



**POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE TRONCO ENCEFÁLICO (PEATE) EM RATOS WISTAR TRATADOS COM ALANILGLUTAMINA EXPOSTOS AO RUÍDO <sup>1</sup>**

**AUDITORY BRAINSTEM RESPONSE (ABR) IN WISTAR RATS TREATED WITH ALANYLGLUTAMINE EXPOSED TO NOISE**

**Samara Cristine Knebel<sup>2</sup>, Samara Nicole Friske<sup>3</sup>  
Marcos Soares<sup>4</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>5</sup>, Matias Nunes Frizzo<sup>6</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 (UNIJUÍ).

<sup>2</sup>Acadêmica de Biomedicina da UNIJUÍ. Bolsista PIBITI-UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF.

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

<sup>4</sup>Docente do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUÍ, Doutorando em Distúrbios da Comunicação Humana pela UFSM. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF.

<sup>5</sup>Professor Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUÍ) e Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional (PPMMC).

<sup>6</sup>Professor Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUÍ). (Orientador)

## **INTRODUÇÃO**

A priori, a perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR) causada pela exposição crônica ao ruído ou por trauma acústico promove efeitos nocivos à saúde. O distúrbio auditivo provocado pelo ruído ou pela cisplatina na cóclea desencadeia estresse celular mediado pelos danos oxidativos. Indubitavelmente, para proteção contra situações de ruído a cóclea requer uma resposta citoprotetora, e uma dessas defesas é sob a forma da expressão de uma família de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) (SOARES *et al.*, 2019). Sendo assim, o aumento da expressão intracelular de HSP70 coclear tem efeito citoprotetor nas células do órgão de Corti contra o dano causado pelo ruído e a ototoxicidade.

Segundo Hamiel *et al.* (2009), a glutamina realiza uma função fundamental na proteção celular seguida de uma lesão por meio do aprimoramento e potencialização da HSP70. Nesse sentido, a glutamina é considerada uma substância que induz HSP70 intracelular (iHSP70), conforme Petry *et al.* (2014), evidencia-se que ela aumenta a expressão de iHSP70 em tecido muscular de ratos.

O Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE) corresponde ao registro da atividade elétrica que acontece no sistema auditivo, da orelha interna até o tronco encefálico, conseqüente da apresentação de um estímulo acústico. Ademais, trata-se de um



exame objetivo simples e não invasivo para avaliação da função auditiva (CASALI *et al.*, 2010). O PEATE de rato é composto de 4 componentes (P1 a P4) decorrendo dentro de 6 ms ao início do estímulo, reflete a atividade neural, componente P1 do nervo auditivo, P2 do núcleo coclear, P3 do complexo olivar superior e P4 do lemnisco lateral e/ou colículo inferior. Os limiares auditivos são os níveis mínimos de pressão acústica eficaz necessária para provocar uma sensação auditiva e são determinados pelo decréscimo da intensidade do som, a cada 5 dB, partindo de 100 dB até 0 dB. Por conseguinte, em roedores a onda P2 é mais larga e geralmente a última onda a desaparecer com o decréscimo do estímulo, por conta disso os limiares foram definidos como a menor intensidade capaz de detectar a onda P2. Sendo assim, os dados do PEATE são expressos em Limiares Auditivos (LA) e Diferença de Limiar Auditivo (DLA) que representa a diferença dos limiares entre os grupos (SOARES *et al.*, 2019). Dessa forma, objetivamos avaliar o efeito tratamento com alanilglutamina Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE) após a indução de perda auditiva pelo ruído.

## **METODOLOGIA**

Em relação a ética, 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 (UNIJUÍ) com protocolo nº 058/15. O local de estudo foi no Laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUÍ (LeBio) e no Biotério da UNIJUÍ. Para mais, a análise dos dados foi realizada por teste Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests com múltiplas comparações, sendo considerado nível de significância de 5%.

Correspondendo a amostra, para o projeto foram utilizados 15 ratos Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*), fêmeas, provenientes do biotério da Unijuí, mantidos em condições ideais para animais de laboratório, em ciclo claro/escuro de 12h, temperatura controlada de 22 +/- 2 C°, recebendo água e ração ad libitum. Divididos em 3 grupos: Controle, Ruído e Tratamento com Alanilglutamina, sendo 5 animais para cada. Assim sendo, o grupo Controle não foi exposto a nenhuma intervenção mas os grupos Ruído e Alanilglutamina foram expostos ao ruído. O grupo Alanilglutamina Ratos foi tratado com dose única por gavagem de alanilglutamina na dose de 1,5 g/kg, 6 horas antes da exposição ao ruído.

Em relação à Exposição ao Ruído os animais foram colocados em uma caixa e



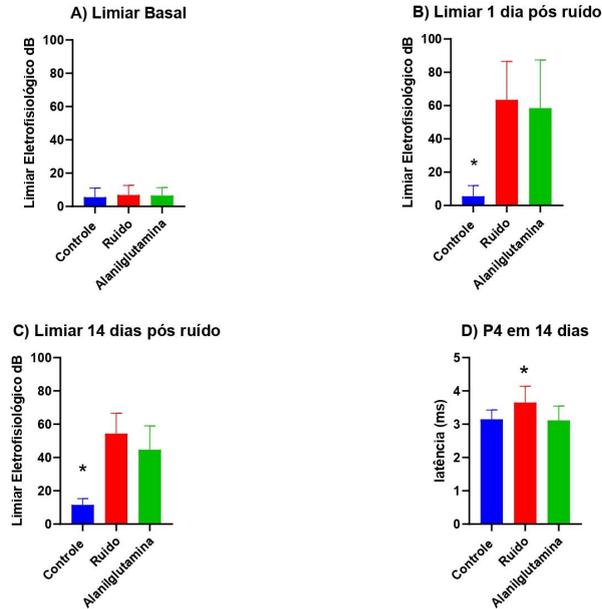
submetidos a ruído branco (white noise), de amplo espectro de frequência, com o pico de intensidade centralizada em 8000Hz, contínuo com nível de 124 dB Nível de Pressão Sonora (NPS), por 2 horas. Assim sendo, o ruído branco foi produzido por um gerador de sinal de áudio (EP125, Insight®) e exposto em auto-falantes no centro da caixa. O nível de ruído foi medido com um decibelímetro (Decibelímetro digital TDEC100, Incoterm®) dentro da caixa no início, e após completar a exposição do ruído.

