



Evento: XII Seminário de Inovação e Tecnologia

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO RUÍDO SOBRE AS CÉLULAS DO GÂNGLIO
ESPIRAL E DAS CÉLULAS DE SCHWANN DO NERVO COCLEAR EM RATOS
WISTAR¹**

**EFFECTS OF NOISE EXPOSURE ON SPIRAL GANGLIUM AND SCHWANN CELLS OF
COCHLEAR NERVE IN WISTAR RATS**

**Samara Nicole Friske², Samara Cristine Knebel^{2,3}, Paula Taís Friske⁴, Marcos Soares⁵,
Thiago Gomes Heck⁶**

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

² Acadêmica de Medicina Veterinária da UNIJUÍ. Bolsista PIBIT-UNIJUÍ.

³ Acadêmica de Biomedicina da UNIJUÍ. Bolsista PIBIT-UNIJUÍ.

⁴ Graduada em Nutrição pela UNIJUÍ, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUÍ (PPGAIS).

⁵ Docente do Curso de medicina da UNIJUÍ, Doutorando em Distúrbios da Comunicação Humana pela UFSM.

⁶ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUÍ (PPGAIS).

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011) em 2011 a poluição sonora se tornou uma das maiores ameaças ambientais à saúde pública, visto que a exposição ao ruído intenso pode gerar a Perda Auditiva Induzida por Ruído (PAIR), geralmente bilateral, irreversível e progressiva com o tempo de exposição (BRASIL, 2006).

O dano causado pelo ruído resulta em perda auditiva neurossensorial pela degeneração de neurônios do gânglio espiral e pelos danos nas células ciliadas da cóclea (MAO; CHEN, 2021). As células ciliadas são responsáveis pela transdução de ondas sonoras em sinais elétricos e o gânglio espiral transmite os sinais ao tronco encefálico (GROVES e FEKETE, 2012).

Acredita-se que a exposição ao ruído pode causar uma intensa atividade metabólica na cóclea (HENDERSON *et al.*, 2006), que gera o estresse oxidativo, responsável por diversos danos. O estresse oxidativo se caracteriza pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e as defesas antioxidantes em favor dos níveis de EROS (HECK, 2021). Por isso, estudos realizados nos últimos anos incluem a utilização de drogas antioxidantes para combater a perda auditiva (GUO *et al.* 2021).

Para realizar a avaliação morfológica de células pode-se utilizar a coloração com hematoxilina e eosina, um método de coloração utilizado a diversos anos e considerado padrão (LLEWELLYN, 2009). A utilização de hematoxilina e eosina permite localizar o



núcleo celular possibilitando a contagem de células viáveis no tecido (OVALLE; NETTER, 2014).

Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar o dano auditivo causado pelo ruído em ratas wistar com base na avaliação histológica de densidade de células do gânglio espiral e células de Schwann do nervo coclear.

METODOLOGIA

Animais

Para este trabalho foram utilizadas 10 ratas *Wistar (Rattus Norvegicus Albinus)* com média de 5 meses de idade, provenientes do biotério da UNIJUI, que foram mantidos sob condições ideais para animais de laboratório, com temperatura ambiente controlada 22 ± 2 C°, umidade relativa de 50 á 60% e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado na CEUA-UNIJUI (no. 058/15).

Delineamento experimental

Os animais da primeira etapa foram divididos em dois grupos de cinco animais cada: Controle (nenhuma intervenção) e Ruído (exposição ao ruído). Os animais do Grupo Ruído foram alocados em uma caixa e submetidos a ruído branco (white noise), de amplo espectro de frequência, com o pico de intensidade centralizada em 8000 Hz, contínuo com nível de 120 dB Nível de Pressão Sonora (NPS), durante duas horas. 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. Os animais do grupo controle somente foram alocados na mesma caixa durante duas horas, mas sem a produção de som. Para a avaliação dos limiares auditivos dos animais é utilizado o teste de Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE) sendo que para a realização do teste os animais foram anestesiados.

