



Brazilian Journal of Otorhinolaryngology

ISSN: 1808-8694

ISSN: 1808-8686

Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia
Cervicofacial

Zucki, Fernanda; Morata, Thais C.; Duarte, Josilene L.; Ferreira,
Maria Cecília F.; Salgado, Manoel H.; Alvarenga, Kátia F.

The maturation state of the auditory nerve and brainstem in rats
exposed to lead acetate and supplemented with ferrous sulfate#

Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, vol. 84, no. 2, 2018, March-April, pp. 150-158

Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervicofacial

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.12.004>

Available in: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=392455541003>

- How to cite
- Complete issue
- More information about this article
- Journal's webpage in redalyc.org

UDEM redalyc.org

Scientific Information System Redalyc

Network of Scientific Journals from Latin America and the Caribbean, Spain and
Portugal

Project academic non-profit, developed under the open access initiative



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

The maturation state of the auditory nerve and brainstem in rats exposed to lead acetate and supplemented with ferrous sulfate[☆]



Fernanda Zucki^{a,*}, Thais C. Morata^b, Josilene L. Duarte^c,
Maria Cecília F. Ferreira^c, Manoel H. Salgado^d e Kátia F. Alvarenga^c

^a Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, SP, Brasil

^b National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Atlanta, EUA

^c Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Odontologia de Bauru, Departamento de Fonoaudiologia, Bauru, SP, Brasil

^d Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Departamento de Engenharia de Produção, Bauru, SP, Brasil

Recebido em 27 de setembro de 2016; aceito em 29 de dezembro de 2016

Disponível na Internet em 3 de julho de 2017

KEYWORDS

Hearing;
Auditory evoked
potentials;
Lead acetate;
Blood lead levels;
Ferrous sulfate

Abstract

Introduction: The literature has reported the association between lead and auditory effects, based on clinical and experimental studies. However, there is no consensus regarding the effects of lead in the auditory system, or its correlation with the concentration of the metal in the blood.

Objective: To investigate the maturation state of the auditory system, specifically the auditory nerve and brainstem, in rats exposed to lead acetate and supplemented with ferrous sulfate.

Methods: 30 weanling male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar) were distributed into six groups of five animals each and exposed to one of two concentrations of lead acetate (100 or 400 mg/L) and supplemented with ferrous sulfate (20 mg/kg). The maturation state of the auditory nerve and brainstem was analyzed using Brainstem Auditory Evoked Potential before and after lead exposure. The concentration of lead in blood and brainstem was analyzed using Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry.

Results: We verified that the concentration of Pb in blood and in brainstem presented a high correlation ($r=0.951$; $p<0.0001$). Both concentrations of lead acetate affected the maturation state of the auditory system, being the maturation slower in the regions corresponding to portion of the auditory nerve (wave I) and cochlear nuclei (wave II). The ferrous sulfate supplementation reduced significantly the concentration of lead in blood and brainstem for the group exposed

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.12.004>

[☆] Como citar este artigo: Zucki F, Morata TC, Duarte JL, Ferreira MC, Salgado MH, Alvarenga KF. The maturation state of the auditory nerve and brainstem in rats exposed to lead acetate and supplemented with ferrous sulfate. Braz J Otorhinolaryngol. 2018;84:150–8.

* Autor para correspondência.

E-mail: fernandazucki@hotmail.com (F. Zucki).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

PALAVRAS-CHAVE

Audição;
Potenciais evocados
auditivos;
Acetato de chumbo;
Níveis de chumbo no
sangue;
Sulfato ferroso

to the lowest concentration of lead (100 mg/L), but not for the group exposed to the higher concentration (400 mg/L).

Conclusion: This study indicate that the lead acetate can have deleterious effects on the maturation of the auditory nerve and brainstem (cochlear nucleus region), as detected by the Brainstem Auditory Evoked Potentials, and the ferrous sulphate can partially amend this effect.

© 2017 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Estado de maturação do nervo auditivo e tronco encefálico em ratos expostos a acetato de chumbo e suplementados com sulfato ferroso**Resumo**

Introdução: A literatura relatou a associação entre o chumbo e os efeitos auditivos, com base em estudos clínicos e experimentais. No entanto, não há consenso em relação aos efeitos do chumbo no sistema auditivo, ou sua correlação com a concentração do metal no sangue.

Objetivo: Investigar o estado de maturação do sistema auditivo, especificamente do nervo auditivo e do tronco encefálico, em ratos expostos ao acetato de chumbo e suplementados com sulfato ferroso.

Método: 30 ratos machos desmamados (*Rattus norvegicus*, Wistar) foram distribuídos em seis grupos de cinco animais e expostos a uma de duas concentrações de acetato de chumbo (100 ou 400 mg/L) e suplementados com sulfato ferroso (20 mg/kg). O estado de maturação do nervo auditivo e do tronco encefálico foi analisado pelo Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico antes e após a exposição ao chumbo. A concentração de chumbo no sangue e tronco encefálico foi analisada utilizando-se Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado.

Resultados: Verificamos que as concentrações de Pb no sangue e no tronco encefálico apresentaram alta correlação ($r=0,951$, $p<0,0001$). Ambas as concentrações de acetato de chumbo afetaram o estado de maturação do sistema auditivo, a maturação foi mais lenta nas regiões correspondentes à porção do nervo auditivo (onda I) e dos núcleos cocleares (onda II). A suplementação com sulfato ferroso reduziu significativamente a concentração de chumbo no sangue e no tronco encefálico no grupo exposto à menor concentração de chumbo (100 mg/L), mas não para o grupo exposto à maior concentração (400 mg/L).

Conclusão: Esse estudo indica que o acetato de chumbo pode ter efeitos deletérios na maturação do nervo auditivo e do tronco encefálico (região do núcleo coclear), como detectado pelos potenciais evocados auditivos do tronco encefálico, e que o sulfato ferroso pode diminuir parcialmente esse efeito.

