



Evento: XI Seminário de Inovação e Tecnologia

PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO RUÍDO 1
LEUKOCYCLE PAR METERS IN WISTAR RATS EXPOSED TO NOISE

Ana Carolina Ordesto Sprandel², Samara Nicole Friske³, Victoria Ribeiro⁴, Marcos Soares⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Matias Nunes Frizzo⁷

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia - UNIJUÍ

² Ana Carolina Ordesto Sprandel - Acadêmica de Biomedicina da UNIJUÍ. Bolsista PIBITI-UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

³ Acadêmica de Medicina Veterinária da UNIJUÍ. Bolsista PIBITI-UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

⁴ Acadêmica de Medicina da UNIJUÍ. Bolsista PIBIT-UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

⁵ Docente do Curso de Medicina - UNIJUÍ, Doutorando em Distúrbios da Comunicação Humana pela UFSM. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

⁶ Professor do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUÍ (PPGAIS). Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

⁷ Professor do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUÍ (PPGAIS). Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF

RESUMO

A perda auditiva acomete cerca de 5% da população mundial apresentando congênitas e adquiridas, dentre as causas adquiridas a perda auditiva induzida por ruído (PAIR). Algumas substâncias têm sido avaliadas para tratar ou prevenir a perda auditiva, como a alanilglutamina, as quais atuam com mecanismo anti-inflamatório e citoprotetor a nível intracelular, na resolução de inflamações. Dessa forma, objetivamos avaliar o efeito tratamento com alanilglutamina nos parâmetros leucocitários após a indução de perda auditiva pelo ruído. Identificamos um efeito citoprotetor e anti inflamatório nos animais tratados com alanilglutamina e expostos ao ruído, o que abre perspectivas para mais estudos sobre o tratamento e prevenção da perda auditiva.

Palavras-chave: Perda Auditiva, Modelo Animal, Estresse Celular, Leucócitos.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 5% da população mundial (466 milhões de pessoas) apresentam perda auditiva incapacitante, que consiste, em adultos, na perda de 40 dB de audição. A OMS estima que em 2050 serão mais de 900 milhões de pessoas com perda auditiva incapacitante, sendo que no Brasil, segundo o censo de 2010 do IBGE, 9.717.318 brasileiros possuem deficiência auditiva. O aumento de casos de perda auditiva, impacta indivíduos funcional, social e economicamente o que demonstra a importância de estudos com novos tratamentos que visem prevenir a perda auditiva induzida por ruído e pela ototoxicidade causada pela cisplatina nos tratamentos contra o câncer.

A perda auditiva apresenta causas congênitas e adquiridas, dentre as causas adquiridas a perda auditiva induzida por ruído (PAIR), incluindo ruído ocupacional. Nesse sentido, o ruído excessivo ocasiona um quadro de estresse oxidativo coclear, caracterizado pela geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Segundo Ohinata et al. (2000), o som intenso também pode induzir a lesão de isquemia /



reperfusão, exacerbando ainda mais a lesão por estresse oxidativo direto, e inflamação tecidual os quais podem contribuir para a PAIR.

Alanilglutamina é um dipeptídeo com efeito antioxidante, citoprotetor e na resolução de inflamações teciduais, o que nos possibilita levantar a hipótese de que o tratamento com alanilglutamina pode desempenhar um possível efeito na PAIR (HECK et al., 2020; HAMIÉL et al., 2009; KIM et al., 2013; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007). Dessa forma, o dano tecidual desencadeado pelo ruído (PAIR) pode ser também mensurado através de parâmetros leucocitários, os quais nos permitem a identificação de respostas celulares imuno inflamatórias associadas ao estresse e lesão celular. Sendo assim, objetivamos avaliar o efeito do tratamento com alanilglutamina nos parâmetros leucocitários após a indução de perda auditiva pelo ruído.

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 Ensaio 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 foram divididos inicialmente em grupos de perda auditiva sem tratamento, perda auditiva tratado com alanilglutamina e grupo controle (sem exposição ao ruído e sem tratamento).

