

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DISTÚRBIOS DA
COMUNICAÇÃO HUMANA

Marcos Soares

**AVALIAÇÃO DA ALANILGLUTAMINA E CHOQUE TÉRMICO NA
INDUÇÃO DE HSP70 NA CÓCLEA COMO POTENCIAL
TERAPÊUTICO EM RATOS**

Santa Maria, RS
2022

Marcos Soares

**AVALIAÇÃO DA ALANILGLUTAMINA E CHOQUE TÉRMICO NA INDUÇÃO DE
HSP70 NA CÓCLEA COMO POTENCIAL TERAPÊUTICO EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, linha de pesquisa em Audição e Equilíbrio, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Distúrbios da Comunicação Humana.

Orientador: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira
Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Gomes Heck

Santa Maria, RS
2022

Soares, Marcos
AVALIAÇÃO DA ALANILGLUTAMINA E CHOQUE TÉRMICO NA
INDUÇÃO DE HSP70 NA CÓCLEA COMO POTENCIAL TERAPÊUTICO EM
RATOS / Marcos Soares.- 2022.
123 p.; 30 cm

Orientador: Aron Ferreira da Silveira
Coorientador: Thiago Gomes Heck
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, RS, 2022

1. Perda Auditiva 2. Perda Auditiva Induzida por Ruído
3. Proteínas de Choque Térmico HSP70 4. Glutamina I.
Ferreira da Silveira, Aron II. Gomes Heck, Thiago III.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MARCOS SOARES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

MARCOS SOARES

AVALIAÇÃO DA ALANILGLUTAMINA E CHOQUE TÉRMICO NA INDUÇÃO DE HSP70 NA CÓCLEA COMO POTENCIAL TERAPÊUTICO EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em **Distúrbios da Comunicação Humana**.

Aprovado em 04 de novembro de 2022:

Aron Ferreira da Silveira, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Thiago Gomes Heck, Prof. Dr. (UNIJUI)
(Co-orientador)

Joel Lavinsky, Prof. Dr. (UFRGS)
(por videoconferência)

Juliana Sato Hermann, Prof^a. Dr^a. (UNIJUI)
(por videoconferência)

Valdete Alves Valentins dos Santos Filha, Prof^a. Dr^a. (UFSM)

Fernanda Soares Aurélio Patatt, Prof^a. Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2022

À minha família, minha esposa Gabriela e meus filhos Felipe e Júlia. Também dedico aos meus pais, Adilton e Glória, pela educação e amor recebidos.

AGRADECIMENTOS

A realização e finalização deste trabalho ocorreu pelo auxílio de várias pessoas. Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse possível, mas de maneira especial agradeço:

- ao meu orientador Aron Ferreira da Silveira pela oportunidade concedida de sua orientação no Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, e pelas estímulos de positividade para que em concluísse esta tese.

- ao meu co-orientador Thiago Gomes Heck, que aceitou a continuidade do trabalho de Mestrado, seguindo a mesma linha de pesquisa realizada no Laboratório de Ensaio Biológicos da UNIJUI, pela amizade construída, e pelos estímulos para a finalização deste trabalho.

- à minha esposa Gabriela pelo amor, por tolerar minhas ausências em casa e por toda a força para que eu não desistisse deste doutoramento.

- à meus filhos, Felipe e Júlia, por serem minha fonte de energia, motivo para eu querer ser sempre melhor e construir um mundo melhor.

- à meus pais, Adilton e Glória, por todo amor, todos os ensinamentos de vida, e por ter me concedido a melhor educação que eu poderia ter para que eu pudesse chegar onde cheguei. Eternamente grato!

- à Prof. Mirna Stela Ludwig pela amizade, força e ensinamentos do mundo da docência. Se aqui estou, muito se deve a você e ao Thiago.

- a todas as pessoas do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) da UNIJUI, em especial a Samara Friscke e Letícia Compagnon que participaram ativamente dos experimentos desta Tese. Muito grato a vocês.

- à fonoaudióloga Raquel Coradini Bortolini, pela amizade e participação na realização dos exames de PEATE nos animais.

- à todos os professores da pós-graduação do Programa de Distúrbios da Comunicação Humana por todos os ensinamentos.

- à todos os colegas de pós-graduação, em especial a Juliana Corrêa Soares, pela amizade construída e pela troca de experiências.

Enfim, agradeço a todos os amigos e pessoas que participam da minha vida, que torcem por mim e fazem eu ser uma pessoa muito melhor.

“A cegueira separa as pessoas das coisas,
enquanto a surdez separa as pessoas das
pessoas”

(Helen Keller)

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ALANILGLUTAMINA E CHOQUE TÉRMICO NA INDUÇÃO DE HSP70 NA CÓCLEA COMO POTENCIAL TERAPÊUTICO EM RATOS

AUTOR: Marcos Soares

ORIENTADOR: Aron Ferreira da Silveira

CO-ORIENTADOR: Thiago Gomes Heck

A perda auditiva é a mais prevalente desordem sensorial, com crescimento global e impacto na vida das pessoas, sendo a Perda Auditiva Induzida pelo Ruído (PAIR) a maior causa evitável de perda auditiva sensorioneural. Diante de situações de estresse coclear, como na exposição ao ruído e ototoxicidade, há aumento na expressão de proteínas de choque térmico de 70kDa (HSP70) em diversas células da orelha interna, com intuito de citoproteção e diminuição do estresse oxidativo coclear, a fim de evitar o dano auditivo. Alguns agentes têm sido evidenciados, como potenciais agentes de otoproteção pela capacidade de indução coclear de HSP70, como o choque térmico, condicionamento sonoro e a geranilgeranilacetona. Neste sentido, a alanilglutamina potencializa a indução de HSP70 em vários tecidos, demonstrando mecanismos anti-inflamatórios em cócleas após exposição ao ruído. Este trabalho teve como objetivo avaliar se a alanilglutamina e o choque térmico induzem HSP70 em diferentes regiões cocleares e avaliar se alanilglutamina possui efeitos de proteção auditiva em avaliação pelo Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) e a histologia coclear. Para isso, desenvolvemos 2 estudos experimentais. O primeiro estudo experimental realizou a avaliação de indução coclear de HSP70 pela alanilglutamina e choque térmico, sendo utilizadas 6 ratos Wistar, divididas igualmente em três grupos: controle, submetidas a choque térmico em todo corpo a 42 °C e tratadas com administração única de alanilglutamina à 1,5 g/kg. Após 6 horas, os animais foram eutanasiados e suas cócleas coletadas para análise imuno-histoquímica de HSP70. O segundo estudo experimental demonstrou o efeito da alanilglutamina na proteção auditiva frente a exposição ao ruído, sendo utilizadas 15 ratos Wistar divididas em grupos controle, expostas ao ruído, e tratadas com alanilglutamina e expostas ao ruído. Após 6 horas do tratamento, os animais foram expostos a ruído branco à 124 dB NPS por 2 horas (grupos Ruído e Alanilglutamina). O PEATE foi realizado antes de qualquer intervenção, 1 dia (avaliação da perda auditiva temporária) e 14 dias (avaliação da perda auditiva permanente) após exposição ao ruído. Após último PEATE, os animais foram eutanasiados para análise histológica da orelha interna. A Alanilglutamina e o choque térmico demonstraram aumento da expressão de HSP70 nas células ciliadas da cóclea, gânglio espiral e estria vascular em comparação ao grupo Controle. Além disso, o no grupo tratado com alanilglutamina e exposto ao ruído, a recuperação auditiva, entre o primeiro e 14º. dia após exposição ao ruído, foi maior em comparação ao grupo exposto ao ruído sem intervenção (22,5 dB NA vs. 9 dB NA, respectivamente). Adicionalmente, o PEATE demonstrou latência de onda P4 menor do grupo tratado com alanilglutamina quando comparado ao grupo exposto ao ruído e na análise histológica, a densidade de neurônios do gânglio espiral no grupo Alanilglutamina foi maior que o grupo Ruído. Frente a isso, concluímos que a alanilglutamina e o choque térmico podem ser potenciais agentes terapêuticos em otoproteção, via indução de HSP70, criando um campo para futuros estudos na preservação auditiva.

Palavras-chave: Perda Auditiva. Perda Auditiva Induzida por Ruído. Choque Térmico. Proteínas de Choque Térmico HSP70. Resposta ao Choque Térmico. Glutamina.

ABSTRACT

EVALUATION OF ALANYLGLUTAMINE AND HEAT SHOCK IN HSP70 INDUCTION IN THE COCHLEA AS A POTENTIAL THERAPEUTIC IN RATS

AUTHOR: Marcos Soares
ADVISOR: Aron Ferreira da Silveira
CO-ADVISOR: Thiago Gomes Heck

Hearing loss is the most prevalent sensory disorder, with global growth and impact on people's lives, with Noise-Induced Hearing Loss (NIHL) being the major preventable cause of sensorineural hearing loss. In situations of cochlear stress, such as exposure to noise and ototoxicity, there is an increase in the expression of 70kDa heat shock proteins (HSP70) in several cells of the inner ear, with the aim of cytoprotection and reduction of cochlear oxidative stress, in order to prevent hearing damage. Some agents have been shown as potential otoprotection agents due to the cochlear induction capacity of HSP70, such as heat shock, sound conditioning and geranylgeranylacetone. In this sense, alanylglutamine potentiates the induction of HSP70 in various tissues, demonstrating anti-inflammatory mechanisms in cochleas after exposure to noise. This study aimed to assess whether alanylglutamine and heat shock induce HSP70 in different cochlear regions and to assess whether alanylglutamine has hearing protection effects as assessed by Auditory Brainstem Response (ABR) and cochlear histology. For this, we developed two experimental studies. The first experimental study carried out the evaluation of cochlear induction of HSP70 by alanylglutamine and heat shock, using 6 Wistar rats, divided equally into three groups: control, subjected to heat shock throughout the body at 42 °C and treated with a single administration of alanylglutamine at 1.5 g/kg. After 6 hours, the animals were euthanized and their cochleas were collected for immunohistochemical analysis of HSP70. The second experimental study demonstrated the effect of alanylglutamine on hearing protection against noise exposure, using 15 Wistar rats divided into control groups, exposed to noise, and treated with alanylglutamine and exposed to noise. After 6 hours of treatment, the animals were exposed to white noise at 124 dB SPL for 2 hours (Noise and Alanylglutamine groups). ABR was performed before any intervention, 1 day (assessment of temporary hearing loss) and 14 days (assessment of permanent hearing loss) after noise exposure. After the last ABR, the animals were euthanized for histological analysis of the inner ear. Alanylglutamine and heat shock demonstrated increased expression of HSP70 in hair cells of the cochlea, spiral ganglion and stria vascularis compared to the Control group. In addition, in the group treated with alanylglutamine and exposed to noise, hearing recovery between the first and 14th. day after noise exposure was higher compared to the noise-exposed group without intervention (22.5 dB HL vs. 9 dB HL, respectively). Additionally, ABR showed lower P4 wave latency in the group treated with alanylglutamine when compared to the group exposed to noise, and in the histological analysis, the density of spiral ganglion neurons in the Alanylglutamine group was higher than in the Noise group. In view of this, we conclude that alanylglutamine and heat shock may be potential therapeutic agents in otoprotection, via induction of HSP70, creating a field for future studies in hearing preservation.

Keywords: Hearing Loss. Noise-Induced Hearing Loss. Heat shock. Heat-Shock Proteins HSP70. Heat Shock Response. Glutamine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	DESENVOLVIMENTO	13
2.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1.1	Perda auditiva induzido por ruído.....	13
2.1.2	Proteínas de choque térmico	20
2.1.3	HSP70 na orelha interna	21
2.1.4	Potenciais agentes indutores de HSP70	24
2.2	PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS	28
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.3.1	Local de realização.....	29
2.3.2	Animais e cálculo amostral	29
2.3.3	Delineamento dos estudos	30
2.3.4	Procedimentos	32
2.3.5	Análise estatística	38
2.3.6	Considerações éticas.....	39
2.4	ARTIGO 1 - “ALANILGLUTAMINA E CHOQUE TÉRMICO COMO INDUTORES DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO DE 70 KDA EM CÓCLEAS DE RATOS: POTENCIAIS AGENTES TERAPÊUTICOS NA PERDA AUDITIVA?”	40
2.5	ARTIGO 2 - “EFEITOS DA ALANILGLUTAMINA NA PERDA AUDITIVA INDUZIDA PELO RUÍDO EM RATOS: ANÁLISE PELO POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE TRONCO ENCEFÁLICO E PELA HISTOLOGIA COCLEAR”	66
2.6	DISCUSSÃO	101
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
	REFERÊNCIAS.....	110
	ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	122

1 INTRODUÇÃO

Mais de 5% da população mundial tem perda auditiva incapacitante, definida como médias dos limiares audiométricos dos tons puros de 1, 2, 3 e 4 KHz igual ou pior que 41 dB NA. A perda auditiva cresce à nível mundial com acometimento de 432 milhões de adultos e 34 milhões de crianças, o que a torna a mais prevalente desordem sensorial (WHO, 2021). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a perda auditiva apresenta um custo global anual de 980 bilhões de dólares (WHO, 2021).

Este problema causa muitas dificuldades durante a vida, diretamente ligada à sua gravidade, com profundo acometimento na habilidade dos indivíduos se comunicarem com outros, dificuldades no estudo, em suas ocupações profissionais e em relações pessoais, com impacto abrangente a toda família e sociedade no qual o indivíduo com distúrbio auditivo está inserido (LOOI et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Especialmente em idosos, a dificuldade de comunicação em decorrência da perda auditiva pode ter um grande impacto em sua vida cotidiana, resultando sentimentos de solidão, isolamento, frustração e dependência (CIORBA et al., 2012).

Apesar do impacto significativo da perda auditiva em todos os segmentos da população, atualmente não existem tratamentos farmacológicos aprovados (FOSTER; JACQUES; PIU, 2022). Aparelhos de amplificação sonora individual, conhecidos como aparelhos auditivos convencionais, são boas opções para a reabilitação do indivíduo surdo, embora tenham algumas desvantagens. Para pacientes com perda auditiva leve a moderada, eles podem ser benéficos quando há necessidade de amplificação simples do som, embora tenham menor eficácia para a percepção de sons na presença de ruído de fundo (“fala no ruído”), e são associados a estigmas significativos que resultam em baixa adesão e atrasos no uso. O implante coclear é uma ótima opção em pacientes com perda auditiva severa a profunda, quando não há benefício com aparelhos auditivos convencionais, mas requer cirurgia cara e invasiva, muitas vezes com dificuldade de acesso em alguns países, e pode fornecer apenas percepção sonora rudimentar em alguns pacientes (SIMPSON et al., 2019). Conseqüentemente, o desenvolvimento de terapias medicamentosas eficazes que

possam interromper a perda auditiva, preveni-la ou restaurar a compreensão auditiva de alta qualidade teria um grande impacto na saúde humana (FOSTER; JACQUES; PIU, 2022).

Inúmeras causas podem levar ao dano auditivo: infecções, como otites e meningites, alterações genéticas, exposição a substâncias químicas ototóxicas, envelhecimento, exposição a ruído, entre outras (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Muitas destas causas podem acometer a região da orelha interna, levando a um dano sensorineural, principalmente ao órgão de Corti da cóclea, onde se localizam as células ciliares externas e internas, fundamentais para o funcionamento da audição, que em mamíferos adultos são incapazes de regeneração. Após um dano que leve a morte celular nestas células, há perda auditiva permanente (JIANG; SHA; SCHACHT, 2005; LAYMAN et al., 2015). Além disso, um dano neural ocorre, principalmente causado por ruído e substâncias ototóxicas, nas sinapses entre as células ciliadas internas e fibras auditivas aferentes, e no gânglio espiral da cóclea (BRAMHALL, 2021; HABYBABADY et al., 2018).

A perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR) é a maior causa de dano auditivo evitável no mundo, e é definida como uma importante prioridade em saúde pública pela OMS (WHO, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O ruído intenso leva a uma intensa atividade metabólica na cóclea (ENDERSON et al., 2006), que gera um estado de estresse oxidativo neste órgão. As espécies reativas do oxigênio e nitrogênio podem desencadear um dano permanente ou transitório nas células sensoriais da cóclea. Por conta disso, muitos estudos vêm sendo realizados com substâncias antioxidantes na prevenção e tratamento da PAIR (BAO et al., 2013; CHEN et al., 2004).

Além das defesas antioxidantes, outro fator protetor da cóclea é a expressão de proteína de choque térmico (HSP), em especial a Proteína de Choque Térmico de 70 kDa (HSP70). Em camundongos pré-condicionados por choque térmico (expostos previamente ao calor), a expressão da HSP70 coclear aumenta, o que confere a estes animais proteção celular contra uma subsequente situação de estresse celular, evitando danos pela exposição ao ruído (YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999). Além disso, a eliminação da expressão do fator de transcrição *Heat Shock Factor 1* (HSF1), que regula a expressão das HSPs, provoca uma perda auditiva

definitiva em camundongos (*knockout* HSF^{-/-}) após exposição ao ruído excessivo, demonstrando a importância da expressão de HSPs na citoproteção coclear frente a danos causados por estresse oxidativo (FAIRFIELD et al., 2005). Além disso, o aumento na expressão intracelular de HSP70 (iHSP70) representa citoproteção por mecanismos anti-inflamatórios (HECK et al., 2017; HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011).

Substâncias indutoras de HSP70 no meio intracelular (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 L-glutamina influencia positivamente no estoque intracelular de glutathione (GSH) e aumenta a expressão de iHSP70 em tecido muscular de ratos, diminuindo a vulnerabilidade tecidual ao estresse oxidativo (PETRY et al., 2014). Em recente estudo, foi evidenciado um efeito anti-inflamatório da alanilglutamina em cócleas de ratos (SOARES et al., 2020). Além disso, a presença de captação e transportadores de glutamina na cóclea, sugere importância deste aminoácido e seu metabolismo na cóclea (OGUCHI et al., 2012; RYAN; SCHWARTZ, 1984).

Frente a isso, agentes indutores de HSP70 na orelha interna podem gerar citoproteção coclear em situações de exposição ao ruído, sendo a L-glutamina uma substância promissora frente a recente evidência de mecanismos anti-inflamatórios na cóclea (SOARES et al., 2020).

A hipótese é que a alanilglutamina pode induzir HSP70 na cóclea e possuir efeitos de otoproteção quando administrada previamente ao ruído.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1 Perda auditiva induzido por ruído

A PAIR é a segunda causa mais comum de perda auditiva sensorineural, depois da presbiacusia, definida pela perda auditiva relacionado com o envelhecimento. Ela é importante na saúde ocupacional, principalmente em países industrializados (SLIWINSKA-KOWALSKA; PAWELCZYK, 2013), sendo a doença ocupacional mais comum nos EUA, com 22 milhões de trabalhadores expostos a níveis sonoros danosos, e gasto anual estimado de US\$242 milhões devido a incapacidade deste tipo de perda auditiva (BASNER et al., 2014). O uso de fones de ouvidos é um dos fatores para o aumento da incidência da PAIR em crianças e adultos jovens, que também pode resultar da exposição ao ruído no âmbito recreacional e militar (DANIEL, 2007).

Além de todos os problemas relacionados com a comunicação humana, a PAIR e outros tipos de perda auditiva neurossensorial interferem na função do hipocampo que continua a gerar novos neurônios na idade adulta, e desempenha um papel importante na navegação espacial, memória e emoção. Ele integra informações de vários sistemas sensoriais, incluindo o sistema auditivo, para desenvolver mapas espaciais cognitivos. A exposição aguda ao ruído intenso interrompe os padrões de disparo específicos do local dos neurônios do hipocampo, “desorientando espacialmente” as células por vários dias. Exposições sonoras maiores que levam a perda auditiva permanente suprimem cronicamente a proliferação celular e a neurogênese no hipocampo, estando associadas a déficits de memória de longo prazo (MANOHAR et al., 2022).

A diminuição do risco de PAIR é realizado pela redução da exposição do ruído e/ou pelo uso de equipamento de proteção auditiva (EPA), conhecidos como plugues, tampões, conchas ou abafadores de ruído. Porém, a exposição a um ruído danoso pode ocorrer em momento inesperado ou até exceder a capacidade de proteção de uma EPA (LO et al., 2013). Cerca de 20% dos trabalhadores europeus são expostos,

em mais da metade do tempo do horário de trabalho, a intensidade de ruído que os leva a elevação do tom da voz para se comunicarem com as outras pessoas (KONINGS; VAN LAER; VAN CAMP, 2009). Adicionalmente, a OMS relata que cerca de 1,1 bilhão de jovens em todo o mundo podem estar em risco de PAIR com base no uso do sistema de áudio pessoal, como exemplo os fones de ouvidos, e na exposição à música amplificada em bares, clubes e shows (LE PRELL, 2022).

A prevenção é a melhor opção para limitar os malefícios do ruído para audição. Programas de conservação auditiva nas escolas fundamentais são potencialmente eficazes para aumentar o conhecimento sobre os riscos da exposição ao ruído no início da vida, que pode resultar em mudanças comportamentais para redução de ruído e proteção auditiva (NEUFELD et al., 2011). Para o ruído industrial, a eliminação ou redução do ruído por meio de controles administrativos ou de engenharia é a melhor linha de defesa (JOY; MIDDENDORF, 2007). O risco de PAIR pode ser minimizado se o ruído for reduzido abaixo de 80 dB NPS (VERBEEK et al., 2009). Para níveis mais altos de ruído, as regulamentações são necessárias, pois a extensão do dano biológico se correlaciona diretamente com o tempo de exposição e a intensidade do ruído. Para prevenir a perda auditiva ocupacional, é necessária uma melhor implementação da legislação e melhores programas de prevenção (VERBEEK et al., 2014). A proteção dos trabalhadores contra a exposição ao ruído é objeto de recomendações internacionais, a exemplo da ISO 1999:2013 e de regulamentações específicas de cada país, porém os regulamentos variam muito entre os diferentes países e um terço dos países do mundo ainda não possui regulamentos ou legislação sobre níveis de ruído permitidos. A maioria dos países da América do Norte e do Sul, inclusive no Brasil, tem o limite de exposição permissível de 85 dB NPS para um dia de trabalho de 8 horas ou dose-equivalente, sendo necessário uso de EPA em intensidades iguais ou superiores (ARENAS; SUTER, 2014). Apesar do uso obrigatório de EPA em trabalhadores expostos ao ruído, a prevalência de uso é baixa, cerca de 42,2% no Brasil e 65,7% nos Estados Unidos (MEIRA; SANTANA; FERRITE, 2015).

O resultado dos efeitos danosos do ruído tem grande variabilidade individual diferentes níveis de suscetibilidade ao desenvolvimento de PAIR, com interação complexa de fatores genéticos e comportamentais (SLIWINSKA-KOWALSKA;

PAWELCZYK, 2013). Dependendo da suscetibilidade do indivíduo, intensidade e duração da exposição ao ruído, pode haver uma mudança transitória ou permanente no limiar auditivo, chamada de perda auditiva temporária ou perda auditiva permanente (LE PRELL, 2021; LO et al., 2013). Geralmente há uma recuperação auditiva dentro de 24 a 48h após uma perda auditiva temporária (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006), no entanto, estudos usando um modelo de camundongo descobriram que a perda auditiva temporária em animais jovens aceleravam a perda auditiva relacionada à idade, mesmo que os limiares auditivos fossem completamente restaurados logo após a perda temporária (KUJAWA; LIBERMAN, 2006).

A lesão da orelha interna pelo ruído não se limita às células ciliadas. Ela se estende para as vias neurais, como degeneração dos neurônios do gânglio espiral, mesmo quando ainda não há lesão das células ciliadas internas (HABYBABADY et al., 2018). Além disso, o trauma acústico está relacionado com lesão axonal e desmielinização do nervo auditivo 21 dias após exposição (COYAT et al., 2019).

Apesar da recuperação da perda auditiva temporária com recuperação dos limiares audiométricos, pode haver danos consideráveis nas sinapses em fita (*ribbon synapses*), denominada sinaptopatia (BHARADWAJ; SHINN-CUNNINGHAM, 2021; QI et al., 2022), que consiste em perda de conexões entre as células ciliadas internas e seus neurônios aferentes logo após uma exposição ao ruído (LIBERMAN et al., 2016), provavelmente resultado da excitotoxicidade do glutamato causando danos aos terminais pós-sinápticos. Quando a sinaptopatia não é acompanhada por uma mudança de limiar auditivo, denomina-se de Perda Auditiva Oculta Induzida por Ruído (SHI et al., 2016). Isso também é apoiado por pesquisas em animais que mostram células ciliadas intactas, mas extensa perda de gânglio espiral induzida por ruído (KUJAWA; LIBERMAN, 2009).

A característica patológica da PAIR com perda auditiva permanente é a perda de células ciliadas, predominantemente de células ciliadas externas, e a degeneração do nervo auditivo tanto na histopatologia do osso temporal humano quanto em um modelo de camundongo (WANG; HIROSE; LIBERMAN, 2002). Uma característica crucial da perda de células ciliadas devido a qualquer causa (ruído, medicamentos ototóxicos, idade) é a incapacidade das células sensoriais de mamíferos adultos de se regenerarem, levando a uma perda permanente da audição (LE et al., 2017).

Após o trauma acústico, danos mecânico diretos e alterações metabólicas indiretas ocorrem nas células ciliares da cóclea (WANG; LIBERMAN, 2002). O dano mecânico é adquirido pela exposição a intensidades de ruído acima de 130 dB de nível de pressão sonora (NPS), levando à dissociação do órgão de Corti da membrana basilar, ruptura das junções celulares e mistura de endolinfa e perilinfa (ENDERSON; HAMERNIK, 1986). O ruído intenso leva a uma importante mudança no aporte sanguíneo coclear com aumento da permeabilidade coclear, vasoconstrição capilar, e estagnação sanguínea em capilares da estria vascular, com consequente hipóxia para o órgão de Corti (NUTTALL, 1999). Após reperfusão, há dano metabólico secundário devido ao aumento das espécies reativas do oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) levando ao estresse oxidativo em nível celular (POIRRIER et al., 2010). Níveis excessivamente altos destas espécies reativas podem ultrapassar as defesas antioxidantes celulares, causando o dano oxidativo para o DNA, lipídeos e proteínas, com subsequente morte celular e perda auditiva (POIRRIER et al., 2010). O estresse oxidativo inicia imediatamente após a exposição ao ruído e persiste por 7 a 10 dias, espalhando-se apicalmente à partir da extremidade basal do órgão de Corti, ampliando assim a área de necrose e apoptose (FETONI et al., 2019). Assim, as células de mamíferos respondem ao estresse pela ativação de uma variedade de interações moleculares, que podem levar a sobrevivência ou morte celular (FAIRFIELD et al., 2005). Neste sentido, os mecanismos de proteção antioxidante, constituídos principalmente por glutathione (GSH), glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e catalase (RYBAK et al., 2009) têm papel fundamental na resposta bioquímica das células cocleares (AJAY; GUNWARDENE; RICHARDSON, 2022; ENDERSON et al., 2006).

A suscetibilidade genética à PAIR foi claramente demonstrada em animais. As cepas de camundongos (C57BL/6) que apresentam perda auditiva relacionada à idade mostraram-se mais suscetíveis ao ruído do que outras cepas. Além disso, vários camundongos knockout heterozigotos e homozigotos, incluindo *Cdh23*, *Pmca2*, *Sod1*, *Gpx1*, *Trpv4*, *Vasp* e *HSF1* mostraram-se mais sensíveis ao ruído (LE et al., 2017). Mais recentemente foi descoberto a *Nox3* como primeiro gene humano relacionado a PAIR (LAVINSKY et al., 2015).

A avaliação auditiva básica em humanos é realizada pela audiometria tonal. Inicialmente na PAIR se encontra um entalhe audiométrico típico, com perda auditiva em “formato de gota” nas frequências agudas, centralizado em 4 kHz, com propagação para as frequências vizinhas de 3 kHz e 6 kHz e alguma recuperação auditiva em 8 kHz (RABINOWITZ et al., 2006). O fato de frequências em torno de 4 kHz serem mais afetadas pelo ruído é provavelmente devido à frequência de ressonância do ouvido externo/canal auditivo, bem como às propriedades mecânicas do ouvido médio (PIERSON et al., 1994). As frequências agudas também são tipicamente afetadas pela presbiacusia; portanto, o entalhe pode desaparecer com o envelhecimento, dificultando a diferenciação entre PAIR e presbiacusia. Além disso, a piora auditiva em frequências agudas também está relacionada com a diminuição das defesas antioxidantes na base da cóclea, especialmente a glutathione (SHA et al., 2001). Com manutenção da exposição ao ruído, o entalhe audiométrico pode ficar mais profundo e mais amplo, envolvendo frequências mais baixas, como 2 kHz, 1 kHz e 0,5 kHz (HONG et al., 2013). A PAIR geralmente não causa perda auditiva superior a 75 dB nas frequências agudas e 40 dB nas frequências graves. No entanto, a exposição crônica ao ruído pode, em alguns indivíduos, causar perda auditiva sensorineural severa a profunda que pode ser influenciada por fatores genéticos subjacentes, ou diferenças na intensidade, tipo e duração da exposição ao ruído, ocasionada especialmente com ruído de impacto ou trauma acústico (LE et al., 2017).