Processamento de Tecidos

Foram coletadas as cócleas, sendo dissecadas, janelas oval e redonda abertas, fixadas



em paraformaldeído 4%, pH 7,0, por 6h. Posteriormente foram lavadas em PBS e imersas em solução de descalcificação (EDTA 10%) por cerca de 90 dias, à temperatura ambiente, sendo essa solução substituída sempre que necessário.

Após o processo de descalcificação, o tecido foi desidratado por passagem em soluções de etanol, clarificado por passagem em xilol, infiltrado em parafina e incluído em bloco de parafina para posterior microtomia em cortes de 8 μ m. Em seguida as lâminas permaneceram por 12 horas em estufa a 60°C para que o tecido fixasse na lâmina.

Transcorridas as 12 horas retirou-se a parafina mergulhando as lâminas no Xilol duas vezes durante 3 minutos. e logo depois foi realizada a hidratação do tecido pela imersão do tecido em soluções de álcool com concentração decrescente (Álcool 100%, 90% e Álcool 70%) durante 3 minutos cada e por fim a realização de uma lavagem com água destilada.

A coloração foi efetuada pela imersão da lâmina em Hematoxilina por 2 minutos e imersão em Eosina também por 2 minutos. A seguir o tecido foi novamente desidratado com soluções de Álcool em concentração crescente (Álcool 95% e 100% por duas vezes) durante 3 minutos, e imergida em Xilol por duas vezes pelo período de 3 minutos para em seguida ser realizada a montagem pingando uma gota de Entellan™ na lâmina e colocando a lamínula sobre esta, retirando as bolhas de ar.

Contagem da Densidade Celular

A densidade de células viáveis do gânglio espiral e das células de Schwann foram quantificadas através de imagens dos tecidos por meio do programa *Image J*, calculada pelo número de células viáveis pela área em pixel da fotografia do corte microscópico, todos em mesmo aumento de 400x. Assim, a fórmula utilizada foi Densidade Celular = n° de células/área em pixel $\times 10^{-6}$.

Análise estatística

Foi realizada a *ANOVA* de uma via com comparações múltiplas por meio do programa *GraphPad Prism 9*. Os resultados são apresentados como média \pm dp. Considerando $P < 0,05$ como significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 podemos observar que o Grupo Ruído teve uma menor densidade de células do Gânglio Espiral, quando comparado com o Grupo Controle, demonstrando que a exposição ao ruído levou a diminuição das células no local. Segundo Kujawa e Liberman (2009) a superexposição acústica pode causar uma perda permanente das fibras do nervo auditivo sem destruir as células sensoriais da cóclea, o que também ocorreu no nosso estudo.

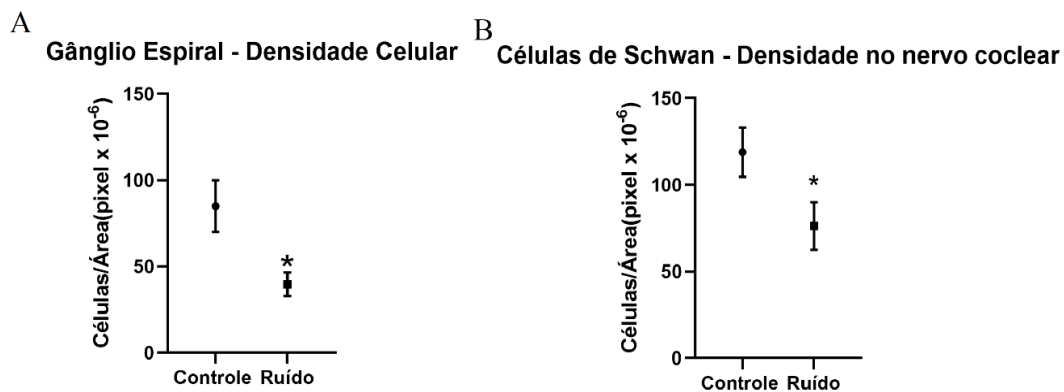


Figura 1. Efeito da exposição ao ruído sobre a densidade celular Coclear. ANOVA de uma via com comparações múltiplas por meio do programa *GraphPad Prism 9*. A: Densidade celular do Gânglio Espiral. $P = <0,0001$, *Ruído vs Controle. B: Densidade de células de Schwann do Nervo Coclear. $P = <0,0001$, *Ruído vs Controle.

