

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

## AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA QUALITATIVA DE CÉLULAS CILIADAS COCLEARES DE RATOS EXPOSTOS AO CHOQUE-TÉRMICO E TRATADOS COM ALANILGLUTAMINA<sup>1</sup>

### QUALITATIVE MORPHOLOGICAL EVALUATION OF COCHLEAR HAIR CELLS OF RATS EXPOSED TO HEAT SHOCK AND TREATED WITH ALANYLGLUTAMINE

Leticia Compagnon<sup>2</sup>, Kassandra Cristina Gaklik<sup>3</sup>, Samara Nicole Friske<sup>4</sup>, Marcos Soares<sup>5</sup>,  
Thiago Gomes Heck<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Projeto de Pesquisa do Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPef. Departamento de Ciências da Vida- DCVida

<sup>2</sup> Bolsista PIBITI/CNPq, aluna do curso de Fisioterapia da UNIJUI.

<sup>3</sup> Bolsista PIBITI/UNIJUI, aluna do curso de Biomedicina da UNIJUI.

<sup>4</sup> Bolsista PIBITI/CNPq, aluna do curso de Medicina Veterinária da UNIJUI

<sup>5</sup> Professor do Departamento de Ciências da Vida - DCVida da UNIJUI. Aluno do Programa de Pós Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana UFSM.

<sup>6</sup> Professor Doutor do Departamento de Ciências da Vida - DCVida Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde UNIJUI/UNICRUZ. Orientador

**Palavras chave:** Perda auditiva, Resposta ao Choque Térmico, Dipeptídeo Alanilglutamina, Células ciliadas.

**Keywords:** Hearing loss, Heat Shock Response, Dipeptide Alanylglutamine, Hair Cells.

## INTRODUÇÃO

Vários fatores se relacionam com a perda auditiva, entre eles, alterações genéticas, agressões ambientais, ototoxicidade por drogas, agentes quimioterápicos como a cisplatina, trauma acústico, ocasionado por ruído intenso ou prolongado e, a própria deterioração influenciada pela idade (FETTIPLACE; NAM, 2019). A função auditiva pode ser prejudicada por danos que ocorrem na cóclea, de modo específico causados por lesões nas células ciliadas sensoriais do órgão de Corti. A cóclea faz parte do sistema auditivo e está localizada no ouvido interno, é constituída por um sofisticado mecanismo capaz de detectar as vibrações sonoras mecânicas, transmitidas pelo ar, e converter em sinais elétricos (FETONI, et al., 2019).

As células ciliadas da cóclea, apresentam característica mecanossensitiva altamente especializada, e apresentam a capacidade de responder a um amplo espectro sonoro. Isso acontece a partir da sensibilidade e das respostas geradas ao longo do comprimento do ducto coclear, as células ciliadas localizadas na base da cóclea respondem a sons de alta frequência, enquanto que, células ciliadas encontradas no ápice coclear, captam e respondem a sons de menor frequência, caracterizando efeito tonotópico da cóclea. Portanto, em condições íntegras são estas células que permitem a discriminação de sons de frequências diferentes (BASCH, et al. 2016).

Os mecanismos de dano coclear gerados pela desregulação entre defesas antioxidantes e agentes pró-oxidantes, são alvos de intensa pesquisa. Em um estudo de revisão, FETONI, et al., (2019), discutiram a função das espécies reativas de oxigênio (EROs) na promoção do dano celular e respostas adaptativas em cócleas submetidas a estresse por ruído, e relataram que, uma condição

**Evento:** X Seminário de Inovação e Tecnologia

**ODS:** 3 - Saúde e Bem-estar

de estresse oxidativo, é induzida pelo excesso de produção de EROs e por um sistema antioxidante insuficiente, podendo levar a oxidação de lipídios, proteínas e DNA, resultando em danos no sistema auditivo.

Em um estudo que investigou a expressão das *Heat shock proteins 70 kDa* (proteínas de choque térmico de 70 kDa - HSP70) pela suplementação com alanilglutamina em animais expostos ao ruído, SOARES, et al., (2019), mostraram que o estresse coclear induzido por ruído é capaz de aumentar a expressão das HSP70 na cóclea, e que embora o tratamento com alanilglutamina não tenha evitado a perda auditiva, foi capaz de atenuar a expressão das HSP70, sugerindo relação de otoproteção mediada pela alanilglutamina. No entanto, este estudo não trouxe uma avaliação morfofuncional do sistema auditivo coclear. Em vista disso, o objetivo deste trabalho é avaliar a morfologia das células ciliadas cocleares de animais expostos ao choque-térmico e tratados com o dipeptídeo alanilglutamina.

## METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ) com protocolo número: 058/15. Foram utilizados 6 ratos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, divididos em 3 grupos com 2 animais cada, da seguinte forma: Grupo CONTROLE: sem tratamento, que receberam água destilada por gavagem, como placebo. Grupo CHOQUE TÉRMICO: receberam gavagem com água destilada e realizaram o choque térmico em todo o corpo. Grupo ALANILGLUTAMINA: animais tratados com alanilglutamina, por gavagem, na dose de 1,5 g/kg 6 horas antes da anestesia e antes da eutanásia. Para execução dos procedimentos todos os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg).

Os animais dos grupos CONTROLE e ALANILGLUTAMINA foram mantidos em banho à 37°C por 15 minutos. Enquanto que os animais do grupo CHOQUE TÉRMICO foram monitorados no banho até atingirem 42° C de temperatura corporal e assim mantidos por 15 minutos. A temperatura corporal foi verificada com termômetro retal, e para o banho foi utilizada uma caixa forrada com alumínio, com água na temperatura desejada, após o término os animais foram monitorados e mantidos aquecidos para que não ocorresse hipotermia. A eutanásia ocorreu 6 horas após o final do procedimento de choque térmico. Realizou-se então a coleta do material biológico, para isso ambas cócleas de cada animal foram removidas e fixadas em paraformaldeído a 4%, pH 7,0 por 6 horas, em seguida, durante 30 dias o material foi mantido em EDTA 10 % para descalcificação.

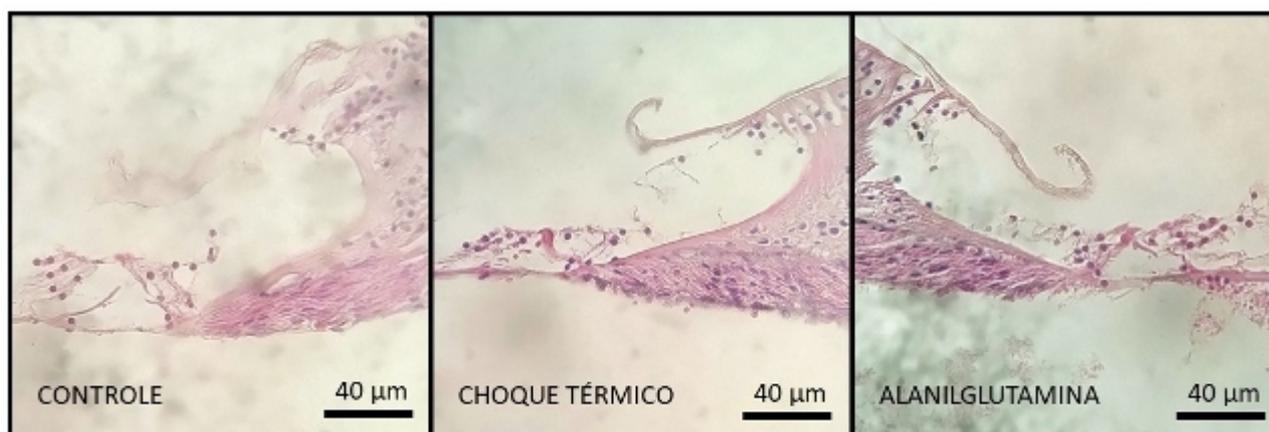
Dando sequência ao processamento histológico, a desidratação do tecido ocorreu por passagens em etanol 30% por 1h, 40% 1h, 50% 1h, 60% 1h, 70% overnight, 80% 1h, 90% 1h, 96% 1h e 100% 1h. Para execução da clarificação as cócleas passaram por 2 banhos de 1hr cada, em Xilol 100%. Para a fase de infiltração utilizou-se parafina líquida à 60°C, 2 vezes de 40 min cada, então efetuou-se a inclusão do material com moldes metálicos e parafina líquida para formar os blocos de parafina. A microtomia de cada bloco foi feita com cortes de 6 µm de espessura, os cortes foram colocados em banho-maria à 40°C e dispostos em lâminas para microscopia. O método hematoxilina-eosina foi utilizado para a coloração dos tecidos cocleares. A avaliação das células ciliadas foi realizada a partir de imagens fotografadas em microscópio óptico, a determinação das células ciliadas foi definida pela presença do núcleo intacto e esférico, localizado na metade basal das células ciliadas encontradas ao longo da membrana basilar do órgão de Corti (NEAL et al., 2015).

