



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LUCIENY SILVA MARTINS SERRA

**EFEITO DA MELATONINA NA PREVENÇÃO DA DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS  
CILIADAS EXTERNAS AUDITIVA RELACIONADA À IDADE NO MODELO  
MURINO C57BL/6J**

Brasília – DF  
2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LUCIENY SILVA MARTINS SERRA

**EFEITO DA MELATONINA NA PREVENÇÃO DA DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS  
CILIADAS EXTERNAS NO PROCESSO DE PERDA AUDITIVA RELACIONADA À  
IDADE NO MODELO MURINO C57BL/6J**

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutora em Ciências  
Médicas pelo Programa de Pós Graduação em  
Ciências Médicas Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Lopes Sampaio  
Co-orientadora: Prof. Dr. Selma Aparecida de Souza Kückelhaus

Brasília – DF  
2020

LUCIENY SILVA MARTINS SERRA

**EFEITO DA MELATONINA NA PREVENÇÃO DA DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS  
CILIADAS EXTERNAS NO PROCESSO DE PERDA AUDITIVA RELACIONADA À  
IDADE NO MODELO MURINO C57BL/6J**

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutora em Ciências  
Médicas pelo Programa de Pós Graduação em  
Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Aprovada em: 10/02/2020

**Banca Examinadora**

---

1º Membro (presidente): Professor Doutor André Luiz Lopes Sampaio  
Professor Adjunto de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina – Área de  
Cirurgia – da Universidade de Brasília

---

2º Membro: Professor Doutor Ronaldo Campos Granjeiro  
Professor da Escola Superior de Ciências da Saúde - ESCS

---

3º Membro: Professora Doutora Isabella Monteiro de Castro Silva  
Professora Adjunta do Curso de Fonoaudiologia Universidade de Brasília

---

4º Membro: Professora Doutora Iruena Moraes Kessler  
Professora da Faculdade de Medicina – Área de Cirurgia – da Universidade de Brasília

---

Suplente: Doutora Vanessa Furtado de Almeida  
Fonoaudióloga Clínica CLIAOD

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter colocado em meu caminho tantas pessoas especiais, as quais tenho muito a agradecer;

Meu pai e minha mãe: obrigada por todo amor, educação, patrocínio e pelas caixas de papéis picados que asseguraram o bem estar dos animais ao longo da pesquisa;

Allan Carlo: obrigada pela compreensão quando eu estive ausente; obrigada pelo patrocínio, assessoria tecnológica, por toda paciência e sugestões;

Allan Vitor: obrigada por você existir e fazer os meus dias mais lindos! Obrigada também por sua compreensão e pela ajuda durante a execução desta pesquisa;

Augusto Bento e Graça Serra: obrigada por sempre me apoiarem e cuidarem de mim como uma filha;

Domingos Santos: obrigada querido tio, pelo incentivo desde o início de minha vida profissional.

Luís Martins: não tenho palavras para agradecer sua inestimável ajuda ao longo dos anos de desenvolvimento deste trabalho.

Dr. Carlos Augusto: obrigada por ter me acompanhado no início desta caminhada e por ter me deixado em tão boas mãos;

Dr. André Sampaio: obrigada por estar ao meu lado em cada momento desta caminhada, por toda ternura distribuída e por sempre ter acreditado na minha capacidade;

Dr. Eduardo Magalhães: obrigada por todos os ensinamentos, pelas incansáveis e criteriosas revisões e por estar sempre presente em minha vida, desde a graduação;

Dra. Selma Kückelhaus: obrigada por nos fazer acreditar que seríamos capazes de concluir este estudo e obrigada por todo conhecimento compartilhado conosco;

Nilda Maia: querida amiga, obrigada por todo apoio que você sempre me deu, por todo amor e cuidado que você sempre teve comigo em nossos anos de Unb;

Adriana Dias: agradeço de coração todos os “psicotapas”, todos os cafés que você tomou me ouvindo, sugerindo e principalmente fazendo meus dias mais leves;

Juliana Gusmão: obrigada pela parceria e por tantos aprendizados compartilhados;

Gabriela Novanta: obrigada pela parceria e por ter tornado possível esta pesquisa emprestando o equipamento necessário para a realização dos exames;

Silvia Braga: obrigada por todas as escutas que você me concedeu e por todas as vezes que você me inspirou a ter ideias que fizeram a pesquisa “desempacar”. Você é um ser de luz que me ilumina cada vez que chego perto de ti;

Ana Carolina Nascimento: obrigada pelas sugestões, pelos treinos, revisões e pela sua inestimável companhia;

A todos os chefes que passaram pela minha vida ao longo dos últimos anos e que sempre foram flexíveis e facilitaram minha caminhada: Dras: Liana Gomide, Cira Antunes, Letícia Narciso e Mariana Palhares;

Aos membros da banca: obrigada por doarem um pouco de seus tempos para avaliarem este estudo com tanto cuidado;

As amigas de pós graduação: em especial, meu grupo de pesquisa agradeço os conhecimentos compartilhados que nos fazem amadurecer a cada dia;

Aos colegas do NUPMIA, em especial, Glorinha obrigada pela parceria no processamento histológico de nosso material;

Aos colegas do Alojamento de Animais da Faculdade de Medicina que cuidaram tão bem dos meus animais por tanto tempo;

Aos queridos veterinários Ana Luiza Sarkis e Rafael Andrade que contribuíram de forma fundamental para a viabilização desta pesquisa;

A todas queridas residentes do HMIB que passaram por mim durante o doutorado, obrigada pela paciência que tiveram;

Marcela Gomes e Lucas Lauand: nossos alunos de PIBIC, obrigada pela colaboração em todas as etapas deste estudo;

Vanessa Pinto e Priscila Oliveira: obrigada pelo encorajamento e auxílio na etapa inicial deste estudo;

Aos funcionários da secretaria de Pós Graduação: obrigada pela paciência e por toda ajuda concedida ao longo dos últimos anos;

Aos amigos que fazem da minha vida social uma animação, meu muito obrigada pela compreensão nos fins de semana que os deixei sem companhia!

E, por fim, um agradecimento especial a todos os animais que deram suas vidas em nome da evolução da ciência. Deixo aqui meu respeito e profundo agradecimento.

*“Surdez significa a perda do estímulo mais vital – o som da voz que traz a linguagem, define os pensamentos e nos mantém na companhia intelectual dos homens”.*  
*(Helen Keller, 1993)*

## RESUMO

A perda de audição relacionada à idade pode ser entendida como uma consequência do envelhecimento do Sistema Auditivo. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio, com consequente apoptose celular, parece ser o mecanismo mais comum de morte das células ciliadas da cóclea. Nesse contexto, surge a hipótese de que a melatonina, devido seu alto potencial antioxidante e sua ação em nível mitocondrial, poderia auxiliar nesse processo de prevenção das disfunções das células ciliadas externas. OBJETIVO: Avaliar o efeito da melatonina na prevenção da disfunção das células ciliadas externas no processo de perda auditiva relacionada à idade no modelo murino suscetível C57BL/6J. MÉTODO: Pesquisa experimental aprovada pelo CEUA/UnB nº (57/2017). Os animais foram divididos em 2 grupos: controle (GC) e melatonina (GM). O GC recebeu solução de soro + álcool e o GM recebeu melatonina (10mg/kg/dia). As soluções foram ofertadas diariamente (50µl) por via oral durante 12 meses. Foram realizados exames de emissões otoacústicas evocadas mensais durante esse período. As análises foram realizadas empregando-se o programa Prism® 5. Foram consideradas significativas, diferenças com  $p < 0,05$ . RESULTADOS: O uso de melatonina na dose de 10mg/kg/dia retardou o aparecimento de presbiacusia no GM quando comparado ao GC. Na avaliação estrutural da cóclea foi verificado que o GM apresentou maior número de células viáveis no gânglio espiral e no ligamento espiral (Mann-Whitney  $p < 0,001$ ) comparado ao GC. CONCLUSÃO: O uso da melatonina ao longo do período de doze meses mostrou efeito protetivo no que se refere ao aparecimento da perda auditiva relacionada à idade no modelo murino C57BL/6J.