Além disso, a PAIR pode estar associada a uma diminuição nos escores de reconhecimento de fala no silêncio, bem como no ruído de fundo, mesmo na configuração de um audiograma de tom puro normal (LIBERMAN et al., 2016). Isso provavelmente está relacionado aos mecanismos sinápticos já descritos, assim como habilidades reduzidas de processamento auditivo central (SHEHABI; PRENDERGAST; PLACK, 2022) como resultado das lesões entre células ciliadas internas e fibras nervosas auditivas, que são importantes para o processamento auditivo (SHI et al., 2016).

Embora a audiometria seja a principal ferramenta diagnóstica clínica para identificação da PAIR, não é o único exame utilizado para mensurar a lesão auditiva por ruído. Além dela, emissões otoacústicas, audiometria de alta frequência, audição no ruído, potenciais evocados auditivos e uma variedade de ferramentas de pesquisa

de zumbido são usadas em estudos de pesquisa que investigam lesões por ruído (LE PRELL, 2022).

A audiometria tonal e vocal depende da resposta do paciente, o que acarreta alguma subjetividade ao teste, além da dificuldade de realização em crianças e de pesquisa em modelos animais. Frente a isso, testes objetivos são importantes para análise auditiva. As medidas eletrofisiológicas, como PEATE, são utilizadas há tempos para detecção dos limiares auditivos. Porém, mais recentemente, tem sido usadas para detectar a sinaptopatia induzida por ruído. Há evidências de que as respostas do PEATE da amplitude da onda I, em testes supralimiais, diminuíram após a exposição ao ruído em animais com limiares auditivos normais, nas frequências tonotopicamente relacionadas à perda sináptica, sugerindo que a amplitude da onda I do PEATE possa ser preditiva do grau de sinaptopatia (MEHRAEI et al., 2016; SHEHABI; PRENDERGAST; PLACK, 2022). Outros achados do PEATE são descritos em vários estudos relacionados a PAIR e a presbiacusia, principalmente na avaliação do atraso de latências das ondas, especialmente a onda V que representa o potencial de ação auditivo no lemnisco lateral e colículo inferior, relacionado o aumento de latência da onda V com dano auditivo neural (ATTIAS; PRATT, 1984; CHEN; CHIANG; CHEN, 1992; FABIANI et al., 1998; KONRAD-MARTIN et al., 2012; PUSHPALATHA; KONADATH, 2016). Além disso, evidências sugerem que o teste de reflexo estapediano alterado, sem perda auditiva audiométrica, pode ser útil para a detecção precoce de sinaptopatia induzida por ruído em humanos (VALERO; HANCOCK; LIBERMAN, 2016), mas requerem mais pesquisas.

Apesar de não haver tratamento clínico de uso humano liberado pelo FDA na PAIR (FOSTER; JACQUES; PIU, 2022), diferentes tipos de agentes farmacêuticos demonstraram redução no risco de perda auditiva secundária à exposição ao ruído. Os esteróides demonstraram efeito terapêutico benéfico na PAIR quando administrados antes ou após trauma acústico em animais. Diferentes vias de administração foram investigadas em animais, incluindo administração intratimpânica, intraperitoneal e direta na escala timpânica, e todas demonstraram efeitos protetores evidenciados por PEATE e arquitetura coclear preservada (HAN et al., 2015). Estudos em humanos demonstraram que após trauma acústico, a administração sinérgica de esteróide sistêmico e intratimpânico resulta em melhores resultados auditivos do que

apenas com esteróides sistêmicos (CHANG et al., 2017). Embora haja alguma evidência de um efeito protetor dos esteróides no trauma acústico agudo, claramente não é uma opção de longo prazo para exposição ocupacional crônica ao ruído, considerando os efeitos colaterais negativos do uso sistêmico prolongado de esteróides.

Os antioxidantes podem ser uma alternativa mais segura aos esteróides devido a um perfil de efeitos colaterais mais favorável. As ERO e o estresse oxidativo são importantes na patogênese da PAIR e, portanto, substâncias antioxidantes poderiam teoricamente constituir um tratamento eficaz.

A N-acetilcisteína (NAC) foi relatada para reduzir os efeitos ototóxicos da exposição ao ruído em modelos animais (BIELEFELD et al., 2007; CLIFFORD et al., 2011; COLEMAN et al., 2010; FETONI et al., 2009; LORITO et al., 2008), porém com resultados limitados em humanos (DOOSTI et al., 2014; KRAMER et al., 2006; LINDBLAD et al., 2011), com um pequeno benefício do NAC na redução da mudança de limiar em uma população exposta ao ruído (KOPKE et al., 2015). Outros antioxidantes que podem potencialmente desempenhar um papel protetor contra trauma coclear induzido por ruído incluem ebselen, ginseng, metionina, coenzima Q10, bem como várias vitaminas, como A, C, E, B12 e ácido fólico (ABBASI; POURRAJAB; TOKHI, 2021; AJAY; GUNWARDENE; RICHARDSON, 2022). Destes antioxidantes, ebselen, vitamina B12, ácido fólico e NAC demonstraram um efeito protetor maior na PAIR (ABBASI; POURRAJAB; TOKHI, 2021; REN; HU; JIANG, 2022). Além disso, tratamento com neurotrofinas e células tronco na cóclea parecem promissores na regeneração das células ciliadas (AJAY; GUNWARDENE; RICHARDSON, 2022; SLY et al., 2016).

Devido à gravidade da perda auditiva e/ou ao baixo reconhecimento de fala devido à neuropatia, alguns indivíduos com PAIR podem eventualmente se tornar candidatos ao implante coclear com prevalência de aproximadamente 2% dos pacientes implantados tendo a PAIR relacionada como causa da sua perda auditiva (KOPELOVICH et al., 2014).

2.1.2 Proteínas de choque térmico

Frente a um estresse ou injúria celular, além dos fatores antioxidantes contra um dano oxidativo celular, há atuação de uma família de proteínas com ação citoprotetora, as proteínas do choque térmico (*Heat Shock Proteins – HSPs*).

HSPs são proteínas altamente conservadas tanto em organismos eucarióticos e procarióticos, e foi descoberta por Ferruccio Ritossa após choque térmico acidental em células de glândulas salivares de *Drosophila buskii* (JOHNSON; FLESHNER, 2005; RITOSSA, 1962).

Elas são classificadas em famílias conforme o seu peso molecular e divididas nas subclasses HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP30 E HSP10 (HENDERSON, 2010). Elas são consideradas como “proteínas de estresse” pois sua expressão é induzida por diversos agentes estressores ambientais, patológicos e fisiológicos, como exposição a metais pesados, radiação ultravioleta, infecções virais e bacterianas, inflamação, inibidores da ciclo-oxigenase, estresse oxidativo, fatores de crescimento, choque térmico, isquemia, exercício, estresse metabólico, ruído e drogas (LINDQUIST; CRAIG, 1988; MATHEW; MORIMOTO, 1998; YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999). A família de 70 kDa (HSP70) é a mais estudada, por ser uma das mais conservada e possuir alta expressão em células de mamíferos sob estresse. Esta família compreende um número de proteínas com peso molecular de 66 a 78 kDa (HENDERSON, 2010), sendo que, dentre elas, a HSP de 72 kDa (HSP72), é induzível durante estresse celular (KRAUSE et al., 2015a).

As HSP70 funcionam como chaperonas moleculares intracelulares que atuam no auxílio do transporte de proteínas, impedem a agregação de proteínas durante a dobragem e protegem as cadeias polipeptídicas sintetizadas contra dobragem errônea e desnaturação proteica (HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011). As iHSP70 possuem ação anti-inflamatória, com ação antiapoptótica, com inibição da expressão gênica e regulando o ciclo celular, promovendo a citoproteção, que é explicado pela inibição da ativação do fator nuclear kB (NF-kB), que tem grande influencia para imunidade, inflamação, sobrevivência celular e apoptose (BORGES et al., 2012; HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011; KRAUSE et al., 2015b).

A ação das HSPs não está somente restrita ao meio intracelular. Um grande número de estudos mais recentes demonstrou que elas são liberadas no espaço extracelular (eHSP70) tendo vários efeitos em outras células (HECK et al., 2017; HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011; KRAUSE; RODRIGUES-KRAUSE, 2011; SEIBERT et al., 2022; SOARES et al., 2020). Curiosamente, a HSP70 possui efeitos antagônicos dependendo de sua localização. Enquanto as iHSP70 tem potente efeito anti-inflamatório, as eHSP70 possuem prioritariamente um papel antagônico, induzindo a ativação de diversas vias pró-inflamatórias, principalmente pela indução pela ligação aos receptores de membrana do tipo Toll-Like (TLR). Porém, as eHSP70 também são capazes de atuar como anti-inflamatórias e imunossupressivas após a internalização e processamento de antígenos (BORGES et al., 2012; HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011). Desta forma, as HSP70 tem se mostrado como fundamentais reguladoras do estresse oxidativo, com participação da maquinaria antioxidante intracelular, sendo a iHSP70 muito importante para inibição da apoptose e inflamação (HECK et al., 2017; KRAUSE et al., 2015b).

2.1.3 HSP70 na orelha interna

O primeiro relato da presença de HSP70 na orelha interna foi realizada por *Neely et al.* (1991). Esta avaliação se baseou em estudo anterior que demonstrou que no sistema visual houve proteção da retina contra a luz excessiva mediada pelas HSPs após sua indução por choque térmico (BARBE et al., 1988). No sistema auditivo, foi sugerido a presença de mecanismo neuroquímico similar, visto que dano coclear causado por ruído interrompido com 18h de período de descanso entre as exposições, reduziu a morte das células ciliares quando comparada ao dano por exposição ao ruído contínuo (BOHNE; ZAHN; BOZZAY, 1985). Além disso, a descoberta que a estimulação acústica, antes de uma exposição mais intensa a ruído, reduziu o dano nas células sensoriais da cóclea, demonstrando a presença de mecanismos protetores na cóclea (CANLON; BORG; FLOCK, 1988). Assim, após hipotetizar a presença de HSPs na orelha interna, foi demonstrado pela primeira vez, por imunohistoquímica de cócleas de cobaias (*guinea pigs*), a presença de HSP70 em cócleas normais (NEELY; THOMPSON; GOWER, 1991).

Na avaliação de diferentes fatores estressores capazes de induzir a HSP70 na orelha interna, *Dechesne et al.* (1992) demonstraram que cobaias e ratos expostos ao choque térmico (elevação da temperatura corporal a 42,5°C por 5 minutos) obtiveram indução de HSP72 na cóclea, principalmente na estria vascular (DECHEsNE et al., 1992); e *Myers et al.* (1992) demonstraram elevação de HSP72 na cóclea após isquemia coclear transitória de 10 minutos, com pico máximo 6h após o evento isquêmico (MYERS et al., 1992).

Em avaliação de agente estressor coclear mais comum, *Lim et al.* (1993) utilizaram a exposição ao ruído, com expressão máxima de HSP72 após 6h do estímulo ruidoso, avaliada por imunodeteção (LIM et al., 1993).

Apesar de não se saber o papel exato da HSP70 na cóclea neste momento, se acreditava que ela tivesse ação importante na citoproteção frente a um agente estressor da orelha interna (LIM et al., 1993).

A primeira demonstração do papel citoprotetor coclear da HSP70 foi realizada por *Yoshida et al.* (1999), demonstrando que camundongos condicionados por choque térmico diminuíram o dano auditivo causado pelo ruído exposto 6 e 12h após a terapia térmica em todo o corpo, que foi relacionado com o aumento da expressão coclear de iHSP70 (YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999).

A importância do papel citoprotetor da HSP70 também foi avaliada com estudos envolvendo o fator 1 de choque térmico (HSF1), um dos fatores de transcrição responsáveis para regulação de HSP70 induzidas pelo estresse. Em condições normais, HSF1 permanece em estado monomérico inativo. Na resposta ao estresse, HSF1 monomérica sofre trimerização, resultando na sua ativação e na transcrição dos seus genes alvo (MATHEW; MORIMOTO, 1998). Mesmo na ausência de um agente estressor, HSF1 tem elevada expressão em células ciliares, estria vascular e gânglio espiral de cócleas de ratos e camundongos. *Fairfield et al.* (2002) demonstraram presença e ativação de HSF1 em resposta a choque térmico em cócleas de roedores (FAIRFIELD et al., 2002) com expressão que se correlaciona diretamente com relatos de HSP70 em outros estudos na orelha interna (DECHEsNE et al., 1992; LIM et al., 1993; YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999). Desta forma, HSF1 se mostra como importante regulador da resposta ao estresse em cócleas (FAIRFIELD et al., 2002).

Estudos em camundongos deficientes em HSF1 (XIAO et al., 1999), permitiram melhor avaliação das vias de estresse dependentes de HSF1 na orelha interna, para clarificar a função da HSF1 nas células ciliares contra fatores estressores. Utilizando este modelo animal, *Sugahara et al. (2003)* demonstraram que camundongos deficientes em HSF1, após exposição a ruído intenso (130 dB por 3h), tiveram perda de 60% das células ciliadas externas enquanto camundongos nativos (HSF1 +/+) tiveram perda de somente 20% destas células, demonstrando, assim, a importância da HSP70 na citoproteção coclear após ruído intenso (SUGAHARA et al., 2003).

Utilizando o mesmo modelo animal com camundongos HSF1 -/-, *Fairfield et al. (2005)* demonstraram que a exposição a ruído de 98 dB NPS por 2 horas resultou em perda auditiva permanente de 20 dB após 2 semanas da exposição nos animais HSF1 -/-, enquanto os animais HSF1 +/+ não tiveram perda auditiva no mesmo período. Este fato demonstra a importância das vias de estresse relacionadas com HSF1 e HSP70 na orelha interna frente a exposição ao ruído (FAIRFIELD et al., 2005). Mais tarde, foi demonstrado a indução, após estresse pelo ruído, de HSP25, HSP47, HSP72, HSP73, HSP84, HSP86 E HSP110 nas cócleas de camundongos HSF1 +/+, ao contrário do que ocorria nos animais HSF1 -/-, que demonstra o papel essencial de HSF1 na resposta das vias de choque térmico (GONG et al., 2012).

Diferentemente dos estudos com animais, estudos em humanos à procura de fatores genéticos que predisponham a perda auditiva têm encontrado dificuldades. Variações genéticas envolvendo 3 genes responsáveis pela síntese de HSP70 (*HSP70-1*, *HSP70-2* e *HSP70-hom*) foram relacionadas com a suscetibilidade a PAIR, comparando populações chinesa, sueca e polonesa, com e sem perda auditiva relacionada com o ruído, que trabalhavam em ambiente ruidoso (KONINGS et al., 2009; SLIWINSKA-KOWALSKA; PAWELCZYK, 2013; YANG et al., 2006). Uma metanálise mais recente, reuniu estudos populacionais (CHANG et al., 2011; KONINGS et al., 2009; LI et al., 2017; YANG et al., 2006) demonstrando as associações de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes de HSP70 com a suscetibilidade a perda auditiva induzida pelo ruído (ZONG et al., 2017).

2.1.4 Potenciais agentes indutores de HSP70

O entendimento molecular do papel das HSP70 na orelha interna é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias, principalmente de substâncias que aumentem a expressão de HSP70 dentro da cóclea. Drogas orais têm expectativa para se tornarem viáveis nos próximos anos, pois até hoje não existe droga liberada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento e/ou prevenção da ototoxicidade e da perda auditiva pelo ruído (BAO et al., 2013; FOSTER; JACQUES; PIU, 2022; MUKHERJEA et al., 2014). A indução farmacológica de HSP70 se demonstra uma abordagem viável para proteção das células sob estresse. Um consórcio de 26 laboratórios cooperados com a FDA aprovou drogas e compostos bioativos a fim de identificar compostos que ativem a resposta do choque térmico (FRANCIS et al., 2011).

As evidências científicas do papel da iHSP70 na citoproteção coclear trazem possibilidades terapêuticas para as perdas auditivas, principalmente na sua indução a nível da orelha interna. A ativação da resposta de choque térmico pela indução de HSP70 é realizada por várias substâncias, como o etanol, arsênico e cádmio, em diversos tecidos, porém nem todo indutor pode ter efeito benéfico para orelha interna, pois esta indução pode ser uma resposta ao estresse causado pelo agente nas células sensoriais da cóclea, tornando clinicamente improvável o uso para tratamento de perda auditiva (LINDQUIST; CRAIG, 1988). A substância ideal elevaria os níveis de iHSP70 na cóclea sem lesar este órgão.

Uma substância com estas características, a geranilgeranilacetona (GGA) é uma droga oral anti-úlceras péptica que possui efeito protetor devido a aumento de HSPs na mucosa gástrica e intestinal, medula espinal, fígado, coração, encéfalo e retina. *Mikuriya et al.* (2005) demonstraram, em cócleas, que dose única oral de GGA (600mg/kg) levou a um aumento da expressão de iHSP70 24 a 48h após a sua administração, e que o tratamento prévio diário por 7 dias antes de exposição ao ruído de 130 dB NPS por 3h foi capaz de reduzir a perda auditiva em cobaias quando comparada a controles (MIKURIYA et al., 2005). Além disso, outro estudo demonstrou que um dano na estria vascular da cóclea produzido pela inoculação de lipopolissacarídeo foi protegido pelo pré-tratamento com GGA (SONE et al., 2005).

Estudos do efeito da GGA em ototoxicidade também demonstraram maior sobrevivência das células ciliadas externas quando expostas a gentamicina (SANO et al., 2007) e benéfica contra lesão mitocondrial coclear causado pelo ácido 3-nitropropiónico em cobaias, demonstrando melhora significativa do limiar auditivo (KIM et al., 2010).

Em avaliação da perda auditiva relacionada com a idade, *Mikuriya et al.* (2008) demonstrou que a expressão de iHSP70, em cócleas de camundongos suscetíveis à perda auditiva pela idade (DBA/2J), se mostrou reduzida com a idade quando comparados aos controles. Além disso, a suplementação alimentar com 0,5% de GGA foi capaz de aumentar a expressão coclear de iHSP70 e diminuir a perda auditiva relacionada com a idade (MIKURIYA et al., 2008).

Anualmente, milhares de pacientes têm perda auditiva em decorrência a efeitos colaterais de ototóxicos, havendo uma necessidade de terapêutica para otoproteção que não influencie no potencial terapêutico primário para a doença de base, sendo a indução de iHSP70 é uma alternativa para inibição da morte das células ciliares e perda auditiva pelos aminoglicosídeos e cisplatina (RAMKUMAR et al., 2021). A hipertermia em cultura de utrículo de camundongo demonstrou efeito protetor significativo contra a morte das células ciliares por aminoglicosídeo e cisplatina (CUNNINGHAM; BRANDON, 2006). Estudo utilizando camundongos geneticamente modificados com expressão aumentada de HSP70, demonstrou proteção contra ototoxicidade por aminoglicosídeo (TALEB et al., 2009). *Roy et al.* (2013) desenvolveram um protocolo de exposição ao ruído sem causar dano permanente na audição, chamado de condicionamento sonoro. A exposição prévia levou a um aumento da expressão de iHSP70 e protegeu o dano posterior pela ototoxicidade (ROY et al., 2013). Mais recentemente, *Zhu et al.* (2020) demonstraram, em ratos, que o condicionamento sonoro, em frequência pura de 1 KHz com intensidade de 85 dB NPS durante 24 horas, previamente ao ruído danoso de 115 dB NPS por 6 horas em 2 dias consecutivos, foi capaz de proteger o dano auditivo, tanto em células ciliadas como em neurônios do gânglio espiral da cóclea, pela indução de HSP70 e de superóxido dismutase (ZHU et al., 2020). Assim, a terapia sonora é uma promessa de prevenção da perda auditiva para os pacientes que utilizam ototóxicos ou são expostos a ruído, porém ainda faltam ensaios clínicos.

Visando a indução de iHSP70, há consistentes achados que demonstram a habilidade do eHSP70 ser internalizado pelas células (BORGES et al., 2012). As ações do eHSP70 tem sido demonstradas serem mediadas pela via do NF- κ B levando a aumento dos níveis de iHSP70 (ASEA et al., 2002; HECK et al., 2017). Receptores *scavenger* e *lecitina-like* foram vistos como receptores de endocitose internalizando o eHSP70, porém o que segue após a ligação com estes receptores, ainda não está bem caracterizado (BORGES et al., 2012).

Um estudo demonstrou que a administração de HSP70 exógena (exHSP70) purificada humana, por via intranasal, teve efeitos benéficos na neurodegeneração da doença de Alzheimer, em camundongos (BOBKOVA et al., 2014). Foi demonstrado que esta administração intranasal do exHSP70 é rapidamente capaz de adentrar em várias estruturas cerebrais, sendo que em 3 horas foi encontrada grandes quantidades em bulbos olfatórios, neocortex, hipocampo, núcleos da rafe dorsalis, locus cerúleos e cerebelo (BOBKOVA et al., 2014; YURINSKAYA et al., 2015). Além disso, quando administrada via intracerebroventricular teve grande atividade neuroprotetora, diminuindo crises epiléticas em modelo animal de ratos (EKIMOVA et al., 2010).

Uma substância promissora é a L-glutamina. Ela é o aminoácido livre mais abundante no corpo sendo produzida pelos músculos esqueléticos e lançado no sangue (NEWSHOLME et al., 2003), e está associada com potencialização da expressão de iHSP70, tanto *in vitro* (HAMIEL et al., 2009) e *in vivo* (SINGLETON; WISCHMEYER, 2007), sendo capaz de facilitar a transcrição e síntese desta proteína, através da HSF1, em um processo que depende, pelo menos parcialmente, da ativação da via da glucosamina, apesar de muitas vias serem desconhecidas (HAMIEL et al., 2009).

Outra substância promissora, a L-glutamina é o aminoácido livre mais abundante no corpo sendo primariamente produzido pelos músculos esqueléticos e lançado no sangue (NEWSHOLME et al., 2003), e também associada com potencialização da expressão de iHSP70, tanto *in vitro* (HAMIEL et al., 2009) e *in vivo* (SINGLETON; WISCHMEYER, 2007). Através do HSF1, L-glutamina é capaz de facilitar a transcrição e síntese de iHSP70 em um processo que depende, pelo menos parcialmente, da ativação da via da glucosamina (HAMIEL et al., 2009). Contudo, as

vias pelas quais a L-glutamina aumenta a expressão de HSP70 são na maioria desconhecidas.

Cerca de metade da L-glutamina é necessária para a nova síntese do glutathione (GSH), o mais importante antioxidante intracelular solúvel não-enzimático que tem muitas funções metabólicas e de proteção no metabolismo celular incluindo atenuação do estresse oxidativo (ROTH, 2008). Uma redução da L-glutamina, observada em situações de estresse intenso, podem reduzir a concentração de GSH, deixando o corpo mais vulnerável ao estresse oxidativo e morte celular (KIM; WISCHMEYER, 2013).

O uso oral tanto da alanilglutamina, um dipeptídeo da L-glutamina (ROGERO et al., 2006), ou soluções contendo L-glutamina e L-alanina, ambos em suas formas livres, vem sendo uma alternativa efetiva não invasiva para aumentar os níveis de L-glutamina no corpo, com objetivo de melhorar o aporte de L-glutamina sobre estresse fisiológico (CRUZAT et al., 2014). A sua suplementação influenciou no estoque intracelular de GSH e aumento do iHSP70 em tecido muscular de ratos, diminuindo a vulnerabilidade tecidual ao estresse oxidativo (PETRY et al., 2014). Além disso, a indução de HSP70 pela L-glutamina protege contra o dano em diferentes órgãos, como músculo, rim, intestino, pâncreas, fígado e pulmão (BROVEDAN et al., 2018; CRUZAT et al., 2018, 2015; PETRY et al., 2019; ROPELESKI et al., 2005). Recentemente, *Luo et al* (2019) demonstrou que a alanilglutamina protege contra um dano isquêmico cerebral, mediada pela indução de HSP70, associada a redução de estresse oxidativo e apoptose neuronal, além de aumento nos níveis de superóxido dismutase, glutathione e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (LUO et al., 2019).

Em cócleas, há muito tempo foi demonstrada a captação de glutamina (RYAN; SCHWARTZ, 1984). Além disso, foi descoberta a presença de transportador de glutamina SAT1 nas células ciliares internas, além da presença de glutaminase, mostrando a via de captação de glutamina nas células ciliares para formação do glutamato (OGUCHI et al., 2012).

Em estudo mais recente, foi demonstrado que o ruído intenso foi capaz de gerar uma resposta de choque térmico sistêmica, com liberação de HSP70 à nível plasmático, sugerindo que a HSP70 poderia ser usada como biomarcador sistêmico

do estresse coclear gerado pelo ruído. O mesmo estudo mostrou que o dipeptídeo alanilglutamina diminuiu o estresse oxidativo, pela diminuição da resposta de choque térmico, em nível coclear e sistêmico, em ratos expostos ao ruído (SOARES et al., 2020).

2.2 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS

As últimas duas décadas observaram um aumento notável na pesquisa auditiva e uma grande melhoria em nossa compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que contribuem para diferentes formas de perda auditiva. Estas crescentes evidências geraram inúmeras ideias para terapias que estão sendo avaliadas em novos e aprimorados modelos de perda auditiva pré-clínica, com várias terapias já progredindo em ensaios clínicos em humanos (FOSTER; JACQUES; PIU, 2022)

A fim de desenvolver novas terapias para prevenção da PAIR, uma prioridade alta é dada para pesquisa objetivando a melhora do conhecimento científico das causas moleculares que levam a estas doenças. Em março de 2015, a *InterAcademy Medical Panel* (IAMP) realizou uma chamada para ação de fortalecimento para o cuidados de saúde voltado para a perda auditiva, citando a importância da realização de pesquisas e programas de inovação nesta patologia visto que o prejuízo e o ônus causado pelas perdas auditivas é muito grande (LE PRELL, 2022; LOOI et al., 2015). Além disso, primeiro estudo de alanilglutamina, que demonstra fatores anti-inflamatórios em cócleas de ratos, foi realizado em nosso grupo de pesquisa (SOARES et al., 2020).

Esta tese de Doutorado segue de forma natural a construção de uma linha de pesquisa iniciada em meu Mestrado, com experimentos realizados no mesmo grupo de pesquisa, liderado pelo Prof. Dr. Thiago Gomes Heck, onde se avaliou a resposta de choque térmico na orelha interna e o papel da alanilglutamina na cóclea. O Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI) possui uma grande linha de estudos de resposta de choque térmico em diversas situações e patologias. As pesquisas realizadas neste

Doutorado servem para responder várias perguntas não contempladas no projeto do Mestrado.

Apesar da alanilglutamina demonstrar efeitos anti-inflamatórios sistêmicos e cocleares após o ruído intenso, via resposta de choque térmico (SOARES et al., 2020), não se evidenciou a capacidade de indução de HSP70 nas estruturas cocleares. Frente a isso, a proposição desta Tese de Doutorado foi responder as perguntas: se a alanilglutamina pode induzir HSP70 na cóclea, analisando e quantificando onde ocorreria esta indução, e se alanilglutamina, por já demonstrar efeitos anti-inflamatórios cocleares, poderia ter efeitos de proteção auditiva quando administrada previamente ao ruído, pois até hoje não existe droga liberada pela FDA para o tratamento e/ou prevenção da ototoxicidade e da perda auditiva pelo ruído (BAO et al., 2013; FOSTER; JACQUES; PIU, 2022; MUKHERJEA et al., 2014).

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Local de realização

Os estudos experimentais para realização dos artigos 1 e 2 foram realizados no Laboratório de Histologia - Departamento de Morfologia - CCS – UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; e no Laboratório de Ensaios Biológicos – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, Ijuí, RS, Brasil.