© 2017 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

Associação significativa entre alta exposição ao chumbo (Pb) e resultados negativos de desenvolvimento tem sido relatada, inclusive distúrbios na inteligência, cognitivos, emocionais e comportamentais. Recentemente, a exposição ao baixo nível de Pb mostrou ter impactos negativos pequenos, mas significativos, que persistem durante a infância e início da adolescência e da fase adulta.

A literatura também relatou a associação entre Pb e efeitos auditivos, com base em estudos clínicos e experimentais. No entanto, não há consenso em relação aos efeitos do Pb no sistema auditivo ou sua correlação com a concentração do metal no sangue.¹⁻⁶

Dada a toxicidade geral do Pb em seres humanos, alguns estudos objetivaram examinar os efeitos protetores de agentes quelantes e antioxidantes, entre outros.⁷⁻⁹ Um estudo⁸ apresentou uma revisão sobre os efeitos benéficos de diferentes antioxidantes na prevenção da carga corporal de Pb

e estresse oxidativo. Descobriu-se que a administração de antioxidantes naturais ou sintéticos demonstrou ser benéfica na prevenção e atenuação de alterações bioquímicas induzidas pelo metal, mas estudos a esse respeito em seres humanos ainda são limitados. Em pesquisas que investigaram os possíveis efeitos protetores do ferro (Fe) sobre a exposição ao Pb, verificou-se que o Fe impediu a citotoxicidade e a apoptose induzida por Pb,¹⁰ possivelmente protegeu a integridade da barreira hematoencefálica.¹¹ Em contraste, estudos anteriores que examinaram o efeito do Pb no sistema antioxidante cerebral e no sistema auditivo central não confirmaram um efeito protetor do Fe no córtex auditivo.^{12,13}

O PEATE é uma medida eletrofisiológica que tem sido usada em pesquisas que envolvem exposição ao Pb e ao sistema auditivo. Ele mede a atividade elétrica que ocorre da porção distal do nervo auditivo ao colículo inferior na região do tronco encefálico, mapeia as sinapses das vias auditivas relacionadas ao nervo coclear, núcleos cocleares,

complexo olivar superior (ponte) e colículo inferior (mesencéfalo). O PEATE representa a ativação sequencial de uma série de núcleos, expressa no aparecimento de uma onda; a mudança de sua amplitude pode indicar a ativação particular dos núcleos do tronco encefálico e o desenvolvimento da via auditiva central periférica, demonstrando a correlação entre o desenvolvimento da função sináptica e o potencial de maturação pós-natal desse processo.¹⁴ A latência indica o tempo decorrido entre a apresentação do estímulo acústico e a ocorrência dos picos. Com o processo de maturação do sistema auditivo, ocorrem mudanças graduais na morfologia do PEATE, bem como nas características de latência e amplitude das ondas. Essas alterações têm sido atribuídas à mielinização progressiva das fibras, melhor sincronização neural e maior eficiência da transmissão sináptica dentro da via auditiva.¹⁴⁻¹⁶ Em humanos, as vias retrococleares e do tronco encefálico amadurecem desde o nascimento até o segundo ano de vida.¹⁷

Estudos eletrofisiológicos em humanos ou animais expostos ao Pb tem sido conduzidos em amostras com o processo de maturação do sistema auditivo periférico e central (até o tronco encefálico) finalizado, não permitindo avaliar a relação entre intoxicação por Pb e estado de maturação do sistema auditivo.

O objetivo do presente estudo foi analisar o estado de maturação do nervo auditivo e do tronco encefálico em ratos expostos ao acetato de chumbo e se os seus efeitos adversos foram impedidos pela administração de sulfato ferroso.

Método

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo - FOB/USP, Brasil (processo número 019/2009). Um estudo piloto foi conduzido para estabelecer a relação entre o acetato de chumbo administrado na água e a concentração de Pb obtida do sangue dos animais. Duas concentrações de acetato de chumbo na água foram estabelecidas, 100 e 400 mg/L, representando baixa e alta exposição ao Pb, respectivamente. Foram obtidas concentrações de Pb no sangue dos animais de aproximadamente 10 µg/dL e 30 µg/dL.

Animais e exposição

O estudo realizado com 30 ratos machos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, Wistar), oriundos do Biotério Central da instituição proponente, com 26 dias de vida e pesando em média 96-105 g cada. Foram divididos em seis grupos de cinco animais:

- Controle: recebeu somente água de beber deionizada;
- 100 mg/L Pb: recebeu 100 mg/L de Pb (CH_3COO)₂ em água de beber;
- 100 mg/L de Pb + FeSO_4 : recebeu 100 mg/L de Pb (CH_3COO)₂ em água de beber e uma solução de FeSO_4 a uma dose de 20 mg/kg de peso corporal;
- 400 mg/L Pb: recebeu 400 mg/L de Pb (CH_3COO)₂ em água de beber;

- 400 mg/L de Pb + FeSO_4 : recebeu 400 mg/L de Pb (CH_3COO)₂ em água de beber e uma solução de FeSO_4 a uma dose de 20 mg/kg de peso corporal;
- FeSO_4 : recebeu água deionizada para beber e uma solução de FeSO_4 a uma dose de 20 mg/kg de peso corporal.

Os animais foram mantidos durante seis semanas em gaiolas metabólicas em uma sala com temperatura e umidade controladas, com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com alimento e água *ad libitum*. A dieta selecionada foi a ração comercial Purina® (Labina-Purina, São Paulo, SP, Brasil), com baixas concentrações de Pb e Fe. A água para beber foi preparada com a dissolução de acetato de chumbo em água destilada e deionizada em concentrações de 100 mg/L e 400 mg/L e a concentração de Pb em água foi analisada por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. O consumo de água foi avaliado a cada dois dias.

A solução de sulfato ferroso (FeSO_4) e a água deionizada foram administradas uma vez a cada dois dias aos animais por via oral por meio de gavagem, com um tubo de aço inoxidável rígido com a ponta arredondada. A gavagem é considerada o método mais preciso de administração oral para o animal, além de permitir a administração da dosagem exata predeterminada. Mesmo assim, tentamos controlar possíveis perdas de solução ao calcular a quantidade restante de solução no tubo e assegurar que os conteúdos inicialmente estabelecidos fossem administrados. A gavagem foi feita por um profissional experiente.

Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE)

O PEATE foi feito antes e após a exposição ao Pb, quando os ratos tinham 26 dias, e foi repetido aos 63 dias, para avaliar o estado de maturação do sistema auditivo.

Preparação do animal

Cada rato foi levemente sedado com ketamina e xilazina (substâncias que não interferem nas respostas do teste) para a colocação de eletrodos de superfície usados para registrar os potenciais evocados. Foi realizada a tricotomia do crânio e a limpeza da pele, aplicada a pasta eletrolítica nos eletrodos de superfície Embramac. Esses foram conectados ao pré-amplificador EPA 25 e posicionados da seguinte forma: o eletrodo ativo em Fz, eletrodos de referência posicionados em M1 e M2 (mastóide esquerda e direita) e eletrodo terra na pata traseira na parte de trás da pata. A impedância individual dos eletrodos foi mantida inferior a 5 kΩ e a impedância entre eles foi inferior a 2 kΩ.

Registro do PEATE

O PEATE foi obtido com um equipamento *Smart-EP* da *Intel-ligent Hearing Systems* (IHS) (Miami, FL, EUA), para gerar estímulo acústico e para aquisição de sinais. A orelha de teste foi escolhida aleatoriamente. Os estímulos de clique (rarefação) foram apresentados unilateralmente por meio de um fone de ouvido (duração do pulso, 0,1 ms, taxa de apresentação, 21,1 cliques/segundo) a uma intensidade de

80 dB nHL e média de 1.000 apresentações. As respostas foram filtradas com um filtro passa-banda de 100-3000 Hz.

Foram obtidos dois registros para cada orelha e a presença de resposta foi considerada com a observação da reprodutibilidade das ondas. Foram analisados as latências absolutas das ondas I, II, III e IV e os valores dos intervalos interpicos. Este estudo não considerou a onda V, pois a ocorrência dessa onda pode ser considerada atípica, mesmo em ratos normais.¹⁸

Coleta de amostras

No fim do período experimental, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina e xilazina. A cavidade peritoneal e o tórax foram expostos e o coração foi perfurado para coleta de sangue em tubos Trace Royal Blue BD Hemogard (BD Vacutainer®, EUA), que apresentam baixos níveis de elementos traço, que foi então armazenado a -20 °C para posterior análise da concentração de Pb. O tronco encefálico do animal foi dissecado, pesado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para análise posterior da concentração de Pb no tecido.

Análise de chumbo no sangue total e tronco encefálico

A análise de Pb no sangue e no tronco encefálico foi feita em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado; foi equipado com uma célula de reação (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, Perkin Elmer, Sciex, Norwalk, CT, EUA), como descrito por Batista et al.¹⁹ Para amostras de tecidos e Materiais de Referência Certificados (MRC), foram pesados aproximadamente 75 mg em tubos Falcon® de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson). Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) a 50% (v/v) às amostras, que foram incubadas à temperatura ambiente durante 12 h em um homogeneizador rotativo. Após solubilização, o volume foi ajustado para 10 mL com uma solução diluída com ácido nítrico (HNO₃) a 0,5% (v/v), 10 µg/L de Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Os padrões de calibração analítica foram preparados em um intervalo de concentração entre zero e 20 µg/L, em diluente com TMAH 5% (v/v), HNO₃ 0,5% (v/v), 10 µg/L Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). O limite de detecção para Pb foi 0,0066 µg/L.

Para a análise do sangue foram colocados 200 µL de cada amostra em um tubo de polipropileno Falcon® de 15 mL (Becton Dickinson), atingiu-se um volume final de 10 mL (diluição de 50 vezes) com uma solução com HNO₃ a 0,5% (v/v), 10 µg/L de Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Os padrões de calibração analítica foram preparados no intervalo de concentração entre zero e 20 µg/L no mesmo diluente. A curva foi feita com ajuste da matriz, que continha os padrões de calibração, sangue ovino diluído 50 vezes (sangue com base) e diluente.

As amostras foram preparadas e injetadas diretamente no equipamento. O controle de qualidade para a análise do Pb seguiu as diretrizes fornecidas em materiais de referência pelo *National Institute of Standards and American Technology* (NIST 955c) pelo *Department of Health of New York State* (NYSDOH - programa de testes de proficiência para elementos traço em sangue total) e pelo *National Public Health*

Institute de Quebec, Canadá (INSP - esquema de análise de qualidade externa [EQAS] para elementos traço em sangue).

Análise estatística

Para a análise de dados usamos o *software* GraphPad Instat (versão 3.0 para Windows, GraphPad Inc. La Jolla, CA, EUA). Inicialmente verificamos a normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e a homogeneidade dos dados (teste de Bartlett), para a seleção do teste estatístico apropriado.

A concentração de Pb no sangue foi analisada com Anova, seguida pelo teste de Tuckey após transformação logarítmica. Em seguida, a concentração de Pb no tronco encefálico foi analisada com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais.

Para a análise estatística do PEATE, foi usado o *software* SPSS versão 13.0. O teste *t* de Student pareado foi usado para comparação de resultados entre a orelha direita e esquerda. O teste Anova de medidas repetidas com dois fatores foi adotado para avaliar três variáveis:

- Efeito Grupo: os resultados pré- e pós-exposição ao Pb foram comparados entre os grupos;
- Efeito Tempo: comparação dos resultados pré- e pós-exposição ao Pb independentemente do grupo;
- Efeito Grupo × Tempo: comparação dos resultados pré- e pós-exposição ao Pb por grupo e tempo.