Palavras-chave: Presbiacusia, Idade, Cóclea, Melatonina

## ABSTRACT

**Introduction:** Age-related hearing loss (ARHL) can be understood as a consequence of the auditory system aging process. The best known mechanism of cell death in ARHL is cell apoptosis due to increased production of reactive oxygen species, which causes cell oxidation. In this context, it is hypothesized that melatonin, due to its high antioxidant potential and its action at the mitochondria, may support the process of outer hair cell dysfunction (HCD) prevention. **Aims:** To evaluate the effect of melatonin on the prevention of HCD dysfunction in the ARHL process in the susceptible murine C57BL/6J model. **Method:** Experimental research with C57BL/6J animals divided into two groups: control (CG) and melatonin (MG). The CG received saline + alcohol solution and the MG, melatonin (10mg/kg/day). The solutions were offered daily (50µl) orally in a 12-month period. Distortion Product Otoacoustic Emissions (DPOAE) were measured once a month. **Results:** There was a decrease in DPOAE values in both groups and a differentiation between them from the 10th month of life of the animals onwards, when it was observed that the MG maintained higher DPOAE values than the CG on all frequencies tested. **Conclusion:** The use of melatonin has shown to be otoprotective to HCD in the ARHL process in the C57BL/6J model.

**Keywords:** presbycusis, aging, cochlea, melatonin, antioxidants

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de média, desvio padrão e mediana da amplitude do sinal na frequência de 6kHz	47
Tabela 2 -	Valores de média, desvio padrão e mediana da relação sinal ruído na frequência de 6kHz	47
Tabela 3 -	Valores de média, desvio padrão e mediana da amplitude do sinal na frequência de 8kHz	50
Tabela 4 -	Valores de média, desvio padrão e mediana da relação sinal ruído na frequência de 8kHz	50
Tabela 5 -	Valores de média, desvio padrão e mediana da amplitude do sinal na frequência de 10kHz	54
Tabela 6 -	Valores de média, desvio padrão e mediana da relação sinal ruído na frequência de 10kHz	54
Tabela 7 -	Valores de média, desvio padrão e mediana da amplitude do sinal na frequência de 12kHz	58
Tabela 8 -	Valores de média, desvio padrão e mediana da relação sinal ruído na frequência de 12kHz	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de apoptose celular esquematizado	23
Figura 2 - Localização citogenética da mutação do gene CDH23	26
Figura 3 - Estrutura química da melatonina	31
Figura 4 - Via de produção da melatonina	32
Figura 5 - Fluxograma do Experimento	36
Figura 6 - Modelos de olivas testadas para aquisição de EOA	37
Figura 7 - A: Oliva adaptada tamanho recém nascido; B: Cavidade de calibração da sonda de EOA; C: Animal na caixa de exames	39
Figura 8 - A: Pesagem da melatonina; B: Administração da medicação	40
Figura 9 - Peça preparada para emblocamento	42
Figura 10 – Perfil de variação da amplitude do sinal e relação sinal ruído na frequência de 6kHz	45
Figura 11 – Boxplot da amplitude do sinal e relação sinal ruído na frequência de 6kHz com 2 e 14 meses	46
Figura 12 - Perfil de variação da amplitude do sinal e relação sinal ruído na frequência de 8kHz	48
Figura 13 - Boxplot da amplitude do sinal e relação sinal ruído na frequência de 8kHz com 2 e 14 meses	49
Figura 14 - Perfil de variação da amplitude do sinal e relação sinal ruído na frequência de 10kHz com 2 e 14 meses	52
Figura 15 - Boxplot da amplitude do sinal e relação sinal ruído na frequência de 10kHz	53
Figura 16 - Perfil de variação da amplitude do sinal e relação sinal ruído na frequência de 12kHz com 2 e 14 meses	56
Figura 17 - Boxplot da amplitude do sinal e relação sinal ruído na frequência de 12kHz	57
Figura 18 – Total de células viáveis no gânglio espiral	59
Figura 19 - Fotomicrografia do gânglio espiral	60
Figura 20 - Análise do total de células viáveis na estria vascular	61
Figura 21 - Fotomicrografia do ducto coclear e estruturas	62
Figura 22 - Análise do total de células viáveis no ligamento espiral	62
Figura 23 - Fotomicrografia do ligamento espiral	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

AANAT	Aril-alquil-N-acetiltransferase
AASI	Aparelho de amplificação sonora individual
CB	Controle basal
CCE	Célula ciliada externa
CCI	Célula ciliada interna
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CV	Controle veículo
EOA	Emissões otoacústicas
EOAPD	Emissões otoacústicas por produto de distorção
EOAT	Emissões otoacústicas por transiente
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GM	Grupo melatonina
IC	Implante coclear
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LCR	Líquido céfalo raquidiano
LEPO	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Otorrinolaringologia
NUPMIA	Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada
S/R	Sinal ruído
SNAC	Sistema Nervoso Auditivo Central
SNC	Sistema Nervoso Central
TPH	Triptofano hidroxilase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 Presbiacusia .....	17
2.2 Presbiacusia e apoptose celular.....	24
2.3 Experimentos com animais e o modelo C57BL/6J. ....	26
2.4 Emissões Otoacústicas.....	30
2.5 Melatonina. ....	34
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos. ....	38
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>39</b>
4.1 Delineamento do Estudo.....	39
4.2 Tipo de Estudo.....	40
4.3 Seleção dos animais.....	40
4.4 Procedimentos para seleção dos grupos.....	40
4.5 Critérios de Exclusão .....	41
4.6 Adaptação da oliva para sonda de EOA. ....	41
4.7 Exames de EOAPD .....	41
4.8 Administração da medicação .....	42
4.9 Medidas dos níveis de ruído no alojamento de animais. ....	43
4.10 Eutanásia.....	44
4.11 Processamento histológico .....	44
4.12 Obtenção dos dados histológicos. ....	45
4.13 Procedimentos analíticos.....	45
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
5.1 Adaptação da oliva da sonda .....	46
5.2 Medida dos níveis de ruído do alojamento de animais. ....	47
5.3 Análises das amplitudes e relação sinal ruído .....	47
5.3.1 Frequência de 6kHz .....	47
5.3.2 Frequência de 8kHz .....	52
5.3.3 Frequência de 10kHz.....	57

5.3.4	Frequência de 12kHz .....	60
5.4	Avaliação estrutural da cóclea .....	64
5.4.1	Gânglio espiral .....	65
5.4.2	Estria vascular .....	66
5.4.3	Ligamento espiral .....	68
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
6.1	Adaptação da oliva da sonda.....	77
6.2	Medida dos níveis de ruído do alojamento de animais. ....	77
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
	APÊNDICE A.....	95
	ANEXO I – Parecer Consubstanciado do CEP.....	96

## 1. INTRODUÇÃO

A melatonina é um hormônio produzido pelo corpo humano e por vários organismos como plantas e insetos. Na última década, a sua utilização exógena tornou-se bastante disseminada e atualmente essa substância é comercializada em muitos países como um produto de venda livre sob a forma de suplemento alimentar (1).

O uso clínico da melatonina já está comprovado no tratamento de alguns distúrbios relativos à regulação do sono e do ciclo circadiano. Além disso, também apresenta importante ação antiinflamatória, antitumoral, imunomodulatória e antioxidante. Essa substância, juntamente com seus metabólitos, tem a capacidade de reduzir de forma significativa a carga de estresse oxidativo das células envelhecidas ou expostas a toxinas. Em virtude dessas propriedades, pesquisas têm sugerido que a melatonina possui efeitos benéficos contra os processos de senescência (2,3).

A senescência é definida como o processo fisiológico de envelhecimento, no qual ocorre a diminuição no funcionamento dos sistemas corporais. É uma etapa da vida que precisa ser compreendida sob vários aspectos (cronológico, funcional, biológico, social e psicológico) para que o indivíduo possa envelhecer de forma saudável e com menor número de comorbidades. Não se pode conceber o envelhecimento como uma condição individual, pois consiste em um fenômeno social mais amplo, cujos efeitos podem ser observados em várias regiões do mundo (4).

O envelhecimento populacional pode trazer em seu arcabouço problemas, entre os quais se destacam aqueles relacionados às demandas sociais e de saúde, que constituem um desafio para os governos e a sociedade. Em um país onde a expectativa de vida e o número de idosos vem aumentando a cada ano, o desenvolvimento de estratégias que possam assistir essa população, conferindo-lhe longevidade com dignidade e autonomia é fundamental (5).

