

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

## **ANÁLISE DA DENSIDADE DE CÉLULAS DO GÂNGLIO ESPIRAL DE RATOS EXPOSTOS À ALANILGLUTAMINA OU CHOQUE TÉRMICO<sup>1</sup>**

### **ANALYSIS OF THE CELL DENSITY OF SPIRAL GANGLION CELLS OF RATS EXPOSED TO ALANYLGLUTAMINE OR HEAT SHOCK**

**Kassandra Cristina Gaklik<sup>2</sup>, Evandro Tatim da Silva<sup>3</sup>, Marcos Soares<sup>4</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>5</sup>,  
Matias Nunes Frizzo<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Trabalho vinculado ao projeto do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Atenção Integral à Saúde UNIJUÍ/UNICRUZ

<sup>2</sup> Acadêmica de Biomedicina UNIJUÍ, bolsista PIBIT/UNIJUÍ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

<sup>3</sup> Acadêmico de Medicina UNIJUÍ, bolsista voluntário, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

<sup>4</sup> Professor do Curso de Medicina - Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Professor do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

<sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Professor do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

#### **INTRODUÇÃO**

A perda da função auditiva possui diversos fatores etiológicos, entre eles o ruído. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR) é definida como um problema de saúde pública (OMS, 2020). O dano gerado pela exposição ao ruído, promove uma intensa atividade metabólica na cóclea e um estado de desequilíbrio, gerado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e pela insuficiência de enzimas antioxidantes, denominado estresse oxidativo (HENDERSON et al., 2006).

A lesão coclear pelo ruído acomete diversas estruturas cocleares, entre elas o gânglio espiral (HABYBABADY et al., 2018). Essa porção da cóclea, é uma coleção de corpos celulares neurais, que fornecem a inervação sensorial do órgão de Corti e cujos processos centrais formam uma porção importante do nervo auditivo. As células ganglionares do tipo I são morfologicamente maiores, tendo por função a inervação sensorial das células ciliadas internas do órgão de Corti, estas células são responsáveis pela transdução do estímulo sonoro mecânico, em estímulo elétrico, que através do gânglio espiral alcança o córtex auditivo. A ativação das células ciliadas resulta na liberação de neurotransmissores na sinapse das células ganglionares do tipo I, onde, esse potencial gerado, causa a ativação das vias auditivas centrais, incluindo a ativação do córtex auditivo primário (RUSZNÁK; SZÁCS, 2009). Portanto, as células do gânglio espiral são de extrema importância para um bom desempenho da audição.

Neste sentido, a busca por substâncias capazes de atuar na prevenção e no tratamento dos danos gerados nestas estruturas do órgão de Corti é objeto de vários estudos. As proteínas de choque térmico (HSP), principalmente as de 70 kDa (HSP70), são fatores citoprotetores da cóclea através de sua ação anti-inflamatória (HECK et al., 2017; HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011). Fairfield et al., (2005), em um de seus estudos, constatou que a eliminação do Fator de choque térmico (HSF1), responsável pela regulação da expressão de HSP70, provoca perda auditiva definitiva após exposição a um estressor, como o ruído. Portanto, alternativas terapêuticas capazes de induzir a expressão de HSP70 podem ser de grande valia para a proteção dessas estruturas. Entre elas, a suplementação com L-glutamina influencia positivamente no estoque intracelular de substâncias antioxidantes como glutatona e HSP70, diminuindo a vulnerabilidade tecidual ao estresse oxidativo (PETRY et al., 2014). Do mesmo modo, a exposição prévia de animais ao calor, através do

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

**ODS:** 3 - Saúde e Bem-estar

choque térmico, também já demonstrou potencial citoprotetor pela expressão de HSP (YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999).

Porém, antes de testar o efeito protetor desses dois indutores da HSP70 nos corpos celulares do gânglio espiral de ratos, sobre a PAIR, é fundamental certificar-se da ausência de efeitos danosos sobre tais estruturas. Dessa forma, o objetivo desse estudo piloto é verificar se o choque térmico e a alanil-glutamina causam alterações nos corpos celulares do gânglio espiral de ratos.

**Palavras-chave:** Contagem de Células; Área do Gânglio Espiral; Histologia; Alteração Morfológica; L-glutamina; Choque Térmico.

**Keywords:** Cell Count; Spiral Ganglion Area; Histology; Morphological Alteration; L-glutamine; Heat Shock.

## METODOLOGIA

### Delineamento do estudo

Esse estudo é parte de um projeto piloto realizado. Neste, foram utilizados nove ratos Wistar, mantidos em temperatura de  $22 \pm 2$  °C, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com ração (NUVILAB CR-1, Nuvital Nutrients S.A., Curitiba, Brasil) e água ad libitum. Foram excluídos do experimento animais com otite média evidenciada através de otoscopia. Esses animais foram distribuídos em três grupos experimentais (n= 3 animais/grupo):

**CONTROLE:** receberam água, por gavagem e foram expostos a normotermia;

**ALANILGLUTAMINA:** foram tratados com alanilglutamina por gavagem e expostos a normotermia;

**CHOQUE TÉRMICO:** receberam água por gavagem e submetidos ao choque térmico;

O trabalho foi aprovado pelo CEUA – UNIJUÍ com protocolo nº 058/15.