2.3.2 Animais e cálculo amostral

Em todos os experimentos foram utilizados 21 ratos Wistar fêmeos (90 dias de vida). Foram alocados no máximo 4 animais por caixa, com temperatura de 22-23°C, sob 12h de ciclo claro/escuro com ração (NUVILAB CR-1, Nuvital Nutrients S.A., Curitiba, Brasil) e água à vontade. Foram utilizados 6 ratos para o estudo do artigo 1 e 15 ratos para o estudo do artigo 2. Foram excluídos do experimento animais com otite média evidenciada através de otoscopia.

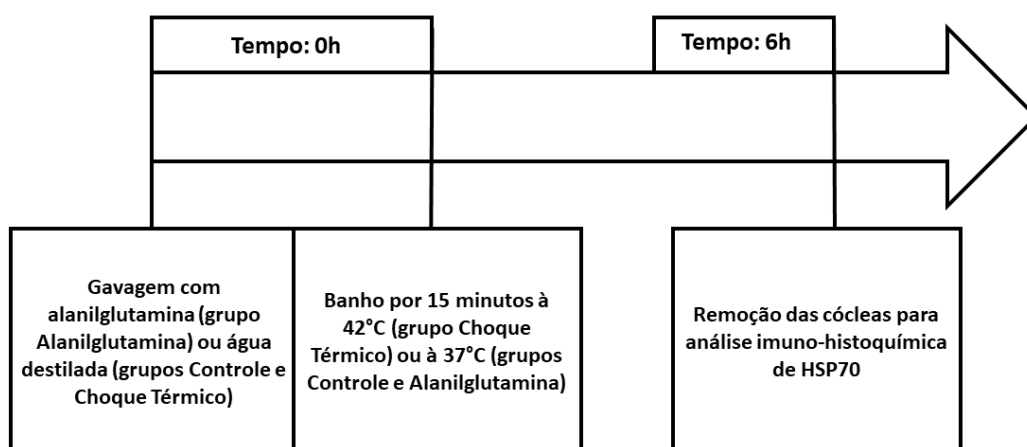
O cálculo amostral do artigo 2 foi baseado em um estudo com exposição ao ruído (FUJIOKA et al., 2006), que usou o mesmo modelo de indução de perda auditiva

em ratos, a fim de que a diferença de limiar auditivo entre os grupos controles e intervenção tenha nível de significância de 0,05.

2.3.3 Delineamento dos estudos

O artigo 1, do tipo pesquisa original, intitulado na língua portuguesa de “Alanilglutamina e Choque Térmico como indutores de Proteínas de Choque Térmico de 70 KDa (HSP70) em cócleas de ratos: Potenciais agentes terapêuticos na perda auditiva?” surgiu para responder se a alanilglutamina poderia induzir HSP70 na cóclea, visto que o aminoácido glutamina foi capaz de induzir HSP70 em vários tecidos com papel citoprotetor, e demonstrou efeitos anti-inflamatórios cocleares. Porém ainda não se tinha evidenciado sua indução nas estruturas cocleares. Será submetido na revista “International Archives of Otorhinolaryngology”. Este estudo experimental utilizou 6 ratas Wistar divididas igualmente em 3 grupos: Controle, Choque Térmico, e Alanilglutamina. No início do experimento as ratas receberam gavagem com água destilada ou alanilglutamina, sendo seguidamente alocadas em banho com água à temperatura de 37°C ou 42°C, dependendo de cada grupo. Após 6 horas foi realizado o sacrifício dos animais e coleta das cócleas para análise imuno-histoquímica (Figura 1).

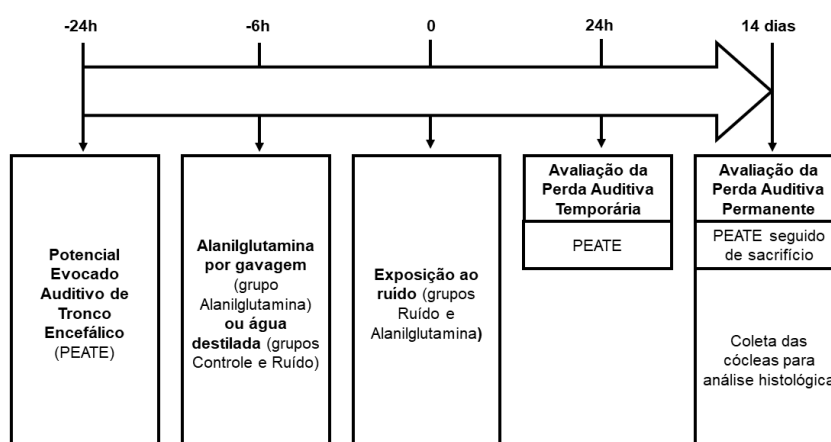
Figura 1 - Desenho experimental do artigo 1.



Fonte: Próprio autor

O artigo 2, do tipo pesquisa original, intitulado em Língua Portuguesa de “Efeitos da alanilglutamina na Perda Auditiva Induzida pelo Ruído em Ratos: Análise pelo Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) e pela histologia coclear” surge para avaliar se a alanilglutamina possui papel de proteção auditiva avaliada pelas técnicas eletrofisiológicas e histológicas, visto que possui papel indutor de HSP70 em tecidos e anti-inflamatórios em cócleas. Além disso, nosso grupo já havia analisado os resultados do experimento do artigo 1 (ainda não publicado em revista científica). O artigo 2 será submetido na revista “Plos One”. Neste estudo experimental foram utilizadas 15 ratas Wistar divididas igualmente em 3 grupos: grupo Controle, grupo Ruído e o grupo Alanilglutamina. Um dia antes da exposição ao ruído, foi realizada a avaliação auditiva de todos os animais pelo PEATE, para evidenciar os limiares e parâmetros eletrofisiológicos basais antes de qualquer intervenção. Seis horas antes da exposição ao ruído todos os animais receberam gavagem em administração única, com água destilada ou alanilglutamina, dependendo de cada grupo. Após 6 horas da gavagem, os animais dos grupos Ruído e Alanilglutamina foram expostos a ruído capaz de causar dano permanente a audição. Um dia após o ruído, foi realizada avaliação auditiva pelo PEATE para avaliar a perda auditiva temporária, e após 14 dias, PEATE foi novamente realizado para avaliação da perda auditiva permanente. Logo após, os animais foram sacrificados para análise histológica da orelha interna (Figura 2).

Figura 2 - Desenho experimental do artigo 2.



Fonte: Próprio autor

2.3.4 Procedimentos

2.3.4.1 Gavagem e administração de alanilglutamina

A administração de alanilglutamina foi utilizada em ambos experimentos dos artigos 1 e 2. Foi realizada por gavagem (1ml/100g peso corpóreo) em administração única, na dose de 1,5 g/Kg no grupo Alanilglutamina em ambos os estudos. Foi utilizado alanilglutamina na concentração de 0,2g/mL diluído em água (Dipeptiven®, Fresenius Kabi®). Os grupos Controle (artigos 1 e 2), Choque Térmico (artigo 1) e Ruído (artigo 2) receberam gavagem com água destilada.

2.3.4.2 Choque Térmico em todo o corpo

Procedimento realizado no artigo 1, onde os animais do grupo Choque Térmico foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Após os níveis anestésicos serem atingidos, foi colocado com termômetro retal para mensuração da temperatura corporal durante o procedimento de choque térmico. Os animais foram alocados em caixa de alumínio com água (banho) à 42°C e monitorados até atingirem a temperatura corporal de 42°C, e mantidos por 15 minutos (figura 3). Após, foram retirados do banho e acompanhados com plataforma a 37 graus para não sofrerem hipotermia. Os animais dos grupos Controle e Alanilglutamina também foram anestesiados, porém foram mantidos em banho à 37°C por 15 minutos e também acompanhados para não sofrerem hipotermia, devido a perda da capacidade de controle corporal devido ao ato anestésico, até sua recuperação anestésica (LISSARASSA et al., 2020).

Figura 3 – Rato em processo de choque térmico em todo o corpo.



Fonte: Foto do próprio autor

2.3.4.3 Avaliação auditiva nos ratos

Utilizada no experimento do artigo 2, a avaliação auditiva nos animais foi realizada pelo teste eletrofisiológico PEATE, conhecido na língua inglesa como *Auditory Brainstem Response* (ABR), através do equipamento *Intelligent Hearing System® SmartEP®*. Para realização do teste, os animais foram 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, foram inseridos na região posterior da orelha (eletrodo ativo), no vertex (eletrodo referência) e orelha contralateral (eletrodo terra). Foram utilizados estímulos sonoros do tipo cliques (*rise/fall time*, 2 ms; duração total, 2 ms; taxa de repetição, 21/s). As respostas foram filtradas (100-3000Hz), e reproduzida pela média de 1000 amostras (Figura 4).

Figura 4 – Posicionamento de eletrodos subcutâneos e sondas em orelhas dos ratos.



Fonte: Foto do próprio autor

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 foram os 2 marcadores auditivos avaliados em nosso estudo. Também foi realizada análise de latências das ondas, em milissegundos (ms), e amplitudes das ondas, em microvolts (μV). Para medida da amplitude de P1 foi considerado a diferença do pico de onda P1 com o vale subsequente (BRAMHALL, 2021).

2.3.4.4 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 (FUJIOKA et al., 2006). Durante a exposição, os animais foram alocados em uma caixa dentro de uma sala anecóica. 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®) situado dentro da caixa no início e após completar a exposição ao ruído.

2.3.4.5 Análise histológica coclear

A análise histológica das cócleas tem a finalidade de avaliar a vitalidade celular em diferentes regiões da cóclea e realizar quantificação celular.

Na fase de sacrifício dos animais, foi realizada a decapitação do animal, sendo as cócleas rapidamente dissecadas, janelas oval e redonda abertas e fixação através a infusão lenta de paraformaldeído à 4%, pH 7,0 e mantidas na mesma solução por 6h. Após a fixação, as cócleas foram lavadas em solução PBS e descalcificadas em EDTA 10% por 30 dias à temperatura ambiente.

Após, as cócleas foram submetidas à desidratação por passagem em soluções de etanol (etanol 30% por 1h, 40% 1h, 50% 1h, 60% 1h, 70% overnight, 80% 1h, 90% 1h, 96% 1h e 100% 1h). Após, no processo de clarificação, passarão em Xilol 100% por 2 vezes, 1h cada passagem. Após, será realizada a infiltração em parafina líquida à 60°C (2x 40 min), com posterior inclusão em bloco de parafina.

A microtomia foi realizada em cortes de 8 µm, paralelo ao eixo modiolar, com contagem do início dos cortes na face voltada para orelha média e final dos cortes na face voltada para encéfalo. Após, foi realizada a coloração com o método da hematoxilina-eosina.

A viabilidade das células ciliadas foram evidenciadas pela presença de núcleo intacto e esférico, localizado na metade basal da célula (NEAL et al., 2015).

Para a contagem dos corpos celulares dos neurônios do gânglio espiral e das células de Schwann no nervo auditivo, na região do modíolo, foi utilizado a contagem de células por área de cada área do gânglio espiral, utilizando o programa *ImageJ*®, com a função de contagem de células multi-ponto por área. Dessa forma, foi avaliada a densidade de células no gânglio espiral (HABYBABADY et al., 2018).

2.3.4.6 Análise de HSP70 coclear por imuno-histoquímica

Procedimento utilizado no experimento do artigo 1, realizado 6 horas após o banho com água em todo corpo para avaliação da expressão de HSP70 coclear.

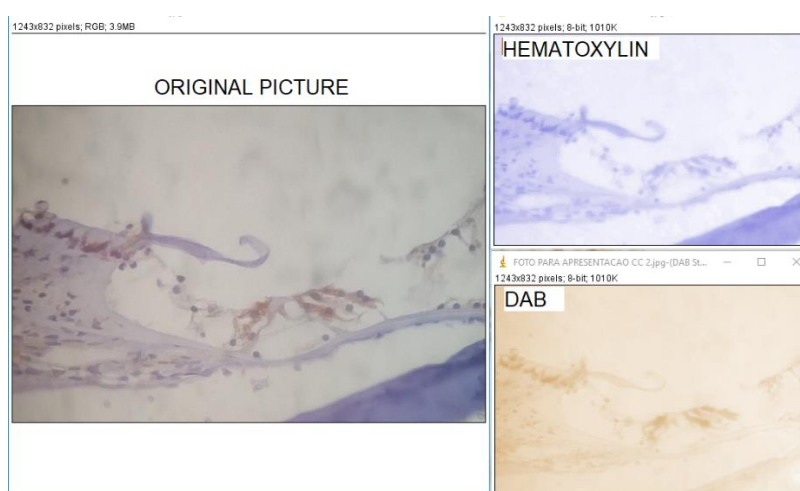
Logo após sacrifício do animal, as cócleas foram rapidamente dissecadas, janelas oval e redonda abertas e fixação através a infusão de paraformaldeído à 4%, pH 7,0 e mantidas na mesma solução por 6h. Após a fixação, as cócleas serão foram lavadas em solução PBS e descalcificadas em EDTA 10% por cerca 30 dias à temperatura ambiente. Após, as cócleas foram submetidas à desidratação por passagem em soluções de etanol (etanol 30% por 1h, 40% 1h, 50% 1h, 60% 1h, 70% overnight, 80% 1h, 90% 1h, 96% 1h e 100% 1h). Após, no processo de clarificação, passaram em Xilol 100% por 2 vezes, 1h cada passagem. Após, foi realizada a infiltração em parafina líquida à 60°C (2x 40 min), com posterior inclusão em bloco de parafina. A microtomia foi realizada em cortes de 8 µm. Na sequência, os cortes foram deparafinados com Xilol e hidratados com etanol 100% 3min, 90% 3 min, 70% 3 min e lavadas em água destilada (LOPEZ et al., 2016).

Na sequência, as lâminas foram submetidas ao processo de recuperação antigênica em citrato de sódio, em pH 6,0, aquecidos em micro-ondas até 98 °C, e mantidas a esta temperatura por 25 minutos. Após, mais 20 minutos de resfriamento em temperatura ambiente, foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas com a utilização de Peróxido de Hidrogênio à 3% por 5 minutos. Após, o tecido foi incubado em leite desnatado à 3% em PBS por 1 hora para o bloqueio de ligações inespecíficas. Após, as lâminas foram tratadas com anticorpo primário anti-HSP72/73 (H5147 Sigma, mouse anti-HSP70) na concentração 1:200, overnight à 4°C, em câmara escura úmida. Após, as lâminas foram lavadas com PBS 2x 5 min. Após, foi colocado anticorpo secundário marcado com peroxidase (anti-mouse A9044 Sigma) 1:100 por

2h na temperatura ambiente em câmara escura úmida e novamente lavadas em PBS 2x 5min. Em seguida, foi realizada a revelação com solução com DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro) 0,1% por 10 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina e montadas para visualização em microscópio óptico (LOPEZ et al., 2016; ZUO et al., 2008).

As imagens da cóclea foram capturadas em formato digital analisadas no programa de acesso livre NIH-ImageJ® (NIH Bethesda, MD, USA). As fotografias foram capturadas com tempo de exposição padronizado para avaliar e quantificar a intensidade de cor. A coloração marrom do DAB foi separada cor azul da hematoxilina pela técnica de deconvolução de cor pelo plugin IHC PROFILER (VARGHESE et al., 2014) e a intensidade de cor de cada pixel avaliou quantitativamente a intensidade de HSP70 nas cócleas (MAHALE et al., 2017) (Figura 5). Na análise de imagem digital, os valores de intensidade de pixel para qualquer cor variam de 0 a 255, em que 0 representa o tom mais escuro da cor e 255 representa o tom mais claro da cor como padrão (VARGHESE et al., 2014). Para conversão de pixel para a concentração de HSP70 em unidades aleatórias (U.A.), foi utilizada a fórmula $[I]_{HSP70} = 255 - \text{média de pixel}$, para criar um valor diretamente proporcional de concentração desta proteína. Também foi calculada a Razão de Concentração de HSP70 dos grupos em relação à média da concentração do grupo Controle.

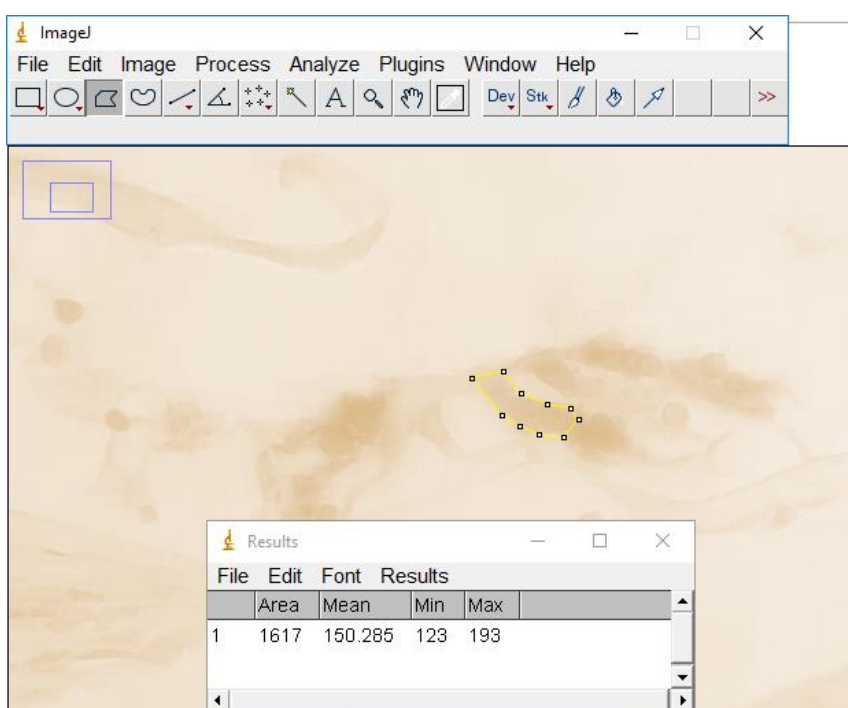
Figura 5 - Exemplo do uso da técnica de deconvolução de cor na célula ciliada pelo plug-in IHC Profiler no software ImageJ® para separar a coloração da hematoxilina e do DAB, para análise de HSP70 na cóclea.



Fonte: Próprio autor

Foram avaliadas as concentrações de HSP70 nas células ciliadas, corpos celulares dos neurônios do Gânglio Espiral e na estria vascular, através da seleção das áreas destas regiões e medida da intensidade de pixel no software ImageJ, conforme exemplo da figura 6.

Figura 6 - Exemplo de análise da intensidade de cor, em média de pixel, do DAB em uma célula ciliada.



Fonte: Próprio autor

2.3.5 Análise estatística

Para o tratamento estatístico, foi realizado teste de normalidade e os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e realizado teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett, sendo considerado nível de significância de 5%.

Foi utilizado o software GraphPad Prism 9.4.0 para análise dos dados e construção dos gráficos dos resultados contidos nos artigos.

2.3.6 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê 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.

2.4 ARTIGO 1 - “ALANILGLUTAMINA E CHOQUE TÉRMICO COMO INDUTORES DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO DE 70 KDA EM CÓCLEAS DE RATOS: POTENCIAIS AGENTES TERAPÊUTICOS NA PERDA AUDITIVA?”

Alanylglutamine and heat shock as inducers of 70 kDa heat shock proteins in rat cochlea: potential therapeutic agents in hearing loss?

Marcos Soares^{1,2}, Samara Friske², Gabriela Gomes Mânica², Leticia Compagnon², Matias Nunes Frizzo^{2,3}, Mirna Stela Ludwig^{2,3}, Thiago Gomes Heck^{2,3,4}, Aron Ferreira da Silveira¹

¹ Postgraduate Program in Human Communication Disorders at the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

² Research Group in Physiology, Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State (UNIJUI), Ijuí, RS, Brazil.

³ Postgraduate Program in Integral Attention to Health (PPGAIS-UNIJUI/UNICRUZ), Ijuí, RS, Brazil.

⁴ Post Graduate Program in Mathematical and Computational Modeling (PPGMMC-UNIJUI), Ijuí, RS, Brazil

Abstract

Introduction: Hearing loss is the most prevalent sensory disorder with global growth and impact on people's lives. In situations of cochlear stress, such as noise exposure and ototoxicity, there is an increase in the expression of 70 kDa heat shock proteins (HSP70) in several cells of the inner ear with the aim of cytoprotection and reduction of cochlear oxidative stress, in order to prevent hearing damage. Alanylglutamine induces HSP70 in various tissues and has demonstrated anti-inflammatory mechanisms in the cochlea after noise exposure.

Objective: To assess whether alanylglutamine induces HSP70 in different cochlear regions compared to whole-body heat shock.

Methods: Experimental study with 6 Wistar rats, equally divided into 3 groups: Control, Heat Shock, and Alanylglutamine. Initially, the animals were submitted to gavage with distilled water (Control and Heat Shock groups) or alanylglutamine at 1.5 g/kg (Alanylglutamine group) in a single administration. Afterwards, the animals were anesthetized and submerged in a water bath at 37 °C (Control and Alanylglutamine groups) or at 42 °C (Heat Shock group) for 15 minutes. After 6 hours, the animals were sacrificed, and their cochleae were collected for immunohistochemical analysis of HSP70.

Results: Alanylglutamine and heat shock showed increased expression of HSP70 in hair cells of the cochlea, spiral ganglion, and stria vascularis compared to the Control group.

Conclusion: Alanylglutamine and heat shock may be potential therapeutic agents in otoprotection, via induction of HSP70, creating a field for future studies in hearing preservation.

Keywords: hearing loss; heat shock proteins; HSP70; alanylglutamine; heat shock response; immunohistochemistry

Introduction

Hearing loss is the most prevalent sensory disorder and a growing problem globally (LOOI et al., 2015). More than 5% of the world's population has disabling hearing loss, including 432 million adults and 34 million children (WHO, 2021). Several causes of hearing loss, such as noise, ototoxic substances, and aging, generate sensorineural damage that, when established, usually causes permanent damage to hearing, as the hair cells of the cochlea and auditory neural pathways, such as the spiral ganglion, have no regeneration potential in adult mammals (MAO; CHEN, 2021).

Faced with different situations of cellular stress on the inner ear, such as exposure to noise and ototoxicity, there is an increase in the expression of 70 kDa heat shock proteins (HSP70) in several cells of the inner ear, with the aim of cytoprotection. Studies show that in mice preconditioned by heat shock, cochlear HSP70 expression increases, and these animals are protected against subsequent noise damage if exposure occurs when the concentration of HSP70 in the cochlea is high (YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999). Furthermore, suppression of the expression of heat shock factor 1 (HSF1), which regulates the expression of HSP72 (the inducible form of HSP70), studied in HSF1 knockout mice, causes a definitive hearing loss after excessive noise exposure, demonstrating the importance of HSP70 expression in cochlear cytoprotection against oxidative stress (FAIRFIELD et al., 2005). Additionally, the increase in intracellular expression of HSP70 represents cytoprotection by anti-inflammatory mechanisms (HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011).

Due to the cytoprotective power, much research has been carried out aiming at otoprotection mediated by the expression of HSP70 in the inner ear, as observed in utricle hair cells of mice exposed to aminoglycosides (BAKER et al., 2014; CUNNINGHAM; BRANDON, 2006), mouse cochlea exposed to whole-body heat shock (GONG et al., 2012), noise-exposed rat cochlea (LIM et al., 1993), genetically modified mice overexpressing HSP70 (TALEB et al., 2009), and guinea pigs treated with tetramethylpyrazine (CUI; LIU; QIN, 2015).

Promising substances, L-glutamine and its dipeptide alanylglutamine, are associated with potentiation of HSP70 expression *in vitro* (CRUZAT et al., 2015; HAMIEL et al., 2009) and *in vivo* (CRUZAT et al., 2014; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007). Glutamine availability maintains cellular homeostasis and promotes cell survival

against environmental and physiological stress challenges through protection mediated by intracellular HSPs (iHSP) levels (CRUZAT et al., 2018). Furthermore, L-glutamine supplementation influences intracellular glutathione storage and HSP70 increase in rat muscle tissue, decreasing tissue vulnerability to oxidative stress (PETRY et al., 2014, 2019a).

In the cochlea, glutamine uptake has long been demonstrated (RYAN; SCHWARTZ, 1984) through the presence of the glutamine transporter, system A transporter 1 (SAT1), in inner hair cells (OGUCHI et al., 2012). In addition, a recent study demonstrated that oral alanylglutamine was able to decrease inflammatory measures of heat shock response (via HSP70) at the cochlear and systemic level in rats, using pooled cochleae (SOARES et al., 2020).

The molecular understanding of the role of HSP70 in the inner ear is essential for the development of new therapies, especially substances that increase the expression of HSP70 within the cochlea. Oral drugs are expected to become viable in the coming years, as to date there is no drug released by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment and/or prevention of ototoxicity and noise hearing loss (BAO et al., 2013; FOSTER; JACQUES; PIU, 2022; MUKHERJEA et al., 2014).

The aim of this study is to evaluate the role of alanylglutamine in inducing HSP70 in different cochlear regions compared to whole-body heat shock.

Methods

This experimental study used 6 Wistar rats divided equally into 3 groups: Control, Heat Shock, and Alanylglutamine. At the beginning of the experiment, the rats received gavage with distilled water or alanylglutamine, then placed in a water bath at 37 °C or 42 °C, depending on each group. After 6 hours, the animals were sacrificed, and the cochleae were collected for immunohistochemical analysis (Figure 1).

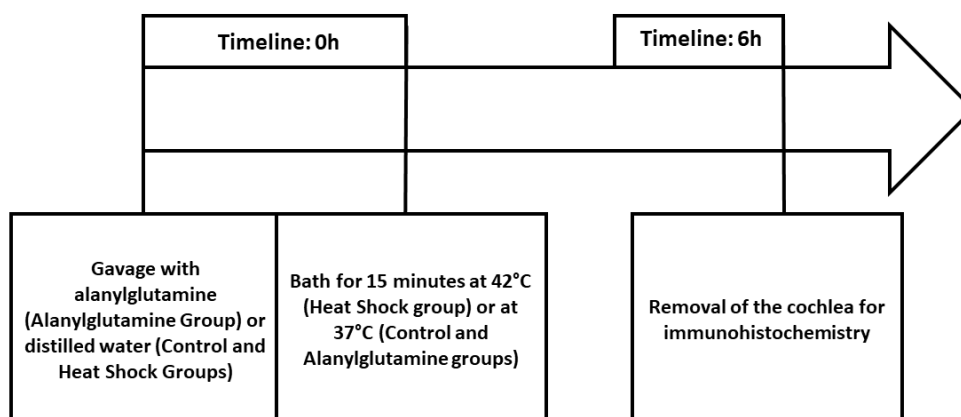


Figure 1. Study design.

Alanylglutamine administration

Initially, all animals received gavage (1 ml/100 g body weight) in a single administration; the Control and Heat Shock groups received gavage with distilled water and the Alanylglutamine group received alanylglutamine at a dose of 1.5 g/kg. Alanylglutamine was used at a concentration of 0.2 g/mL diluted in water (Dipeptiven®, Fresenius Kabi®).

Whole-body heat shock

Immediately after gavage, the animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) for immersion in a water bath, with body temperature monitoring through a rectal thermometer, for a duration of 15 minutes. The animals in the Heat Shock group were placed in an aluminium box with water at 42 °C and monitored until they reached a body temperature of 42 °C, which was maintained for 15 minutes. Afterwards, they were removed from the bath and monitored at 37 °C to avoid hypothermia. All animals from other groups were also anesthetized but kept in a bath at 37 °C for 15 minutes and monitored for hypothermia.

Immunohistochemical analysis

Six hours after bathing in water, all rats were sacrificed by decapitation to evaluate the expression of cochlear HSP70 through the immunohistochemistry technique (totalling 12 ears).

Soon after the animal was sacrificed, the cochleae were quickly dissected, the oval and round windows were opened, and the samples were fixed through an infusion of 4% paraformaldehyde (pH 7.0) and kept in the same solution for 6 h. After fixation, the cochleae were washed in PBS solution and decalcified in 10% EDTA for about 30 days at room temperature.

Afterwards, the cochleae were subjected to dehydration by passage in ethanol solutions (30% ethanol for 1 h, 40% 1 h, 50% 1 h, 60% 1 h, 70% overnight, 80% 1 h, 90% 1 h, 96% 1 h, and 100% 1 h). In the clarification process, they were passed in 100% xylol twice, 1 h each passage. Afterwards, infiltration in liquid paraffin was performed at 60 °C (2 x 40 min), with subsequent inclusion in a paraffin block. Microtomy was performed in 8 µm sections. Subsequently, the sections were dewaxed with xylol, hydrated with 100% ethanol for 3 min, 90% ethanol for 3 min, 70% ethanol for 3 min, and washed in distilled water (LOPEZ et al., 2016).