No Brasil, as análises populacionais confirmam a tendência de que a população está em processo de envelhecimento. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstra que, na década de 1960, havia cerca de 3 milhões de idosos e 13 milhões de adultos com idade entre 25 e 39 anos. No Censo de 2010,

essa população passou para 20 milhões de idosos, com idade a partir de 60 anos, e 46 milhões de adultos na faixa etária entre 25 e 39 anos. No ano de 2012, a população com 60 anos ou mais era de 25,4 milhões e, atualmente, esse número ultrapassa os 29 milhões (6).

Várias formas de combate aos efeitos dos processos de envelhecimento têm sido estudadas ao longo do tempo. Estudos nas áreas da Dermatologia e Nutrição se destacam nesse contexto, apesar de esse assunto ser de interesse comum a todos os campos da saúde (7,8).

A velocidade do envelhecimento depende de fatores como estilo de vida, condições socioeconômicas, doenças crônicas e fatores genéticos. Dentre as inúmeras mudanças fisiológicas, decorridas desse processo, a perda da audição destaca-se como uma alteração sensorial com alta prevalência e que afeta diretamente a qualidade de vida do idoso. A perda de audição relacionada à idade, ou presbiacusia, é uma condição presente em grande parcela da população idosa que tem como maior queixa a dificuldade de comunicação (5,9).

A comunicação exerce a função de inserir os indivíduos nos mais variados contextos pois permite a aquisição de conhecimentos e a troca de experiências necessárias para o convívio familiar e social. Caso essa função comunicativa não ocorra de forma eficiente, pode-se incorrer em prejuízos. Um exemplo típico é a dificuldade de ouvir os sons da fala, bastante comum na população idosa. Dentre as privações sensoriais presentes no processo de envelhecimento, a dificuldade de comunicação causada pela surdez é a que mais isola o sujeito do seu convívio social, causando efeitos negativos em sua qualidade de vida (10).

A possibilidade de existência de uma melhoria nessa condição tem sido tema de pesquisas desenvolvidas ao longo dos últimos anos. Nesse contexto, alguns antioxidantes como vitamina C, coenzima-Q, vitamina E, lizaróides e ácido  $\alpha$ -lipóico foram testados, porém, sem resultados promissores. Outros estudos experimentais também foram realizados com uso de medicamentos, suplementos nutricionais e restrição calórica, no entanto, também não foram encontrados indícios de que essas intervenções possam ser efetivas na prevenção da presbiacusia.

Seguindo a linha de raciocínio do uso dos antioxidantes a fim de verificar a ocorrência de benefícios nos processos de surdez relacionada à idade, a melatonina

foi escolhida para ser a substância utilizada no presente estudo. Visto que há um considerável número de publicações que reitera os benefícios do uso dessa substância contra os processos de envelhecimento em vários sistemas corporais e sabendo que uma das principais causas da presbiacusia é a perda de células devido a ocorrência de estresse oxidativo, a hipótese deste estudo é a de que o uso continuado de uma substância com alto poder antioxidante possa trazer benefícios na prevenção da presbiacusia no modelo experimental estudado.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Presbiacusia

O termo presbiacusia tem origem grega, “*presby*” significa velho e “*akousis*” significa audição. Ele foi cunhado pelo otologista novaiorquino, St. John Roosa, e, em 1899, foi utilizado pela primeira vez por Zwaademaker em uma pesquisa na qual identificou a dificuldade de idosos ouvirem tons agudos. Os termos presbiacusia e perda auditiva relacionada à idade são utilizados como sinônimos, pois não é possível isolar os efeitos puros do envelhecimento de outros fatores que causam a perda auditiva na velhice (11,12).

A presbiacusia pode ser entendida como uma consequência de efeitos cumulativos do envelhecimento sobre o sistema auditivo. É uma alteração sensorioneural, bilateral, simétrica e lentamente progressiva, que causa a diminuição do limiar auditivo e das habilidades de compreensão da fala (13).

Trata-se de uma condição cuja prevalência aumenta de forma proporcional ao aumento da idade. Afeta entre de 25% e 40% das pessoas com mais de 65 anos de idade, entre 40% e 66% dos que têm mais de 75 anos e chega a afetar 80% daqueles com mais de 85 anos. Atualmente a presbiacusia ocupa o terceiro lugar na lista de condições de saúde que mais afetam idosos, perdendo apenas para doenças cardíacas e artrites (9,13,14).

Por ser uma patologia com alta prevalência, a presbiacusia constitui um importante problema social e de saúde em vários países. Nos Estados Unidos existem cerca de 26,7 milhões adultos e idosos com mais de 60 anos com algum tipo de perda auditiva, na Inglaterra e País de Gales esse número chega a 8,1 milhões. No Brasil, segundo o Censo de 2010 do IBGE, estima-se um número de 8,7 milhões de pessoas surdas, com grande parte dentre a população idosa (15,16).

O diagnóstico da presbiacusia nem sempre é realizado de forma fácil e rápido, pois o envelhecimento do sistema auditivo resulta de uma série de efeitos que são adquiridos ao longo da vida e há diversos fatores que podem ser desencadeadores ou potencializadores desta condição. Devido ao seu início lento e progressivo, alguns pacientes só notam a existência de uma perda auditiva quando se deparam com dificuldades de compreensão da fala (12,17).

Estudos epidemiológicos mostram que indivíduos do sexo masculino são mais propensos a desenvolver presbiacusia, quando comparados a mulheres. Em geral, essa ocorrência pode ser devido a fatores ambientais, como, por exemplo, maior exposição a elevados níveis de ruído ao longo da vida, por conta de diferenças nos ambientes de trabalho frequentados por indivíduos de ambos os sexos. (13).

A presbiacusia é descrita por vários autores como uma alteração multifatorial, em que há o somatório de desordens extrínsecas e intrínsecas. Como agentes de ordem extrínseca potencializadores da perda auditiva relacionada à idade é possível destacar traumatismos, alterações vasculares, metabólicas, dietéticas, exposição a ruídos e agentes ototóxicos. Os fatores intrínsecos podem ser divididos em dois grupos: de ordem genética e os relacionados aos processos fisiológicos de envelhecimento (14,18).

No tocante às alterações genéticas, um estudo recente sugeriu que a neuropilina-1 (um receptor ativo de proteínas nos neurônios) pode estar relacionada ao processo de perda auditiva relacionada à idade. Já as alterações relacionadas ao envelhecimento vão acontecendo de forma irreversível no sistema auditivo ao longo da vida (19).

Em 1964, Schuknecht classificou a presbiacusia com base nas alterações encontradas nas análises histológicas e na configuração dos audiogramas:

1. Sensorial – caracteriza-se pela atrofia do Órgão de Corti, perda de células ciliadas e das células de sustentação na base da cóclea. É considerada como o tipo mais comum de presbiacusia. O audiograma exhibe uma perda auditiva nas frequências altas, com preservação nas médias e baixas. O índice de reconhecimento da fala, encontra-se preservado na maioria dos casos e se observam alterações no exame de Emissões Otoacústicas (EOA). Os pacientes com essa classificação obtêm benefícios com uso de prótese auditiva;
2. Neuronal – caracteriza-se pela atrofia dos neurônios cocleares e de forma mais acentuada dos neurônios ganglionares espirais. O audiograma apresenta uma perda auditiva decrescente com grande comprometimento do índice de reconhecimento de fala. Para este tipo de presbiacusia, o ganho com uso de prótese auditiva é limitado;

3. Metabólica (estrial) – caracteriza-se pela degeneração da estria vascular e acomete todas as frequências. O audiograma mostra um traçado plano e a discriminação da fala permanece preservada. O uso de prótese auditiva pode ser benéfico;
4. Mecânica (condutiva coclear) – caracteriza-se pelo enrijecimento da membrana basilar em virtude de mudanças de massa/rigidez ou atrofia do ligamento espiral. O audiograma apresenta um traçado descendente com progressão mais lenta nas baixas frequências. A discriminação da fala é boa, compatível com os limiares tonais, o que facilita uma boa adaptação de prótese auditiva.

