

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 TÉRMICO¹

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

**Kassandra Cristina Gaklik², Evandro Tatim da Silva³, Marcos Soares⁴, Thiago Gomes Heck⁵,
Matias Nunes Frizzo⁶**

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

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

³ Acadêmico de Medicina UNIJUÍ, bolsista voluntário, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

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

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

⁶ 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 ± 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.

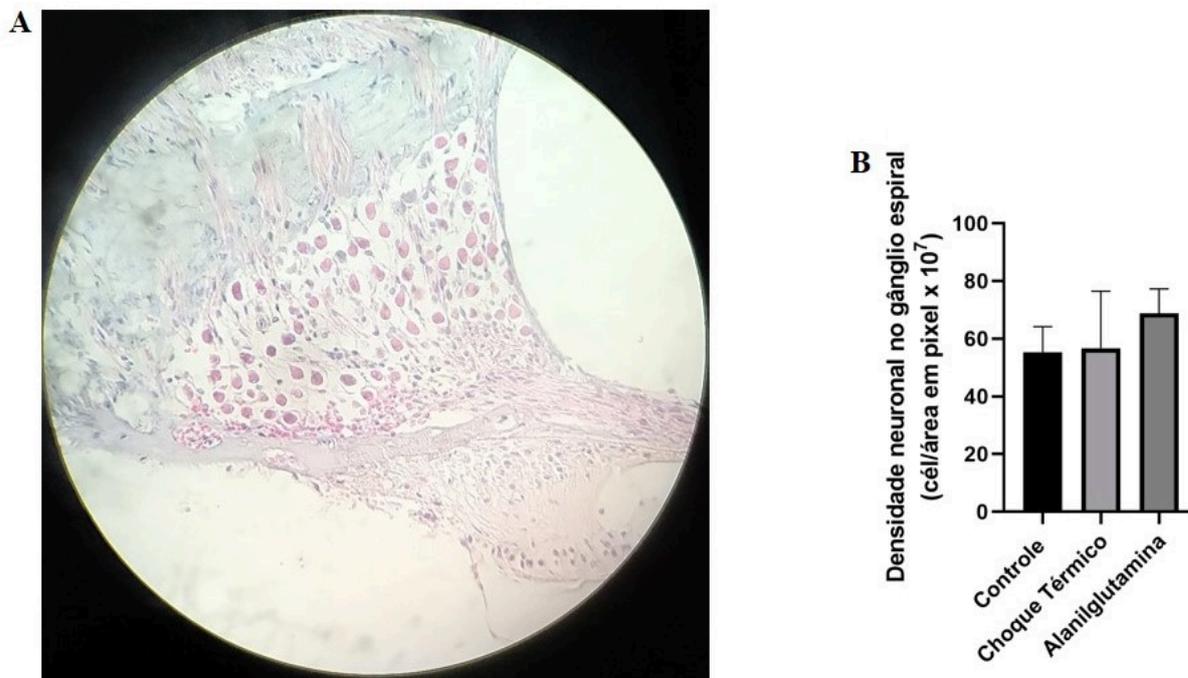


Figura 1. Efeito do choque térmico e administração de alanilglutamina sobre a área do gânglio

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 μm . **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 glutathione, 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