### Procedimentos

#### Gavagem e Choque Térmico

Primeiramente, os animais do grupo Choque Térmico e Controle, receberam por água gavagem, enquanto os do grupo Alanilglutamina receberam o dipeptídeo alanilglutamina na concentração de 0,2g/mL diluído em água (Dipeptiven®, Fresenius Kabi®), por gavagem (1,5 g/Kg). Em seguida, seis horas após a gavagem, todos os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg).

Em seguida, verificou-se a temperatura retal durante os procedimentos. Os animais do grupo Choque Térmico foram posicionados no banho e monitorados até atingirem 42°C e mantidos por 15 minutos. Já os animais dos grupos Alanilglutamina e Controle foram mantidos em banho à 37°C, também por 15 minutos. Ao término do procedimento, os animais foram monitorados para possível hipotermia.

### Eutanásia

Decorridas quatro horas do choque térmico realizou-se a eutanásia por guilhotina. As cócleas dos animais foram dissecadas, janela oval e redonda abertas e fixadas através da infusão de paraformaldeído à 4% por 6 horas. Em seguida, foram lavadas em solução Tampão fostato-salino (PBS) e descalcificadas em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% por cerca de 30 dias à temperatura ambiente, havendo substituição da solução a cada 2 dias.

### Histologia

Passados os 30 dias, realizou-se o processamento histológico e inclusão das cócleas. Esses incluíram

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

a desidratação do tecido realizada com sete passagens em concentrações variadas de etanol, a clarificação com duas passagens em xilol 100%, a infiltração com duas passagens em parafina líquida  $\pm 60^\circ\text{C}$ , todas as passagens com duração de uma hora cada. E por fim, efetuou-se a inclusão dos tecidos com parafina líquida dentro dos moldes metálicos, para após realizar-se a microtomia a  $6\ \mu\text{m}$ . As lâminas foram colocadas na estufa a  $\pm 60^\circ\text{C}$  por 12-24 horas.

Na fase de coloração e montagem, as lâminas passaram pela diafanização (retirada da parafina) com duas passagens em xilol, de hidratação em álcool 100%, 90% e 70%, e uma lavagem com água destilada, por três minutos cada. Para a coloração usou-se hematoxilina e eosina.

Avaliação da densidade das células do gânglio espiral

A contagem das células e demarcação da área do gânglio espiral foram feitas com o programa ImageJ®.

Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido de teste Tukey, sendo considerado nível de significância de 5%, através do programa GraphPad Prism 8. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais dos grupos Controle, Choque Térmico e Alanilglutamina não apresentaram diferenças em relação à densidade do gânglio espiral (Figura 1). Portanto, tanto a exposição ao choque térmico, quanto o tratamento com alanilglutamina, não comprometem as células ganglionares e também não causam mudanças na área desse segmento coclear.