As alterações audiológicas em decorrência da idade podem surgir, em alguns casos, já a partir da quarta década de vida, com piora progressiva. A patogênese da perda de audição relacionada à idade ainda não é totalmente entendida, mas acredita-se que essa desordem seja uma combinação multifatorial. No indivíduo com queixa de perda auditiva relacionada à idade, alterações funcionais e estruturais são verificadas tanto na via auditiva periférica como na via auditiva central. Na via periférica, pode ser observado comprometimento nas células ciliadas internas (CCI) e externas (CCE), bem como na estria vascular. Já na via central, observam-se alterações no processamento temporal do estímulo acústico. A ocorrência dessa alteração pode estar relacionada à diminuição de neurotransmissores inibitórios que permeiam o processamento temporal dos estímulos acústicos complexos rápidos. Na maior parte dos casos de perda auditiva relacionada à idade, o comprometimento ocorre nas duas vias (18,20–23).

Uma das queixas mais importantes dos indivíduos com presbiacusia é a dificuldade de compreensão da fala, principalmente, em ambientes ruidosos. Embora não seja uma ameaça imediata à vida do indivíduo, a perda auditiva relacionada à idade é uma condição que traz consequências sociais graves, além de problemas de saúde como depressão e declínio cognitivo (13).

É cada vez mais comum a ocorrência de estudos que associam o quadro de presbiacusia a uma progressão mais acelerada do declínio cognitivo do indivíduo idoso. O isolamento social é a consequência mais clara e imediata da presbiacusia, pois as conversas no ambiente familiar e/ou social deixam de ser momentos agradáveis e passam a ser um verdadeiro desafio para o idoso. Em virtude dessa

dificuldade de compreender os sons da fala, muitos deles diminuem a frequência de interações sociais e passam a viver cada vez mais isolados (24,25).

Ainda não está claro se a perda auditiva provoca um declínio cognitivo ou se aqueles indivíduos com um declínio cognitivo são mais propensos a desenvolverem uma perda auditiva. De todo modo, os estudos mostram que, na população idosa, o declínio cognitivo, o surgimento precoce da demência, o isolamento social e a depressão estão correlacionados com a perda auditiva (26–28).

Várias características próprias do processo de envelhecimento podem estar associadas a quadros depressivos, porém, a convivência com doenças incapacitantes, como a presbiacusia, pode agravar o quadro. Uma pesquisa recente realizada com indivíduos com idade entre 53 e 63 anos de idade concluiu que aqueles com perda auditiva leve tinham o dobro de chances de desenvolver sintomas depressivos. No caso de perda moderada, essa chance aumenta para 2,5 e aqueles sujeitos com perda auditiva de grau severo apresentaram quatro vezes mais chances de desenvolver depressão quando comparados a idosos com audição normal (29).

Um estudo realizado com apoio de neuroimagem comprovou que indivíduos com deficiência auditiva sofreram aceleração das taxas de atrofia cerebral total, bem como apresentaram declínio de volume específico nos giros temporais superior, médio e inferior direito após 6,4 anos de acompanhamento. Essas regiões temporais são importantes não apenas para o processamento da linguagem falada, mas também para memória semântica, integração sensorial e estão envolvidas nos estágios iniciais do comprometimento cognitivo leve ou da doença de Alzheimer precoce (30,31).

Restrições relativas à saúde física também podem estar associadas à presbiacusia. Uma pesquisa populacional realizada com indivíduos idosos com mais de 75 anos verificou que aqueles que apresentavam perda auditiva tinham maiores limitações físicas quando comparados a outros sem a queixa auditiva. Estudo semelhante associou o declínio mental com a perda de audição (32–34).

Estudos que versam sobre a presbiacusia de modo geral apresentam dificuldades consideráveis. Trata-se de um sistema altamente complexo, cuja pesquisa requer aspectos logísticos que precisam ser considerados em sua

execução como, por exemplo, o número de participantes, a necessidade de realização de exames de alto custo e que requerem mão de obra especializada, além dos fatores intrínsecos inerentes a cada indivíduo, que fazem dessa patologia uma condição difícil de ser estudada em humanos. Assim, o uso de modelos experimentais é fundamental para o desenvolvimento das pesquisas relacionadas à presbiacusia (35).

Em uma sociedade que tende a envelhecer de forma acelerada nas próximas décadas, a manutenção do sentido da audição configura-se em fator fundamental para manutenção da qualidade de vida dos idosos. Intervenções com uso de aparelho de amplificação sonora individual (AASI) ou implante coclear (IC) devem ser sempre consideradas como uma opção para propiciar melhoria da função social, emocional, comunicação, função cognitiva e, conseqüentemente, da qualidade de vida do indivíduo com presbiacusia (34).

O uso de próteses auditivas em idosos foi associado a escores mais altos de qualidade de vida, saúde geral, mental e emocional. Esses efeitos foram vistos a partir de um mês de uso e mantiveram-se em uma reavaliação feita após um ano. Além do usuário, cuidadores e familiares referiram melhoria na qualidade de vida em função do uso do AASI pelo idoso (36).

Apesar das vantagens verificadas com o uso de AASI, em muitos casos, os idosos não aderem ao uso do dispositivo. Em um estudo realizado acerca dos motivos pelos quais os pacientes (de idades variadas) não utilizavam o dispositivo, os motivos mais mencionados foram a falta de percepção de melhora da audição, sensação de oclusão da orelha, ruídos de microfonia e distorção do som. No caso dos idosos, houve ainda relato de problemas de manipulação do aparelho por 10% daqueles que não aderiram ao uso do dispositivo (37).

Assim como o AASI, o IC é outra opção de reabilitação auditiva, indicado para pacientes com perda auditiva de grau severo a profundo. Em uma pesquisa realizada acerca da influência do uso do IC em pacientes idosos com idade entre 65 e 85 anos, foi verificado que após seis meses da cirurgia houve melhora significativa na capacidade de atenção, velocidade de processamento auditivo, qualidade de vida e sintomas depressivos. Não há contraindicação para a realização de cirurgia de IC exclusivamente devido à idade avançada do paciente. É necessária a realização de

um exame pré-operatório detalhado para garantir a segurança do procedimento e conferir ao paciente idoso todos os benefícios esperados com o procedimento. Após a cirurgia de IC, 65% dos idosos relatam reconhecer vozes no telefone e 80% deles acreditam que foi a melhor opção escolhida. No caso de pacientes com demência estabelecida, o uso de dispositivos de amplificação não mostrou grandes benefícios no que se refere à recuperação das funções cognitivas. (36,38).

Os mecanismos causadores da presbiacusia ainda não são completamente conhecidos, mas, por ser uma patologia multifatorial, observam-se grandes dificuldades no desenvolvimento de medicamentos para esse fim e ainda não existe um fármaco capaz de reverter ou mesmo retardar o processo de surdez relacionada à idade. No ano de 2013, uma empresa do ramo farmacêutico conduziu o primeiro ensaio clínico para examinar o efeito de um medicamento (PF-04958242) para o tratamento da perda auditiva relacionada à idade. Os resultados não conseguiram mostrar diferença nas análises comparando o grupo que fez uso do medicamento com o grupo que fez uso de placebo. Estudos mais aprofundados se encontram em andamento com previsão de término no ano de 2021 (39).

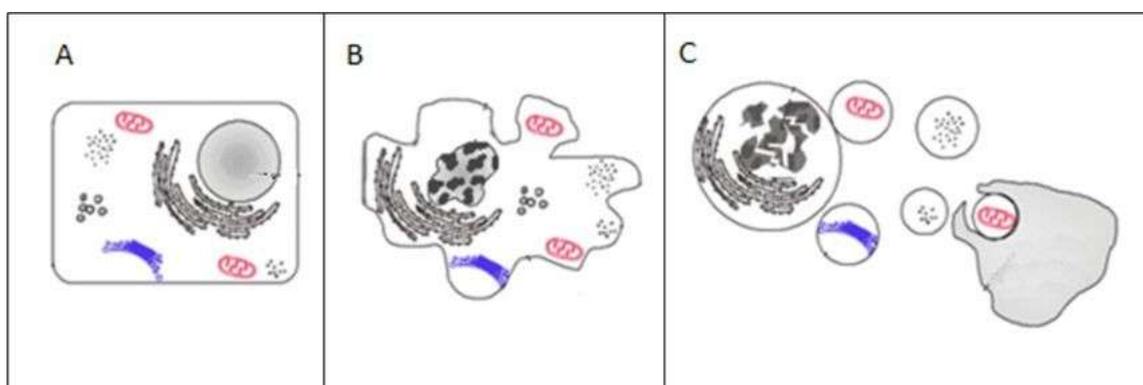
Além das buscas por fármacos que sejam capazes de atenuar ou resolver a presbiacusia, diversos estudos tem sido desenvolvidos com o objetivo de encontrar outras substâncias, suplementos ou dietas que sejam capazes de oferecer benefício relativo aos danos causados pela presbiacusia. Nessa linha, os antioxidantes ganham destaque em virtude de serem capazes de retardar o processo de envelhecimento celular (15,40,41).