Exposição ao Ruído: Para exposição ao ruído os animais foram submetidos a ruído branco (*white noise*), de amplo espectro de frequência, com o pico de intensidade centralizada em 8000Hz, contínuo com nível de 124 dB NPS por 2 horas. Durante a exposição, os animais foram alocados em uma caixa dentro de uma sala anecóica. Ruído branco é produzido por um gerador de sinal de áudio (EP125, Insight®) e exposto em auto-falantes no centro da caixa. O



nível de ruído é medido com um decibelímetro (Decibelímetro digital TDEC100, Incoterm®) situado dentro da caixa no início e após completar a exposição do ruído.

Tratamento com alanilglutamina: Os animais foram tratados com alanilglutamina oral (grupos GLUT) e grupo sem tratamento, além do grupo sem indução da perda auditiva (CONT).

Coleta de Sangue: Forão realizadas coletas de sangue após 12 horas de ruído e após a eutanásia dos animais (sangue total), sendo parte armazenado em frasco com anticoagulante ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) na concentração de 2 mg/mL de sangue.

Análises Hematológicas: O sangue coletado foi acondicionado em tubo com anticoagulante (EDTA) para determinação dos parâmetros leucocitários (5 µL de EDTA, para cada 500 µL de sangue). Para a determinação automatizada dos parâmetros leucocitários foi utilizado o analisador hematológico ABX Micros 60 (Horiba), obtendo-se os seguintes parâmetros: contagem total de leucócitos, contagem relativa e absoluta de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos). As amostras de sangue colhidas foram diluídas 1:3 com solução salina 0,9 % e realizadas em análises em triplicata. Posteriormente, foi realizada a avaliação das distensões hematológicas em lâmina (coloração de de Giensa May Grunwaldt), sendo realizadas as contagens diferenciais de leucócitos com 100 células por lâmina. Para o cálculo da relação neutrófilo linfócito utilizamos a razão entre as contagens absolutas destes dois tipos leucocitários.

Ética: O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) - UNIJUÍ com protocolo nº 058/15.

Análise Estatística: 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 ± desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

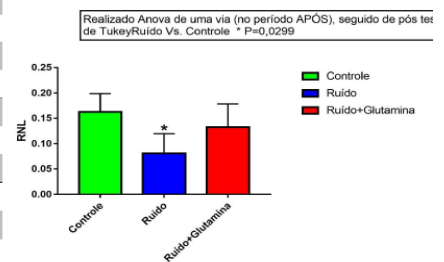
Em nosso estudo identificamos uma diminuição na contagem absoluta de neutrófilos no grupo ruído após o tempo de 13 dias de exposição, quando comparado aos grupos controle



e ruído + alanilglutamina (Tabela 1). Os neutrófilos são células de defesa da resposta imune inata, sendo consideradas as primeiras células a migrarem ao foco inflamatório. Dessa forma, nosso resultado no tempo de 13 dias após a exposição ao ruído demonstra que os animais expostos ao ruído apresentam uma maior transmigração de neutrófilos, associados ao quadro de lesão tecidual. Neste mesmo sentido, identificamos que o tratamento com alanilglutamina desenvolveu um efeito protetor ao tecido e que minimizou a resposta inflamatória no tecido. Além disso, associado a contagem de neutrófilos a Relação de Neutrófilos e Linfócitos demonstra uma redução desta relação no grupo ruído, também sinalizando para esta maior transmigração de leucócitos sanguíneos para os tecidos, como está descrito na figura 1.

