oxide. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 7, p. 1359-1363, 1997.

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. **Mutat Res**, v. 494, n. 1-2, p.161-167, 2001.

ANEXO I

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



PROJETO DE PESQUISA

Título: METABOLISMO OXIDATIVO E MATURAÇÃO DAS VIAS AUDITIVAS NOS POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS EM PREMATUROS

Área Temática:

Área 7. Biossegurança.

Versão: 2

CAAE: 05704712.8.0000.5346

Pesquisador: Aron Ferreira da Silveira

Instituição: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 109.677

Data da Relatoria: 17/09/2012

Apresentação do Projeto:

Este é um estudo de coorte que visa avaliar a influência do stress oxidativo na maturação das vias auditivas nos recém nascidos prematuros.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a influência do metabolismo oxidativo em prematuros e a maturação das vias auditivas nos Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE) e nos Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência (PEALL).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto tem seus riscos e benefícios adequados para o tipo de projeto

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os participantes serão avaliados no primeiro mês de vida e reavaliados após três meses o que caracteriza o estudo como um estudo de coorte.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovar o projeto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 27 de Setembro de 2012

Assinado por:
Félix Alexandre Antunes Soares
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 7º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: 5532-2093 **Fax:** 5532-2080 **E-mail:** comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br

APÊNDICE A

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Ministério da Educação
Universidade Federal de Santa Maria/RS
Centro de Ciências da Saúde



Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana

Pesquisadores responsáveis:

Aron Ferreira da Silveira, Michele Vargas Garcia e

Dayane Domeneghini Didoné

Telefone: (55)91338653

E-mail: dayanedidone@yahoo.com.br

Breve informação

O desenvolvimento das vias auditivas é fundamental para a aquisição da fala e aprendizagem escolar de seu filho (a). Por isso, os bebês, principalmente os prematuros, necessitam de avaliações das estruturas cerebrais que são responsáveis por esse desenvolvimento. Além disso, o nascimento pode causar pequenas alterações em algumas células do nosso corpo e causar diversas doenças, principalmente nos bebês prematuros. Portanto, a verificação dessas células também é importante para saber se a saúde do bebê está adequada.

Por isso, seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa de mestrado que tem como:

Título: Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência e Metabolismo oxidativo em recém-nascidos a termo e prematuros.

Objetivo: Verificar a saúde geral e as condições das vias auditivas de seu filho (a).

Descrição dos procedimentos: Para verificar o desenvolvimento das vias auditivas, alguns pontos da pele de seu filho (a), como testa e atrás das orelhas, serão limpos com algodão e álcool e, logo após serão colocados alguns eletrodos nessas regiões limpas, sendo fixados com esparadrapos. Esses eletrodos serão conectados a cabos ligados no computador, onde serão registradas as respostas do exame. Seu filho deverá permanecer de maneira confortável em seu colo. Será feita também a coleta de um pouco de saliva de seu filho (a) através de uma leve raspagem da bochecha com uma espátula, a fim de verificar se todas as células estão saudáveis. **Benefícios:** O seu filho receberá uma avaliação auditiva completa gratuitamente. Além disso, você obterá informação se as células do organismo de seu filho (a) estão saudáveis.

Riscos e desconfortos: A limpeza de alguns pontos da pele de seu filho (a) com álcool poderá causar pequena irritação à mesma, e a colocação dos fones de inserção (espécie de protetor auditivo) poderá lhe causar pequeno desconforto,

porém é mínimo. A coleta de saliva poderá causar leve incômodo, mas sem risco de dor.

Possibilidade de desistência: As avaliações serão encerradas a qualquer momento caso você não queira que seu filho (a) continue os exames. As disponibilidades de seus horários serão respeitadas para as avaliações. Caso solicite explicações sobre a pesquisa ou sobre os exames, a fonoaudióloga lhe dará informações a qualquer momento sem custo adicional.

Informações adicionais: Trata-se de uma pesquisa de mestrado da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os dados serão sigilosos o nome de seu filho (a) não será divulgado. Os resultados das suas avaliações serão analisados conjuntamente com os resultados de outros participantes. Após a defesa da dissertação de mestrado, serão publicados artigos científicos com as informações dos exames de todos os sujeitos participantes.

Considero-me igualmente informado:

- Da garantia de receber respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios, e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- Da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionada à minha privacidade, sendo que as avaliações realizadas serão usadas para obter informações relacionadas à pesquisa e, após, serão arquivadas pela pesquisadora para posteriores trabalhos na área de fonoaudiologia, sempre preservando o sigilo sobre a identidade dos participantes;
- Do compromisso dos pesquisadores de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que essa possa afetar a minha vontade de continuar participando;
- De que não terei gastos com a participação nesta pesquisa.

Mediante os esclarecimentos recebidos pela pesquisadora, eu _____ (nome completo), portador do documento de identidade número _____, responsável pelo (a) _____ autorizo a participação de meu filho (a) na pesquisa acima referida. Afirmando que estou ciente de que os dados deste estudo serão divulgados em meio científico, sem a minha identificação.

Assinatura do participante

Assinatura da pesquisadora

Data: ___/___/___