Resultados

Nível de chumbo no sangue e no tronco encefálico

A administração de FeSO₄ reduziu a concentração de Pb no sangue e no tronco encefálico (tabela 1). No sangue, as menores concentrações de Pb foram observadas nos grupos controle e FeSO₄, enquanto que o valor mais alto foi encontrado para o grupo com 400 mg/L de Pb. A administração concomitante de FeSO₄ nos grupos 100 mg/L de Pb + FeSO₄ e 400 mg/L de Pb + FeSO₄ reduziu a concentração de Pb no sangue em 65% e 50%, respectivamente; no entanto, foi observada diferença estatisticamente significativa apenas para 100 mg/L de Pb e 100 mg/L de Pb + FeSO₄ (tabela 1).

No tronco encefálico, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e 400 mg/L de Pb e entre o grupo FeSO₄ com os grupos 400 mg/L de Pb e 400 mg/L de Pb + FeSO₄. Embora tenha sido observada uma redução na concentração de Pb no tronco encefálico dos animais que receberam administração concomitante de sulfato ferroso, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados com os seus pares sem suplementação, conforme apresentado na tabela 1.

PEATE

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov mostrou distribuição normal dos resultados do PEATE obtidos neste estudo ($p \leq 0,05$). Na análise das ondas I, II, III e IV do PEATE pré- e pós-exposição ao Pb, o fator orelha não foi considerado individualmente, uma vez que as orelhas direita e

Tabela 1 Média (\pm DP) da concentração de chumbo no sangue e tronco encefálico dos animais dos grupos controle e experimental ($n = 5/\text{grupo}$)

Grupos	[Chumbo] no sangue ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	[Chumbo] no tronco encefálico (ng/g)
Controle	$0,19 \pm 0,10$	$11,18 \pm 4,42$
100 mg/L Pb	$10,56 \pm 5,29^{a,b}$	$27,21 \pm 7,03$
100 mg/L Pb + FeSO_4	$3,89 \pm 2,04^a$	$19,53 \pm 9,41$
400 mg/L Pb	$48,39 \pm 8,66^a$	$259,88 \pm 76,53^a$
400 mg/L Pb + FeSO_4	$25,85 \pm 3,61^a$	$208,87 \pm 91,10$
FeSO_4	$0,13 \pm 0,02$	$8,54 \pm 1,34^c$

^a Média com diferença significativa quando comparados o grupo controle com grupos experimentais.

^b Média com diferença significativa entre os grupos com 100 mg/L de Pb e 100 mg/L de Pb + FeSO_4 .

^c Média com diferença significativa entre os grupos FeSO_4 , 400 mg/L de Pb e 400 mg/L de Pb + FeSO_4 .

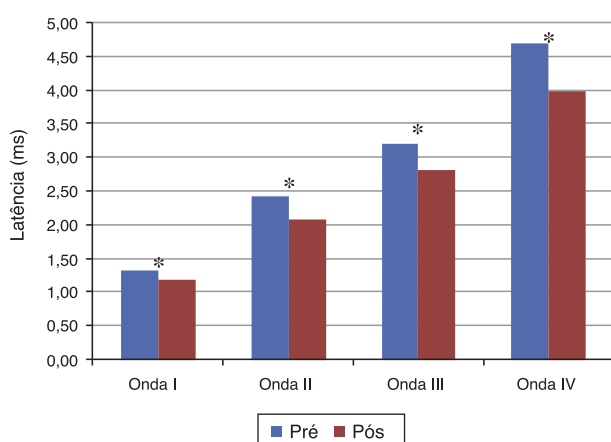


Figura 1 Média e valor de p de latências absolutas (em ms) das ondas I, II, III e IV do PEATE para o Efeito Tempo. Pré, Pré-exposição ao Pb; Pós-Pós-exposição ao Pb; Ms, milissegundos; p obtido a partir da comparação em cada momento (pré e pós-exposição a Pb); * $p < 0,01$; Pré-exposição ao Pb, ratos com 26 dias; Pós-exposição a Pb, ratos com 63 dias. A maturação do sistema auditivo (nervo auditivo e tronco encefálico), que ocorre nos seres humanos desde o nascimento até o segundo ano de vida, promove uma diminuição gradual das latências absolutas das ondas do PEATE.

esquerda foram comparadas (teste t pareado) e não houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

As figuras 1 e 2 apresentam a média e o valor de p das latências absolutas das ondas I, II, III e IV e os intervalos interpicos I-II, II-III, III-IV e I-IV, respectivamente, para o Efeito Tempo. A análise do Efeito Tempo demonstrou uma diferença estatisticamente significativa para todas as ondas de latências absolutas (fig. 1) e intervalos interpicos (fig. 2), entre os períodos pré- e pós-exposição ao Pb.

As tabelas 2 e 3 mostram a média e o valor de p das latências absolutas das ondas I, II, III e IV e os intervalos interpicos I-II, II-III, III-IV e I-IV, respectivamente, para o Efeito Grupo.

Discussão

Diferentes pesquisadores apresentaram hipóteses sobre os mecanismos pelos quais o Pb pode alterar os processos bioquímicos, farmacológicos e moleculares no Sistema Nervoso Central (SNC),²⁰ inclusive (1) interações do Pb com

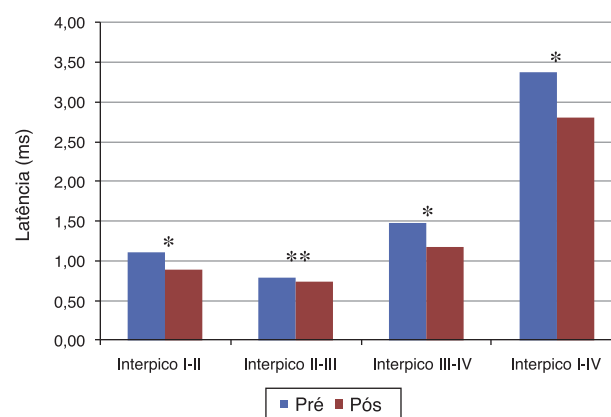


Figura 2 Média e valor de p dos intervalos interpicos I-II, II-III, III-IV e I-IV para o PEATE para o Efeito Tempo. Pré, Pré-exposição ao Pb; Pós-Pós-exposição ao Pb; Ms, milissegundos; p obtido a partir da comparação em cada momento (pré e pós-exposição a Pb); * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; Pré-exposição ao Pb, ratos com 26 dias; Pós-exposição ao Pb, ratos com 63 dias. A maturação do sistema auditivo (nervo auditivo e tronco encefálico), que ocorre nos seres humanos desde o nascimento até o segundo ano de vida, promove uma diminuição gradual das latências absolutas dos intervalos interpicos do PEATE.