Subsequently, the slides were submitted to the antigenic recovery process in sodium citrate at pH 6.0, heated in a microwave to 98 °C, and kept at this temperature for 25 minutes. After another 20 minutes of cooling at room temperature, blocking of endogenous peroxides was performed using 3% hydrogen peroxide for 5 minutes. Afterwards, the tissue was incubated in 3% skim milk in PBS for 1 hour to block nonspecific binding. Afterwards, the slides were treated with anti-HSP72/73 primary antibody (H5147 Sigma, mouse anti-HSP70), at a concentration of 1:200, overnight at 4 °C in a humid darkroom. Afterwards, the slides were washed with PBS twice (5 min each time). Afterwards, secondary antibody labelled with peroxidase (A9044 Sigma anti-mouse), at a concentration of 1:100, was placed for 2 h at room temperature in a humid darkroom and washed again in PBS twice (5 min). Then, the development was carried out with a solution of 0.1% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) for 10 min. After washing in distilled water, the slides were counterstained with haematoxylin and mounted for viewing under an optical microscope (LOPEZ et al., 2016; ZUO et al., 2008).

Cochlear images were captured in digital format and analysed using the open access program NIH-ImageJ® (NIH Bethesda, MD, USA). Photographs were captured with standardized exposure time to assess and quantify colour intensity. DAB brown staining was separated from the blue colour from haematoxylin by colour

deconvolution technique using the IHC Profiler plugin (VARGHESE et al., 2014), and the colour intensity of each pixel quantitatively evaluated the intensity of HSP70 in the cochlea

(MAHALE et al., 2017) (Figure 2). In the digital image analysis, pixel intensity values for any colour range from 0 to 255, where 0 represents the darkest shade of colour and 255 represents the lightest shade of colour by default (VARGHESE et al., 2014). For pixel conversion to HSP70 concentration in arbitrary units (A.U.), the formula $[HSP70] = 255 - Pixel\ Mean$ was used to create a directly proportional value of concentration of this protein. The HSP70 concentration ratio of the groups in relation to the mean concentration of the Control group was also calculated.

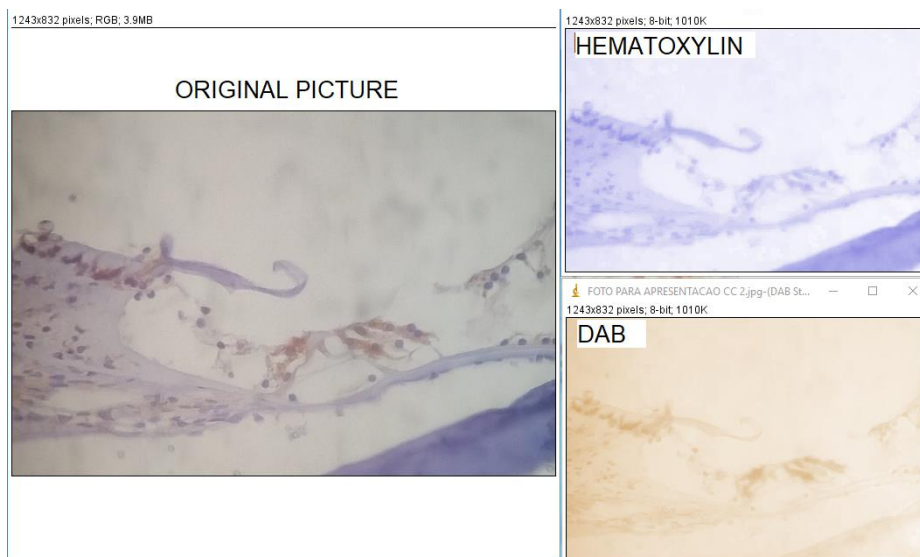


Figure 2. Example of the use of the hair cell colour deconvolution technique by the IHC Profiler plug-in in the ImageJ® software to separate hematoxylin and DAB staining for analysis of HSP70 in the cochlea.

HSP70 concentrations were evaluated in hair cells, cell bodies of spiral ganglion neurons, and stria vascularis by selecting the areas of these regions and measuring the pixel intensity in the ImageJ software, as shown in Figure 3.

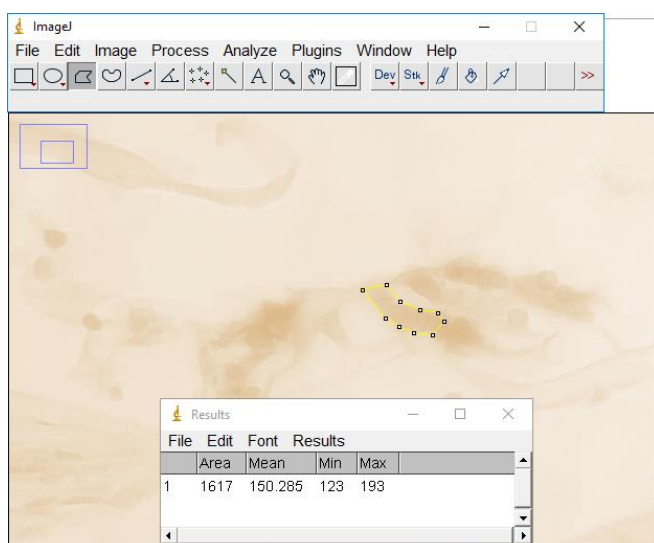


Figure 3. Example of analysis of the colour intensity of the DAB in a hair cell.

Statistical analysis and ethics

For statistical treatment, after a normality test, data were expressed as mean \pm standard deviation, and a one-way Analysis of Variance (ANOVA) test was performed followed by Dunnett's post hoc test, with a significance level of 5%. GraphPad Prism 9.4.0 software was used for data analysis. This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of the Regional University of the Northwest of the State of Rio Grande do Sul (UNIJUI) with protocol no. 058/15.

Results

In the analysis of the hair cells of each group, we observed an increase in the concentration of HSP70 in the Heat Shock and Alanylglutamine groups of 23.3% and 32.1%, respectively, in relation to the Control group. There was no difference between the Heat Shock and Alanylglutamine groups (Fig. 4A).

In the analysis of the cell bodies of the spiral ganglion neurons, there was also an increase in the concentration of HSP70 in the Heat Shock and Alanylglutamine groups of 36.1% and 47.9%, respectively, in relation to the Control group (Fig. 4B).

In stria vascular, the Alanylglutamine group had an increase in relation to the Control and Heat Shock group of 124.9% and 83.2%, respectively. The Heat Shock group also showed an increase of 41.7% in relation to the Control group (Fig. 4C). An

illustrative example of each cochlear region in the different groups can be seen in Figure 5.

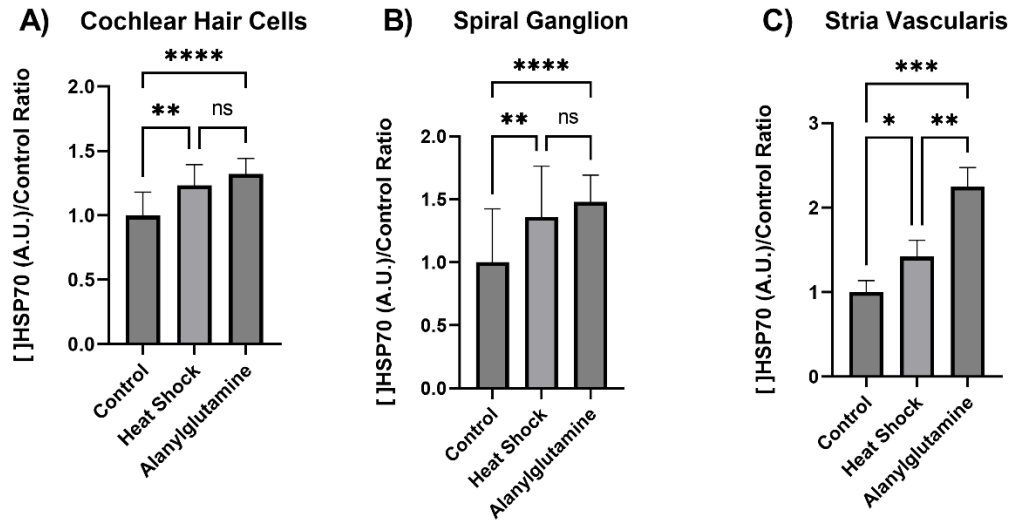


Figure 4: Ratio of HSP70 concentration of each group in relation to the mean concentration of the Control group. A) [HSP70] (A.U.)/control ratio in hair cells. B) [HSP70] (A.U.)/control ratio in the spiral ganglion. C) [HSP70] (U.A.)/control ratio in striae vascularis. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns = no significance).

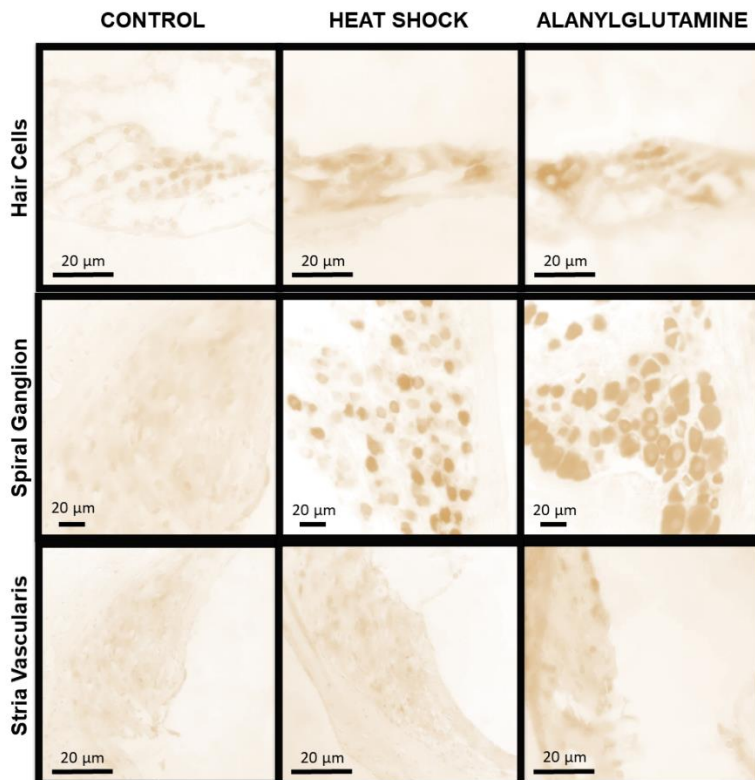


Figure 5. Example image of the different cochlear regions evaluated in the different groups, revealed with DAB for HSP70.

Discussion

For the first time, we identified that alanylglutamine was able to increase HSP70 concentrations in hair cells, spiral ganglion, and stria vascularis 6 h after its administration. In our previous study, we observed cochlear and systemic anti-inflammatory effects in the face of noise exposure, but it was not possible to evaluate its induction of cochlear expression of HSP70 in the group exclusively treated with alanylglutamine (SOARES et al., 2020). On the other hand, the anti-inflammatory effects evidenced in our research and the evidence of induction of HSP70 in other tissues by alanylglutamine (PETRY et al., 2014, 2019a) motivated us to continue the research of this substance, mainly to evidence its induction at the cochlear level.

The induction of HSP70 by L-glutamine has been shown to protect against damage in different organs, such as the muscles, kidneys, intestines, pancreas, liver, and lungs (BROVEDAN et al., 2018; CRUZAT et al., 2018, 2015; PETRY et al., 2019a; ROPELESKI et al., 2005). Recently, Luo et al (2019) demonstrated that alanylglutamine protects against ischemic brain damage, mediated by the induction of HSP70, associated with reduced oxidative stress and neuronal apoptosis, in addition to increased levels of superoxide dismutase, glutathione, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (LUO et al., 2019).

Glutamine is taken up by the inner hair cells of the cochlea by the SAT1 transporter (OGUCHI et al., 2012). In addition to the participation of the antioxidant machinery and acting as a precursor of glutathione (CRUZAT et al., 2018), glutamine within these cells is transformed into glutamate, by the glutaminase enzyme, to be released into the synaptic cleft. The glutamate-glutamine cycle occurs between hair cells and cochlear support cells for neurotransmission to the auditory nerve (OGUCHI et al., 2012). Studies have shown that loud noise leads to an excessive accumulation of glutamate in the synaptic cleft between inner hair cells and contributes to both acute and chronic deterioration of the auditory pathways, called excitotoxicity (KIM et al., 2019). On the other hand, administration of alanylglutamine, at a high concentration of 0.75 g/kg/day, increased plasma glutamine without increasing brain glutamate, demonstrating that administration of alanylglutamine is not associated with brain injury mediated by excitotoxicity (NÄGELI et al., 2014).

Glutamine is the most abundant and versatile amino acid in the body, and under stress, its plasma concentration can drop, and its supplementation is beneficial in many stressful situations (CRUZAT et al., 2018). Its uptake and participation in hair cell metabolism has long been demonstrated (RYAN; SCHWARTZ, 1984). Part of the captured glutamine is used for neurotransmission in the synapse between the inner hair cells and the auditory nerve, but it was shown that glutamine has anti-inflammatory effects in the cochlea and at a systemic level in the face of intense noise as a stressor factor, which demonstrates another function of this amino acid at the cochlear level (SOARES et al., 2020). The present study demonstrates that alanylglutamine, by itself, was able to induce the expression of HSP70, which is known to be cytoprotective in the cochlea and hearing. Furthermore, its expression was elevated in spiral ganglion neurons and stria vascularis. This finding suggests that alanylglutamine may act as a possible cytoprotector against cochlear and auditory pathway stressors, such as loud noise and ototoxic substances, being a potential therapeutic agent to be studied in hearing protection.

The present study demonstrates the increase of HSP70 expression in cochleae with whole-body heat shock, as already observed in other studies (GONG et al., 2012; YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999); however, for the first time, an increase in HSP70 was identified after heat shock in specific areas of the inner ear, namely in hair cells, spiral ganglion neurons, and stria vascularis. Gong et al (2012) showed the expression of HSP70 in a pool of cochleae, without discrimination of intracochlear structures, by the RT-PCR technique. Yoshida et al (1999) demonstrated hearing protection in rats exposed to 100 dB SPL for 2 hours, when the whole-body heat shock was performed 6 and 12 h before noise exposure; however, this study also analysed a pool of cochleae, without individualizing the expression of HSP70 in each structure within the cochlea (YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999).

Several strategies in otoprotection have been studied in different stressors, and the induction of HSP70 at the cochlear level seems to be a promising target (MUKHERJEA et al., 2020). Activation of HSP70 by sound conditioning, characterized by exposure to noise that leads to transient hearing loss without causing permanent hearing loss, has shown otoprotection against aminoglycosides (ROY et al., 2013) and against acoustic trauma (ZHU et al., 2020) in cochleae of animal models. On the other

hand, cochlear sound conditioning, depending on sound levels, exposure time, and the susceptibility of the individual can lead to synaptic damage between the inner hair cells and the spiral ganglion, and it can be difficult to find safe levels of sound intensity for cochlear conditioning without causing a synaptopathy (HARRISON et al., 2022; VALERO et al., 2017). The discovery of different methods of preconditioning the cochlea against damage may bring new avenues for preventing hearing loss in vulnerable populations (HARRISON et al., 2022). Although some animal studies show otoprotection with whole-body heat shock (hyperthermia) performed before a cochlear stressor (CUNNINGHAM; BRANDON, 2006; YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999), there are still no studies in humans, and it appears to be a favorable field to be researched.

In addition, for the first time, the quantitative analysis technique was used through the IHC-Profiler plugin of the free software ImageJ®, through colour deconvolution in cochleae. This opens the possibility of new studies involving the cochlea in the analysis of numerous substances through immunohistochemistry using the paraffin method.

Conclusion

Alanylglutamine and whole-body heat shock were able to increase HSP70 concentrations in several regions of the inner ear, namely hair cells, spiral ganglion neurons, and stria vascularis. In view of the cytoprotective capacity of HSP70 in the inner ear, alanylglutamine and heat shock may be potential therapeutic agents in otoprotection, creating a field for future studies in hearing preservation.

References

- ABBASI, M.; POURRAJAB, B.; TOKHI, M. O. Protective effects of vitamins/antioxidants on occupational noise-induced hearing loss: A systematic review. **Journal of Occupational Health**, v. 63, n. 1, p. 1–11, 2021.
- AJAY, E.; GUNWARDENE, N.; RICHARDSON, R. Emerging therapies for human hearing loss. **Expert opinion on biological therapy**, v. 22, n. 6, p. 689–705, jun. 2022.
- ARENAS, J. P.; SUTER, A. H. Comparison of occupational noise legislation in the

Americas: an overview and analysis. **Noise & health**, v. 16, n. 72, p. 306–319, 2014.

ASEA, A. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70. ROLE OF Toll-LIKE RECEPTOR (TLR) 2 AND TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15028–15034, 2002.

ASEA, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15028–34, 26 abr. 2002.

ATTIAS, J.; PRATT, H. Auditory evoked potentials and audiological follow-up of subjects developing noise-induced permanent threshold shift. **Audiology : official organ of the International Society of Audiology**, v. 23, n. 5, p. 498–508, 1984.

BAKER, T. G. et al. Heat Shock Protein-Mediated Protection Against Cisplatin-Induced Hair Cell Death. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 16, n. 1, p. 67–80, 2014.

BAO, J. et al. Prophylactic and therapeutic functions of drug combinations against noise-induced hearing loss. **Hearing Research**, v. 304, p. 33–40, 2013.

BARBE, M. F. et al. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. **Science (New York, N.Y.)**, v. 241, n. 4874, p. 1817–20, 30 set. 1988.

BASNER, M. et al. Auditory and non-auditory effects of noise on health. **The Lancet**, v. 383, p. 1325–1332, 2014.

BHARADWAJ, H.; SHINN-CUNNINGHAM, B. What's been hidden in hidden hearing loss. **Neuron**, v. 109, n. 6, p. 909–911, 17 mar. 2021.

BIELEFELD, E. C. et al. Noise protection with N-acetyl-l-cysteine (NAC) using a variety of noise exposures, NAC doses, and routes of administration. **Acta otolaryngologica**, v. 127, n. 9, p. 914–919, set. 2007.

BOBKOVA, N. V et al. Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 38, n. 2, p. 425–35, 2014.

BOHNE, B. A.; ZAHN, S. J.; BOZZAY, D. G. Damage to the Cochlea following Interrupted Exposure to Low Frequency Noise. **Annals of Otolaryngology & Rhinology**, v. 94, n. 2, p. 122–128, mar. 1985.

BORGES, T. J. et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. **Frontiers in**

Immunology, v. 3, n. MAY, p. 1–12, 2012.

BRAMHALL, N. F. Use of the auditory brainstem response for assessment of cochlear synaptopathy in humans. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 150, n. 6, p. 4440–4451, 2021.

BROVEDAN, M. A. et al. Glutamine protection in an experimental model of acetaminophen nephrotoxicity. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 96, n. 4, p. 366–371, abr. 2018.

CANLON, B.; BORG, E.; FLOCK, A. Protection against noise trauma by pre-exposure to a low level acoustic stimulus. **Hearing research**, v. 34, n. 2, p. 197–200, 15 jul. 1988.

CHANG, N.-C. et al. Association of polymorphisms of heat shock protein 70 with susceptibility to noise-induced hearing loss in the Taiwanese population. **Audiology & neuro-otology**, v. 16, n. 3, p. 168–174, 2011.

CHANG, Y.-S. et al. Effects of early intratympanic steroid injection in patients with acoustic trauma caused by gunshot noise. **Acta oto-laryngologica**, v. 137, n. 7, p. 716–719, jul. 2017.

CHEN, T. J.; CHIANG, H. C.; CHEN, S. S. Effects of aircraft noise on hearing and auditory pathway function of airport employees. **Journal of occupational medicine. : official publication of the Industrial Medical Association**, v. 34, n. 6, p. 613–619, jun. 1992.

CHEN, Z. et al. Protection of auditory function against noise trauma with local caroverine administration in guinea pigs. **Hearing Research**, v. 197, n. 1–2, p. 131–136, 2004.

CIORBA, A. et al. The impact of hearing loss on the quality of elderly adults. **Clinical Interventions in Aging**, n. 7, p. 159–163, 2012.

CLIFFORD, R. E. et al. Low-dose D-methionine and N-acetyl-L-cysteine for protection from permanent noise-induced hearing loss in chinchillas.

Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, v. 145, n. 6, p. 999–1006, dez. 2011.

COLEMAN, J. et al. Dosing study on the effectiveness of salicylate/N-acetylcysteine for prevention of noise-induced hearing loss. **Noise & health**, v. 12, n. 48, p. 159–165, 2010.

- COYAT, C. 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.
- CRUZAT, V. et al. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–31, 2018.
- CRUZAT, V. F. et al. Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 602–611, 2014.
- CRUZAT, V. F. et al. Alanyl-glutamine improves pancreatic β -cell function following ex vivo inflammatory challenge. **The Journal of endocrinology**, v. 224, n. 3, p. 261–271, mar. 2015.
- CUI, C.; LIU, D.; QIN, X. Attenuation of streptomycin ototoxicity by tetramethylpyrazine in guinea pig cochlea. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 152, n. 5, p. 904–911, 2015.
- CUNNINGHAM, L. L.; BRANDON, C. S. Heat shock inhibits both aminoglycoside- and cisplatin-induced sensory hair cell death. **JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 7, p. 299–307, 2006.
- DANIEL, E. Noise and hearing loss: A review. **Journal of School Health**, v. 77, n. 5, p. 225–231, 2007.
- DECHESNE, C. J. et al. Expression of heat shock protein, HSP72, in the guinea pig and rat cochlea after hyperthermia: Immunochemical and in situ hybridization analysis. **Hearing Research**, v. 59, n. 2, p. 195–204, 1992.
- DOOSTI, A. et al. Comparison of the effects of N-acetyl-cysteine and ginseng in prevention of noise induced hearing loss in male textile workers. **Noise & Health**, v. 16, n. 71, p. 223–227, 2014.
- EKIMOVA, I. V et al. Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. **Journal of neurochemistry**, v. 115, n. 4, p. 1035–44, 2010.
- FABIANI, M. et al. Auditory evoked potentials for the assessment of noise induced hearing loss. **Scandinavian audiology. Supplementum**, v. 48, p. 147–153, 1998.
- FAIRFIELD, D. A. et al. Expression and localization of heat shock factor (Hsf) 1 in the rodent cochlea. **Hearing Research**, v. 173, n. 1–2, p. 109–118, 2002.

- 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.
- FETONI, A. R. et al. Protective effects of N-acetylcysteine on noise- induced hearing loss in guinea pigs. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, v. 29, p. 70–75, 2009.
- 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.
- FETONI, A. R. et al. Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: Oxidative stress and ROS signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 135, p. 46–59, maio 2019.
- FOSTER, A. C.; JACQUES, B. E.; PIU, F. Hearing loss: The final frontier of pharmacology. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2022.
- FRANCIS, S. P. et al. Celastrol inhibits aminoglycoside-induced ototoxicity via heat shock protein 32. **Cell death & disease**, v. 2, n. 8, p. e195, 2011.
- FUJIOKA, M. et al. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. **Journal of neuroscience research**, v. 83, n. 4, p. 575–83, mar. 2006.
- GONG, T. W. et al. Induction of heat shock proteins by hyperthermia and noise overstimulation in Hsf1-/- mice. **JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 13, p. 29–37, 2012.
- 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.
- 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, M. A. et al. Therapeutic Effect of Dexamethasone for Noise-induced Hearing Loss: Systemic Versus Intratympanic Injection in Mice. **Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology**

Society [and] European Academy of Otolology and Neurotology, v. 36, n. 5, p. 755–762, jun. 2015.

HARRISON, R. T. et al. Cochlear Preconditioning as a Modulator of Susceptibility to Hearing Loss. **Antioxidants & redox signaling**, v. 36, n. 16–18, p. 1215–1228, jun. 2022.

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, B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 1, p. 1–14, jan. 2010.

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.

HENDERSON, D.; HAMERNIK, R. P. Impulse noise: critical review. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 80, n. 2, p. 569–584, ago. 1986.

HONG, O. et al. Understanding and preventing noise-induced hearing loss. **Disease-a-month : DM**, v. 59, n. 4, p. 110–118, abr. 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Noise and Military Service: Implications for Hearing Loss and Tinnitus**. Washington, DC: The National Academies Press, 2006.

JENSEN, J. B. et al. Immediate and delayed cochlear neuropathy after noise exposure in pubescent mice. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0125160, 2015.

JIANG, H.; SHA, S.-H.; SCHACHT, J. NF-kB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 5, p. 644–651, 2005.

JOHNSON, J. D.; FLESHNER, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 3, p. 425–434, 30 dez. 2005.

JOY, G. J.; MIDDENDORF, P. J. Noise exposure and hearing conservation in U.S.

coal mines--a surveillance report. **Journal of occupational and environmental hygiene**, v. 4, n. 1, p. 26–35, jan. 2007.

KIM, K. X. et al. Vesicular Glutamatergic Transmission in Noise-Induced Loss and Repair of Cochlear Ribbon Synapses. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 23, p. 4434–4447, jun. 2019.

KIM, M.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 105, p. 90–96, 2013.

KIM, Y. H. et al. Geranylgeranylacetone ameliorates acute cochlear damage caused by 3-nitropropionic acid. **NeuroToxicology**, v. 31, n. 3, p. 317–325, 2010.

KONINGS, A. et al. Variations in HSP70 genes associated with noise-induced hearing loss in two independent populations. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 17, n. 3, p. 329–335, 2009.

KONINGS, A.; VAN LAER, L.; VAN CAMP, G. Genetic studies on noise-induced hearing loss: a review. **Ear and hearing**, v. 30, n. 2, p. 151–159, 2009.

KONRAD-MARTIN, D. et al. Age-related changes in the auditory brainstem response. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 23, n. 1, p. 15–18, jan. 2012.

KOPELOVICH, J. C. et al. Risk factors for loss of ipsilateral residual hearing after hybrid cochlear implantation. **Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology**, v. 35, n. 8, p. 1403–1408, set. 2014.

KOPKE, R. et al. Efficacy and safety of N-acetylcysteine in prevention of noise induced hearing loss: A randomized clinical trial. **Hearing Research**, v. 323, p. 40–50, 2015.

KRAMER, S. et al. Efficacy of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in protecting ears exposed to loud music. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 17, n. 4, p. 265–278, abr. 2006.

KRAUSE, M. et al. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 18, n. 4, p. 374–80, 2015a.

KRAUSE, M. et al. The Chaperone Balance Hypothesis : The Importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio to Inflammation-Driven Type 2 Diabetes ,

the Effect of Exercise , and the Implications for Clinical Management. **Mediators of inflammation**, v. 2015, n. ID 2492205, p. 12, 2015b.

KRAUSE, M.; RODRIGUES-KRAUSE, J. D. C. Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: Possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 2, p. 286–290, 2011.

KUJAWA, S. G.; LIBERMAN, M. C. Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 2115–2123, fev. 2006.

KUJAWA, S. G.; LIBERMAN, M. C. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 45, p. 14077–14085, nov. 2009.

LAVINSKY, J. et al. Genome-Wide Association Study Identifies Nox3 as a Critical Gene for Susceptibility to Noise-Induced Hearing Loss. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1–21, 2015.

LAYMAN, W. S. et al. Histone deacetylase inhibition protects hearing against acute ototoxicity by activating the Nf-κB pathway. **Cell death discovery**, v. 1, n. 15012, jan. 2015.

LE PRELL, C. G. Effects of noise exposure on auditory brainstem response and speech-in-noise tasks: a review of the literature. **International journal of audiology**, v. 58, n. sup1, p. S3–S32, fev. 2019.

LE PRELL, C. G. Investigational Medicinal Products for the Inner Ear: Review of Clinical Trial Characteristics in ClinicalTrials.gov. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 32, n. 10, p. 670–694, nov. 2021.

LE PRELL, C. G. Prevention of Noise-Induced Hearing Loss Using Investigational Medicines for the Inner Ear: Previous Trial Outcomes Should Inform Future Trial Design. **Antioxidants & redox signaling**, v. 36, n. 16–18, p. 1171–1202, jun. 2022.

LE, T. N. et al. Current insights in noise-induced hearing loss: a literature review of the underlying mechanism, pathophysiology, asymmetry, and management options. **Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery**, v. 46, n. 1, p. 41, 23 dez.

2017.

