



Evento: XI Seminário de Inovação e Tecnologia

## A EXPRESSÃO DA HSP70 COCLEAR E SUA RELAÇÃO COM PERDA AUDITIVA INDUZIDA PELO ENVELHECIMENTO 1

### THE EXPRESSION OF HSP70 COCLEAR AND ITS RELATION WITH AGING-INDUCED HEARING LOSS

**Victória Luisa da Rosa Ribeiro<sup>2</sup>, Samara Nicole Friske<sup>3</sup>, Ana Carolina Ordesto Sprandel<sup>4</sup>, Marcos Soares<sup>5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>6</sup> e Matias Nunes Frizzo<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Pesquisa Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPEF) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI).

<sup>2</sup> Bolsista PIBIT CNPq e estudante do curso de Medicina da UNIJUI.

<sup>3</sup> Aluna do Curso de Medicina Veterinária da UNIJUI, bolsista PIBIT/UNIJUI.

<sup>4</sup> Aluna do Curso de Biomedicina da UNIJUI, bolsista PIBIT/UNIJUI.

<sup>5</sup> Professor do Curso de Medicina da UNIJUI e Aluno de doutorado do Programa de Pós Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana (UFSM).

<sup>6</sup> Professor Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUI) e Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional (PPGMMC).

<sup>7</sup> Professor Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUI).

#### RESUMO

A presbiacusia é a perda auditiva decorrente do envelhecimento, uma vez que esse processo envolve acúmulo de danos celulares causados por estresse oxidativo, o qual estudos apontam fator protetor através da expressão da HSP70. Assim, objetiva-se avaliar se a capacidade auditiva dos animais está relacionada com a idade e com expressão da HSP70 ao longo do envelhecimento do animal. Para isso, utilizou-se 15 animais de diferentes faixas etárias que foram submetidos ao Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE) para avaliar a capacidade auditiva e utilizou-se duas plataformas (Gene Expression Omnibus e GEO2R) para fazer a análise da expressão do gene da HSP70 com relação à perda auditiva. Para análise estatística, foi realizado teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey, sendo considerado nível de significância de 5%. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI) com protocolo nº 058/15. Os resultados do exame PEATE indicam aumento na perda auditiva conforme o aumento das idades dos animais ( $p < 0,0001$ ), visto que a maior perda auditiva, ou seja, maior média de limiar auditivo (43,75 dB), identificamos nos animais mais idosos, caracterizando um decrescimento da audição conforme o envelhecimento do animal. Em relação aos valores de expressão de HSP70 (gene HSPA1b) coclear encontrado na, identificamos diferença no valor de expressão entre os grupos, visto que os animais de 7 semanas apresentaram valores superiores (média = 7492 U.A.) aos animais do grupo de 32 semanas (média = 2555 U.A.). Logo, pode-se relacionar a baixa expressão da HSP70 (gene HSPA1b) coclear com a severidade da perda auditiva nesses modelos animais. Dessa forma, concluiu-se que a expressão diminuída de HSP70 coclear pode levar a uma perda de citoproteção e menor função tecidual.

**Palavras-chave:** envelhecimento; perda auditiva; HSP70.

#### INTRODUÇÃO

A perda auditiva é a mais prevalente desordem sensorial e é um problema que cresce globalmente. A presbiacusia (perda de audição associada à idade) se caracteriza como uma perda bilateral da sensibilidade auditiva que progride de frequências altas para baixas com o envelhecimento, sendo uma das quatro principais condições crônicas de saúde vivenciadas pelos idosos. A prevalência de perda auditiva acelera dramaticamente com a idade, com



aproximadamente 25% dos indivíduos com idade entre 50-65 anos apresentando limiares auditivos superiores a 30 dB em pelo menos uma orelha (LIU; YAN, 2007).

As células ciliadas, os receptores mecanossensoriais do ouvido interno, são responsáveis pela audição e equilíbrio, assim, conseqüentemente, a morte dessas células resulta em uma perda auditiva. Uma variedade de estresses pode lesar e induzir a apoptose das células ciliadas, incluindo envelhecimento, trauma por ruído e tratamento clínico com quimioterápicos de câncer à base de platina ou antibióticos aminoglicosídeos, os chamados medicamentos ototóxicos (BREGGIO et al., 2020).

Substâncias indutoras de iHSP70 como a L-glutamina são associadas com a potencialização da expressão da HSP70, tanto *in vitro* (HAMIEL et al., 2009) quanto *in vivo* (SINGLETON; WISCHMEYER, 2007). A suplementação com alanilglutamina diminui a vulnerabilidade tecidual ao estresse oxidativo (PETRY et al., 2014). Um dos processos decorrentes do envelhecimento é o quadro de danos celulares que é causado por estresse oxidativo. Nesse sentido, estudos anteriores têm observado fatores protetores da cóclea como a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs), em especial a de 70 kDa (HSP70), o que justifica a importância de um estudo experimental com suplementação de alanilglutamina. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é avaliar se a capacidade auditiva de animais está relacionada com a idade e com a expressão da HSP70 ao longo do envelhecimento do animal.