## **2.2. Presbiacusia e apoptose celular**

Em tecidos normais, é necessário que haja equilíbrio entre a geração de células novas através do processo de divisão celular e a perda de células velhas através da morte celular. O envelhecimento celular pode ser caracterizado pela perda da capacidade de divisão celular, pela ausência de atividade da telomerase (enzima capaz de repor os segmentos dos telômeros dos cromossomos perdidos durante as divisões celulares) e pelo estresse oxidativo, que está relacionado ao acúmulo de radicais livres. No final do período de senescência da célula, é

deflagrado o processo de morte celular, que, em geral, ocorre por apoptose após a ativação das caspases (42,43).

A apoptose é um processo de morte celular programada, durante o qual o genoma é quebrado, a célula é fragmentada em pequenos pedaços, que são fagocitados por macrófagos e removidos sem que haja processo inflamatório, como pode ser verificado no esquema da Figura 1. Trata-se, pois, de um processo indispensável para o desenvolvimento, renovação e envelhecimento embriológico, bem como para a homeostasia (43).



**Figura 1.** Esquema do processo de apoptose celular. A – célula normal; B – início da condensação e formação dos corpos apoptóticos; C – fagocitose dos corpos apoptóticos pelo macrófago. Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Fagócito> (modificado pela autora).

A apoptose pode ocorrer por duas vias: a extrínseca (citoplasmática) e a intrínseca (mitocondrial). Essas vias iniciam em locais diferentes e com estímulos distintos, porém, em ambas se observa a ativação de caspases, levando a clivagem de proteínas. As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific-proteases*) pertencem à família das cisteínas proteases que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. Elas sinalizam para o início do processo de apoptose e clivam esses substratos, ocasionando a condensação e fragmentação nuclear e externalizando os fosfolipídios da membrana, que irão disparar sinais para que essa célula seja fagocitada por macrófagos. Em mamíferos, são conhecidas 14 caspases, das quais, seis participam do processo de apoptose (42,44).

Na via extrínseca da apoptose, o processo é iniciado por estímulos extracelulares, que ativam os receptores de morte celular (sequência de 65 aminoácidos). A partir da ativação de um desses receptores, inicia-se uma cascata de atividades, que culminam na clivagem da caspase-8 e na ativação da caspase-3, iniciando a morte por apoptose (45).

Na via intrínseca, a apoptose é controlada pela família de proteínas Bcl-2. São 25 proteínas, que estimulam ou bloqueiam a apoptose. Essa via é ativada e ocorrem mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, que ativam a caspase-9, liberam o citocromo C e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). O aumento na produção das EROS causa a oxidação celular e a resposta da mitocôndria a esse dano é importante para o início da apoptose. A apoptose parece ser o mecanismo mais comum de morte das células ciliadas (42,43,45).

### **2.3. Experimentos com animais e o modelo C57BL/6J**

Historicamente, as pesquisas experimentais com uso de modelos animais remetem à Antiguidade Clássica, em que Hipócrates (460-370 a.C.), Aristóteles (384-322 a.C.) e Galeno (131-201 a.C.) buscaram seus conhecimentos sobre o corpo humano através da vivisseção e necropsia nos animais com o objetivo de encontrar semelhanças com as doenças que afetavam os humanos (46).

Séculos depois, a Teoria da Evolução (1859), defendida por Charles Darwin (1809-1882), mudou o paradigma sobre o processo evolutivo das espécies, a partir da qual se passou a conceber que os seres vivos descendem de formas primitivas. Assim, foi possível extrapolar para humanos os resultados obtidos em experimentos com uso de animais (46).

Atualmente, os modelos animais são utilizados em diversos ramos de pesquisas, principalmente nas áreas das Ciências Biológicas e Biomédicas. Esse uso ocorre devido à possibilidade de uma análise detalhada das manifestações biológicas e comportamentais, além de permitir a observação de processos patológicos ou naturais, que, em muitos casos, assemelham-se aos seres humanos (47).

O uso de animais em pesquisas permitiu descobertas importantes, dentre as quais se destacam a descoberta da circulação sanguínea, dos antibióticos, dos mecanismos das enfermidades infecciosas, anestésicos para cirurgias, transplante de órgãos, sistema de suporte de vida para neonatos, entre outras (48).

As vantagens em utilizar modelos animais em pesquisas, principalmente os roedores, estão relacionadas à facilidade de manejo e domesticação, prolificidade, docilidade, baixo consumo alimentar, fisiologia conhecida, ciclo reprodutivo curto, precocidade, nutrição variada, adaptação ao cativeiro e sociabilidade (49).

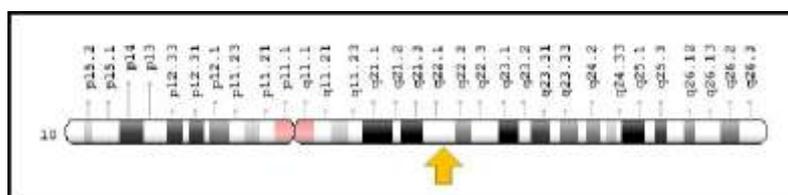
Na área da Audiologia, os modelos animais também são largamente utilizados. Dentre os diversos procedimentos realizados para avaliação do sistema auditivo, destacam-se a análise histológica (50), o reflexo de Preyer (51), as EOA (52–54) e o Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) (55,56). Esses estudos vêm sendo desenvolvidos para entender melhor os temas relacionados à exposição ao ruído (57), otoproteção (58), ototoxicidade (59,60), novos genes da perda auditiva (61), plasticidade do sistema nervoso auditivo central (SNAC) (62), regeneração celular (63), zumbido (64,65), equilíbrio (66), hiperbilirrubinemia (67) e presbiacusia (68).

Camundongos são modelos considerados úteis e viáveis em função de terem uma vida curta, o que significa que alguns aspectos, como, por exemplo, os efeitos da idade são aparentes dentro de um curto período de tempo e os tecidos podem ser analisados em todas as fases do processo de envelhecimento. A facilidade com que os camundongos podem ser geneticamente manipulados levou à geração de numerosos modelos que imitam as mutações da perda auditiva em humanos (35).

O camundongo C57BL/6J é uma cepa endogâmica bastante utilizada em pesquisas experimentais. Apresenta uma forma clássica de perda auditiva precoce que é similar àquela apresentada pelo ser humano no processo de envelhecimento. Além disso, essa linhagem desenvolve outras condições comuns ao avanço da idade como a obesidade, arteriosclerose, diabetes tipo 2, microftalmia e baixa densidade óssea (15,69).

Esses camundongos exibem um padrão de presbiacusia precoce devido a uma mutação no gene CDH23, que codifica a caderina 23 (otocaderina). O CDH23 é um gene autossômico não recessivo, que possui 69 exons. A mutação verificada

nessa linhagem animal decorre da substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) no exon que codifica a glicoproteína de adesão entre as células no epitélio sensorial da orelha interna, necessária para a formação e funcionalidade dos feixes de estereocílios. Assim, a perda auditiva apresentada está associada à degeneração das células ciliadas, uma característica da presbiacusia sensorial (35,70,71). A Figura 2 aponta a localização citogenética da mutação, no braço longo do cromossomo 10, na posição 22.1.



**Figura 2.** Localização citogenética da mutação do gene CDH23. Fonte: Genoma Decoration Page/NCBI.

Estudo realizado em seres humanos demonstra que o polimorfismo de nucleotídeo único G>A está associado à perda auditiva relacionada à idade. A redução ou falta da otocaderina permite que os estereocílios das células sejam facilmente danificados, causando apoptose das células ciliadas ao longo do tempo. Isso reforça as descobertas feitas por Schuknecht quanto à ocorrência de presbiacusia em virtude de alterações sensoriais (35).