Para medida dos limiares auditivos, o PEATE foi realizado 1 dia antes, 1 dia após e 14 dias após a exposição ao ruído em todos os grupos. Para o teste os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Sendo assim, foram inseridos eletrodos subcutâneos (tipo agulha) na região posterior da orelha (eletrodo ativo), no vertex (eletrodo referência) e orelha contralateral (eletrodo terra). Os estímulos sonoros foram cliques (rise/fall time, 2 ms; duração total, 2 ms; taxa de repetição, 21/s). As respostas foram filtradas (100-3000 Hz), e reproduzidas pela média de 1000 amostras. O estímulo de clique tem uma alta reprodutibilidade e estabilidade no formato das ondas, sendo um dos estímulos mais comuns. Em ratos, a avaliação auditiva com cliques, corresponde ao espectro de frequência de 8000-10000 Hz.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à realização do teste PEATE, neste subprojeto de estudo buscou-se avaliar a detecção de efeitos na perda auditiva de animais expostos ao ruído com tratamento de alanilglutamina, mais especificamente entre três grupos, Controle (passou pelo mesmo estresse, não foi exposto ao ruído), Ruído (exposição ao ruído) e Alanilglutamina (obtiveram tratamento com alanilglutamina e exposição ao ruído).

**Figura 1:** A) Limiar auditivo basal, grupos controle (5) ruído (5) alanilglutamina (5), realizado teste Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests com múltiplas comparações. B) Limiar auditivo 1 dia pós ruído grupos controle (5) ruído (5) alanilglutamina (5), realizado teste Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests com múltiplas comparações. \* $P < 0,05$ , controle vs ruído e alanilglutamina. C) Limiar auditivo 14 dias pós ruído, grupos controle (5) ruído (5) alanilglutamina (5), realizado teste Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests com múltiplas comparações. \* $P < 0,05$ , controle vs ruído e alanilglutamina. D) Componente P4 latência auditiva após 14 dias, grupos controle (5) ruído (5) alanilglutamina (5), realizado teste Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests com múltiplas comparações. \* $P < 0,05$ , ruído vs controle e alanilglutamina.



Em relação a figura A, os grupos foram avaliados quanto ao limiar basal, um dia antes da exposição ao ruído e sem nenhum tratamento ainda instituído. Observou-se que os limiares permaneceram similares, demonstrando a concordância dos limiares auditivos entre os grupos antes de qualquer intervenção ( $P < 0,05$ ).

Na figura B, mostra os grupos 1 dia após a exposição ao ruído, constatando-se que os grupos expostos (Alanilglutamina e Ruído) obtiveram aumento no limiar auditivo (piora auditiva), relacionando  $P < 0,05$ . Por conseguinte, a figura C constata que os grupos Alanilglutamina e Ruído estavam com limiar sem alterações e não houve diferença entre eles em  $P < 0,05$ . Tanto a perda auditiva transitória (1 dia) e permanente (14 dias), não houve proteção dos limiares auditivos no grupo tratado com alanilglutamina em relação ao grupo ruído.

Por outro lado, analisando a figura D, a onda P4 do PEATE demonstrou aumento de latência somente no grupo ruído, e o tratamento com alanilglutamina manteve esta latência em valores semelhantes ao grupo controle. Recorda-se que o PEATE do rato tem como componente o P4 que reflete ao lemnisco lateral e/ou colículo inferior. Este fato sugere que a alanilglutamina, apesar de ter modificado os limiares auditivos em relação ao grupo ruído, foi capaz de ter latências menores que o grupo ruído, que demonstra possivelmente pouco dano nas vias auditivas centrais, pelo menos até o colículo inferior.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, a diminuição de latência de P4, demonstra uma transmissão neural mais rápida no grupo tratado com Alanilglutamina, apesar de não ter interferido nos limiares auditivos basais. Este fato, sugere que o tratamento com Alanilglutamina protegeu contra um dano neural, pelo menos, até o nível de colículo inferior. Sendo assim, para corroborar a hipótese necessita-se de mais estudos concernentes, principalmente na análise histológica das vias neurais.

**Palavras-chave:** Ruído. Ratos Wistar. Perda Auditiva. PEATE. Alanilglutamina.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica, especialmente ao PIBITI UNIJUÍ pela concessão de bolsas, incentivando a pesquisa. Para mais, agradeço a todos do Grupo de Pesquisa em Fisiologia por todos os ensinamentos, em especial ao meu orientador, professor Dr. Matias Nunes Frizzo, pela oportunidade de ingresso na pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASALI, Raquel Leme; DOS SANTOS, Maria Francisca Colella. Auditory Brainstem Evoked Response: response patterns of full-term and premature infants. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, v. 76, n. 6, p. 729-738, 2010.

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.

Petry, Eder 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* vol. 94,2 (2014): 130-6. doi:10.1016/j.lfs.2013.11.009

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*, 2019.