	Grupos	12 horas	13 dias	P
WBC /mm ³	Controle	4.950 ± 1.570	3.075 ± 780	0,2113
	Ruído	6.600 ± 1.810	4.020 ± 450	0,0625
	Ruído+Glutamina	6.600 ± 2.184	3.660 ± 1.410	0,0782
Neutrófilos /mm ³	Controle	348 ± 129	412 ± 143	0,6673
	Ruído	884 ± 270	284 ± 135	0,0163*
	Ruído+Glutamina	883 ± 420	409 ± 226	0,1088
Eosinófilos /mm ³	Controle	27 ± 31	13 ± 15	0,4512
	Ruído	54 ± 35	33 ± 19	0,2228
	Ruído+Glutamina	88 ± 74	25 ± 15	0,0906
Monócitos /mm ³	Controle	175 ± 65	138 ± 79	0,6292
	Ruído	449 ± 130	153 ± 27	0,0071*
	Ruído+Glutamina	398 ± 104	147 ± 43	0,0018*
Linfócitos /mm ³	Controle	4.400 ± 1.390	2.512 ± 590	0,1531
	Ruído	5.213 ± 1.410	3.550 ± 370	0,0521
	Ruído+Glutamina	5.231 ± 1.650	3.079 ± 1.190	0,0939

Tabela 1. Efeito da exposição ao ruído e exposição ao ruído associada a suplementação de glutamina sobre parâmetros hematológicos 12h após a exposição ao ruído e 13 dias após a exposição ao ruído. Dados expressos como média ± DP. Teste T pareado para WBC do grupo Controle e Ruído+Glutamina, Neutrófilo do grupo Controle, Ruído e Ruído+Glutamina, Eosinófilos do grupo Controle e Ruído+Glutamina, Monócitos do grupo Controle, Ruído e Ruído+Glutamina, Linfócitos do grupo Controle, Ruído e Ruído+Glutamina. Teste de Wilcoxon Pareado para WBC do grupo Ruído, Eosinófilos do grupo Ruído.



Além do resultado nas contagens de neutrófilos, observamos diminuição na contagens de monócitos na análise entre o período de 12 horas e 13 dias após a exposição. identificamos que tanto o grupo ruído como o grupo ruído + alanilglutamina apresentaram diminuição na contagem de monócitos, o que também está relacionado a uma maior migração destas células aos tecidos em resposta inflamatória.

A glutamina desempenha um papel importante na geração de compostos essenciais para o metabolismo e na função dos leucócitos, gerando expressão de marcadores de superfície de células como linfócitos e à produção de citocinas os quais permitem a identificação de respostas anti inflamatórias e citoprotetoras associadas ao estresse. Nos



demais parâmetros leucocitários analisados como a contagem global de leucócitos, contagens absolutas de linfócitos e eosinófilos não identificamos diferenças nas análises intra e intergrupos nos períodos experimentais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão identificamos um efeito citoprotetor e antiinflamatório da alanilglutamina, uma vez que nossos resultados abrem perspectivas para mais estudos sobre o efeito protetor na alanilglutamina no tratamento e prevenção da perda auditiva.

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

- Heck, Thiago Gomes et al. **“Suppressed anti-inflammatory heat shock response in high-risk COVID-19 patients: lessons from basic research (inclusive bats), light on conceivable therapies.”** *Clinical science (London, England : 1979)* vol. 134,15 (2020): 1991-2017. doi:10.1042/CS20200596.
- International Standard, **ISO 1999 acústica: determinação da exposição ocupacional ao ruído e estimativa da deficiência auditiva induzida pelo ruído.** In: Editado por: Standardization GIOf. 1990.
- Kim, M.; Wischmeyer, P. E. **Glutamine.** *World Review of Nutrition and Dietetics*, v. 105, p. 90–96, 2013.
- Ohinata Y., Miller JM., Altschuler RA., Schacht J. **Intense noise induz a formação de produtos de peroxidação de lipídios vasoativos na cóclea.** *Brain Res.* 2000; 878 : 163–73.
- Park, Hyo-Jin et al. **“GSTA4 mediates reduction of cisplatin ototoxicity in female mice.”** *Nature communications* vol. 10,1 4150. 12 Sep. 2019, doi:10.1038/s41467-019-12073-0.
- 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.
- Han Z, Truong QA, Park S, Breslow JL. **Dois membros da família Hsp70 expressos em lesões ateroscleróticas.** *Proc Natl Acad Sci US A.* 2003, 4 de fevereiro; 100 (3): 1256-61. doi: 10.1073 / pnas.252764399. Epub 27 de janeiro de 2003. PMID: 12552099; PMCID: PMC298760. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE100365>.