A variedade consanguínea C57BL/6J é um modelo no qual os níveis de Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção (EOAPD) podem ser captadas já entre os 21º e 28º dias de vida. A avaliação auditiva desses animais com uso das EOAPD tem grande aplicabilidade, pois permite a caracterização da morfologia funcional das CCE e, por isso, se torna um importante instrumento na avaliação auditiva, além de os resultados serem fáceis de mensurar e interpretar (72).

O C57BL/6J começa a exibir limiares auditivos elevados logo nos primeiros meses de vida, inicialmente nas frequências mais altas e em seguida se expande para outras frequências mais baixas até atingir uma perda profunda em todas as frequências. Aos 12 meses de idade os níveis de EOAPD já se encontram bastante alterados (35,73,74).

Esse modelo animal tem sido utilizado em inúmeras pesquisas na área de Audiologia tempo devido às semelhanças anatômicas com as estruturas humanas. Em ambas as espécies, as orelhas externa e média são projetadas para receber, transmitir e amplificar o som e, na orelha interna, ficam os órgãos sensoriais da audição e do equilíbrio. Algumas estruturas estão didaticamente descritas no Quadro 1 (75).

**Quadro 1.** Comparação das estruturas auditivas entre camundongos e humanos.

<b>Estrutura</b>	<b>Camundongo</b>	<b>Humano</b>
Pavilhão auricular	Formato de cone com poucas dobras e recoberto de pelos. Presença de glândulas sebáceas e bastante vascularizado.	Cartilaginoso com poucos pelos. Presença de glândulas sebáceas e bastante vascularizado.
Meato acústico externo	6,25 mm ligeiramente curvado. Poucos pelos, presença de glândulas sebáceas e ceruminosas.	2,5 cm em formato de “s”. Poucos pelos, presença de glândulas sebáceas e ceruminosas.
Membrana timpânica (MT)	2,67mm <sup>2</sup> , formada por uma porção flácida e uma porção tensa.	9mm, formada por uma porção flácida e uma porção tensa.
Sistema tímpano ossicular	Presença de 3 ossículos: martelo, bigorna e estribo com movimentação restrita. Em ambas as espécies os músculos tensor do tímpano e estapédio se contraem para ajustar a tensão da MT e amortecer vibrações excessivas.	Presença de 3 ossículos: martelo, bigorna e estribo com ampla movimentação. Em ambas as espécies os músculos tensor do tímpano e estapédio se contraem para ajustar a tensão da MT e amortecer vibrações excessivas.
Tuba auditiva	Apresenta porção cartilaginosa e óssea e tem função de equilibrar a pressão na orelha média.	Apresenta porção cartilaginosa e óssea e tem função de equilibrar a pressão na orelha média.
Cóclea	2,5 voltas ao redor do modíolo com cerca de 5-6 mm de comprimento. Apresenta ducto coclear contendo endolinfa e o órgão de corti; e escala vestibular e timpânica com presença de perilinfa.	2,75 voltas com cerca de 30-35 mm de comprimento. Apresenta ducto coclear contendo endolinfa e o órgão de corti; e escala vestibular e timpânica com presença de perilinfa.

## 2.4. Emissões Otoacústicas

De forma clássica, as EOA são conhecidas como o processo de liberação da energia sonora produzida nas CCE da cóclea. Energia essa que se propaga em direção à orelha média e ao meato acústico externo em um processo de audição normal (76).

Foram descritas pela primeira vez em 1948 por Thomas Gold, que propôs a teoria do princípio ativo da cóclea, segundo a qual a cóclea possuía um papel de amplificador mecânico. Por limitações tecnológicas para a comprovação dessa teoria, ela foi abandonada e somente após 30 anos foi retomada por David Kemp, que observou a possibilidade de captar a energia sonora produzida pela cóclea, utilizando uma sonda inserida no meato acústico externo, com microfone e amplificador miniaturizados (76,77).

O teste de EOA constitui uma avaliação de grande utilidade clínica. Trata-se de um procedimento rápido, não invasivo, objetivo (não depende da resposta do indivíduo), que pode ser aplicado mesmo em locais sem tratamento acústico e é sensível a perdas auditivas de grau leve a profundo, uni ou bilaterais. Existem evidências de que alterações sutis da função coclear são possíveis de ser detectadas na avaliação das EOA antes mesmo que sejam apontadas mudanças significativas no audiograma do indivíduo (77).

As EOA podem ser classificadas como espontâneas (EOAE) ou evocadas (EOA). As EOAE foram as primeiras a serem descritas por Gold em suas observações acerca do funcionamento coclear. São sons de banda estreita, registrados no canal auditivo na ausência de estímulo acústico, e podem ser detectados em cerca de 50 a 60% dos indivíduos com audição normal. As EOAE deixam de ser observadas nas regiões de frequências associadas a perdas auditivas maiores que 30 dB NA e permanecem presentes nas frequências com limiares auditivos normais (78,79).

Já as EOA podem ser classificadas com base no mecanismo de geração ou de acordo com o estímulo utilizado. Com base no mecanismo de geração, as EOA podem ser geradas por distorção ou reflexão. A fonte de distorção é gerada a partir da não linearidade dos feixes estereociliares das CCE e o modelo de reflexão ocorre a partir da existência de perturbações aleatórias agrupadas ao longo da partição

coclear. Assim, quando a energia mecânica encontra esses refletores, retorna em direção à orelha média e é registrada como EOA (80).

A classificação que toma como base o tipo de estímulo utilizado é a mais tradicional e utilizada na prática clínica. Essa classificação divide as EOA em transientes (EOAT) e por produto de distorção (EOAPD).

O estímulo acústico utilizado para a captação das EOAT é breve (cliques ou *toneburst*) e abrange ampla gama de frequências, permitindo, assim, uma estimulação ampla da cóclea. As EOAT estão presentes em 98% a 100% dos indivíduos com audição normal. A amplitude das respostas, entretanto, varia de acordo com gênero, lado, interferência do nível de pressão sonora do estímulo e interferência do nível de ruído, que pode ser do ambiente ou do indivíduo. Outro fator que exerce influência decisiva na mudança da amplitude da resposta é a idade. Há uma relação inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a idade, menor a amplitude das EOAT, situando-se em torno de 20 dB nos recém nascidos, 10 dB nos adultos e 6 dB nos idosos (79,81,82).

Estudos realizados demonstram a ocorrência de redução significativa na amplitude da resposta das EOAT na presença de leves mudanças na audição do idoso. Em adultos jovens, o mesmo fenômeno não acontece. Em casos em que aparecem mudanças sutis na audição, as amplitudes das EOAT não se modificaram. Esse mesmo comportamento pode ser observado na aquisição das EOAT em modelos animais como ratos, camundongos e cobaias (77,79,82).

Assim como as EOAT, as EOAPD são sons gerados pelas CCE. São constituídas por dois tons puros ( $f_1$  e  $f_2$ ) apresentados concomitantemente e com frequências sonoras muito próximas ( $f_2/f_1=1,22$ ). Por convenção, o tom puro de frequência mais baixa é referido como  $f_1$  primário e o seu nível de intensidade é L1. O tom puro de frequência mais alta é  $f_2$  e seu nível de intensidade é L2. Os parâmetros analisados no exame de EOAPD são as medidas de amplitude do sinal e a relação sinal-ruído (S/R) (76,83,84).

Nos seres humanos, a cóclea funciona como um sistema não linear. Assim, quando dois tons são percebidos, ocorre a produção de outros tons ou produtos de distorção com frequências que não estão presentes no estímulo inicial, pois representam uma combinação das frequências dos tons apresentados. A resposta é

chamada de distorcida, por se originar na cóclea como um sinal que não estava presente nos tons puros evocados. Dessa forma, é possível que as EOAE por estímulos contínuos sejam passíveis de registro no conduto auditivo externo, uma vez que a resposta é analisada por frequência (81).

A facilidade da captação das EOAPD ocorre em virtude de a frequência da resposta ser matematicamente prevista a partir dos dois tons puros geradores, ou seja, a resposta calculada é a intermodulação ou o produto de distorção produzido pela orelha estimulada (79).