## METODOLOGIA

**Delineamento experimental:** Estudo epidemiológico do tipo experimental randomizado, *in vivo* e prospectivo, para avaliar se o tratamento com alanilglutamina previne a perda auditiva transitória e permanente em ratas expostas ao ruído excessivo e à cisplatina.

**Local do Estudo:** O estudo está sendo realizado no Laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUÍ (LeBio) e no Biotério da universidade.

**Amostra:** Foram utilizados 15 animais, randomizados em 3 grupos experimentais (n = 5 animais/grupo). Os animais serão divididos inicialmente em grupos de perda auditiva sem tratamento, perda auditiva tratado com alanilglutamina e grupo controle (sem exposição ao ruído e sem tratamento).

**Pesquisa on-line da expressão gênica:** Utilizou-se da plataforma *Gene Expression*



*Omnibus* para procurar em estudos já existentes a expressão de genes de interesse que tivessem características importantes para o desenvolvimento do projeto. Para fazer a busca na plataforma, utilizou-se como palavras-chaves “*heat shock protein, oxidative stress e cochlea*” e selecionou-se a opção *GEO Profiles Database*. A partir deste método inicial selecionamos artigos sobre modelos de perda auditiva relacionados à idade, com relação à cóclea, HSPa1b para analisar e comparar os grupos de interesse do estudo quanto o valor de expressão desse gene determinado.

**Avaliação Auditiva nos Ratos:** foi realizado o Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE), através do Vivosonic Integrity V500 system®. Os animais são anestesiados por via intraperitoneal com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e colocados na sala anecóica (FETONI et al., 2013). Eletrodos subcutâneos, do tipo agulha, serão inseridos na região posterior da orelha (eletrodo ativo), no vertex (eletrodo referência) e orelha contralateral (eletrodo terra). Os estímulos sonoros serão cliques (rise/fall time, 2 ms; duração total, 2 ms; taxa de repetição, 21/s). As respostas serão filtradas (100-3000Hz), e reproduzidas pela média de 500 amostras.

O PEATE do rato é composto de 4 componentes (rotulados de P1 a P4) ocorrendo dentro de 6 ms do início do estímulo. Estes componentes refletem a atividade neural do nervo auditivo (P1), do núcleo coclear (P2), complexo olivar superior (P3) e lemnisco lateral e/ou colículo inferior (P4). Limiares auditivos são determinados pelo decréscimo da intensidade do som, a cada 5 dB, partindo de 100 dB até 0 dB. Em roedores, a onda P2 é mais larga e geralmente a última onda a desaparecer com o decréscimo do estímulo. Por esta razão, os limiares foram definidos como a menor intensidade capaz de detectar a onda P2. Assim, os dados do PEATE serão expressos em Limiares Auditivos (LA) e Diferença de Limiar Auditivo (DLA) que representa a diferença entre os limiares, antes e após o ruído de cada animal por cada grupo (FETONI et al., 2013). Portanto, o LA e DLA serão os 2 marcadores auditivos avaliados em todos os subprojetos deste estudo.

**Ética:** O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ) com protocolo nº 058/15.

**Análise de dados:** Foi realizado teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey, sendo considerado nível de significância de 5%. Resultados



expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

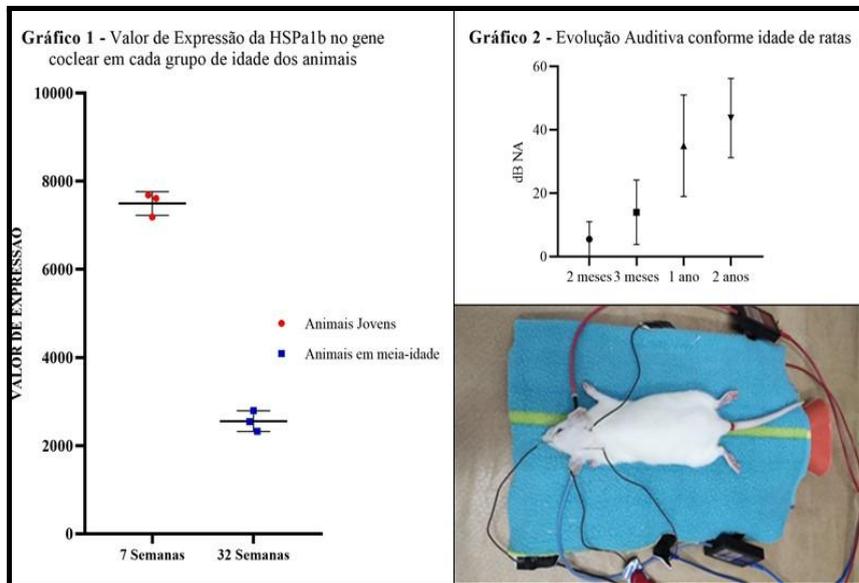
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gráfico 1 mostra o valor de expressão da HSPa1b no gene coclear em cada grupo de animais avaliados (SOMEYA et al., 2007). Identificamos diferença no valor de expressão entre os grupos, visto que os animais de 7 semanas apresentaram valores superiores (média= 7492) aos animais do grupo de 32 semanas (média= 2555). O estudo descreve os camundongos com 7 semanas como apresentando perda auditiva moderada/leve, enquanto que os de 32 semanas são descritos apresentando perda auditiva severa. Logo, pode-se relacionar a baixa expressão da HSPa1b no gene coclear com a severidade da perda auditiva nesses modelos animais.