LI, Y. et al. Polymorphisms of heat shock protein 70 genes (HSPA1A , HSPA1B and HSPA1L) and susceptibility of noise-induced hearing loss in a Chinese population : A case-control study. p. 1–12, 2017.

LIBERMAN, M. C. et al. Toward a Differential Diagnosis of Hidden Hearing Loss in Humans. **PLoS one**, v. 11, n. 9, p. e0162726, 2016.

LIM, H. H. et al. Detection of HSP 72 synthesis after acoustic overstimulation in rat cochlea. **Hearing research**, v. 69, p. 146–150, 1993.

LINDBLAD, A.-C. et al. The efficacy of N-acetylcysteine to protect the human cochlea from subclinical hearing loss caused by impulse noise: a controlled trial. **Noise & health**, v. 13, n. 55, p. 392–401, 2011.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The Heat-Shock Proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, n. 1, p. 631–677, dez. 1988.

LISSARASSA, Y. P. S. et al. Chronic heat treatment positively impacts metabolic profile of ovariectomized rats: association with heat shock response pathways. **Cell Stress and Chaperones**, v. 25, n. 3, p. 467–479, 2020.

LIU, Y. et al. 17-DMAG induces Hsp70 and protects the auditory hair cells from kanamycin ototoxicity in vitro. **Neuroscience letters**, v. 588, p. 72–7, 19 mar. 2015.

LO, W. C. et al. Dose-dependent effects of d-methionine for rescuing noise-induced permanent threshold shift in guinea-pigs. **Neuroscience**, v. 254, p. 222–229, 2013.

LOOI, L. M. et al. Hearing loss: a global health issue. **The Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 943–944, 2015.

LOPEZ, I. A. et al. Immunohistochemical techniques for the human inner ear. **Histochemistry and cell biology**, v. 146, n. 4, p. 367–387, out. 2016.

LORITO, G. et al. Different strategies in treating noise-induced hearing loss with N-acetylcysteine. **Medical Science Monitor**, v. 14, n. 8, p. 159–165, 2008.

LUO, L. L. et al. L-glutamine protects mouse brain from ischemic injury via up-regulating heat shock protein 70. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 25, n. 9, p. 1030–1041, 2019.

MAHALE, A. et al. Histopathologic and immunohistochemical features of capsular tissue around failed Ahmed glaucoma valves. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187506, 9 nov. 2017.

- MANOHAR, S. et al. Unexpected Consequences of Noise-Induced Hearing Loss: Impaired Hippocampal Neurogenesis, Memory, and Stress. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 16, p. 871223, 2022.
- MAO, H.; CHEN, Y. Noise-Induced Hearing Loss: Updates on Molecular Targets and Potential Interventions. **Neural Plasticity**, v. 2021, 2021.
- MATHEW, A.; MORIMOTO, R. I. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 99–111, 1998.
- MEHRAEI, G. et al. Auditory brainstem response latency in noise as a marker of cochlear synaptopathy. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 13, p. 3755–3764, 2016.
- MEIRA, T. C.; SANTANA, V. S.; FERRITE, S. Gender and other factors associated with the use of hearing protection devices at work. **Revista de saúde pública**, v. 49, p. 1–8, jan. 2015.
- MIKURIYA, T. et al. Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. **Brain Research**, v. 1065, n. 1–2, p. 107–114, 2005.
- MIKURIYA, T. et al. Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone. **Brain Research**, v. 1212, p. 9–17, 2008.
- MUKHERJEA, D. et al. Early investigational drugs for hearing loss. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 24, n. 01, p. 1–17, 2014.
- MUKHERJEA, D. et al. Strategies to reduce the risk of platinum containing antineoplastic drug-induced ototoxicity. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 16, n. 10, p. 965–982, out. 2020.
- MYERS, M. W. et al. Expression of the Major Mammalian Stress Protein in the Rat Cochlea Following Transient Ischemia. **The Laryngoscope**, v. 102, n. 9, p. 981–987, set. 1992.
- NÄGELI, M. et al. Prolonged continuous intravenous infusion of the dipeptide L-alanine- L-glutamine significantly increases plasma glutamine and alanine without elevating brain glutamate in patients with severe traumatic brain injury. **Critical care (London, England)**, v. 18, n. 4, p. R139, jul. 2014.
- NEAL, C. et al. Hair cell counts in a rat model of sound damage: Effects of tissue preparation & identification of regions of hair cell loss. **Hearing Research**, v. 328, p.

120–132, 2015.

NEELY, J. G.; THOMPSON, A. M.; GOWER, D. J. Detection and localization of heat shock protein 70 in the normal guinea pig cochlea. **Hearing Research**, v. 52, n. 2, p. 403–406, 1991.

NEUFELD, A. et al. Prospective, randomized controlled assessment of the short- and long-term efficacy of a hearing conservation education program in Canadian elementary school children. **The Laryngoscope**, v. 121, n. 1, p. 176–181, jan. 2011.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 153–163, 2003.

NUTTALL, A. L. Sound-Induced Cochlear Ischemia/Hypoxia as a Mechanism of Hearing Loss. **Noise & health**, v. 2, n. 5, p. 17–32, jan. 1999.

OGUCHI, T. et al. Inner hair cells of mice express the glutamine transporter SAT1. **Hearing Research**, v. 292, n. 1–2, p. 59–63, 2012.

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.

PETRY, É. R. et al. Oral glutamine supplementation attenuates inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: Role of 70 kDa heat shock protein. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 145, n. September, p. 87–102, 2019a.

PETRY, É. R. et al. Oral glutamine supplementation attenuates inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: Role of 70 kDa heat shock protein. **Free radical biology & medicine**, v. 145, p. 87–102, dez. 2019b.

PIERSON, L. L. et al. Relationship between outer ear resonance and permanent noise-induced hearing loss. **American journal of otolaryngology**, v. 15, n. 1, p. 37–40, 1994.

POIRRIER, A. L. et al. Oxidative stress in the cochlea: an update. **Current medicinal chemistry**, v. 17, p. 3591–3604, 2010.

PRENDERGAST, G. et al. Effects of noise exposure on young adults with normal audiograms I: Electrophysiology. **Hearing Research**, v. 344, p. 68–81, 1 fev. 2017.

PUSHPALATHA, Z. V.; KONADATH, S. Auditory brainstem responses for click and

CE-chirp stimuli in individuals with and without occupational noise exposure. **Noise & health**, v. 18, n. 84, p. 260–265, 2016.

QI, G. et al. Morphology changes in the cochlea of impulse noise-induced hidden hearing loss. **Acta oto-laryngologica**, v. 142, n. 6, p. 455–462, jun. 2022.

RABINOWITZ, P. M. et al. Audiogram notches in noise-exposed workers. **Ear and hearing**, v. 27, n. 6, p. 742–750, dez. 2006.

RAMKUMAR, V. et al. Oxidative stress and inflammation caused by cisplatin ototoxicity. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2021.

REN, H.; HU, B.; JIANG, G. Advancements in prevention and intervention of sensorineural hearing loss. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 13, p. 20406223221104988, 2022.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 571–573, 1 dez. 1962.

ROGERO, M. M. et al. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition**, v. 22, n. 5, p. 564–571, 2006.

ROPELESKI, M. J. et al. Anti-apoptotic effects of L-glutamine-mediated transcriptional modulation of the heat shock protein 72 during heat shock. **Gastroenterology**, v. 129, n. 1, p. 170–184, jul. 2005.

ROTH, E. Nonnutritive effects of glutamine. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 10, p. 2025S-2031S, 2008.

ROY, S. et al. Sound preconditioning therapy inhibits ototoxic hearing loss in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 11, p. 4945–4949, 2013.

RYAN, A. F.; SCHWARTZ, I. R. Preferential glutamine uptake by cochlear hair cells: implications for the afferent cochlear transmitter. **Brain research**, v. 290, n. 2, p. 376–9, 9 jan. 1984.

RYBAK, L. P. et al. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 219, n. 3, p. 177–86, 2009.

SANO, H. et al. Effect of geranylgeranylacetone on gentamycin ototoxicity in rat cochlea culture. **Auris Nasus Larynx**, v. 34, n. 1, p. 1–4, 2007.

SANZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Utility of auditory steady-state and brainstem

- responses in age-related hearing loss in rats. **Acta oto-laryngologica**, v. 135, n. 1, p. 35–41, jan. 2015.
- SEIBERT, P. et al. Increased eHSP70-to-iHSP70 ratio in prediabetic and diabetic postmenopausal women: a biomarker of cardiometabolic risk. **Cell stress & chaperones**, jun. 2022.
- SHA, S. H. et al. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. **Hearing research**, v. 155, n. 1–2, p. 1–8, 2001.
- SHEHABI, A. M.; PRENDERGAST, G.; PLACK, C. J. The Relative and Combined Effects of Noise Exposure and Aging on Auditory Peripheral Neural Deafferentation: A Narrative Review. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 14, p. 877588, 2022.
- SHI, L. et al. Cochlear Synaptopathy and Noise-Induced Hidden Hearing Loss. **Neural plasticity**, v. 2016, p. 6143164, 2016.
- SIMPSON, A. N. et al. Time From Hearing Aid Candidacy to Hearing Aid Adoption: A Longitudinal Cohort Study. **Ear and hearing**, v. 40, n. 3, p. 468–476, 2019.
- SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. 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.
- SLIWINSKA-KOWALSKA, M.; PAWELCZYK, M. Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review. **Mutation research**, v. 752, n. 1, p. 61–5, 2013.
- SLY, D. J. et al. Applying Neurotrophins to the Round Window Rescues Auditory Function and Reduces Inner Hair Cell Synaptopathy After Noise-induced Hearing Loss. **Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology**, v. 37, n. 9, p. 1223–1230, out. 2016.
- 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**, v. 86, n. 6, p. 703–710, 2020.
- SONE, M. et al. Upregulation of HSP by geranylgeranylacetone protects the cochlear lateral wall from endotoxin-induced inflammation. **Hearing Research**, v. 204, n. 1–2,

p. 140–146, 2005.

SUGAHARA, K. et al. Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. **Hearing Research**, v. 182, p. 88–96, 2003.

TALEB, M. et al. Hsp70 inhibits aminoglycoside-induced hearing loss and cochlear hair cell death. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, p. 427–437, 2009.

VALERO, M. D. et al. Noise-induced cochlear synaptopathy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Hearing research**, v. 353, p. 213–223, set. 2017.

VALERO, M. D.; HANCOCK, K. E.; LIBERMAN, M. C. The middle ear muscle reflex in the diagnosis of cochlear neuropathy. **Hearing research**, v. 332, p. 29–38, fev. 2016.

VARGHESE, F. et al. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96801, 6 maio 2014.

VERBEEK, J. H. et al. Interventions to prevent occupational noise induced hearing loss. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 3, p. CD006396, jul. 2009.

VERBEEK, J. H. et al. Interventions to prevent occupational noise-induced hearing loss: A Cochrane systematic review. **International journal of audiology**, v. 53, n. 0 2, p. S84–S96, 2014.

WANG, Y.; HIROSE, K.; LIBERMAN, M. C. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO**, v. 3, n. 3, p. 248–268, set. 2002.

WANG, Y.; LIBERMAN, M. C. Restraint stress and protection from acoustic injury in mice. **Hearing Research**, v. 165, n. 1–2, p. 96–102, 2002.

WHO. **World Report On Hearing**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Deafness and Hearing Loss**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>>. Acesso em: 29 maio. 2017.

XIAO, X. et al. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. **EMBO Journal**, v. 18, n. 21, p. 5943–5952, 1999.

YANG, M. et al. Association of hsp70 polymorphisms with risk of noise-induced hearing loss in Chinese automobile workers. **Cell stress & chaperones**, v. 11, n. 3,

p. 233–239, 2006.

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.

YURINSKAYA, M. et al. The Fate of Exogenous Human HSP70 Introduced into Animal Cells by Different Means. 2015.

ZHU, G. et al. Hsp70/Bmi1-FoxO1-SOD Signaling Pathway Contributes to the Protective Effect of Sound Conditioning against Acute Acoustic Trauma in a Rat Model. **Neural Plasticity**, v. 2020, 2020.

ZONG, S. et al. Association of polymorphisms in heat shock protein 70 genes with the susceptibility to noise-induced hearing loss: A meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188195, 16 nov. 2017.

ZUO, H. et al. Changes in Guinea Pig Cochlear Hair Cells after Sound Conditioning and Noise Exposure. **Journal of Occupational Health**, v. 50, n. 5, p. 373–379, 2008.

2.5 ARTIGO 2 - “EFEITOS DA ALANILGLUTAMINA NA PERDA AUDITIVA INDUZIDA PELO RUÍDO EM RATOS: ANÁLISE PELO POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE TRONCO ENCEFÁLICO E PELA HISTOLOGIA COCLEAR”

Effects of alanylglutamine on noise-induced hearing loss in rats: analysis of auditory brainstem response and cochlear histology

Marcos Soares^{1,2,5}, Samara Friske², Gabriela Gomes Mânica^{2,5}, Leticia Compagnon², Raquel Coradini Bortolini⁵, Matias Nunes Frizzo^{2,3}, Mirna Stela Ludwig^{2,3}, Thiago Gomes Heck^{2,3,4}, Aron Ferreira da Silveira¹.

¹ Postgraduate Program in Human Communication Disorders at the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

² Research Group in Physiology, Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State (UNIJUI), Ijuí, RS, Brazil.

³ Postgraduate Program in Integral Attention to Health (PPGAIS-UNIJUI/UNICRUZ), Ijuí, RS, Brazil.

⁴ Post Graduate Program in Mathematical and Computational Modeling (PPGMMC-UNIJUI), Ijuí, RS, Brazil

⁵ CORI Clinic – Ijuí Otorhino Center, Ijuí, RS, Brazil.

* Corresponding author:

E-mail: marcossoaresorl@gmail.com (MS)

Research Group in Physiology,
Department of Life Sciences,
Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State (UNIJUI)
Rua do Comércio, 3000 – Bairro Universitário – Ijuí - RS, Brazil.
ZIP code: 98700-000
Phone: +55 (55) 3332-0476

Intenção de publicação na revista “Plos One”.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of alanylglutamine on noise-induced hearing loss in rats, through analysis of the auditory brainstem response (ABR) and cochlear histology. Fifteen Wistar rats were divided equally into Control, Noise (exposed to noise) and Alanylglutamine (treated with alanylglutamine and exposed to noise) groups. Initially, gavage with distilled water (Control and Noise groups) or alanylglutamine at 1.5 g/kg (Alanylglutamine group) was administered. After 6 hours, the animals were exposed to white noise at 124 dB SPL for 2 hours (Noise and Alanylglutamine groups). The ABR was assessed before any intervention, and 1 day (assessment of temporary hearing loss) and 14 days (assessment of permanent hearing loss) after noise exposure. After the last ABR assessment, the animals were sacrificed for histological analysis of the inner ear. Although there was no difference in hearing thresholds between the Noise and Alanylglutamine groups in the assessment of temporary and permanent hearing loss, the hearing recovery, between the first and 14th day after noise exposure, it was higher in the Alanylglutamine group compared to the Noise group (22.5 dB HL vs. 9 dB HL, respectively). In addition, the ABR showed lower P4 wave latency in the Alanylglutamine group when compared to the Noise group and similar latency to the Control group. In the histological analysis, the density of spiral ganglion neurons in the Alanylglutamine group was higher than in the Noise group, despite being lower than in the Control group, and there was no difference in the myelination of auditory fibers in the modiolus region between the Alanylglutamine and Control groups. These data demonstrate a potential otoprotective effect of alanylglutamine that deserves future studies to better clarify its potential for hearing protection.

Keywords: Noise-Induced Hearing Loss; Alanylglutamine; Glutamine; Auditory Evoked Potential; Auditory Brain Stem Evoked Potentials; Cochlear Nerve; Cochlear Diseases; Auditory Hair Cells; Spiral Ganglion.

Introduction

Hearing loss is the most prevalent sensory disorder and a growing problem globally (LOOI et al., 2015). More than 5% of the world's population has disabling hearing loss, including 432 million adults and 34 million children (WHO, 2021). Exposure to loud sounds can result in sensorineural hearing loss due to loss of or damage to cochlear hair cells and auditory neural pathways, particularly spiral ganglion neurons (MAO; CHEN, 2021). Depending on the individual's genetic susceptibility to acoustic stimulation, and the intensity and duration of noise exposure, there may be a temporary or permanent change in the hearing threshold (LO et al., 2013). Studies have shown that light to moderate noise triggers temporary hearing loss as there is no irreversible damage to hair cells or afferent neural fibers (FETONI et al., 2019). However, exposure to intense noise, and exposure for long periods, can lead to necrosis and apoptosis of cochlear hair cells, causing permanent hearing loss as adult mammals are unable to regenerate hair cells. Therefore, after damage leading to cell death, there is permanent hearing loss (JIANG; SHA; SCHACHT, 2005; LAYMAN et al., 2015; MAO; CHEN, 2021).

Loud sounds can cause direct mechanical damage, mainly to the stereocilia, and indirect metabolic changes in the cochlear hair cells (WANG; LIBERMAN, 2002) causing oxidative damage to DNA, lipids and proteins, with subsequent cell death and hearing loss (POIRRIER et al., 2010). Inner ear damage from noise is not limited to hair cells. It extends to neural pathways, such as the degeneration of spiral ganglion neurons, even when inner hair cell damage is not yet present (HABYBABADY et al., 2018). Furthermore, acoustic trauma is related to reduced synaptic connection

between hair cells and spiral ganglion cells, axonal injury, and auditory nerve demyelination (COYAT et al., 2019; JENSEN et al., 2015; MAO; CHEN, 2021).

In addition to assessing hearing thresholds, electrophysiological analysis of the auditory brainstem response (ABR) has been used to assess auditory neuropathy in humans (BHARADWAJ; SHINN-CUNNINGHAM, 2021). Noise exposure has been shown to cause neural damage even before hair cells are involved, including in patients with normal pure-tone audiometry (PRENDERGAST et al., 2017). Decreased ABR wave I (or P1 in animals) amplitude is related to synaptopathy between inner hair cells and auditory afferent fibers (BRAMHALL, 2021), and increased wave V latency, which is equivalent to the P4 wave in rats (MEHRAEI et al., 2016), is related to noise-induced neuropathy (ATTIAS; PRATT, 1984; CHEN; CHIANG; CHEN, 1992; FABIANI et al., 1998; KONRAD-MARTIN et al., 2012; LE PRELL, 2019; PRENDERGAST et al., 2017; PUSHPALATHA; KONADATH, 2016).

In this sense, antioxidant protection mechanisms play a fundamental role in the biochemical response of cochlear cells (HENDERSON et al., 2006), involving glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase and catalase (RYBAK et al., 2009). Another cochlear defense system against noise stress is the Heat Shock Response, which acts mainly by increasing cochlear expression of the 70k Da Heat Shock Protein (HSP70) (YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999). As a result, many studies have evaluated otoprotection by inducing cochlear HSP70 (BAKER et al., 2014; CUNNINGHAM; BRANDON, 2006; GONG et al., 2012; LIM et al., 1993; LIU et al., 2015; SOARES et al., 2020; TALEB et al., 2009).

Among several promising substances, L-glutamine and its dipeptide alanylglutamine are associated with potentiation of HSP70 expression, *in vitro*

(CRUZAT et al., 2015; HAMIEL et al., 2009) and *in vivo* (CRUZAT et al., 2014; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007). Glutamine availability maintains cellular homeostasis and promotes cell survival against environmental and physiological stress challenges through protection mediated by intracellular levels of HSP70 (CRUZAT et al., 2018). Furthermore, L-glutamine supplementation influences intracellular glutathione storage and increases HSP70 in rat muscle tissue, decreasing tissue vulnerability to oxidative stress (PETRY et al., 2014, 2019a). Glutamine uptake in cochleas has long been known (RYAN; SCHWARTZ, 1984), along with the presence of the glutamine transporter SAT1 in inner hair cells (OGUCHI et al., 2012). Furthermore, a recent study demonstrated that oral alanylglutamine was able to decrease inflammatory measures of HSP70-mediated heat shock response at the cochlear and systemic levels in rats (SOARES et al., 2020).

Oral drugs are expected to become viable in the coming years, as to date no drugs have been released by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment and/or prevention of NIHL (BAO et al., 2013; FOSTER; JACQUES; PIU, 2022; MUKHERJEA et al., 2014).

The present study aimed to assess whether alanylglutamine has potential for hearing protection in rats by electrophysiological assessment via the ABR and by histological assessment.

Materials and methods

In this experimental study, 15 Wistar rats were divided equally into three groups: Control, Noise and Alanylglutamine groups. One day before exposure to noise, the ABR of all animals was evaluated in order to determine baseline electrophysiological hearing thresholds and parameters before any intervention. Six hours before exposure

to noise, all animals received gavage in a single administration, with distilled water or alanylglutamine, depending on each group. After 6 hours of gavage, the animals in the Noise and Alanylglutamine groups were exposed to noise capable of causing permanent hearing damage, as described below. One day after noise exposure, another ABR hearing assessment was performed to assess temporary hearing loss, and after 14 days, ABR was performed again to assess permanent hearing loss. Soon after, the animals were sacrificed for histological analysis of the inner ear (Fig. 1).

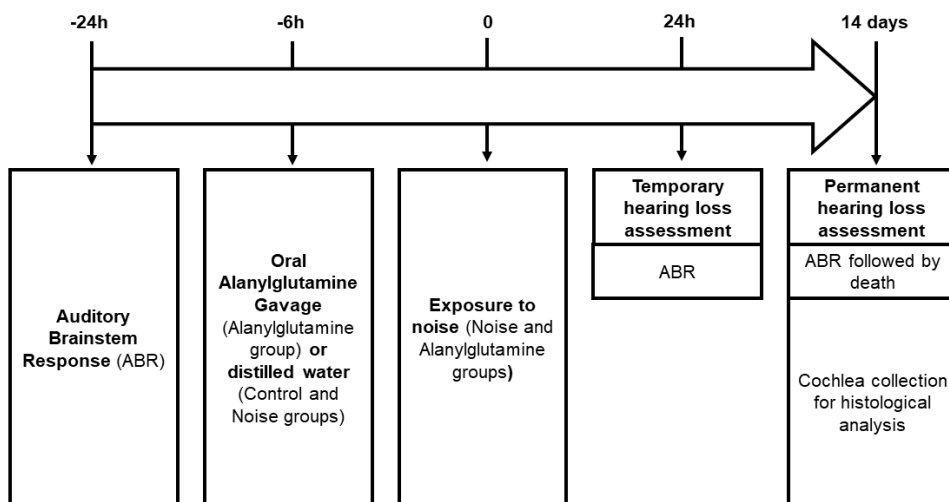


Fig. 1. Experimental study design.

Hearing assessment in rats

The auditory evaluation of the animals was performed by assessing the ABR using the Intelligent Hearing System® SmartEP®. The animals were anaesthetized intraperitoneally with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and placed in an anechoic room (FETONI et al., 2013).

Needle-type subcutaneous electrodes were inserted in the posterior region of the ear (active electrode), in the vertex (reference electrode) and in the contralateral

ear (ground electrode). Sound stimuli were clicks (rise/fall time, 2 ms; total duration, 2 ms; repetition rate, 21/s). The responses were filtered (100–3000 Hz), reproduced by the average of 1000 samples.

The rat ABR comprises four components (labeled P1 to P4) occurring within 6 ms of the onset of the stimulus. These components reflect the neural activity of the auditory nerve (P1), cochlear nucleus (P2), superior olivary complex (P3) and lateral lemniscus and/or inferior colliculus (P4). Hearing thresholds were defined as the lowest intensity capable of detecting the P2 wave. Thus, ABR data were expressed as Hearing Thresholds (HT) and Hearing Threshold Shift (HTS), which represents the difference between the thresholds before and after noise exposure, in decibels hearing level (dB HL) (FETONI et al., 2013). Wave latencies were also analysed in milliseconds (ms), and wave amplitudes in microvolts (μV). To measure the P1 amplitude, the difference between the P1 wave peak and the subsequent trough was calculated (BRAMHALL, 2021).

Administration of alanylglutamine

All animals received gavage with a volume of 1 ml/100 g of body weight in a single administration. The Control and Noise groups received gavage with distilled water and the Alanylglutamine group received alanylglutamine at a dose of 1.5g/Kg. Alanylglutamine was used at a concentration of 0.2g/mL diluted in water (Dipeptiven®, Fresenius Kabi®).

Noise exposure

The animals were exposed to continuous white noise, with a wide frequency spectrum with the peak intensity centered at 8000 Hz and a sound pressure level of

124 decibels (dB SPL) for 2 hours (FUJIOKA et al., 2006). During exposure, the animals were placed in a box inside an anechoic room. White noise was produced by an audio signal generator (EP125, Insight®) connected to loudspeakers in the centre of the box. The noise level was measured using a decibel meter (digital decibel meter TDEC100, Incoterm®) located inside the box before and after noise exposure. The Control group was placed inside the same box, without exposure to noise, for 2 hours.

Histological analysis of the inner ear

The histological analysis of the cochlea had the purpose of evaluating the vitality of the different regions of the cochlea. Soon after decapitation of the animal, the cochleas were quickly dissected, oval and round windows were opened and fixation was achieved using an infusion of 4% paraformaldehyde at pH 7.0 for 6 h. After fixation, the cochleas were decalcified in 10% EDTA for 30 days at room temperature.

Afterwards, the cochleas were dehydrated by passage in ethanol solutions (30% ethanol for 1 h, 40% 1 h, 50% 1 h, 60% 1 h, 70% overnight, 80% 1 h, 90% 1 h, 96% 1 h and 100 % 1 h). Afterwards, in the clarification process, they were passaged in 100% Xylol twice for 1 h in each passage. Afterwards, infiltration in liquid paraffin was carried out at 60°C (2x 40 min), with subsequent inclusion in a paraffin block.

Microtomy was performed in 8 µm sections, parallel to the modiolar axis, and staining was performed using the hematoxylin-eosin method.

The viability of hair cells was demonstrated by the presence of an intact and spherical nucleus, located in the basal half of the cell (NEAL et al., 2015).

Cell bodies of spiral ganglion neurons and Schwann cells in the auditory nerve in the region of the modiolus were counted, using the free program ImageJ® and the function for counting cells per area in pixels to evaluate the density of these cells, after 14 days of noise exposure (HABYBABADY et al., 2018).

Statistical analysis and ethics

For statistical treatment, a normality test was performed, data were expressed as mean \pm standard deviation, and a one-way ANOVA was performed followed by Dunnett's post hoc test, with a significance level of 5%. GraphPad Prism 9.4.0 software was used for data analysis.

This experimental study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of the Regional University of the Northwest of the State of Rio Grande do Sul (UNIJUI) under protocol no. 058/15.

Results

Before noise exposure, there was no difference in hearing thresholds between the groups (Fig. 2A). In the assessment of temporary hearing loss, there was a worsening of hearing thresholds in the groups exposed to noise: the Noise group had an HTS of 69.5 dB HL (± 9.85 dB HL) and the Alanylglutamine group had an HTS of 62.0 dB HL (± 25.52 dB HL), with no difference between these two groups (Fig. 2D). In the assessment of permanent loss, the Noise group had an HTS of 60.5 dB HL (± 9.56 dB HL) and the Alanylglutamine group had an HTS of 39.5 dB HL (± 22.66 dB HL), with no difference between these two groups ($p=0.0575$) (Fig. 2E). When considering hearing recovery from temporary hearing loss compared to permanent hearing loss, the Alanylglutamine group showed a improvement in hearing compared to the Noise

group, with a recovery of 22.5 dB HL (± 13.39 dB HL) between the first day after noise exposure and the 14th day, while the Noise group had a hearing recovery of 9 dB HL (± 7.38 dB HL) in this period (Fig. 2F). There were no changes in hearing thresholds in the Control group between the analysed periods.