O produto de distorção mais robusto em seres humanos acontece em  $2f_1-f_2$ , na situação em que a relação  $f_2/f_1$  é de 1,22. Várias combinações de intensidades (L1 e L2) podem ser utilizadas no teste. O protocolo em que L1 é de 65 dB NPS e L2 de 55 dB NPS, parece ser o mais sensível na identificação de perdas auditivas. Em modelos animais, alguns experimentos foram feitos variando os valores de L1 e L2, porém, até o presente momento, a maior parte das pesquisas tem utilizado o mesmo critério (L1 = 65 dB NPS e L2 = 55 dB NPS) (72,85,86).

Os critérios utilizados na interpretação do exame geralmente empregam o nível de resposta em relação à amplitude e ao ruído, sendo que em estudos com modelos animais, de modo geral, é feita uma avaliação do comportamento das EOA da espécie estudada ao longo do tempo. Outros estudos utilizam parâmetros semelhantes aos utilizados para seres humanos, considerando presentes as EOAS quando os valores de amplitude estão acima de -5 e a relação S/R de pelo menos 3dB (86,87).

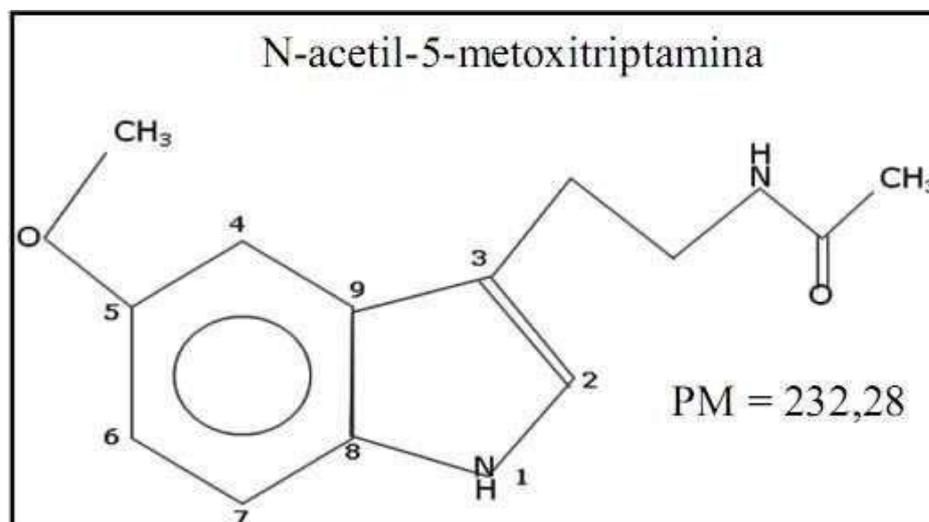
A vantagem das EOAPD é a maior especificidade de frequência, podendo-se avaliar a função coclear desde a espira basal (frequências altas) até a apical (frequências baixas), variando-se as frequências primárias dos estímulos evocadores. A coleta das respostas nas frequências baixas é mais difícil de realizar, pois são mais suscetíveis a ruídos externos (ambiente) e internos (respiração do paciente). Em humanos, as EOAPD apresentam informações mais precisas nas frequências acima de 2 kHz, pois o ruído diminui com o aumento da frequência e a transmissão da energia pela orelha média é mais eficiente para as frequências médias e altas. As suas melhores respostas estão na faixa de frequência de 4 kHz. Nos modelos experimentais, observam-se melhores respostas de EOAPD em

frequências mais altas, a partir de 6kHz (77,83,88).

As medidas de EOAPD têm sido amplamente utilizadas em modelos animais como forma de avaliação da função coclear, em que se destacam pesquisas relacionadas à exposição a altos níveis de ruído, uso de medicamentos antineoplásicos, aminoglicosídeos e em estudos acerca da perda auditiva relacionada à idade (86,89–91).

## 2.5. Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) foi identificada em 1958 pelo grupo de pesquisa do médico Aaron Lerner. É uma molécula ubíqua, presente na natureza, e que pode ser encontrada em quase todos os organismos vivos. Sua presença já foi verificada em fósseis de bactérias como a *Rhodospirillum rubra* com mais de 2,5 bilhões de anos e vestígios da substância foram encontrados em cianobactérias, dinoflagelados, fungos, vermes, moluscos, estrelas do mar, insetos, plantas, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (92–94). A Figura 3 apresenta a estrutura química da melatonina.

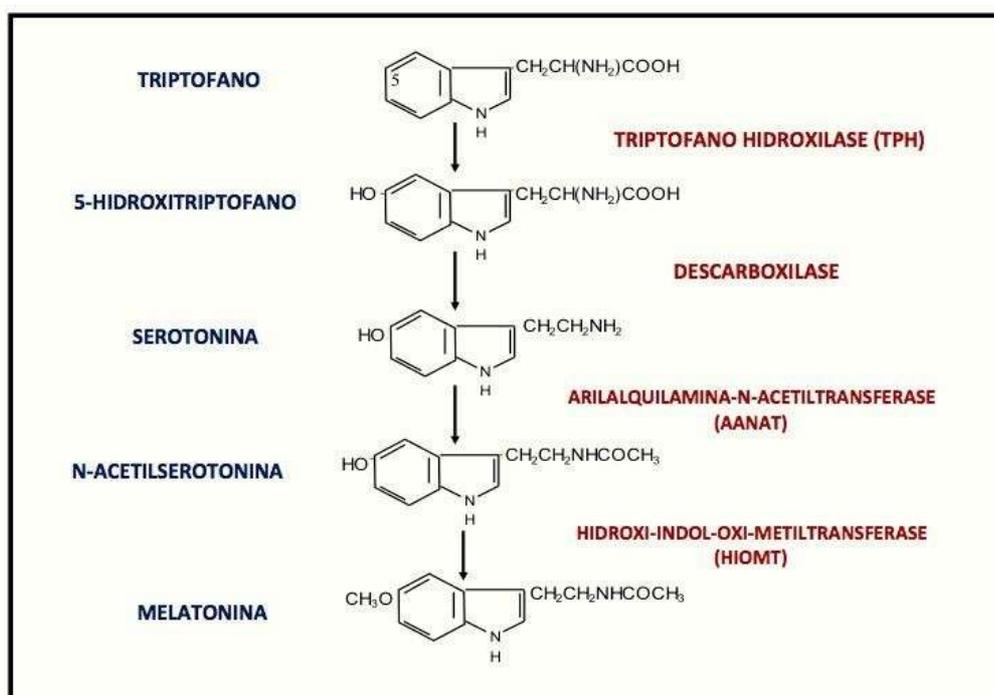


**Figura 3.** Estrutura química da melatonina. Fonte: internet. Site: sigmaldrich.com

É o principal hormônio secretado na glândula pineal de mamíferos e participa de diversas funções fisiológicas, incluindo a regulação do sono, do ciclo circadiano, do sistema imunológico e cardiovascular. Essa substância foi caracterizada

quimicamente como uma indolamina anfifílica derivada do triptofano, proficiente na eliminação de radicais livres e com notáveis propriedades antioxidantes, devido a sua capacidade de estimular enzimas antioxidantes em diferentes tecidos (92).

Os seres vertebrados possuem uma glândula especializada, a glândula pineal, que sintetiza a melatonina para funcionar como um hormônio com ações endócrinas. Os pinealócitos da glândula pineal têm o aminoácido triptofano como seu precursor. Esse aminoácido sofre ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH), que o transforma em 5-hidroxitriptofano. Essa substância, por sua vez, sofre ação de descarboxilase, que a transforma em 5-hidroxitriptamina, também conhecida como serotonina. Por ação da enzima aril-alquil-N-acetiltransferase (AANAT), é transformada em N-acetilserotonina, que, por fim, sofre ação da hidroxí-indol-oxi-metiltransferase (HIOMT), transformando-a em melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina (92,95) (Figura 4).



**Figura 4.** Via de produção da melatonina. Fonte: Ferreira, 2014.

Essa melatonina produzida, devido as suas características de solubilidade, é prontamente liberada na corrente sanguínea, onde será ligada à albumina e ao líquido cefalorraquidiano (LCR), atingindo várias áreas do Sistema Nervoso Central

(SNC) e órgãos periféricos. E seu mecanismo de ação se dá tanto por ações mediadas por receptores como as não mediadas por receptores (96).