Em nosso primeiro experimento, foram utilizados 15 ratos wistar fêmeas de 2 meses de idade com massa de  $\pm 141,69$ g, que foram divididos em 3 grupos (n=5), o grupo controle (CONT), grupo de perda auditiva por ruído com tratamento (PA C/T) e grupo de perda auditiva por ruído sem tratamento (PA S/T). Para identificar a capacidade auditiva desses animais foi realizado o exame do Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE) antes e depois da exposição ao ruído em cada orelha do animal conforme Figura 1.

No gráfico 2, que apresenta a evolução da audição conforme a idade dos animais, tem-se os resultados do exame PEATE inicial realizado antes da exposição ao ruído e antes dos tratamentos serem administrados em todos os animais já utilizados no projeto de perda auditiva em outras etapas experimentais, a fim de fazer uma análise comparativa da capacidade auditiva em diferentes idades de animais avaliados ao longo do projeto.

Observamos aumento na perda auditiva conforme o aumento das idades dos animais ( $p < 0,0001$ ), sendo assim evidenciamos que a melhor qualidade auditiva, ou seja, a menor média de limiar auditivo alcançado (5,5 dB), ocorreu nos animais que estavam na puberdade. Já a maior perda auditiva, ou seja, maior média de limiar auditivo (43,75 dB), identificamos nos animais mais idosos, caracterizando um decréscimo da audição conforme o envelhecimento do animal. Considerando que a expressão da HSP70 possui efeito citoprotetor, isso porque, elas são importantes proteínas do tipo chaperonas que facilitam o dobramento de proteínas e que evitam que esse ocorra de maneira incorreta, os níveis de expressão desta proteína podem evitar ou amenizar a perda auditiva.



**Gráfico 1** - Grupo vermelho (animais jovens de 7 semanas de idade, n=3): apresentou valor de expressão médio de 7492 ± 267,8. Grupo azul (animais em meia-idade de 32 semanas de idade, n=3): apresentou valor de expressão médio de 2555 ± 236,3. **Gráfico 2** - Grupo de animais de 2 meses de idade (n=10) apresentou resultado no exame PEATE de 5,5 ± 5,5 dB. **Figura 1** - Animal realizando o exame PEATE. Na imagem observa-se dois fios mais grossos na cor vermelha e azul ligados às orelhas do animal, nos quais os sons de cliques eram propagados, e 4 eletrodos com fios pretos mais finos ligados à cabeça do animal, um atrás de cada orelha e dois no vértex (um mais a frente e outro mais atrás) para captar os potenciais de ação gerados pela captação do som e transferência dessa informação para o Sistema Nervoso Central.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão identificamos que uma expressão diminuída de HSP70 na cóclea, assim como ocorre gradativamente com o envelhecimento, pode levar a uma perda na citoproteção e por conseguinte menor função celular/tecidual.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica (PIBIC CNPq, PIBIC UNIJUI, PROBIC FAPERGS, PIBIT CNPq, PIBIT UNIJUI, PROBIT FAPERGS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BREGLIO, Andrew M. et al. Exosomes mediate sensory hair cell protection in the inner ear. *The Journal of clinical investigation*, v. 130, n. 5, p. 2657-2672, 2020. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32027617/>. Acesso 14 jul 2021.
- FETONI, A. R. et al. Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 33, n. 9, p. 4011-23, 2013. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6619303/>. Acesso em 15 jul 2021.
- HAMIEL, C. R. et al. Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 297, n. 6, p. C1509-C1519, 2009. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2793053/>. Acesso em 15 jul 2021.
- LIU, X. Z.; YAN, D. Ageing and hearing loss. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, v. 211, n. 2, p. 188-197, 2007. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17200945/>. Acesso em 13 jul 2021.
- PETRY, Éder Ricardo et al. Alanine-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. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320513007078?via%3Dihub>. Acesso em 15 jul 2021.
- SINGLETON, Kristen D.; WISCHMEYER, Paul E. Glutamine's protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 292, n. 5, p. R1839-R1845, 2007. Disponível em [https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpregu.00755.2006?rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org](https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpregu.00755.2006?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org). Acesso em 14 jul 2021.
- SOMEYA S, et al. Genes encoding mitochondrial respiratory chain components are profoundly down-regulated with aging in the cochlea of DBA/2J mice. *Brain Res*, 2007. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899307021427?via%3Dihub>. Acesso em 14 jul 2021.