proteínas celulares;²¹ (2) inibição dos canais de cálcio sensíveis à voltagem;²² (3) perturbação da transmissão sináptica de diversos neurotransmissores;^{22,23} (4) alteração do desenvolvimento e crescimento de neurônios e astrogliia em sistemas de cultura;²⁴ e (5) interação direta com íons metálicos essenciais no cérebro.²⁵

O nível de Fe em tecidos específicos no SNC é regulado para atender às necessidades especializadas do metabolismo e prevenir a citotoxicidade.^{26,27} A absorção do Fe é controlada por um mecanismo conhecido como homeostase do Fe²⁷ e apesar da importância dessa homeostase, os mecanismos que envolvem a absorção de Fe no cérebro não são bem compreendidos.²⁸ A perda da homeostase pode ocorrer a partir de estados agudos, tais como disfunção neuronal causada por acidente vascular cerebral (quando a barreira hematoencefálica está comprometida) ou distúrbios neurológicos progressivos, tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, distúrbios hereditários como a hemocromatose e o acúmulo de metais tais como Pb e cádmio no plexo coroide.^{20,29-32} As toxinas seletivas do

Tabela 2 Média e valor de *p* de latências absolutas (em ms) das ondas I, II, III e IV do PEATE para o Efeito Grupo

Efeito Grupo (n = 30)	Ondas (ms)							
	I Exposição		II Exposição		III Exposição		IV Exposição	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Controle	1,388	1,236	2,566	2,109	3,418	2,882	4,895	4,128
100 mg/L Pb	1,292	1,167	2,278	2,079	3,101	2,888	4,594	4,091
100 mg/L Pb + FeSO ₄	1,231	1,230	2,328	2,038	3,067	2,753	4,490	3,850
400 mg/L Pb	1,324	1,197	2,345	2,106	3,181	2,827	4,582	3,987
400 mg/L Pb + FeSO ₄	1,378	1,110	2,539	2,007	3,340	2,692	4,753	3,854
FeSO ₄	1,270	1,195	2,451	2,118	3,152	2,844	4,822	4,017
<i>p</i>	0,237	0,397	0,066	0,468	0,030 ^a	0,189	0,175	0,125

ms, milissegundos; Pré, Pré-exposição ao Pb; Pós, Pós-exposição ao Pb.

^a *p* obtido a partir da comparação dos grupos em cada momento (pré e pós-exposição a Pb).**Tabela 3** Média e valor de *p* dos intervalos interpícos (em ms) I-II, II-III, III-IV e I-IV do PEATE para o Efeito Grupo

Efeito Grupo (n = 30)	Intervalos interpícos (ms)							
	I-II Exposição		II-III Exposição		III-IV Exposição		I-IV Exposição	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Controle	1,178	0,873	0,852	0,773	1,477	1,246	3,507	2,892
100 mg/L Pb	0,986	0,912	0,823	0,809	1,493	1,203	3,302	2,924
100 mg/L Pb + FeSO ₄	1,097	0,808	0,739	0,715	1,423	1,097	3,259	2,620
400 mg/L Pb	1,021	0,909	0,836	0,721	1,401	1,160	3,258	2,790
400 mg/L Pb + FeSO ₄	1,161	0,897	0,801	0,685	1,413	1,162	3,375	2,744
FeSO ₄	1,181	0,923	0,701	0,726	1,670	1,173	3,552	2,822
<i>p</i>	0,011 ^a	0,131	0,384	0,200	0,192	0,270	0,143	0,033 ^a

ms, milissegundos; Pré, Pré-exposição ao Pb; Pós, Pós-exposição ao Pb.

^a *p* obtido a partir da comparação dos grupos em cada momento (pré e pós-exposição ao Pb).

plexo coroide geralmente não alteram diretamente a permeabilidade nem produzem alterações maciças fisiopatológicas observadas na prática clínica. No entanto, metais como o Pb, em direção ao cérebro, podem atuar seletivamente sobre certas funções reguladoras críticas do plexo coroide, resultar em consequências neurotóxicas importantes.²⁰ O Fe é considerado uma das toxinas sequestradas do plexo coroide, as quais são também denominadas toxinas armazenadas pela barreira e que podem ser depositadas no plexo coroide ou sequestradas por ele. No entanto, o sequestro desses metais no tecido não foi associado a qualquer consequência patológica ou patofisiológica conhecida para a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano.²⁰ Assim, podemos supor que o desequilíbrio na homeostase do Fe no cérebro, causado pela administração de Pb, pode ser revertido pela suplementação de Fe e reduzir a absorção de Pb pelo tronco encefálico.

Em estudos que investigaram os possíveis efeitos protetores do Fe sobre a exposição ao Pb, verificou-se que o Fe evitou a citotoxicidade e a apoptose induzida pelo Pb,¹⁰ possivelmente protegendo a integridade da barreira hematoencefálica.¹¹ Em contraste, outros estudos que examinaram o efeito do Pb no sistema antioxidante cerebral e no sistema auditivo central não confirmaram um efeito