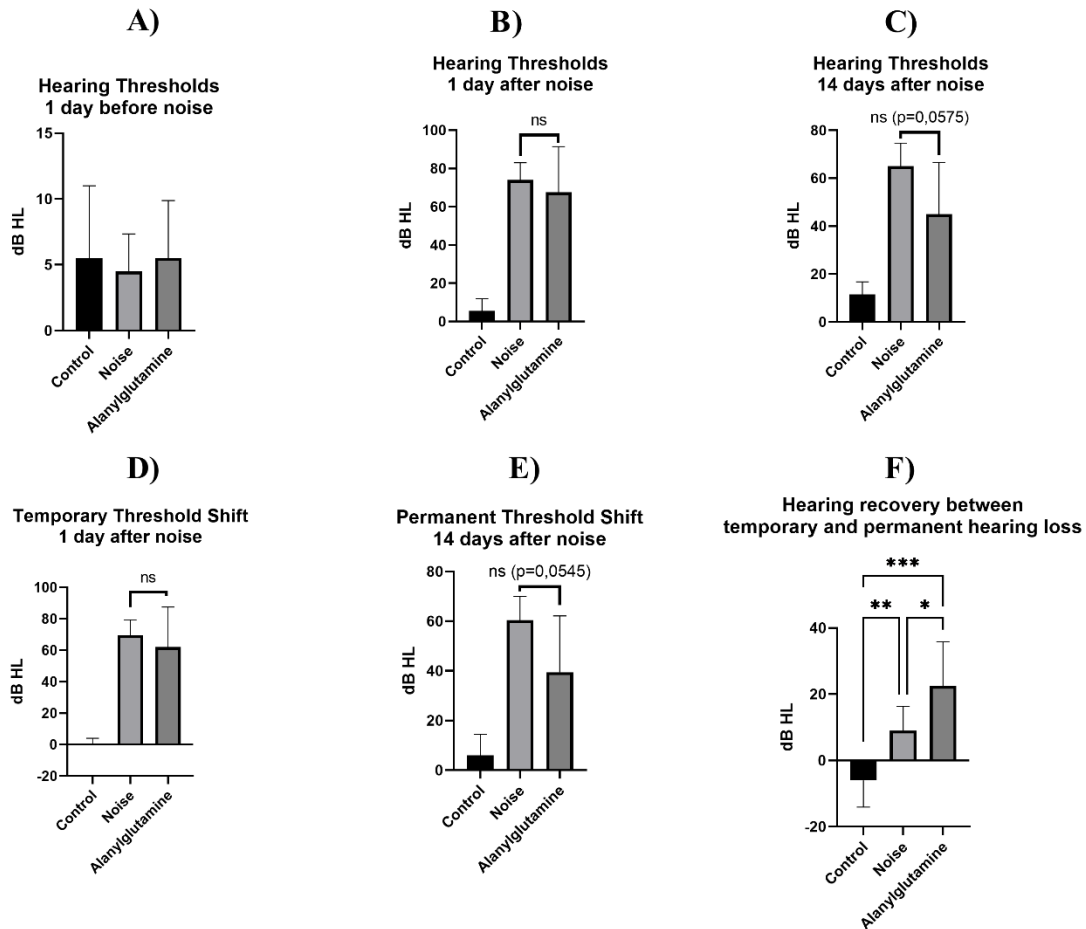


Fig. 2. Electrophysiological hearing thresholds according to ABR. A) Basal hearing thresholds before the intervention. There was no difference in threshold between the groups. B) Hearing threshold 1 day after noise to assess temporary hearing loss (Noise and Alanylglutamine groups vs. Control, $P < 0.0001$; Noise group vs. Alanylglutamine, no significance). C) Hearing threshold 14 days after noise to assess permanent hearing loss (Noise group vs. Control, $P < 0.0001$; Alanylglutamine group vs. Control, $P = 0.0022$; Noise group vs. Alanylglutamine, no significance with $P = 0.0575$). D) Hearing Threshold Shift 1 day after noise to assess temporary hearing loss (Noise and Alanylglutamine groups vs. Control, $P < 0.0001$; Noise group vs. Alanylglutamine, no significance). E) Hearing Threshold Shift 14 days after noise for the assessment of permanent hearing loss (Noise group vs. Control, $P < 0.0001$; Alanylglutamine group vs. Control, $P = 0.0032$; Noise group vs. Alanylglutamine, no significance with $P = 0.0545$). F) Hearing recovery between the first day and the 14th day after noise exposure ($*P = 0.0411$, $**P = 0.0012$, $***P = 0.0001$).

In the analysis of the latencies of ABR waves on the 14th day after noise exposure, the Noise group showed a higher latency in the P4 wave compared to the Control and Alanylglutamine groups, with no difference in latencies between the Control and Alanylglutamine groups, demonstrating that the administration of alanylglutamine decreased the P4 latency after noise exposure (Fig. 3C). In the analysis of the amplitude of the P1 wave on the 14th day after noise exposure, a decrease was observed in the Noise and Alanylglutamine groups compared to the Control group, but there was no difference between these groups (Fig. 3D). There was no difference between groups in P1 and P2 latencies (Fig. 3A and 3B).

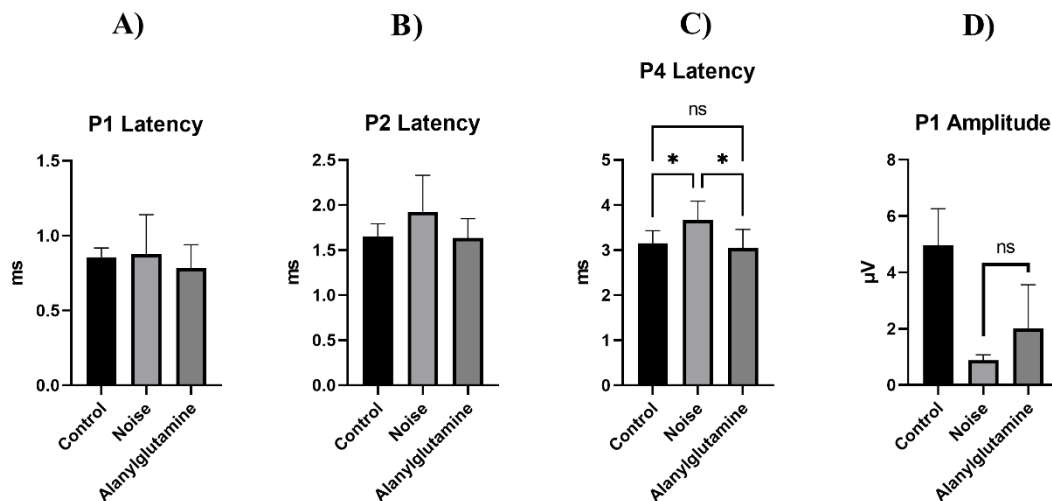


Fig. 3. ABR wave latencies and amplitudes. A) P1 wave latency (no difference between groups). B) P2 wave latency (no difference between groups). C) P4 wave latency (increased latency in the Noise group vs. Alanylglutamine and Control, * $P < 0.05$). D) P1 wave amplitude (Noise group vs. Control, $P < 0.0001$; Alanylglutamine group vs. Control, $P = 0.0007$, Noise group vs. Alanylglutamine, no significance).

In the histological analysis, the density of neurons in the spiral ganglion was lower in the groups exposed to noise (Noise and Alanylglutamine Groups) compared to the Control group, when measured 14 days after exposure to noise. However, the number of spiral ganglion neurons in the Alanylglutamine group was higher than in the

Noise group, showing less neuron loss following the administration of alanylglutamine (Fig. 4A). In the analysis of the density of Schwann cells in the modiolus region, there was a decrease in the number of cells in the Noise group compared to the Control group, but there was no difference between the Alanylglutamine group, and the Control and Noise groups ($P=0.0623$), demonstrating that there was no demyelination in the Alanylglutamine group compared to the Control group (Fig. 4B).

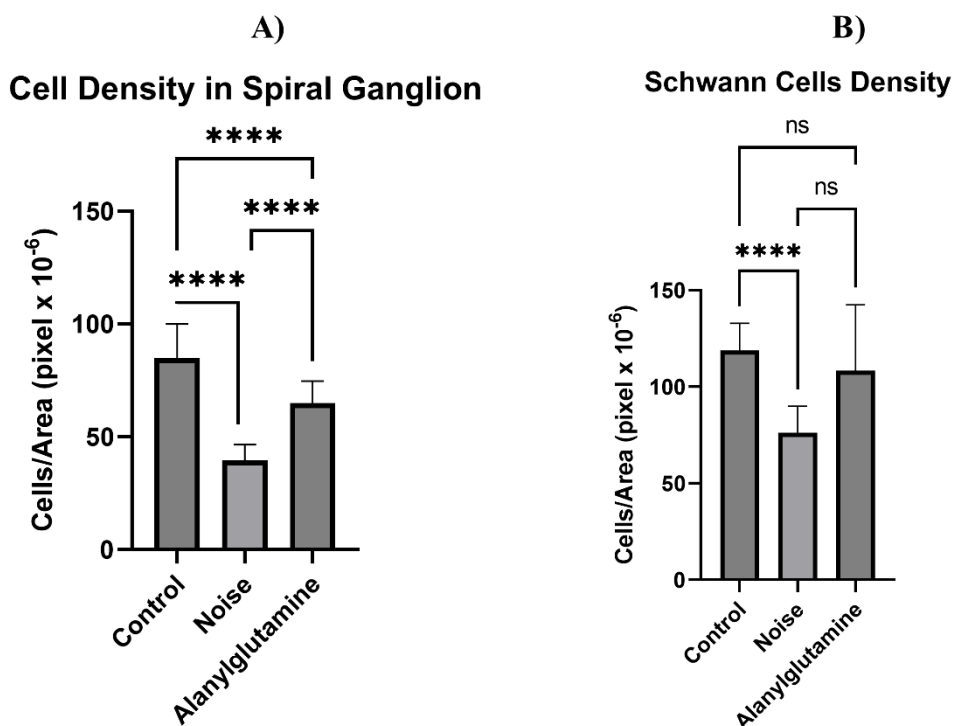


Fig. 4. Histological analysis of spiral ganglion and Schwann cells. A) Cell density of spiral ganglion neurons (**** $P<0.0001$). B) Cell density of Schwann cells of the auditory fibers of the modiolus (**** $P<0.0001$ and ns=no significance).

In hair cells analysis, it was possible to see structural changes between the groups, with preservation of the structure of the organ of Corti in the Control group compared to the groups exposed to noise (Fig. 5).

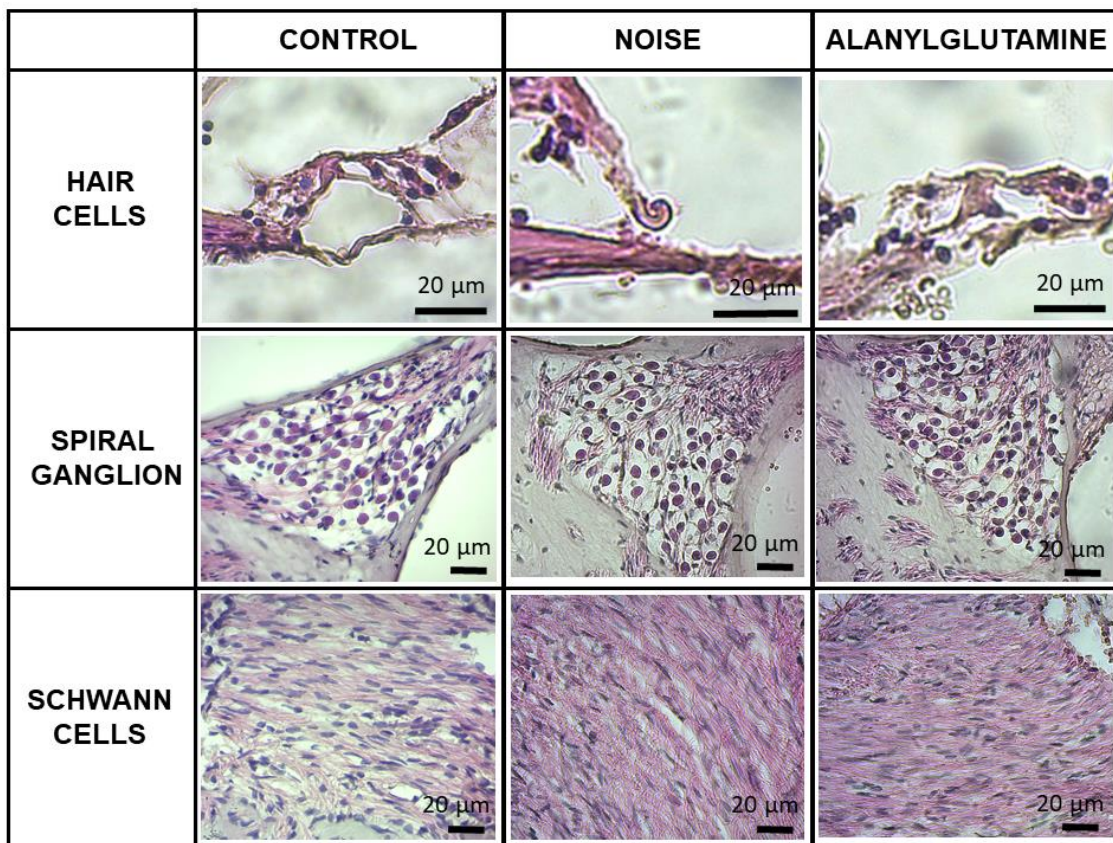


Fig. 5. Histological illustration of the inner ear areas in each group.

Discussion

The administration of alanylglutamine at a dose of 1.5 g/kg 6 hours before noise exposure resulted in greater hearing recovery between the first day and the 14th day after noise exposure, in addition to decreasing P4 wave latency and reducing the amount of damage to spiral ganglion neurons, 14 days after noise exposure.

Considering only the noise-exposed groups, treatment with alanylglutamine was not able to improve hearing thresholds compared to the untreated group, either for temporary or permanent hearing loss. The average difference in hearing threshold in

the Noise group on the 14th day was higher than in the Alanylglutamine group, but there was no difference between these groups ($p=0.0575$).

When considering hearing recovery from temporary to permanent hearing loss, that is, the difference in hearing threshold between the first day after noise exposure to the 14th day, the hearing improvement in the Alanylglutamine group was greater than in the Noise group (22.5dN HL vs. 9dB HL, respectively).

In the analysis of latency of the P4 wave between the groups, there were equivalent latency values in the Alanylglutamine and Control groups, while the Noise group had a higher latency. The P4 wave in rats is equivalent to the V wave in humans (MEHRAEI et al., 2016) and is equivalent to the action potential in the lateral lemniscus and/or inferior colliculus. Studies demonstrate that noise exposure increases wave V latency in humans, even with normal pure-tone audiometry (LE PRELL, 2019; PRENDERGAST et al., 2017). This fact demonstrates that noise causes neural damage even before altering audiometric thresholds, and can be demonstrated by electrophysiological tests such as ABR. Our study demonstrated that alanylglutamine was able to decrease P4 latency in rats, in permanent hearing loss, even with noise exposure, indicating less neural damage to the auditory pathway, according to the ABR electrophysiological test.

L-glutamine has been shown to protect against damage in different organs such as muscle, kidney, intestine, pancreas, liver and lung (BROVEDAN et al., 2018; CRUZAT et al., 2018, 2015; PETRY et al., 2019b; ROPELESKI et al., 2005). In an analysis of the neuroprotective effects of L-glutamine, a recent study demonstrated that this substance protected against ischaemic brain damage, mediated by the induction of HSP70, associated with a reduction in oxidative stress and neuronal

apoptosis, in addition to an increase in the levels of superoxide dismutase, glutathione and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (LUO et al., 2019).

P1 wave amplitude assessment has been used to assess synaptopathy between inner hair cells and auditory afferent fibers (BRAMHALL, 2021). In the noise-exposed groups (Noise and Alanylglutamine groups), there was a decrease in P1 amplitude in relation to the control, but there was no difference between the Noise and Alanylglutamine groups.

Cochlear histological evaluation allows us to quantify and analyse structures in different cochlear regions. Despite the observation of histological differences between the organ of Corti, the use of the histological section technique makes it difficult to quantify viable hair cells, as they are distributed in a three-dimensional form, being better evaluated using the whole-mount technique (JENSEN et al., 2015; NEAL et al., 2015). Despite this, visually greater damage to the organ of Corti was observed in the groups exposed to noise. On the other hand, regions of the spiral ganglion and auditory fibers of the modiolus can be visualized and quantified in histological paraffin sections, as performed in our study.

In the analysis of spiral ganglion neurons, alanylglutamine was able to protect against neural injury in this structure relative to the Noise group, although the cell density in the spiral ganglion did not reach Control values. In the Noise group, in addition to the decrease in the density of neurons in the spiral ganglion, there was a decrease in myelination relative to the Control group. On the other hand, there was no difference in Schwann cell density between the Alanylglutamine and Control groups. NIHL neuropathy is related to immediate loss of inner hair cell afferent synapses and later depletion of spiral ganglion neurons (JENSEN et al., 2015). Our study

demonstrated that broad spectrum white noise at 124 dB SPL for 2 hours was able to cause permanent damage to the spiral ganglion and myelination of auditory neural fibers after 14 days of exposure, and that alanylglutamine attenuated this neural injury, with greater preservation of spiral ganglion neurons compared to the untreated and noise-exposed group.

Currently, it is known that noise can cause neural changes, even before causing structural damage to the organ of Corti, especially in the synaptic communication between inner hair cells and afferent auditory fibers. In our study, although we found no significant difference between the hearing thresholds between the Noise and Alanylglutamine groups 14 days after noise exposure, the findings of decreased P4 latency and less damage to spiral ganglion neurons in the alanylglutamine-treated group demonstrated that the myelination of auditory neural fibers in this group was similar to the Control group and that this substance may have otoprotective power, especially in the neural auditory pathways, and deserves attention in further studies to determine the optimal dose and time for the greatest hearing protection. Although there have only been a few studies of glutamine in otoprotection and/or neuroprotection, it has already been shown that it has anti-inflammatory effects on the cochlea (SOARES et al., 2020) and neuroprotective effects on the central nervous system against an ischaemic process (LUO et al., 2019).

Our study was limited by the difficulty in quantifying the degree of injury to hair cells, due to the use of the technique of histological paraffin sections. On the other hand, the evaluation of the spiral ganglion and Schwann cells was excellent. In addition, the audiological data from ABR provided us with information about the hearing status of the animals, partially countering the difficulty in assessing hair cells.

Finally, this study will encourage further evaluations of the use of alanylglutamine in NIHL, a problem of extreme importance in Public Health worldwide since we still have no treatment for it (FOSTER; JACQUES; PIU, 2022).

Conclusion

Alanylglutamine improved electrophysiological auditory parameters, with greater hearing recovery and decreased P4 wave latency, and histological parameters, with less damage to spiral ganglion neurons, 14 days after noise exposure. This substance seems promising in hearing protection and deserves further studies to determine its otoprotective power.

Acknowledgements

The authors would like to thank colleagues from the Research Group in Physiology (GPeF) of the Regional University of the Northwest of the State of Rio Grande do Sul (UNIJUI) for their technical support of this research.

References

- ABBASI, M.; POURRAJAB, B.; TOKHI, M. O. Protective effects of vitamins/antioxidants on occupational noise-induced hearing loss: A systematic review. **Journal of Occupational Health**, v. 63, n. 1, p. 1–11, 2021.
- AJAY, E.; GUNWARDENE, N.; RICHARDSON, R. Emerging therapies for human hearing loss. **Expert opinion on biological therapy**, v. 22, n. 6, p. 689–705, jun. 2022.
- ARENAS, J. P.; SUTER, A. H. Comparison of occupational noise legislation in the Americas: an overview and analysis. **Noise & health**, v. 16, n. 72, p. 306–319, 2014.

ASEA, A. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70. ROLE OF Toll-LIKE RECEPTOR (TLR) 2 AND TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15028–15034, 2002.

ASEA, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15028–34, 26 abr. 2002.

ATTIAS, J.; PRATT, H. Auditory evoked potentials and audiological follow-up of subjects developing noise-induced permanent threshold shift. **Audiology : official organ of the International Society of Audiology**, v. 23, n. 5, p. 498–508, 1984.

BAKER, T. G. et al. Heat Shock Protein-Mediated Protection Against Cisplatin-Induced Hair Cell Death. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 16, n. 1, p. 67–80, 2014.

BAO, J. et al. Prophylactic and therapeutic functions of drug combinations against noise-induced hearing loss. **Hearing Research**, v. 304, p. 33–40, 2013.

BARBE, M. F. et al. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. **Science (New York, N.Y.)**, v. 241, n. 4874, p. 1817–20, 30 set. 1988.

BASNER, M. et al. Auditory and non-auditory effects of noise on health. **The Lancet**, v. 383, p. 1325–1332, 2014.

BHARADWAJ, H.; SHINN-CUNNINGHAM, B. What's been hidden in hidden hearing loss. **Neuron**, v. 109, n. 6, p. 909–911, 17 mar. 2021.

BIELEFELD, E. C. et al. Noise protection with N-acetyl-l-cysteine (NAC) using a variety of noise exposures, NAC doses, and routes of administration. **Acta otolaryngologica**, v. 127, n. 9, p. 914–919, set. 2007.

BOBKOVA, N. V et al. Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of

- Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 38, n. 2, p. 425–35, 2014.
- BOHNE, B. A.; ZAHN, S. J.; BOZZAY, D. G. Damage to the Cochlea following Interrupted Exposure to Low Frequency Noise. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, v. 94, n. 2, p. 122–128, mar. 1985.
- BORGES, T. J. et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. MAY, p. 1–12, 2012.
- BRAMHALL, N. F. Use of the auditory brainstem response for assessment of cochlear synaptopathy in humans. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 150, n. 6, p. 4440–4451, 2021.
- BROVEDAN, M. A. et al. Glutamine protection in an experimental model of acetaminophen nephrotoxicity. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 96, n. 4, p. 366–371, abr. 2018.
- CANLON, B.; BORG, E.; FLOCK, A. Protection against noise trauma by pre-exposure to a low level acoustic stimulus. **Hearing research**, v. 34, n. 2, p. 197–200, 15 jul. 1988.
- CHANG, N.-C. et al. Association of polymorphisms of heat shock protein 70 with susceptibility to noise-induced hearing loss in the Taiwanese population. **Audiology & neuro-otology**, v. 16, n. 3, p. 168–174, 2011.
- CHANG, Y.-S. et al. Effects of early intratympanic steroid injection in patients with acoustic trauma caused by gunshot noise. **Acta oto-laryngologica**, v. 137, n. 7, p. 716–719, jul. 2017.
- CHEN, T. J.; CHIANG, H. C.; CHEN, S. S. Effects of aircraft noise on hearing and auditory pathway function of airport employees. **Journal of occupational**

medicine. : official publication of the Industrial Medical Association, v. 34, n. 6, p. 613–619, jun. 1992.

CHEN, Z. et al. Protection of auditory function against noise trauma with local caroverine administration in guinea pigs. **Hearing Research**, v. 197, n. 1–2, p. 131–136, 2004.

CIORBA, A. et al. The impact of hearing loss on the quality of elderly adults. **Clinical Interventions in Aging**, n. 7, p. 159–163, 2012.

CLIFFORD, R. E. et al. Low-dose D-methionine and N-acetyl-L-cysteine for protection from permanent noise-induced hearing loss in chinchillas.

Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, v. 145, n. 6, p. 999–1006, dez. 2011.

COLEMAN, J. et al. Dosing study on the effectiveness of salicylate/N-acetylcysteine for prevention of noise-induced hearing loss. **Noise & health**, v. 12, n. 48, p. 159–165, 2010.

COYAT, C. 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.

CRUZAT, V. et al. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–31, 2018.

CRUZAT, V. F. et al. Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 602–611, 2014.

CRUZAT, V. F. et al. Alanyl-glutamine improves pancreatic β -cell function following ex vivo inflammatory challenge. **The Journal of endocrinology**, v. 224, n. 3, p.

261–271, mar. 2015.

CUI, C.; LIU, D.; QIN, X. Attenuation of streptomycin ototoxicity by tetramethylpyrazine in guinea pig cochlea. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 152, n. 5, p. 904–911, 2015.

CUNNINGHAM, L. L.; BRANDON, C. S. Heat shock inhibits both aminoglycoside- and cisplatin-induced sensory hair cell death. **JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 7, p. 299–307, 2006.

DANIEL, E. Noise and hearing loss: A review. **Journal of School Health**, v. 77, n. 5, p. 225–231, 2007.

DECHESNE, C. J. et al. Expression of heat shock protein, HSP72, in the guinea pig and rat cochlea after hyperthermia: Immunochemical and in situ hybridization analysis. **Hearing Research**, v. 59, n. 2, p. 195–204, 1992.

DOOSTI, A. et al. Comparison of the effects of N-acetyl-cysteine and ginseng in prevention of noise induced hearing loss in male textile workers. **Noise & Health**, v. 16, n. 71, p. 223–227, 2014.

EKIMOVA, I. V et al. Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. **Journal of neurochemistry**, v. 115, n. 4, p. 1035–44, 2010.

FABIANI, M. et al. Auditory evoked potentials for the assessment of noise induced hearing loss. **Scandinavian audiology. Supplementum**, v. 48, p. 147–153, 1998.

FAIRFIELD, D. A. et al. Expression and localization of heat shock factor (Hsf) 1 in the rodent cochlea. **Hearing Research**, v. 173, n. 1–2, p. 109–118, 2002.

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.

FETONI, A. R. et al. Protective effects of N-acetylcysteine on noise- induced hearing loss in guinea pigs. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, v. 29, p. 70–75, 2009.

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.

FETONI, A. R. et al. Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: Oxidative stress and ROS signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 135, p. 46–59, maio 2019.

FOSTER, A. C.; JACQUES, B. E.; PIU, F. Hearing loss: The final frontier of pharmacology. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2022.

FRANCIS, S. P. et al. Celastrol inhibits aminoglycoside-induced ototoxicity via heat shock protein 32. **Cell death & disease**, v. 2, n. 8, p. e195, 2011.

FUJIOKA, M. et al. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. **Journal of neuroscience research**, v. 83, n. 4, p. 575–83, mar. 2006.

GONG, T. W. et al. Induction of heat shock proteins by hyperthermia and noise overstimulation in Hsf1^{-/-} mice. **JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 13, p. 29–37, 2012.

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.

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, M. A. et al. Therapeutic Effect of Dexamethasone for Noise-induced Hearing Loss: Systemic Versus Intratympanic Injection in Mice. **Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology**, v. 36, n. 5, p. 755–762, jun. 2015.

HARRISON, R. T. et al. Cochlear Preconditioning as a Modulator of Susceptibility to Hearing Loss. **Antioxidants & redox signaling**, v. 36, n. 16–18, p. 1215–1228, jun. 2022.

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, B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 1, p. 1–14, jan. 2010.

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.

HENDERSON, D.; HAMERNIK, R. P. Impulse noise: critical review. **The Journal of**

the **Acoustical Society of America**, v. 80, n. 2, p. 569–584, ago. 1986.

HONG, O. et al. Understanding and preventing noise-induced hearing loss. **Disease-a-month : DM**, v. 59, n. 4, p. 110–118, abr. 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Noise and Military Service: Implications for Hearing Loss and Tinnitus**. Washington, DC: The National Academies Press, 2006.

JENSEN, J. B. et al. Immediate and delayed cochlear neuropathy after noise exposure in pubescent mice. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0125160, 2015.

JIANG, H.; SHA, S.-H.; SCHACHT, J. NF-kB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 5, p. 644–651, 2005.

JOHNSON, J. D.; FLESHNER, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 3, p. 425–434, 30 dez. 2005.

JOY, G. J.; MIDDENDORF, P. J. Noise exposure and hearing conservation in U.S. coal mines--a surveillance report. **Journal of occupational and environmental hygiene**, v. 4, n. 1, p. 26–35, jan. 2007.

KIM, K. X. et al. Vesicular Glutamatergic Transmission in Noise-Induced Loss and Repair of Cochlear Ribbon Synapses. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 23, p. 4434–4447, jun. 2019.

KIM, M.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 105, p. 90–96, 2013.

KIM, Y. H. et al. Geranylgeranylacetone ameliorates acute cochlear damage caused by 3-nitropropionic acid. **NeuroToxicology**, v. 31, n. 3, p. 317–325, 2010.

KONINGS, A. et al. Variations in HSP70 genes associated with noise-induced

hearing loss in two independent populations. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 17, n. 3, p. 329–335, 2009.

KONINGS, A.; VAN LAER, L.; VAN CAMP, G. Genetic studies on noise-induced hearing loss: a review. **Ear and hearing**, v. 30, n. 2, p. 151–159, 2009.

KONRAD-MARTIN, D. et al. Age-related changes in the auditory brainstem response. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 23, n. 1, p. 15–18, jan. 2012.

KOPELOVICH, J. C. et al. Risk factors for loss of ipsilateral residual hearing after hybrid cochlear implantation. **Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology**, v. 35, n. 8, p. 1403–1408, set. 2014.

KOPKE, R. et al. Efficacy and safety of N-acetylcysteine in prevention of noise induced hearing loss: A randomized clinical trial. **Hearing Research**, v. 323, p. 40–50, 2015.