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação feita através das lâminas histológicas onde foi observado a morfologia e integridade das células ciliadas, revelou que não houve alterações na conformação das células tanto nos animais expostos ao choque térmico quanto nos animais que foram tratados com alanilglutamina (Figura 1). Ou seja, as células ciliadas foram localizadas ao longo da membrana basilar, com a presença do núcleo celular íntegro, conforme descrito por NEAL et al., (2015).



**Figura 1:** Imagens dos cortes histológicos dos diferentes grupos, objetiva com aumento de 40µm, as células ciliadas dos grupos: CONTROLE, CHOQUE TÉRMICO e ALANILGLUTAMINA, apresentam-se com núcleo esférico e intacto dispostos ao longo da membrana basilar do órgão de Corti.

Já foi demonstrado um possível efeito anti-inflamatório da alanilglutamina, mediado pela indução de expressão de HSP na cócleas de ratos (SOARES et al., 2019). Também PETRY et al., (2014) com objetivo de avaliar se a suplementação oral de L- glutamina poderia atenuar o estresse oxidativo muscular, observaram que há influência da suplementação com L-glutamina sobre a quantidade intracelular de glutathione e que também há aumento da expressão de HSP70 intracelular, sendo responsável pela diminuição da suscetibilidade aos danos gerados pelo estresse oxidativo. Portanto este resultado sugere que o tratamento com a alanilglutamina não causa alterações na conformação das células mecanosensoriais da cóclea, podendo ser utilizado em protocolos de pesquisa e investigação de agentes com efeitos protetores contra a perda auditiva.

Do mesmo modo BAKER, et al., (2015) com o objetivo de examinar os efeitos protetores da HSP70 contra a morte de células ciliadas induzida por cisplatina, expuseram utrículos de camundongos ao choque térmico e ao tratamento com cisplatina, e observaram que os utrículos que passaram pelo choque térmico 6 h antes do tratamento com cisplatina tiveram uma sobrevivência significativamente maior das células ciliadas. Também observaram que a HSP70 é necessária para que se obtenha o efeito protetor do choque térmico contra a morte de células ciliadas em camundongos *Knockout*, ou seja, com inativação dos genes da HSP70. Tais resultados, reforçam o fato de que a indução de HSP70 pelo choque térmico é um método eficaz e que pode apresentar um papel importante no estudo da citoproteção das células ciliadas.

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento com alanilglutamina e a exposição dos animais ao choque térmico, não danificou a morfologia das células ciliadas cocleares, sendo portanto, métodos passíveis de uso em protocolos para estudar a perda auditiva, que será alvo da sequência de avaliações dos efeitos protetores da alanilglutamina contra a perda auditiva induzida por ruído.

## REFERÊNCIAS

BAKER, Tiffany G, et al., Heat Shock Protein-Mediated Protection Against Cisplatin-induced Hair Cell Death, **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, n.16, p. 67-80, 2015.

BASCH, Martin L, et al., Where Hearing Starts: The Development of the Mammalian Cochlea, **Journal of anatomy**, v. 228, n.2, p. 233-254, 2016.

FETONI, Anna Rita, et al., Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: Oxidative stress and ROS signaling, **Free Radical Biology and Medicine**, n.1, v. 135, p. 46-59, 2019.

NEAL, C. et al., Hair cell counts in a rat model of sound damage: Effects of tissue preparation & identification of regions of hair cell loss, **Hearing Research**, v. 328, p. 120–132, 2015.

FETTIPLACE, Robert, NAM, Jong-Hoon, Tonotopy in Calcium Homeostasis and Vulnerability of Cochlear Hair Cells, **Hearing Research**, v. 376, p.11-21, 2019.

PETRY, Éder Ricardo, et al., Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways, **Life Sciences**, n. 2, v. 94, p. 130-136, 2014.

SOARES, Marcos et al., Heat shock response in noise-induced hearing loss: effects of alanyl-glutamine dipeptide supplementation on heat shock proteins status. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, 2019.

TAKADA, Yohei et al., Ototoxicity-induced Loss of Hearing and Inner Hair Cells Is Attenuated by HSP70 Gene Transfer, **Molecular therapy. Methods & clinical development**, v. 2, 2015.

Parecer CEUA: 058/15