protetor do Fe no córtex auditivo.^{12,13} Nossas observações demonstraram que o sulfato ferroso teve um efeito protetor contra a neurotoxicidade do Pb. Verificamos níveis reduzidos de Pb no sangue quando o sulfato ferroso foi administrado a animais expostos ao Pb. A diferença foi estatisticamente significativa para o grupo que recebeu a menor dose de acetato de chumbo. Estudos anteriores usaram concentrações de sulfato ferroso que variavam de 7 a 40 mg/kg.^{10,11} Um estudo relatou que uma dose de 7 mg/kg de Fe diminuiu a concentração de Pb no cérebro e foi protetora, enquanto que 14 mg/kg aumentaram a concentração de Pb no cérebro, embora aparentemente protegesse a barreira hematoencefálica. Em uma publicação posterior de acompanhamento, foram usados 20 mg/kg como dose baixa e 40 mg/kg de Fe como dose alta e sendo relatada exatamente a mesma quantidade de Pb no sangue que no estudo anterior. Esses estudos apresentaram inconsistências metodológicas que tornaram incerta a relação entre a suplementação de Fe e os efeitos associados ao Pb. Por esse motivo, no presente estudo, usamos 20 mg/kg de sulfato ferroso, o que corresponde a um valor médio apresentado na literatura (varia de 7 a 40 mg/kg),^{10,11} e os nossos resultados demonstraram que 20 mg/Kg foram capazes de reduzir significativamente a concentração de Pb no sangue.

A análise da concentração de Pb no tronco encefálico e no sangue confirmou alta correlação entre a concentração de Pb em ambos ($r = 0,951$, $p < 0,0001$). No entanto, apesar de ter sido verificada uma redução nas concentrações de Pb no tecido do tronco encefálico para os grupos com 100 mg/L de Pb + FeSO₄ e 400 mg/L de Pb + FeSO₄, esse resultado não foi significativo quando comparado com os grupos que não receberam sulfato ferroso. Em um estudo¹¹ que usou apenas uma concentração de acetato de chumbo (342 mg/mL) associada à suplementação com duas doses de sulfato ferroso (7 e 14 mg/kg), a análise do nível de Pb em três tecidos cerebrais diferentes demonstrou que os grupos suplementados com baixas concentrações de sulfato ferroso tiveram uma redução significativa na concentração de Pb nessas regiões em comparação com o grupo que recebeu apenas acetato de chumbo, enquanto a alta concentração de sulfato ferroso na suplementação não teve efeito significativo sobre os níveis de Pb no cérebro.

Em relação aos resultados obtidos no PEATE, a análise do Efeito Tempo (pré- e pós-exposição ao Pb) demonstrou redução significativa das latências absolutas das ondas I, II, III e IV (fig. 1) e dos valores dos intervalos interpicos I-II, II-III, III-IV e I-IV (fig. 2) em todos os grupos. Esse resultado era esperado, pois a pesquisa foi desenvolvida para incluir o estado de maturação do nervo auditivo e tronco encefálico, com o estudo do PEATE pré-exposição realizado nos ratos com 26 dias e o estudo pós-exposição nos ratos com 63 dias. Assim, os resultados demonstraram que a exposição ao acetato de chumbo não impediu o estado de maturação das estruturas do sistema auditivo, pois houve uma redução na latência absoluta das ondas e valores dos intervalos interpicos com o aumento da idade. Isso reflete a mielinização gradual das fibras, sincronização neural e aumento da eficiência de transmissão na sinapse dentro dos núcleos na via auditiva do tronco encefálico.¹⁴⁻¹⁶

No entanto, na análise do Efeito Grupo, observamos que os grupos controle e com 100 mg/L de Pb + FeSO₄ apresentaram diferenças estatisticamente significativas na latência absoluta da onda III quando comparados com os demais grupos ($p = 0,030$) no teste pré-exposição (tabela 2). De forma semelhante, os grupos com FeSO₄ e 100 mg/L de Pb apresentaram valores significativamente diferentes do intervalo interpico I-II quando comparados com os outros grupos ($p = 0,011$) (tabela 3). Os resultados dos testes pós-exposição revelaram que a diferença estatística não foi mantida; ou seja, a latência absoluta da onda III e os valores do intervalo interpico I-II não foram significativamente diferentes entre os grupos ($p = 0,189$ e $p = 0,131$, respectivamente). Os dados sugerem que o estado de maturação foi mais lento no nervo auditivo e no núcleo coclear (porção inferior do tronco encefálico) em grupos expostos a baixas concentrações de Pb.

Além disso, a análise do Efeito Grupo \times Tempo mostrou que a redução esperada no valor do intervalo interpico I-II foi menor com 100 mg/L de Pb e 400 mg/L de Pb ($p = 0,049$) quando comparado com os outros grupos. Isso reforça a hipótese do efeito do Pb na maturação das estruturas do sistema auditivo periférico, pois a onda I corresponde à atividade do nervo auditivo e a onda II corresponde à região do núcleo coclear. Os resultados obtidos a partir da análise do Efeito Grupo e Efeito Grupo \times Tempo indicaram que para ambas as concentrações de acetato de chumbo usadas, o estado

de maturação foi mais lento nas regiões correspondentes ao nervo auditivo e núcleos cocleares, de acordo com resultados relatados por outros estudos.^{33,34}

Os demais estudos apresentados na literatura que realizaram o PEATE em humanos e animais com histórico de intoxicação por Pb não incluíram a análise do estado de maturação do sistema auditivo periférico e central (até o tronco encefálico). Entretanto, vale ressaltar que o efeito tóxico do Pb nessas estruturas do sistema foi confirmado na maioria dos estudos.^{1,35-45} Porém, há descrições de resultados normais do PEATE,^{2,46-49} assim como falta de correlação entre os resultados do PEATE e a concentração de Pb no sangue.^{6,49}

No caso da suplementação com FeSO₄, os resultados indicaram o fortalecimento da hipótese inicial de que ela modifica os efeitos da exposição ao acetato de chumbo. A maturação mais lenta nos grupos intoxicados por acetato de chumbo, independentemente da concentração, como discutido acima, não foi observada quando o FeSO₄ foi coadministrado, uma vez que não foi encontrada diferença significativa nas latências absolutas e intervalos interpicos para os grupos tratados com 100 mg/L Pb + FeSO₄ e 400 mg/L de Pb + FeSO₄ em comparação com o grupo controle. Isso é reforçado pelos resultados da análise do Efeito Grupo sobre o valor do intervalo interpico I-IV, que mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos com 100 mg/L Pb e 100 mg/L Pb + FeSO₄ no período pós-exposição ($p = 0,033$) (tabela 3). Ao considerar que os valores do intervalo interpico no período pré-exposição nesses grupos não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,143$) (tabela 3), é possível observar uma redução mais lenta do intervalo interpico e, conseqüentemente, no estado de maturação, no grupo sem suplementação. Portanto, os resultados sugerem um efeito protetor do sulfato ferroso sobre a toxicidade do acetato de chumbo em uma região específica do sistema auditivo.