KRAMER, S. et al. Efficacy of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in protecting ears exposed to loud music. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 17, n. 4, p. 265–278, abr. 2006.

KRAUSE, M. et al. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 18, n. 4, p. 374–80, 2015a.

KRAUSE, M. et al. The Chaperone Balance Hypothesis : The Importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio to Inflammation-Driven Type 2 Diabetes , the Effect of Exercise , and the Implications for Clinical Management. **Mediators of inflammation**, v. 2015, n. ID 2492205, p. 12, 2015b.

- KRAUSE, M.; RODRIGUES-KRAUSE, J. D. C. Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: Possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 2, p. 286–290, 2011.
- KUJAWA, S. G.; LIBERMAN, M. C. Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 2115–2123, fev. 2006.
- KUJAWA, S. G.; LIBERMAN, M. C. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 45, p. 14077–14085, nov. 2009.
- LAVINSKY, J. et al. Genome-Wide Association Study Identifies Nox3 as a Critical Gene for Susceptibility to Noise-Induced Hearing Loss. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1–21, 2015.
- LAYMAN, W. S. et al. Histone deacetylase inhibition protects hearing against acute ototoxicity by activating the Nf- κ B pathway. **Cell death discovery**, v. 1, n. 15012, jan. 2015.
- LE PRELL, C. G. Effects of noise exposure on auditory brainstem response and speech-in-noise tasks: a review of the literature. **International journal of audiology**, v. 58, n. sup1, p. S3–S32, fev. 2019.
- LE PRELL, C. G. Investigational Medicinal Products for the Inner Ear: Review of Clinical Trial Characteristics in ClinicalTrials.gov. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 32, n. 10, p. 670–694, nov. 2021.

- LE PRELL, C. G. Prevention of Noise-Induced Hearing Loss Using Investigational Medicines for the Inner Ear: Previous Trial Outcomes Should Inform Future Trial Design. **Antioxidants & redox signaling**, v. 36, n. 16–18, p. 1171–1202, jun. 2022.
- LE, T. N. et al. Current insights in noise-induced hearing loss: a literature review of the underlying mechanism, pathophysiology, asymmetry, and management options. **Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery**, v. 46, n. 1, p. 41, 23 dez. 2017.
- LI, Y. et al. Polymorphisms of heat shock protein 70 genes (HSPA1A , HSPA1B and HSPA1L) and susceptibility of noise-induced hearing loss in a Chinese population : A case-control study. p. 1–12, 2017.
- LIBERMAN, M. C. et al. Toward a Differential Diagnosis of Hidden Hearing Loss in Humans. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162726, 2016.
- LIM, H. H. et al. Detection of HSP 72 synthesis after acoustic overstimulation in rat cochlea. **Hearing research**, v. 69, p. 146–150, 1993.
- LINDBLAD, A.-C. et al. The efficacy of N-acetylcysteine to protect the human cochlea from subclinical hearing loss caused by impulse noise: a controlled trial. **Noise & health**, v. 13, n. 55, p. 392–401, 2011.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The Heat-Shock Proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, n. 1, p. 631–677, dez. 1988.
- LISSARASSA, Y. P. S. et al. Chronic heat treatment positively impacts metabolic profile of ovariectomized rats: association with heat shock response pathways. **Cell Stress and Chaperones**, v. 25, n. 3, p. 467–479, 2020.
- LIU, Y. et al. 17-DMAG induces Hsp70 and protects the auditory hair cells from kanamycin ototoxicity in vitro. **Neuroscience letters**, v. 588, p. 72–7, 19 mar. 2015.

- LO, W. C. et al. Dose-dependent effects of d-methionine for rescuing noise-induced permanent threshold shift in guinea-pigs. **Neuroscience**, v. 254, p. 222–229, 2013.
- LOOI, L. M. et al. Hearing loss: a global health issue. **The Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 943–944, 2015.
- LOPEZ, I. A. et al. Immunohistochemical techniques for the human inner ear. **Histochemistry and cell biology**, v. 146, n. 4, p. 367–387, out. 2016.
- LORITO, G. et al. Different strategies in treating noise-induced hearing loss with N-acetylcysteine. **Medical Science Monitor**, v. 14, n. 8, p. 159–165, 2008.
- LUO, L. L. et al. L-glutamine protects mouse brain from ischemic injury via up-regulating heat shock protein 70. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 25, n. 9, p. 1030–1041, 2019.
- MAHALE, A. et al. Histopathologic and immunohistochemical features of capsular tissue around failed Ahmed glaucoma valves. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187506, 9 nov. 2017.
- MANOHAR, S. et al. Unexpected Consequences of Noise-Induced Hearing Loss: Impaired Hippocampal Neurogenesis, Memory, and Stress. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 16, p. 871223, 2022.
- MAO, H.; CHEN, Y. Noise-Induced Hearing Loss: Updates on Molecular Targets and Potential Interventions. **Neural Plasticity**, v. 2021, 2021.
- MATHEW, A.; MORIMOTO, R. I. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 99–111, 1998.
- MEHRAEI, G. et al. Auditory brainstem response latency in noise as a marker of cochlear synaptopathy. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 13, p. 3755–3764, 2016.

MEIRA, T. C.; SANTANA, V. S.; FERRITE, S. Gender and other factors associated with the use of hearing protection devices at work. **Revista de saúde pública**, v. 49, p. 1–8, jan. 2015.

MIKURIYA, T. et al. Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. **Brain Research**, v. 1065, n. 1–2, p. 107–114, 2005.

MIKURIYA, T. et al. Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone. **Brain Research**, v. 1212, p. 9–17, 2008.

MUKHERJEA, D. et al. Early investigational drugs for hearing loss. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 24, n. 01, p. 1–17, 2014.

MUKHERJEA, D. et al. Strategies to reduce the risk of platinum containing antineoplastic drug-induced ototoxicity. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 16, n. 10, p. 965–982, out. 2020.

MYERS, M. W. et al. Expression of the Major Mammalian Stress Protein in the Rat Cochlea Following Transient Ischemia. **The Laryngoscope**, v. 102, n. 9, p. 981–987, set. 1992.

NÄGELI, M. et al. Prolonged continuous intravenous infusion of the dipeptide L-alanine- L-glutamine significantly increases plasma glutamine and alanine without elevating brain glutamate in patients with severe traumatic brain injury. **Critical care (London, England)**, v. 18, n. 4, p. R139, jul. 2014.

NEAL, C. et al. Hair cell counts in a rat model of sound damage: Effects of tissue preparation & identification of regions of hair cell loss. **Hearing Research**, v. 328, p. 120–132, 2015.

NEELY, J. G.; THOMPSON, A. M.; GOWER, D. J. Detection and localization of heat

shock protein 70 in the normal guinea pig cochlea. **Hearing Research**, v. 52, n. 2, p. 403–406, 1991.

NEUFELD, A. et al. Prospective, randomized controlled assessment of the short- and long-term efficacy of a hearing conservation education program in Canadian elementary school children. **The Laryngoscope**, v. 121, n. 1, p. 176–181, jan. 2011.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 153–163, 2003.

NUTTALL, A. L. Sound-Induced Cochlear Ischemia/Hypoxia as a Mechanism of Hearing Loss. **Noise & health**, v. 2, n. 5, p. 17–32, jan. 1999.

OGUCHI, T. et al. Inner hair cells of mice express the glutamine transporter SAT1. **Hearing Research**, v. 292, n. 1–2, p. 59–63, 2012.

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.

PETRY, É. R. et al. Oral glutamine supplementation attenuates inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: Role of 70 kDa heat shock protein. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 145, n. September, p. 87–102, 2019a.

PETRY, É. R. et al. Oral glutamine supplementation attenuates inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: Role of 70 kDa heat shock protein. **Free radical biology & medicine**, v. 145, p. 87–102, dez. 2019b.

PIERSON, L. L. et al. Relationship between outer ear resonance and permanent noise-induced hearing loss. **American journal of otolaryngology**, v. 15, n. 1, p.

37–40, 1994.

POIRRIER, A L. et al. Oxidative stress in the cochlea: an update. **Current medicinal chemistry**, v. 17, p. 3591–3604, 2010.

PRENDERGAST, G. et al. Effects of noise exposure on young adults with normal audiograms I: Electrophysiology. **Hearing Research**, v. 344, p. 68–81, 1 fev. 2017.

PUSHPALATHA, Z. V.; KONADATH, S. Auditory brainstem responses for click and CE-chirp stimuli in individuals with and without occupational noise exposure. **Noise & health**, v. 18, n. 84, p. 260–265, 2016.

QI, G. et al. Morphology changes in the cochlea of impulse noise-induced hidden hearing loss. **Acta oto-laryngologica**, v. 142, n. 6, p. 455–462, jun. 2022.

RABINOWITZ, P. M. et al. Audiogram notches in noise-exposed workers. **Ear and hearing**, v. 27, n. 6, p. 742–750, dez. 2006.

RAMKUMAR, V. et al. Oxidative stress and inflammation caused by cisplatin ototoxicity. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2021.

REN, H.; HU, B.; JIANG, G. Advancements in prevention and intervention of sensorineural hearing loss. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 13, p. 20406223221104988, 2022.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 571–573, 1 dez. 1962.

ROGERO, M. M. et al. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition**, v. 22, n. 5, p. 564–571, 2006.

ROPELESKI, M. J. et al. Anti-apoptotic effects of L-glutamine-mediated transcriptional modulation of the heat shock protein 72 during heat shock.

Gastroenterology, v. 129, n. 1, p. 170–184, jul. 2005.

ROTH, E. Nonnutritive effects of glutamine. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 10, p. 2025S-2031S, 2008.

ROY, S. et al. Sound preconditioning therapy inhibits ototoxic hearing loss in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 11, p. 4945–4949, 2013.

RYAN, A. F.; SCHWARTZ, I. R. Preferential glutamine uptake by cochlear hair cells: implications for the afferent cochlear transmitter. **Brain research**, v. 290, n. 2, p. 376–9, 9 jan. 1984.

RYBAK, L. P. et al. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 219, n. 3, p. 177–86, 2009.

SANO, H. et al. Effect of geranylgeranylacetone on gentamycin ototoxicity in rat cochlea culture. **Auris Nasus Larynx**, v. 34, n. 1, p. 1–4, 2007.

SANZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Utility of auditory steady-state and brainstem responses in age-related hearing loss in rats. **Acta oto-laryngologica**, v. 135, n. 1, p. 35–41, jan. 2015.

SEIBERT, P. et al. Increased eHSP70-to-iHSP70 ratio in prediabetic and diabetic postmenopausal women: a biomarker of cardiometabolic risk. **Cell stress & chaperones**, jun. 2022.

SHA, S. H. et al. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. **Hearing research**, v. 155, n. 1–2, p. 1–8, 2001.

SHEHABI, A. M.; PRENDERGAST, G.; PLACK, C. J. The Relative and Combined Effects of Noise Exposure and Aging on Auditory Peripheral Neural Deafferentation:

A Narrative Review. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 14, p. 877588, 2022.

SHI, L. et al. Cochlear Synaptopathy and Noise-Induced Hidden Hearing Loss.

Neural plasticity, v. 2016, p. 6143164, 2016.

SIMPSON, A. N. et al. Time From Hearing Aid Candidacy to Hearing Aid Adoption: A Longitudinal Cohort Study. **Ear and hearing**, v. 40, n. 3, p. 468–476, 2019.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. 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.

SLIWINSKA-KOWALSKA, M.; PAWELCZYK, M. Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review. **Mutation research**, v. 752, n. 1, p. 61–5, 2013.

SLY, D. J. et al. Applying Neurotrophins to the Round Window Rescues Auditory Function and Reduces Inner Hair Cell Synaptopathy After Noise-induced Hearing Loss. **Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology**, v. 37, n. 9, p. 1223–1230, out. 2016.

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**, v. 86, n. 6, p. 703–710, 2020.

SONE, M. et al. Upregulation of HSP by geranylgeranylacetone protects the cochlear lateral wall from endotoxin-induced inflammation. **Hearing Research**, v. 204, n. 1–2, p. 140–146, 2005.

SUGAHARA, K. et al. Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of

sensory hair cells against acoustic overexposure. **Hearing Research**, v. 182, p. 88–96, 2003.

TALEB, M. et al. Hsp70 inhibits aminoglycoside-induced hearing loss and cochlear hair cell death. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, p. 427–437, 2009.

VALERO, M. D. et al. Noise-induced cochlear synaptopathy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Hearing research**, v. 353, p. 213–223, set. 2017.

VALERO, M. D.; HANCOCK, K. E.; LIBERMAN, M. C. The middle ear muscle reflex in the diagnosis of cochlear neuropathy. **Hearing research**, v. 332, p. 29–38, fev. 2016.

VARGHESE, F. et al. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96801, 6 maio 2014.

VERBEEK, J. H. et al. Interventions to prevent occupational noise induced hearing loss. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 3, p. CD006396, jul. 2009.

VERBEEK, J. H. et al. Interventions to prevent occupational noise-induced hearing loss: A Cochrane systematic review. **International journal of audiology**, v. 53, n. 02, p. S84–S96, 2014.

WANG, Y.; HIROSE, K.; LIBERMAN, M. C. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO**, v. 3, n. 3, p. 248–268, set. 2002.

WANG, Y.; LIBERMAN, M. C. Restraint stress and protection from acoustic injury in mice. **Hearing Research**, v. 165, n. 1–2, p. 96–102, 2002.

WHO. **World Report On Hearing**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Deafness and Hearing Loss**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>>. Acesso em: 29 maio. 2017.

XIAO, X. et al. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. **EMBO Journal**, v. 18, n. 21, p. 5943–5952, 1999.

YANG, M. et al. Association of hsp70 polymorphisms with risk of noise-induced hearing loss in Chinese automobile workers. **Cell stress & chaperones**, v. 11, n. 3, p. 233–239, 2006.

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.

YURINSKAYA, M. et al. The Fate of Exogenous Human HSP70 Introduced into Animal Cells by Different Means. 2015.

ZHU, G. et al. Hsp70/Bmi1-FoxO1-SOD Signaling Pathway Contributes to the Protective Effect of Sound Conditioning against Acute Acoustic Trauma in a Rat Model. **Neural Plasticity**, v. 2020, 2020.

ZONG, S. et al. Association of polymorphisms in heat shock protein 70 genes with the susceptibility to noise-induced hearing loss: A meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188195, 16 nov. 2017.

ZUO, H. et al. Changes in Guinea Pig Cochlear Hair Cells after Sound Conditioning and Noise Exposure. **Journal of Occupational Health**, v. 50, n. 5, p. 373–379, 2008.

2.6 DISCUSSÃO

A perda auditiva é um grande problema de saúde global com cerca de meio bilhão de pessoas sofrendo com perda auditiva incapacitante. Além disso, ela tem sido apontada como um importante fator de risco para o desenvolvimento de demência e está fortemente associada a distúrbios psicológicos, como depressão, isolamento social em idosos, e impacta negativamente na qualidade de vida das pessoas e em sua comunicação. Apesar do impacto significativo da perda auditiva em todos os segmentos da população, atualmente não existem tratamentos farmacológicos aprovados. Conseqüentemente, o desenvolvimento de terapias medicamentosas eficazes que possam interromper a perda auditiva, preveni-la ou restaurar a compreensão auditiva de alta qualidade teria um grande impacto na saúde humana, pois atualmente as principais terapias para a perda auditiva são o uso de aparelhos de amplificação sonora individual e os implantes cocleares (FOSTER; JACQUES; PIU, 2022).

A forma mais comum de perda auditiva em todo o mundo é a perda auditiva sensorioneural e o desenvolvimento de medicamentos para tratá-la ou preveni-la tem se mostrado desafiador. Muitas pesquisas têm procurado caracterizar os mecanismos bioquímicos, moleculares e intracelulares tanto na função auditiva no estado normal quanto nos processos patológicos. Na última década, instituições acadêmicas e empresas farmacêuticas em todo o mundo começaram levantar recursos para o desenvolvimento de terapias para a perda auditiva sensorioneural. Esses esforços combinados resultaram em uma explosão relativamente recente de ensaios clínicos e aumentou a esperança de que essas terapias emergentes possam ter uso clínico em breve (AJAY; GUNWARDENE; RICHARDSON, 2022).

À procura destas novas terapias para a perda auditiva, muitos estudos têm avaliado a resposta de choque térmico, via HSP70, na orelha interna, que tem demonstrado grande poder de otoproteção. Dessa forma, o entendimento molecular do papel das HSP70 na orelha interna é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias.

A L-glutamina e o seu dipeptídeo alanilglutamina estão associadas com potencialização da expressão de HSP70, em vários tecidos (CRUZAT et al., 2014,

2015; HAMIEL et al., 2009; PETRY et al., 2019; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007), diminuindo a vulnerabilidade tecidual ao estresse oxidativo. Em cócleas, há muito tempo foi demonstrada a captação de glutamina (RYAN; SCHWARTZ, 1984), pela presença de transportador de glutamina SAT1 nas células ciliares internas (OGUCHI et al., 2012).

Pensando nisso, nosso grupo de pesquisa em 2020 realizou a primeira publicação da avaliação da alanilglutamina na orelha interna de ratos, e sua relação com a resposta de choque térmico, pela HSP70. Este estudo demonstrou que a alanilglutamina oral, administrada diariamente por 21 dias, sendo 7 dias antes até 14 dias após a exposição do ruído, foi capaz de diminuir medidas inflamatórias de resposta de choque térmico (via HSP70) a nível coclear e sistêmico nos animais, utilizando pool de cócleas inteiras (SOARES et al., 2020). Este estudo não evidenciou indução de HSP70 em regiões específicas cocleares. Portanto, no projeto deste doutoramento, deu-se seguimento ao estudo com análise histológica da orelha interna.

Desta forma, pela primeira vez, identificamos que a alanilglutamina foi capaz de aumentar as concentrações de HSP70, nas células ciliadas, gânglio espiral e estria vascular, 6 horas após a sua administração. Em nosso estudo descrito previamente, observamos efeitos anti-inflamatórios da alanilglutamina à nível coclear e sistêmico frente a exposição a ruído, mas não foi possível avaliar a sua indução de expressão coclear de HSP70 no grupo exclusivamente tratado com esta substância (SOARES et al., 2020). Por outro lado, os efeitos anti-inflamatórios evidenciados em nossa pesquisa e a evidência de indução de HSP70 em outros tecidos pela alanilglutamina (PETRY et al., 2014, 2019), nos motivaram a prosseguir na pesquisa desta substância, principalmente para evidenciar a sua indução à nível coclear, com avaliação imuno-histoquímica, capaz de individualizar as estruturas dentro da cóclea.

Tem se demonstrado que a indução de HSP70 pela L-glutamina protege contra o dano em diferentes órgãos, como músculo, rim, intestino, pâncreas, fígado e pulmão (BROVEDAN et al., 2018; CRUZAT et al., 2018, 2015; PETRY et al., 2019; ROPELESKI et al., 2005). Recentemente, *Luo et al* (2019) demonstrou que a alanilglutamina protege contra um dano isquêmico cerebral, mediada pela indução de HSP70, associada a redução de estresse oxidativo e apoptose neuronal, além de

aumento nos níveis de superóxido dismutase, glutatona e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (LUO et al., 2019).

A glutamina é captada pelas células ciliadas internas da cóclea pelo transportador SAT1 (OGUCHI et al., 2012). Além da participação da maquinaria antioxidante e atuar como precursor da glutatona (CRUZAT et al., 2018), a glutamina dentro destas células é transformada em glutamato, pela enzima glutaminase, para ser liberada na fenda sináptica. O ciclo glutamato-glutamina ocorre entre as células ciliadas e células de suporte da cóclea para neurotransmissão para nervo auditivo (OGUCHI et al., 2012). Estudos têm demonstrado que o ruído intenso leva a um excessivo acúmulo de glutamato na fenda sináptica entre as células ciliadas internas e contribuem para deterioração aguda e crônica das vias auditivas, chamado de excitotoxicidade (KIM et al., 2019). Por outro lado, a administração de alanilglutamina, na concentração de 0,75 g/kg, aumentou a glutamina plasmática sem aumentar o glutamato encefálico, demonstrando que a administração de alanilglutamina não está associada com injúria cerebral mediada pela excitotoxicidade (NÄGELI et al., 2014).

A glutamina é o aminoácido mais abundante e versátil do corpo, e em situações de estresse, sua concentração plasmática pode cair, e sua suplementação se mostra benéfica em muitas situações de estresse (CRUZAT et al., 2018). Há muito tempo foi demonstrada a sua captação e participação no metabolismo das células ciliadas (RYAN; SCHWARTZ, 1984). Parte da glutamina captada é utilizada para neurotransmissão na sinapse entre as células ciliadas internas e nervo auditivo, porém se evidenciou que a glutamina possui efeitos anti-inflamatórios na cóclea e a nível sistêmico frente ao ruído intenso como fator estressor, o que demonstra outra função deste aminoácido a nível coclear (SOARES et al., 2020). O presente estudo demonstra que a alanilglutamina, por si só, foi capaz de induzir a expressão da HSP70, que sabidamente é citoprotetora na cóclea e audição. Além disso, sua expressão foi elevada em neurônios do gânglio espiral e estria vascular. Este achado sugere que a alanilglutamina possa atuar como possível citoprotetor contra fatores estressores cocleares e das vias auditivas, como a ruído intenso e substâncias ototóxicas, sendo um potencial agente terapêutico a ser estudado em proteção auditiva.

Em nosso estudo também foi evidenciado o aumento da expressão de HSP70 em cócleas com o choque térmico em todo o corpo, como já observado em outros estudos (GONG et al., 2012; YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999). Porém, pela primeira vez se identificou o aumento de HSP70 após choque térmico em áreas específicas da orelha interna, nomeadamente nas células ciliadas, neurônios do gânglio espiral e estria vascular. Gong *et al* evidenciou a expressão de HSP70 em *pool* de cócleas inteiras, sem discriminação das estruturas intracocleares, pela técnica de RT-PCR. Yoshida *et al* demonstrou proteção auditiva em ratos expostos a 100dB NPS por 2 horas, quando realizado o choque térmico em todos o corpo 6 e 12 h antes da exposição ao ruído, tendo relação deste fator otoprotetor com o aumento da expressão de HSP70 na cóclea. Porém, este estudo também utilizou o pool de cócleas inteiras, sem individualizar a expressão de HSP70 em cada estrutura dentro da cóclea (YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999).

Várias estratégias em otoproteção têm sido estudadas, nos diferentes fatores estressores, e a indução de HSP70 em nível coclear parece ser um alvo promissor (MUKHERJEA et al., 2020). Apesar de alguns estudos em animais mostrarem otoproteção com choque térmico em todo corpo (hipertermia) realizado antes de um fator estressor coclear (CUNNINGHAM; BRANDON, 2006; YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999), em humanos ainda não há estudos, e parece ser um campo favorável para ser pesquisado.

Além disso, pela primeira vez foi utilizada a técnica de análise quantitativa através do plugin IHC-Profiler do software gratuito ImageJ®, através de deconvolução de cor, em cócleas. Isto abre possibilidade de novos estudos envolvendo a cóclea na análise de inúmeras substâncias através da imunohistoquímica pelo método da parafina.

Após nossa demonstração de indução da alanilglutamina nas estruturas intracocleares, iniciamos o estudo para avaliar se a administração prévia de alanilglutamina a uma exposição ao ruído poderia ter função otoprotetora. Foi evidenciado que a administração única de alanilglutamina na dose de 1,5 g/kg, administrada 6 horas antes da exposição a ruído, na mesma dose e tempo que demonstramos a sua indução coclear, demonstrou maior recuperação auditiva entre o primeiro dia e 14º. dia após exposição ao ruído, além de diminuir a latência da onda

P4 e demonstrar menor lesão dos neurônios do gânglio espiral, 14 dias após a exposição ao ruído.

Neste estudo, foi utilizado o teste de PEATE para avaliação auditiva dos animais. Os estímulos de cliques e tons puros são comumente usados no exame. O estímulo de clique tem uma alta reprodutibilidade e estabilidade no formato das ondas, sendo um dos estímulos mais comuns nos estudos clínicos. Em humanos, a avaliação auditiva com cliques, corresponde ao espectro de frequência de 2000-4000 Hz, enquanto em ratos o clique corresponde à avaliação espectral de 8000-10000 Hz. A possível explicação para este fato, segundo os autores, são as diferenças anatômicas da orelha entre homens e o rato (SANZ-FERNÁNDEZ et al., 2015). Portanto, em nosso estudo, o estímulo com clique pareceu adequado para avaliação coclear devido a sua ótima reprodutibilidade.

Neste experimento, considerando os grupos expostos ao ruído, o tratamento com alanilglutamina não foi capaz de melhorar os limiares auditivos em comparação ao grupo sem tratamento, tanto na perda auditiva temporária e permanente. A média de diferença de limiar auditivo no grupo Ruído no 14^o. dia foi maior que o grupo Alanilglutamina, porém não houve diferença entre estes grupos ($P=0,0575$).

Ao considerar a recuperação auditiva da perda transitória para a perda permanente, ou seja, a diferença de limiar auditivo entre o primeiro dia após exposição ao ruído até o 14^o. dia, a melhora auditiva do grupo Alanilglutamina foi maior que no grupo Ruído (22,5dB NA vs. 9dB NA, respectivamente).

Na análise de latência da onda P4 entre os grupos, houve valores de latências equivalentes do grupo Alanilglutamina e Controle, enquanto o grupo Ruído teve latência maior. A onda P4 em ratos equivale a onda V em humanos (MEHRAEI et al., 2016) e equivale ao potencial de ação no lemnisco lateral e/ou colículo inferior. Estudos demonstram que a exposição ao ruído aumenta a latência da onda V em humanos, mesmo com audiometria tonal normal (ATTIAS; PRATT, 1984; CHEN; CHIANG; CHEN, 1992; FABIANI et al., 1998; KONRAD-MARTIN et al., 2012; LE PRELL, 2019; PRENDERGAST et al., 2017; PUSHPALATHA; KONADATH, 2016). Este fato demonstra que a ruído causa lesão neural mesmo antes de alterar os limiares audiométricos, e pode ser evidenciado por testes eletrofisiológicos como o PEATE. Nosso estudo demonstrou que a alanilglutamina foi capaz de diminuir a

latência da P4 em ratos, na perda auditiva permanente, mesmo com a exposição ao ruído, fato que demonstra menor lesão neural na via auditiva, através de teste eletrofisiológico.

Avaliação de amplitude de P1 tem sido utilizada para avaliação de sinaptopatia entre as células ciliadas internas e fibras aferentes auditivas (BRAMHALL, 2021). Nos grupos expostos ao ruído (grupos Ruído e Alanilglutamina), houve diminuição da amplitude de P1 em relação ao controle, mas não houve diferença entre os grupos Ruído e Alanilglutamina.

A avaliação histológica coclear nos permite quantificar e analisar as estruturas em diferentes regiões cocleares. Apesar de se observar diferenças histológicas entre o órgão de Corti, o uso da técnica de cortes histológicos traz dificuldades para quantificar as células ciliadas viáveis, pois estas estão distribuídas em forma tridimensional, sendo melhor avaliadas na técnica whole-mount (JENSEN et al., 2015; NEAL et al., 2015). Apesar disso, visualmente observou-se maior lesão no órgão de Corti nos grupos expostos ao ruído. Por outro lado, regiões do gânglio espiral e fibras auditivas do modíolo são facilmente visualizadas e quantificadas com cortes histológicos em parafina, conforme realizado em nosso estudo.

Em análise dos neurônios do gânglio espiral, a alanilglutamina foi capaz de proteger a lesão neural nesta estrutura em comparação com o grupo Ruído, apesar de a densidade celular no gânglio espiral não ter atingido valores do controle. No grupo Ruído, além da diminuição da densidade de neurônios no gânglio espiral, houve uma diminuição da mielinização em relação ao grupo controle. Por outro lado, não houve diferença de densidade das células de Schwann entre os grupos Alanilglutamina e Controle. A neuropatia da perda permanente induzida pelo ruído está relacionado com perda imediata da sinapses aferentes da células ciliadas internas e de diminuição mais tardia dos neurônios do gânglio espiral (JENSEN et al., 2015). Nosso estudo demonstrou, que o ruído branco de amplo espectro de frequência a 124 dB NPS por 2 horas, foi capaz de causar dano permanente no gânglio espiral e mielinização das fibras auditivas aferentes após 14 dias da exposição, e que a alanilglutamina atenuou esta lesão neural, com maior preservação dos neurônios do gânglio espiral em relação ao grupo não tratado e exposto ao ruído.