A densidade de células de Schwann no nervo coclear é demonstrada no Gráfico 2, onde podemos observar que o Grupo Ruído apresentou uma menor densidade de células. Essas células são responsáveis pela manutenção do revestimento dos axônios do nervo coclear (Nagarajan *et al.*, 2002). Estudos recentes mostraram que a perda transitória de células de Schwann cocleares causa déficits auditivos permanentes em camundongos, o que demonstra que a menor densidade dessas células pode interferir na audição (BUDAK *et al.*, 2021).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição ao ruído foi capaz de promover a diminuição da densidade das células do Gânglio Espiral e também das células de Schwann no Nervo Coclear o que demonstra que o ruído causa danos nas células responsáveis pela transmissão dos sinais elétricos gerados na cóclea, resultando assim em prejuízos para a audição. Estes dados são importantes para que possamos ter base para avaliações de novas estratégias farmacológicas e não farmacológicas de prevenção à perda auditiva.



Palavras-chave: Ruído. Ratos Wistar. Perda Auditiva. Estresse Oxidativo. Histologia.

AGRADECIMENTOS: CNPq, FAPERGS, CAPES, UNIJUÍ, PPGAIS, GPeF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Perda auditiva induzida por ruído (Pair)**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 40 p. (Saúde do Trabalhador: Protocolos de Complexidade Diferenciada, n. 5; Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006.
- BUDAK, M., GROSH, K., SASMAL, A., CORFAS, G., ZOCHOWSKI, M., & BOOTH, V. **Contrasting mechanisms for hidden hearing loss: Synaptopathy vs myelin defects**. *PLoS computational biology*, 17(1), e1008499, 2021.
- GROVES, K., FEKETE, D. M. **Moldando o som no espaço: a regulação da padronização do ouvido interno**. *Desenvolvimento* 139, 245-257, 2012.
- GUO, L., CAO, W., NIU, Y., HE, S., CHAI, R., YANG, J. **Autophagy Regulates the Survival of Hair Cells and Spiral Ganglion Neurons in Cases of Noise, Ototoxic Drug, and Age-Induced Sensorineural Hearing Loss**. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 2021.
- HECK, T. G. **Cardioproteção durante a Quimioterapia: Perspectivas de Estratégias com Antioxidantes**. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* [online]. 2021, v. 117, n. 6
- HENDERSON, D., BIELEFELD, E. C., HARRIS, KELLY C., HU, B. H. **O Papel do Estresse Oxidativo na Perda Auditiva Induzido por Ruído, Ouvido e Audição**. Fevereiro de 2006 - Volume 27 - Edição 1 - p 1-19
- KUJAWA S. G., LIBERMAN M.C. **Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss**. *J Neurosci* 29: 14077–14085, 2009
- LLEWELLYN, B. D. **Nuclear staining with alum hematoxylin**. *Biotechnic and Histochemistry*, v. 84, n. 4, p. 159–177, 2009.
- MAO H, CHEN Y. **Noise-Induced Hearing Loss: Updates on Molecular Targets and Potential Interventions**. *Neural Plast.* 2021 Jul
- NAGARAJAN R, LE N, MAHONEY H, ARAKI T & MILBRANDT J. **Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling**. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2002.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Novas diretrizes europeias para o ruído ambiental são divulgadas pela OMS**. 2011. Disponível em: <<https://www.proacustica.org.br/publicacoes/reportagens/novas-diretrizes-europeias-para-ruído-ambiental-são-divulgadas-pela-oms/>> Acesso em 28 de jun de 2022.
- OVALLE, W.K.; NAHIRNEY, P.C. **Bases de Histologia - Ilustrações de Frank H. Netter**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.