Um estudo⁴⁵ analisou o impacto do Pb no sistema auditivo de ratos e cobaias e seus mecanismos moleculares, além da ação protetora do Fe. Seus resultados mostraram que o Pb aumentou os limiares do PEATE em animais e o FeSO₄, quando administrado por via oral (gavagem), reduziu significativamente o aumento do limiar do PEATE induzido por Pb, protegendo assim o sistema auditivo contra a toxicidade induzida pelo Pb. Em estudos que investigaram os possíveis efeitos protetores do Fe sobre a exposição ao Pb, verificou-se que o Fe evitava a citotoxicidade e a apoptose induzida pelo Pb,¹⁰ possivelmente protegendo a integridade da barreira hematoencefálica.¹¹ Em contraste, estudos anteriores que examinaram o efeito do Pb no sistema antioxidante cerebral e no sistema auditivo central não confirmaram um efeito protetor do Fe no córtex auditivo.^{12,13}

Consideramos que nossos resultados devem ser analisados com cautela antes de concluir que o Fe seja capaz de "proteger" o PEATE dos efeitos do Pb. As latências do PEATE são influenciadas, entre muitos fatores, pelo calibre do axônio, que é responsivo aos níveis de Fe. Como os níveis basais de Fe e os níveis de Fe pós-exposição não puderam ser obtidos, é possível que a "normalização" da latência do PEATE na presença do Fe represente uma combinação de maturação mais lenta causada pelo Pb e maturação prematura causada por alterações no tamanho do calibre axonal devido ao Fe. Juntos, ambos os mecanismos podem

levar a uma latência do PEATE aparentemente “normal”. Se esse for o caso, talvez não seria correto chamar a resposta vista na presença de Fe como “protetora”, uma vez que não sabemos qual o papel que cada mecanismo teve nas latências do PEATE medidas no primeiro momento, nem sabemos se todas as características foram restauradas à função normal.

Conclusão

Este estudo indica que o acetato de chumbo pode ter um efeito deletério sobre o estado de maturação do nervo auditivo e do tronco encefálico (região do núcleo coclear), detectado pelos potenciais evocados auditivos do tronco encefálico, e que o sulfato ferroso pode alterar parcialmente esse efeito.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Ao doutor Fernando Barbosa Junior pela análise de Pb no sangue e no tronco encefálico. As doutoras Aline de Lima Leite, Mileni da Silva Fernandes e Marília Afonso Rabelo Buzalaf pela orientação e apoio na condução da pesquisa. Aos doutores Leo Buchanan, Edward F. Krieg e Robert W. Keith, pela leitura da primeira versão desse artigo e contribuição para a estruturação do mesmo.

Referências

1. Discalzi GL, Capellaro F, Bottalo L, Fabbro D, Mocellini A. Auditory brain-stem evoked-potentials (BAEPS) in lead-exposed workers. *Neurotoxicology*. 1992;13:207–9.
2. Counter SA, Vahter M, Laurell G, Buchanan LH, Ortega F, Skerfving S. High lead exposure and auditory sensory-neural function in Andean children. *Environ Health Perspect*. 1997;105:522–6.
3. Alvarenga KF, Jacob LCB, Martins CHF, Costa Filho AO, Coube CZV, Marques JM. Emissões otoacústicas – produto de distorção em indivíduos expostos ao chumbo e ao ruído. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69:681–9.
4. Dascanio D, Valle TGM. A associação entre variáveis sócio-demográficas e plumbemia em crianças. *Paidéia*. 2008;18:541–53.
5. Johnson AC, Morata TC. Occupational exposure to chemicals and hearing impairment. The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals. Nordic Expert Group. Gothenburg. *Arbete oh Hälsa*. 2010;44:177.
6. Alvarenga KF, Morata TC, Lopes AC, Feniman MR, Jacob-Corteletti LCB. Brainstem auditory evoked potentials in children with lead exposure. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2015;81:37–43.
7. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Frre Radic Biol Med*. 2000;29:927–45.
8. Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2:191–206.
9. Gautam MSP, Flora SJS. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. *Nutrition*. 2010;26:563–70.
10. Wang Q, Luo W, Zhang W, Dai Z, Chen Y, Chen J. Iron supplementation protects against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex. *Neurotoxicology*. 2007;28:850–9.
11. Wang Q, Luo W, Zheng W, Liu Y, Xu H, Zheng G, et al. Iron supplement prevents lead-induced disruption of the blood-brain barrier during rat development. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;219:33–41.
12. Ferreira MCF [Tese] Efeito do acetato de chumbo associado ou não ao sulfato ferroso em cérebro de ratos: análise das enzimas antioxidantes. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2012. Available at: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25149/tde-08012013-163341/pt-br.php>
13. Duarte JL [Tese] Potencial evocado auditivo cortical, análise bioquímica e morfológica em cérebro de ratos submetidos a tratamento subcrônico com chumbo: efeito protetor da suplementação com ferro. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013. Available at: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25149/tde-04062013-091711/en.php>
14. Blatchley BJ, Cooper WA, Coleman JR. Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in the rat. *Dev Brain Res*. 1987;32:75–84.
15. Romand R, Sans A, Romand MR, Marty R. The structural maturation of the stato-acoustic nerve in the cat. *J Comp Neurol*. 1976;170:1–15.
16. Dum N. Postnatal development of the auditory evoked brainstem potentials in the guinea pig. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1984;97:63–8.
17. Sousa LCA, Piza MRT, Alvarenga KF, Cósér PL. Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas: princípios e aplicações clínicas. 2ª ed. Ribeirão Preto: Editora Novo Conceito; 2010.
18. Jewett DL, Romano MN. Neonatal development of auditory system potentials averaged from the scalp of rat and cat. *Brain Res*. 1972;36:101–15.
19. Batista BL, Grotto D, Rodrigues JL, Souza VCO, Junior BF. Determine of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Anal Chim Acta*. 2009;646:23–9.
20. Zheng W. Toxicology of choroid plexus: special reference to metal-induced neurotoxicities. *Microsc Res Tech*. 2001;52:89–103.
21. Goering PL. Lead–protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology*. 1993;14:45–60.
22. Oortgiesen M, Leinders T, van Kleef RGDM, Vijverberg HPM. Differential neurotoxicological effects of lead on voltage-dependent and receptor-operated ion channels. *Neurotoxicology*. 1993;14:87–96.
23. Cory-Slechta DA, Widzowski DV, Pokora MJ. Functional alterations in dopamine systems assessed using drug discrimination procedures. *Neurotoxicology*. 1993;14:105–14.
24. Legare ME, Barhoumi R, Burghardt RC, Tiffany-Castiglioni E. Low-level lead exposure in cultured astroglia: identification of cellular targets with vital fluorescent probes. *Neurotoxicology*. 1993;14:267–72.
25. Simons TJB. Lead–calcium interactions in cellular lead toxicity. *Neurotoxicology*. 1993;14:77–86.
26. Li H, Swiercz R, Englander EW. Elevated metals compromise repair of oxidative DNA damage via the base excision repair pathway: implications of pathologic iron-overload in the brain on integrity of neuronal DNA. *J Neurochem*. 2009;110:1774–83.
27. Mills E, Dong X, Wang F, Xu H. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem*. 2010;2:51.