Atualmente, sabe-se que o ruído, pode causar alterações neurais, mesmo antes de causar lesões estruturais ao órgão de Corti, especialmente na comunicação sináptica entre as células ciliadas internas e fibras auditivas aferentes. Em nosso estudo, apesar de não encontrarmos diferença significativa entre os limiares auditivos entre os grupos Ruído e Alanilglutamina 14 dias após a exposição ao ruído, os achados de diminuição da latência de P4 e menor dano aos neurônios do gânglio espiral no grupo tratado com alanilglutamina, além da demonstração da mielinização das fibras auditivas deste grupo estar semelhante ao grupo Controle, demonstram que esta substância pode ter poder de otoproteção, especialmente nas vias auditivas neurais, e merece atenção especial em mais estudos para evidenciar melhor dose e tempo para melhor proteção auditiva. Apesar de poucos estudos com glutamina em otoproteção e/ou neuroproteção, já se evidenciou que ela possui efeitos anti-inflamatórios na cóclea (SOARES et al., 2020) e efeitos neuroprotetores no sistema nervoso central contra um processo isquêmico (LUO et al., 2019).

Nosso estudo teve como limitação a dificuldade de quantificar o grau de lesão nas células ciliadas, devido ao uso da técnica de cortes histológicos em parafina. Por outro lado, foi possível ter ótima avaliação do gânglio espiral e células de Schwann. Além disso, os dados audiológicos do PEATE nos trazem informações sobre o status auditivo dos animais, suprimindo em parte a dificuldade de avaliação das células ciliadas. Por fim, este estudo abre um caminho para novas avaliações com a alanilglutamina na PAIR, um problema de extrema importância em Saúde Pública no mundo, visto que até hoje não temos tratamento para ela (FOSTER; JACQUES; PIU, 2022).

Da perspectiva de Saúde Pública, é necessário aumentar a consciência populacional sobre as potenciais consequências a longo prazo do ruído na audição humana, sendo fundamental educar e motivar os indivíduos a proteger sua audição. Do ponto de vista científico, frente a uma necessidade urgente de terapias para perda auditiva e pela impossibilidade de avaliação histopatológica da orelha interna em humanos vivos, a análise da função supraliminar de amplitude e latências das ondas pelos testes eletrofisiológicos merece ser avaliada de maneira padronizada e potencialmente usada para inferir a função de estruturas celulares específicas quando

interpretada como parte dos testes eletrofisiológicos como o PEATE, e não somente avaliando os limiares auditivos.

Por fim, o conjunto de experimentos deste doutoramento traz novos conhecimentos dos efeitos da alanilglutamina e do choque térmico na perda auditiva pelo ruído em ratos e sua relação com a resposta de choque térmico, e estimula mais pesquisas com esta substância na proteção auditiva frente aos estressores cocleares, principalmente o ruído.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Demonstramos, pela primeira vez, que a alanilglutamina e o choque térmico em todo o corpo foram capazes de aumentar as concentrações de HSP70 em várias regiões específicas da orelha interna sugerindo que estes agentes podem ser potenciais agentes terapêuticos em otoproteção, via resposta de choque térmico, criando um campo para futuros estudos na preservação auditiva. Além disso, a alanilglutamina demonstrou melhora de parâmetros auditivos eletrofisiológicos, com maior recuperação auditiva e diminuição da latência da onda P4, e histológicos, com menor lesão dos neurônios do gânglio espiral, 14 dias após a exposição ao ruído. Desta forma, esta substância parece promissora na proteção auditiva e merece maior investigação para melhor esclarecimento sobre sua capacidade de otoproteção.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M.; POURRAJAB, B.; TOKHI, M. O. Protective effects of vitamins/antioxidants on occupational noise-induced hearing loss: A systematic review. **Journal of Occupational Health**, v. 63, n. 1, p. 1–11, 2021.
- AJAY, E.; GUNWARDENE, N.; RICHARDSON, R. Emerging therapies for human hearing loss. **Expert opinion on biological therapy**, v. 22, n. 6, p. 689–705, jun. 2022.
- ARENAS, J. P.; SUTER, A. H. Comparison of occupational noise legislation in the Americas: an overview and analysis. **Noise & health**, v. 16, n. 72, p. 306–319, 2014.
- ASEA, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15028–34, 26 abr. 2002.
- ATTIAS, J.; PRATT, H. Auditory evoked potentials and audiological follow-up of subjects developing noise-induced permanent threshold shift. **Audiology : official organ of the International Society of Audiology**, v. 23, n. 5, p. 498–508, 1984.
- BAO, J. et al. Prophylactic and therapeutic functions of drug combinations against noise-induced hearing loss. **Hearing Research**, v. 304, p. 33–40, 2013.
- BARBE, M. F. et al. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. **Science (New York, N.Y.)**, v. 241, n. 4874, p. 1817–20, 30 set. 1988.
- BASNER, M. et al. Auditory and non-auditory effects of noise on health. **The Lancet**, v. 383, p. 1325–1332, 2014.
- BHARADWAJ, H.; SHINN-CUNNINGHAM, B. What's been hidden in hidden hearing loss. **Neuron**, v. 109, n. 6, p. 909–911, 17 mar. 2021.
- BIELEFELD, E. C. et al. Noise protection with N-acetyl-l-cysteine (NAC) using a variety of noise exposures, NAC doses, and routes of administration. **Acta otolaryngologica**, v. 127, n. 9, p. 914–919, set. 2007.
- BOBKOVA, N. V et al. Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 38, n. 2, p. 425–35, 2014.
- BOHNE, B. A.; ZAHN, S. J.; BOZZAY, D. G. Damage to the Cochlea following Interrupted Exposure to Low Frequency Noise. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, v. 94, n. 2, p. 122–128, mar. 1985.
- BORGES, T. J. et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. MAY, p. 1–12, 2012.

BRAMHALL, N. F. Use of the auditory brainstem response for assessment of cochlear synaptopathy in humans. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 150, n. 6, p. 4440–4451, 2021.

BROVEDAN, M. A. et al. Glutamine protection in an experimental model of acetaminophen nephrotoxicity. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 96, n. 4, p. 366–371, abr. 2018.

CANLON, B.; BORG, E.; FLOCK, A. Protection against noise trauma by pre-exposure to a low level acoustic stimulus. **Hearing research**, v. 34, n. 2, p. 197–200, 15 jul. 1988.

CHANG, N.-C. et al. Association of polymorphisms of heat shock protein 70 with susceptibility to noise-induced hearing loss in the Taiwanese population. **Audiology & neuro-otology**, v. 16, n. 3, p. 168–174, 2011.

CHANG, Y.-S. et al. Effects of early intratympanic steroid injection in patients with acoustic trauma caused by gunshot noise. **Acta oto-laryngologica**, v. 137, n. 7, p. 716–719, jul. 2017.

CHEN, T. J.; CHIANG, H. C.; CHEN, S. S. Effects of aircraft noise on hearing and auditory pathway function of airport employees. **Journal of occupational medicine. : official publication of the Industrial Medical Association**, v. 34, n. 6, p. 613–619, jun. 1992.

CHEN, Z. et al. Protection of auditory function against noise trauma with local caroverine administration in guinea pigs. **Hearing Research**, v. 197, n. 1–2, p. 131–136, 2004.

CIORBA, A. et al. The impact of hearing loss on the quality of elderly adults. **Clinical Interventions in Aging**, n. 7, p. 159–163, 2012.

CLIFFORD, R. E. et al. Low-dose D-methionine and N-acetyl-L-cysteine for protection from permanent noise-induced hearing loss in chinchillas. **Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 145, n. 6, p. 999–1006, dez. 2011.

COLEMAN, J. et al. Dosing study on the effectiveness of salicylate/N-acetylcysteine for prevention of noise-induced hearing loss. **Noise & health**, v. 12, n. 48, p. 159–165, 2010.

COYAT, C. 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.

CRUZAT, V. et al. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–31, 2018.

CRUZAT, V. F. et al. Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation

attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 602–611, 2014.

CRUZAT, V. F. et al. Alanyl-glutamine improves pancreatic β -cell function following ex vivo inflammatory challenge. **The Journal of endocrinology**, v. 224, n. 3, p. 261–271, mar. 2015.

CUNNINGHAM, L. L.; BRANDON, C. S. Heat shock inhibits both aminoglycoside- and cisplatin-induced sensory hair cell death. **JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 7, p. 299–307, 2006.

DANIEL, E. Noise and hearing loss: A review. **Journal of School Health**, v. 77, n. 5, p. 225–231, 2007.

DECHESENE, C. J. et al. Expression of heat shock protein, HSP72, in the guinea pig and rat cochlea after hyperthermia: Immunochemical and in situ hybridization analysis. **Hearing Research**, v. 59, n. 2, p. 195–204, 1992.

DOOSTI, A. et al. Comparison of the effects of N-acetyl-cysteine and ginseng in prevention of noise induced hearing loss in male textile workers. **Noise & Health**, v. 16, n. 71, p. 223–227, 2014.

EKIMOVA, I. V et al. Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. **Journal of neurochemistry**, v. 115, n. 4, p. 1035–44, 2010.

FABIANI, M. et al. Auditory evoked potentials for the assessment of noise induced hearing loss. **Scandinavian audiology. Supplementum**, v. 48, p. 147–153, 1998.

FAIRFIELD, D. A. et al. Expression and localization of heat shock factor (Hsf) 1 in the rodent cochlea. **Hearing Research**, v. 173, n. 1–2, p. 109–118, 2002.

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.

FETONI, A. R. et al. Protective effects of N-acetylcysteine on noise- induced hearing loss in guinea pigs. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, v. 29, p. 70–75, 2009.

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.

FETONI, A. R. et al. Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: Oxidative stress and ROS signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 135, p. 46–59, maio 2019.

FOSTER, A. C.; JACQUES, B. E.; PIU, F. Hearing loss: The final frontier of

pharmacology. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2022.

FRANCIS, S. P. et al. Celastrol inhibits aminoglycoside-induced ototoxicity via heat shock protein 32. **Cell death & disease**, v. 2, n. 8, p. e195, 2011.

FUJIOKA, M. et al. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. **Journal of neuroscience research**, v. 83, n. 4, p. 575–83, mar. 2006.

GONG, T. W. et al. Induction of heat shock proteins by hyperthermia and noise overstimulation in Hsf1^{-/-} mice. **JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 13, p. 29–37, 2012.

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.

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, M. A. et al. Therapeutic Effect of Dexamethasone for Noise-induced Hearing Loss: Systemic Versus Intratympanic Injection in Mice. **Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology**, v. 36, n. 5, p. 755–762, jun. 2015.

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, B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 1, p. 1–14, jan. 2010.

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.

HENDERSON, D.; HAMERNIK, R. P. Impulse noise: critical review. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 80, n. 2, p. 569–584, ago. 1986.

HONG, O. et al. Understanding and preventing noise-induced hearing loss. **Disease-a-month : DM**, v. 59, n. 4, p. 110–118, abr. 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Noise and Military Service: Implications for Hearing Loss and Tinnitus**. Washington, DC: The National Academies Press, 2006.

JENSEN, J. B. et al. Immediate and delayed cochlear neuropathy after noise exposure in pubescent mice. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0125160, 2015.

JIANG, H.; SHA, S.-H.; SCHACHT, J. NF-kB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 5, p. 644–651, 2005.

JOHNSON, J. D.; FLESHNER, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 3, p. 425–434, 30 dez. 2005.

JOY, G. J.; MIDDENDORF, P. J. Noise exposure and hearing conservation in U.S. coal mines--a surveillance report. **Journal of occupational and environmental hygiene**, v. 4, n. 1, p. 26–35, jan. 2007.

KIM, K. X. et al. Vesicular Glutamatergic Transmission in Noise-Induced Loss and Repair of Cochlear Ribbon Synapses. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 23, p. 4434–4447, jun. 2019.

KIM, M.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 105, p. 90–96, 2013.

KIM, Y. H. et al. Geranylgeranylacetone ameliorates acute cochlear damage caused by 3-nitropropionic acid. **NeuroToxicology**, v. 31, n. 3, p. 317–325, 2010.

KONINGS, A. et al. Variations in HSP70 genes associated with noise-induced hearing loss in two independent populations. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 17, n. 3, p. 329–335, 2009.

KONINGS, A.; VAN LAER, L.; VAN CAMP, G. Genetic studies on noise-induced hearing loss: a review. **Ear and hearing**, v. 30, n. 2, p. 151–159, 2009.

KONRAD-MARTIN, D. et al. Age-related changes in the auditory brainstem response. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 23, n. 1, p. 15–18, jan. 2012.

KOPELOVICH, J. C. et al. Risk factors for loss of ipsilateral residual hearing after hybrid cochlear implantation. **Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology**, v. 35, n. 8, p. 1403–1408, set. 2014.

KOPKE, R. et al. Efficacy and safety of N-acetylcysteine in prevention of noise induced hearing loss: A randomized clinical trial. **Hearing Research**, v. 323, p. 40–50, 2015.

KRAMER, S. et al. Efficacy of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in protecting

ears exposed to loud music. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 17, n. 4, p. 265–278, abr. 2006.

KRAUSE, M. et al. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 18, n. 4, p. 374–80, 2015a.

KRAUSE, M. et al. The Chaperone Balance Hypothesis : The Importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio to Inflammation-Driven Type 2 Diabetes , the Effect of Exercise , and the Implications for Clinical Management. **Mediators of inflammation**, v. 2015, n. ID 2492205, p. 12, 2015b.

KRAUSE, M.; RODRIGUES-KRAUSE, J. D. C. Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: Possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 2, p. 286–290, 2011.

KUJAWA, S. G.; LIBERMAN, M. C. Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 2115–2123, fev. 2006.

KUJAWA, S. G.; LIBERMAN, M. C. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 45, p. 14077–14085, nov. 2009.

LAVINSKY, J. et al. Genome-Wide Association Study Identifies Nox3 as a Critical Gene for Susceptibility to Noise-Induced Hearing Loss. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1–21, 2015.

LAYMAN, W. S. et al. Histone deacetylase inhibition protects hearing against acute ototoxicity by activating the Nf-κB pathway. **Cell death discovery**, v. 1, n. 15012, jan. 2015.

LE PRELL, C. G. Effects of noise exposure on auditory brainstem response and speech-in-noise tasks: a review of the literature. **International journal of audiology**, v. 58, n. sup1, p. S3–S32, fev. 2019.

LE PRELL, C. G. Investigational Medicinal Products for the Inner Ear: Review of Clinical Trial Characteristics in ClinicalTrials.gov. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 32, n. 10, p. 670–694, nov. 2021.

LE PRELL, C. G. Prevention of Noise-Induced Hearing Loss Using Investigational Medicines for the Inner Ear: Previous Trial Outcomes Should Inform Future Trial Design. **Antioxidants & redox signaling**, v. 36, n. 16–18, p. 1171–1202, jun. 2022.

LE, T. N. et al. Current insights in noise-induced hearing loss: a literature review of the underlying mechanism, pathophysiology, asymmetry, and management options.

Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery, v. 46, n. 1, p. 41, 23 dez. 2017.

LI, Y. et al. Polymorphisms of heat shock protein 70 genes (HSPA1A , HSPA1B and HSPA1L) and susceptibility of noise-induced hearing loss in a Chinese population : A case-control study. p. 1–12, 2017.

LIBERMAN, M. C. et al. Toward a Differential Diagnosis of Hidden Hearing Loss in Humans. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162726, 2016.

LIM, H. H. et al. Detection of HSP 72 synthesis after acoustic overstimulation in rat cochlea. **Hearing research**, v. 69, p. 146–150, 1993.

LINDBLAD, A.-C. et al. The efficacy of N-acetylcysteine to protect the human cochlea from subclinical hearing loss caused by impulse noise: a controlled trial. **Noise & health**, v. 13, n. 55, p. 392–401, 2011.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The Heat-Shock Proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, n. 1, p. 631–677, dez. 1988.

LISSARASSA, Y. P. S. et al. Chronic heat treatment positively impacts metabolic profile of ovariectomized rats: association with heat shock response pathways. **Cell Stress and Chaperones**, v. 25, n. 3, p. 467–479, 2020.

LO, W. C. et al. Dose-dependent effects of d-methionine for rescuing noise-induced permanent threshold shift in guinea-pigs. **Neuroscience**, v. 254, p. 222–229, 2013.

LOOI, L. M. et al. Hearing loss: a global health issue. **The Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 943–944, 2015.

LOPEZ, I. A. et al. Immunohistochemical techniques for the human inner ear. **Histochemistry and cell biology**, v. 146, n. 4, p. 367–387, out. 2016.

LORITO, G. et al. Different strategies in treating noise-induced hearing loss with N-acetylcysteine. **Medical Science Monitor**, v. 14, n. 8, p. 159–165, 2008.

LUO, L. L. et al. L-glutamine protects mouse brain from ischemic injury via up-regulating heat shock protein 70. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 25, n. 9, p. 1030–1041, 2019.

MAHALE, A. et al. Histopathologic and immunohistochemical features of capsular tissue around failed Ahmed glaucoma valves. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187506, 9 nov. 2017.

MANOHAR, S. et al. Unexpected Consequences of Noise-Induced Hearing Loss: Impaired Hippocampal Neurogenesis, Memory, and Stress. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 16, p. 871223, 2022.

MATHEW, A.; MORIMOTO, R. I. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 99–

111, 1998.

MEHRAEI, G. et al. Auditory brainstem response latency in noise as a marker of cochlear synaptopathy. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 13, p. 3755–3764, 2016.

MEIRA, T. C.; SANTANA, V. S.; FERRITE, S. Gender and other factors associated with the use of hearing protection devices at work. **Revista de saúde pública**, v. 49, p. 1–8, jan. 2015.

MIKURIYA, T. et al. Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. **Brain Research**, v. 1065, n. 1–2, p. 107–114, 2005.

MIKURIYA, T. et al. Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone. **Brain Research**, v. 1212, p. 9–17, 2008.

MUKHERJEA, D. et al. Early investigational drugs for hearing loss. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 24, n. 01, p. 1–17, 2014.

MUKHERJEA, D. et al. Strategies to reduce the risk of platinum containing antineoplastic drug-induced ototoxicity. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 16, n. 10, p. 965–982, out. 2020.

MYERS, M. W. et al. Expression of the Major Mammalian Stress Protein in the Rat Cochlea Following Transient Ischemia. **The Laryngoscope**, v. 102, n. 9, p. 981–987, set. 1992.

NÄGELI, M. et al. Prolonged continuous intravenous infusion of the dipeptide L-alanine- L-glutamine significantly increases plasma glutamine and alanine without elevating brain glutamate in patients with severe traumatic brain injury. **Critical care (London, England)**, v. 18, n. 4, p. R139, jul. 2014.

NEAL, C. et al. Hair cell counts in a rat model of sound damage: Effects of tissue preparation & identification of regions of hair cell loss. **Hearing Research**, v. 328, p. 120–132, 2015.

NEELY, J. G.; THOMPSON, A. M.; GOWER, D. J. Detection and localization of heat shock protein 70 in the normal guinea pig cochlea. **Hearing Research**, v. 52, n. 2, p. 403–406, 1991.

NEUFELD, A. et al. Prospective, randomized controlled assessment of the short- and long-term efficacy of a hearing conservation education program in Canadian elementary school children. **The Laryngoscope**, v. 121, n. 1, p. 176–181, jan. 2011.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 153–163, 2003.

NUTTALL, A. L. Sound-Induced Cochlear Ischemia/Hypoxia as a Mechanism of Hearing Loss. **Noise & health**, v. 2, n. 5, p. 17–32, jan. 1999.

OGUCHI, T. et al. Inner hair cells of mice express the glutamine transporter SAT1. **Hearing Research**, v. 292, n. 1–2, p. 59–63, 2012.

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.

PETRY, É. R. et al. Oral glutamine supplementation attenuates inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: Role of 70 kDa heat shock protein. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 145, n. September, p. 87–102, 2019.

PIERSON, L. L. et al. Relationship between outer ear resonance and permanent noise-induced hearing loss. **American journal of otolaryngology**, v. 15, n. 1, p. 37–40, 1994.

POIRRIER, A L. et al. Oxidative stress in the cochlea: an update. **Current medicinal chemistry**, v. 17, p. 3591–3604, 2010.

PRENDERGAST, G. et al. Effects of noise exposure on young adults with normal audiograms I: Electrophysiology. **Hearing Research**, v. 344, p. 68–81, 1 fev. 2017.

PUSHPALATHA, Z. V.; KONADATH, S. Auditory brainstem responses for click and CE-chirp stimuli in individuals with and without occupational noise exposure. **Noise & health**, v. 18, n. 84, p. 260–265, 2016.

QI, G. et al. Morphology changes in the cochlea of impulse noise-induced hidden hearing loss. **Acta oto-laryngologica**, v. 142, n. 6, p. 455–462, jun. 2022.

RABINOWITZ, P. M. et al. Audiogram notches in noise-exposed workers. **Ear and hearing**, v. 27, n. 6, p. 742–750, dez. 2006.

RAMKUMAR, V. et al. Oxidative stress and inflammation caused by cisplatin ototoxicity. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2021.

REN, H.; HU, B.; JIANG, G. Advancements in prevention and intervention of sensorineural hearing loss. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 13, p. 20406223221104988, 2022.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 571–573, 1 dez. 1962.

ROGERO, M. M. et al. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition**, v. 22, n. 5, p. 564–571, 2006.

ROPELESKI, M. J. et al. Anti-apoptotic effects of L-glutamine-mediated transcriptional modulation of the heat shock protein 72 during heat shock. **Gastroenterology**, v. 129, n. 1, p. 170–184, jul. 2005.

ROTH, E. Nonnutritive effects of glutamine. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 10, p. 2025S-2031S, 2008.

ROY, S. et al. Sound preconditioning therapy inhibits ototoxic hearing loss in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 11, p. 4945–4949, 2013.

RYAN, A. F.; SCHWARTZ, I. R. Preferential glutamine uptake by cochlear hair cells: implications for the afferent cochlear transmitter. **Brain research**, v. 290, n. 2, p. 376–9, 9 jan. 1984.

RYBAK, L. P. et al. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 219, n. 3, p. 177–86, 2009.

SANO, H. et al. Effect of geranylgeranylacetone on gentamycin ototoxicity in rat cochlea culture. **Auris Nasus Larynx**, v. 34, n. 1, p. 1–4, 2007.

SANZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Utility of auditory steady-state and brainstem responses in age-related hearing loss in rats. **Acta oto-laryngologica**, v. 135, n. 1, p. 35–41, jan. 2015.

SEIBERT, P. et al. Increased eHSP70-to-iHSP70 ratio in prediabetic and diabetic postmenopausal women: a biomarker of cardiometabolic risk. **Cell stress & chaperones**, jun. 2022.

SHA, S. H. et al. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. **Hearing research**, v. 155, n. 1–2, p. 1–8, 2001.

SHEHABI, A. M.; PRENDERGAST, G.; PLACK, C. J. The Relative and Combined Effects of Noise Exposure and Aging on Auditory Peripheral Neural Deafferentation: A Narrative Review. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 14, p. 877588, 2022.

SHI, L. et al. Cochlear Synaptopathy and Noise-Induced Hidden Hearing Loss. **Neural plasticity**, v. 2016, p. 6143164, 2016.

SIMPSON, A. N. et al. Time From Hearing Aid Candidacy to Hearing Aid Adoption: A Longitudinal Cohort Study. **Ear and hearing**, v. 40, n. 3, p. 468–476, 2019.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. 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.

SLIWINSKA-KOWALSKA, M.; PAWELCZYK, M. Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review. **Mutation research**, v. 752, n. 1, p. 61–5, 2013.

SLY, D. J. et al. Applying Neurotrophins to the Round Window Rescues Auditory

Function and Reduces Inner Hair Cell Synaptopathy After Noise-induced Hearing Loss. **Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology**, v. 37, n. 9, p. 1223–1230, out. 2016.

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**, v. 86, n. 6, p. 703–710, 2020.

SONE, M. et al. Upregulation of HSP by geranylgeranylacetone protects the cochlear lateral wall from endotoxin-induced inflammation. **Hearing Research**, v. 204, n. 1–2, p. 140–146, 2005.

SUGAHARA, K. et al. Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. **Hearing Research**, v. 182, p. 88–96, 2003.

TALEB, M. et al. Hsp70 inhibits aminoglycoside-induced hearing loss and cochlear hair cell death. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, p. 427–437, 2009.

VALERO, M. D.; HANCOCK, K. E.; LIBERMAN, M. C. The middle ear muscle reflex in the diagnosis of cochlear neuropathy. **Hearing research**, v. 332, p. 29–38, fev. 2016.

VARGHESE, F. et al. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96801, 6 maio 2014.

VERBEEK, J. H. et al. Interventions to prevent occupational noise induced hearing loss. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 3, p. CD006396, jul. 2009.

VERBEEK, J. H. et al. Interventions to prevent occupational noise-induced hearing loss: A Cochrane systematic review. **International journal of audiology**, v. 53, n. 02, p. S84–S96, 2014.

WANG, Y.; HIROSE, K.; LIBERMAN, M. C. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO**, v. 3, n. 3, p. 248–268, set. 2002.

WANG, Y.; LIBERMAN, M. C. Restraint stress and protection from acoustic injury in mice. **Hearing Research**, v. 165, n. 1–2, p. 96–102, 2002.

WHO. **World Report On Hearing**. [s.l.: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Deafness and Hearing Loss**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>>. Acesso em: 29 maio. 2017.

XIAO, X. et al. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. **EMBO Journal**, v. 18, n. 21,

p. 5943–5952, 1999.

YANG, M. et al. Association of hsp70 polymorphisms with risk of noise-induced hearing loss in Chinese automobile workers. **Cell stress & chaperones**, v. 11, n. 3, p. 233–239, 2006.

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.

YURINSKAYA, M. et al. The Fate of Exogenous Human HSP70 Introduced into Animal Cells by Different Means. 2015.

ZHU, G. et al. Hsp70/Bmi1-FoxO1-SOD Signaling Pathway Contributes to the Protective Effect of Sound Conditioning against Acute Acoustic Trauma in a Rat Model. **Neural Plasticity**, v. 2020, 2020.

ZONG, S. et al. Association of polymorphisms in heat shock protein 70 genes with the susceptibility to noise-induced hearing loss: A meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188195, 16 nov. 2017.

ZUO, H. et al. Changes in Guinea Pig Cochlear Hair Cells after Sound Conditioning and Noise Exposure. **Journal of Occupational Health**, v. 50, n. 5, p. 373–379, 2008.

ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Ofício CEUA n° 002/2021

Ijuí, RS, 17 de março de 2021.

Ao Sr Dr.

Thiago Gomes Heck

Professor pesquisador desta

Assunto: Ofício resposta ao ofício 001/2021 prorrogação de projetos - GPeF

Prezado professor

Ao cumprimentá-lo, a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (CEUA – UNIJUI) no uso de suas atribuições, em resposta ao ofício 001/2021 prorrogação de projetos - GPeF resolve: A solicitação de prorrogação de prazo de execução para 31/12/2023 dos projetos listados a seguir:

- a) “Efeito do Tratamento Com Hsp70 Exógena e Alanilglutamina na Perda Auditiva Induzida Pelo Ruído e Pela Cisplatina: Possível Efeito Citoprotetor Mediado Pela Expressão de Hsp70 Coclear” de protocolo 058/15 sob responsabilidade do professor Thiago Gomes Heck, aprovado em reunião no dia 21/12/2015.
- b) “Estudo Comparativo entre Diferentes Regimes Alimentares Sobre a Manutenção da Perda Ponderal e Sua Relação Com o Estresse Celular, Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos em Ratos Wistar” de protocolo 005/19 sob responsabilidade da professora Mirna Stela Ludwig, aprovado em reunião do dia 07/06/2019.
- c) “Treinamento Físico Associado à Terapia Térmica no Combate a Resistência à Insulina: Equilíbrio Extra e Intracelular de Hsp70 Como Biomarcador de Inflamação Subclínica no Diabetes” de protocolo 023/17 sob responsabilidade do professor Thiago Gomes Heck, aprovado na reunião do dia 02/06/2017.

Após apreciação dos membros desta comissão em reunião no dia 26/02/2021 foi aprovado por unanimidade entre os membros presentes autorização de prorrogação de prazo dos referidos projetos.

Prof. Drª Luciana Mori Viero
Coordenadora CEUA/UNIJUI

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIJUI
Telefone: (55) 3332-0200 Ramal 3234
E-mail: ceua@unijui.edu.br
Rua do Comércio, n° 3000, Bairro Universitário, Ijuí/RS – CEP: 98700-000