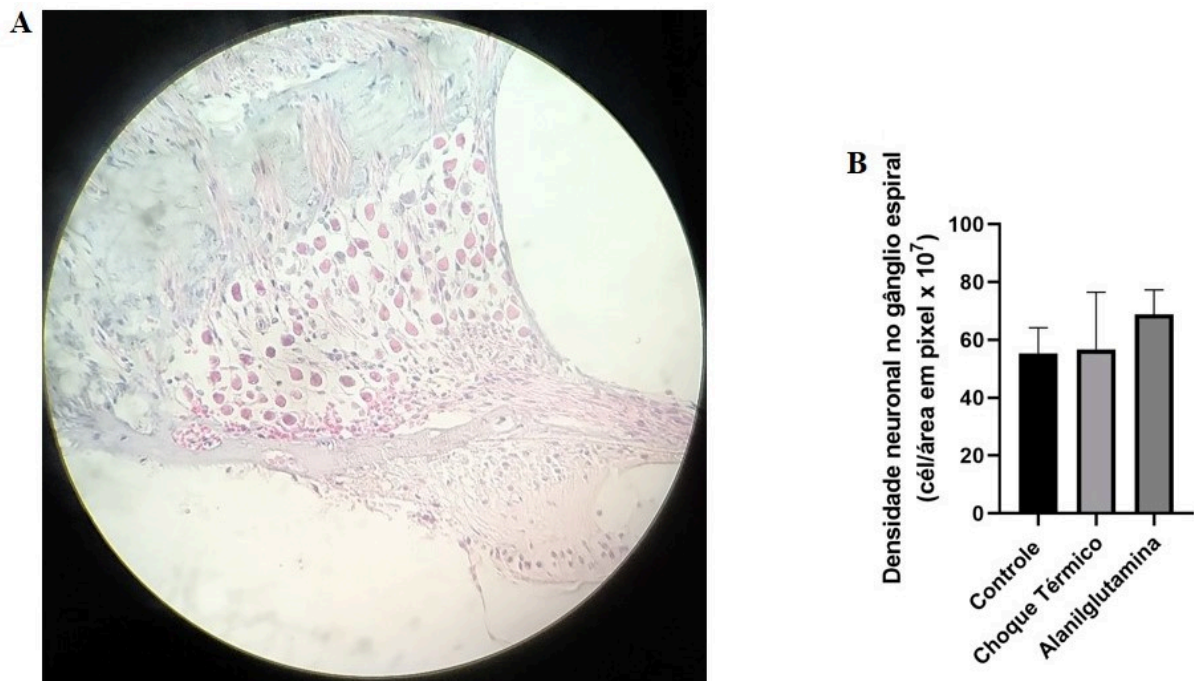


Figura 1. Efeito do choque térmico e administração de alanilglutamina sobre a área do gânglio

Evento: X Seminário de Inovação e Tecnologia

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

**espiral, e a densidade neuronal no gânglio espiral de ratos. A:** Corte histológico com gânglio espiral (67 células) de um rato do grupo choque térmico. Objetiva de 40  $\mu$ m. **B:** Densidade neuronal no gânglio espiral. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Anova de uma via, seguido de Tukey,  $P > 0,05$ .

Em um estudo análogo ao nosso foram analisados os efeitos protetores da N-acetil-L-cisteína sobre a densidade das células do gânglio espiral de ratos Wistar expostos ao ruído. A cisteína é um aminoácido que atua como substrato para a produção de glutatona, a qual é um dos principais antioxidantes endógenos produzidos pelas células. Neste estudo, o grupo de animais que recebeu apenas a administração de N-acetil-L-cisteína, não apresentou danos significativos na densidade das células do gânglio espiral, apresentando núcleo centralizado e citoplasma com coloração normal (HABYBABADY et al., 2018).

A ausência de alteração morfológica induzida pelos tratamentos fortalece a possibilidade de utilizá-los enquanto alternativas terapêuticas. Nesse sentido, alguns estudos prévios já haviam demonstrado o efeito da alanilglutamina (SOARES et al., 2019), e a exposição ao choque térmico sobre a indução de HSP70 em cócleas de ratos (YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999). No entanto, se esse efeito era independente de mudanças morfológicas permanecia incerto. O nosso estudo reforça o fato de que a alanilglutamina e o choque térmico não apresentam riscos à cóclea, e por conseguinte, ao gânglio espiral. Portanto, considerando seu potencial enquanto anti-inflamatório e antioxidante, seu uso pode ser de grande valia para prevenir efeitos deletérios da PAIR.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento com alanilglutamina ou ao choque térmico não prejudicaram a densidade das células no gânglio espiral. Logo, esses métodos podem ser utilizados em protocolos de pesquisa relacionados à perda auditiva, que buscam avaliar seus possíveis efeitos benéficos na reparação de danos oxidativos causados pelo ruído.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COYAT, Carolanne et al. Morphological consequences of acoustic trauma on cochlear hair cells and the auditory nerve. *International Journal of Neuroscience*, v. 129, n. 6, p. 580-587, 2019.

DANIEL, Eileen. Noise and hearing loss: a review. *Journal of School Health*, v. 77, n. 5, p. 225-231, 2007.

FAIRFIELD, D. A. et al. Heat shock factor 1-deficient mice exhibit decreased recovery of hearing following noise overstimulation. *Journal of Neuroscience Research*, v. 81, p. 589-596, 2005.

HABYBABADY, R. H. et al. Protective Effects of N-Acetyl-L-Cysteine on the Density of Spiral Ganglion Cells and Histological Changes Induced by Continuous Noise Exposure in Rats. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, v. 25, n. 5, p. 48-58, 2018.

HECK, T. G. et al. Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. *Cell Stress and Chaperones*, v. 22, n. 2, p. 271-291, 1 mar. 2017.

HECK, T. G.; SCHÖLER, C. M.; DE BITTENCOURT, P. I. H. HSP70 expression: Does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochemistry and Function*, v. 29, n. January, p. 215-226, 2011.

HENDERSON, D. et al. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear and hearing*, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2006.

LOOI, Lai Meng et al. Hearing loss: a global health issue. *The Lancet*, v. 385, n. 9972, p. 943-944, 2015.

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

**ODS:** 3 - Saúde e Bem-estar

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

RUSZNÁK, Zoltán; SZÁCS, Géza. Spiral ganglion neurones: an overview of morphology, firing behaviour, ionic channels and function. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, v. 457, n. 6, p. 1303-1325, 2009.

SOARES, M. 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*, n. xx, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Deafness and Hearing Loss. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>. Acesso em: 02 julho. 2020.

YOSHIDA, N.; KRISTIANSEN, A.; LIBERMAN, M. C. Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. *The Journal of neuroscience*, v. 19, n. 22, p. 10116–10124, 1999.

**Parecer CEUA:** 058/15