28. Rouault TA, Zhang L, Jeong SY. Brain Iron Homeostasis, the choroid plexus, and localization of iron transport proteins. *Metab Brain Dis.* 2009;24:673–84.
29. Gutteridge JMC. Iron and oxygen radicals in brain. *Ann Neurol.* 1992;32:16–21.
30. Curtis AR, Fey C, Morris CM, Bindoff LA, Ince PG, Chinnery PF, et al. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet.* 2001;28:350–4.
31. Ke Y, Ming Qian Z. Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegeneration disorders. *Lancet Neurol.* 2003;2:246–53.
32. Horowitz MP, Greenamyre JT. Mitochondrial iron metabolism and its role in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2010;20:S551–68.
33. Huang CM. A comparative study of the brain stem auditory response in mammals. *Brain Res.* 1980;184:215–9.
34. Möller AR. On the origin of the compound action potentials (N1, N2) of the cochlea of the rat. *Exp Neurol.* 1983;80:633–44.
35. Discalzi G, Fabbro D, Meliga F, Mocellini A, Capellaro F. Effects occupational exposure to mercury and lead on brainstem auditory evoked potentials. *Int J Psychophysiol.* 1993;14:21–5.
36. Murata K, Araki S, Yokoyama K, Uchida E, Fujimura Y. Assessment of central, peripheral, and autonomic nervous system functions in lead workers: neuroelectrophysiological studies. *Environ Res.* 1993;61:323–36.
37. Hirata M, Kosaka H. Effects of lead exposure on neurophysiological parameters. *Environ Res.* 1993;63:60–9.
38. Rothenberg SJ, Poblano A, Garza-Morales S. Prenatal and perinatal low level lead exposure alters brainstem auditory evoked responses in infants. *Neurotoxicology.* 1994;15:695–9.
39. Lasky RE, Maier MM, Snodgrass EB, Hecox KI, Laughlin NK. The effects of lead on otoacoustic emissions and auditory evoked potentials in monkeys. *Neurotoxicol Teratol.* 1995;17:633–44.
40. Lilienthal H, Winneke G. Lead effects on the brain stem auditory evoked potential in monkeys during and after the treatment phase. *Neurotoxicol Teratol.* 1996;18:17–32.
41. Osman K, Pawlas K, Schutz A, Gazdzik M, Sokal JÁ, Vahter M. Lead exposure and hearing effects in children in Katowice, Poland. *Environ Res.* 1999;80:1–8.
42. Rothenberg SJ, Poblano A, Schnaas L. Brainstem auditory evoked response at five years and prenatal and postnatal blood lead. *Neurotoxicol Teratol.* 2000;22:503–10.
43. Wang WG, Wang YM, Feng LD. Effect of plumbism on auditory brainstem response of children. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2005;40:896–8.
44. Jones LG, Prins J, Park S, Walton JP, Luebke AE, Lurie DI. Lead exposure during development results in increased neurofilament phosphorylation, neuritic beading and temporal processing deficits within the murine auditory brainstem. *J Comp Neurol.* 2008;506:1003–17.
45. Liu X, Zheng G, Wu Y, Shen X, Jing J, Yu T, et al. Lead exposure results in hearing loss and disruption of the cochlear blood-labyrinth barrier and the protective role of iron supplement. *Neurotoxicology.* 2013;39:173–81.
46. Murata K, Araki S, Yokoyama K, Nomiyana K, Nomiyana H, Tao YX, et al. Autonomic and central nervous system effects of lead in female glass workers in China. *Am J Ind Med.* 1995;28:233–44.
47. Counter SA, Buchanan LH, Ortega F, Laurel G. Normal auditory brainstem and cochlear function in extreme pediatric plumbism. *J Neurol Sci.* 1997;152:85–92.
48. Lasky RE, Melissa LL, Torre P, Laughlin N. The effects of early lead exposure on auditory function in rhesus monkeys. *Neurotoxicol Teratol.* 2001;23:639–49.
49. Counter SA. Brainstem neural conduction biomarkers in lead-exposed children of Andean lead-glaze workers. *J Occup Environ Med.* 2002;44:855–64.