A caracterização dos receptores de membrana da melatonina foi realizada entre o final dos anos 80 e início dos anos 90 e dois tipos de receptores de alta afinidade (MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>) foram clonados e caracterizados. O receptor MT<sub>1</sub> apresenta 350 aminoácidos, ao passo que o MT<sub>2</sub> apresenta 362, e ambos pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G (Gi, G0, Gq e G11). A ligação desses receptores conduz a uma alteração nas concentrações de nucleotídeos cíclicos intracelulares como AMPc e GMPc e nos níveis de cálcio no interior das células, leva à ativação de subtipos de proteína quinase C, age na localização intracelular de receptores de hormônios esteroides e regula a sinalização da proteína G. Esses receptores são amplamente distribuídos no organismo, tanto no SNC como em diversos órgãos e tecidos. Eles são responsáveis por uma variedade de efeitos intracelulares, de acordo com o tecido onde estão localizados e levam a expressão de vários efeitos fisiológicos importantes como, por exemplo, regulação de funções endócrinas, atividade cardiovascular, imunomodulação, pigmentação da pele, dentre outros. Além de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>, um terceiro sítio de ligação da melatonina, MT<sub>3</sub>, foi identificado, mas não foi considerado como um receptor e sim uma enzima quinona redutase 2, que participa na proteção contra o estresse oxidativo das células (96,97).

O mecanismo de ação da melatonina ocorre também por meio de ações não mediadas por receptores. Esse hormônio apresenta características que lhe conferem o *status* de um eficaz antioxidante, pois possui a capacidade de atuar como doador de elétrons em processos não enzimáticos, tem importante ação na neutralização de grande parte de radicais livres e estimula a atividade de várias enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase. Além disso, a melatonina protege os lipídios, proteínas e DNA de danos oxidativos, sendo altamente concentrada nas mitocôndrias (92,94,98).

A síntese da melatonina não ocorre de forma exclusiva na glândula pineal, como se acreditava no início dos estudos a respeito do tema. Ela também é sintetizada de forma localizada em tecidos e órgãos extrapineais, tais como retina, medula óssea, leucócitos, pele e trato gastrointestinal. Com exceção da retina, a

síntese que acontece nos outros órgãos não segue o ritmo circadiano, e o hormônio age principalmente como antioxidante local (97–99).

Dois aspectos importantes acerca da produção de melatonina no organismo são a variação de acordo com a idade e a tendência a diminuir significativamente ao longo da vida. Em indivíduos recém-nascidos, a produção tem início por volta dos três meses de idade e tende a alcançar os níveis plasmáticos noturnos entre um e três anos de vida. A partir dessa fase, os níveis do hormônio decrescem e, após a puberdade, estabilizam-se nos níveis de adulto (98,99).

Em indivíduos adultos, observa-se uma importante queda nos níveis de melatonina, porém, são níveis maiores quando comparados aos dos idosos. Esse fenômeno pode ser observado em várias espécies de mamíferos, como ratos, camundongos e seres humanos. Dessa forma, conclui-se que o processo de envelhecimento deixa o organismo privado de melatonina, um dos seus maiores mecanismos de defesa antioxidante (98).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da melatonina na prevenção da disfunção das CCE no processo de presbiacusia no modelo murino suscetível C57BL/6J.

#### **3.2. Objetivo Específicos**

- Determinar os valores médios das amplitudes das EOAPD nas frequências de 6 a 12kHz;
- Estabelecer os valores médios da relação S/R das EOAPD nas frequências de 6 a 12kHz;
- Realizar estudo histopatológico do tecido coclear dos roedores C57BL/6J;
- Verificar se os níveis de ruído ambiental no alojamento dos animais são capazes de induzir perda auditiva nos animais do experimento.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Delineamento do estudo

A Figura 5 apresenta o fluxograma de realização do estudo experimental. Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA/UnB), deu-se início à aquisição e aclimatação dos animais para posterior coleta dos dados.

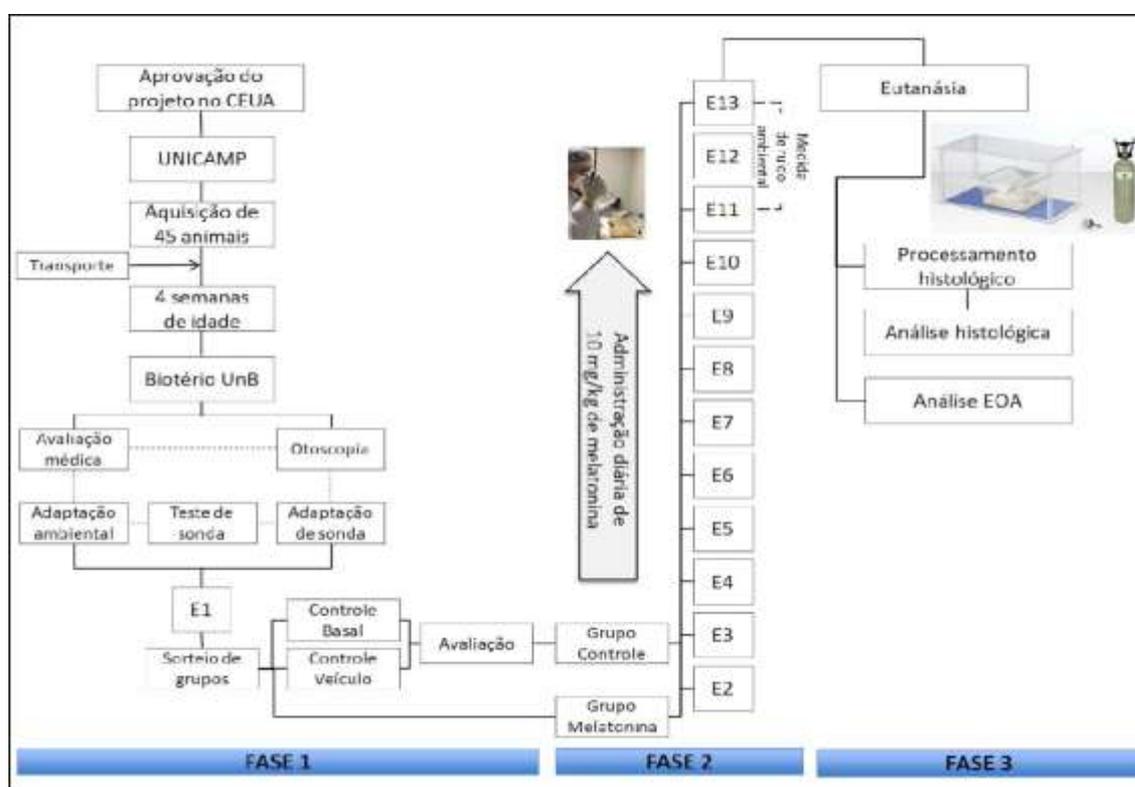


Figura 5. Fluxograma do experimento.

### 4.2. Tipo do estudo

Estudo experimental realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Otorrinolaringologia (LEPO) e no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (NUPMIA).

Antes de iniciar o experimento para este estudo, foram realizados experimentos pilotos, com o objetivo de testar os protocolos de exame mais

adequados, equipamentos que seriam utilizados, além de testes em mais de uma linhagem de animal com objetivo de verificar a aquisição das EOA.

#### 4.3. Seleção dos animais

Fizeram parte do estudo 45 roedores machos da linhagem C57BL/6J adquiridos do Biotério da Universidade de Campinas (UNICAMP). Os roedores foram enviados, ao completarem quatro semanas de vida, e seguiram todos os protocolos de segurança de transporte animal.

#### 4.4. Adaptação da oliva para a sonda de EOA

Devido a nenhuma das olivas que acompanham o equipamento para coleta das EOA caber no conduto auditivo do animal, foi necessário adaptar uma oliva da sonda utilizada para se conseguir o ajuste adequado.

A adaptação foi feita com uso de olivas de tamanho adequado para recém-nascidos, acopladas à ponta da sonda do equipamento, conforme ilustrado na Figura 6.



**Figura 6.** Modelos de olivas testadas para aquisição de EOA. Os modelos escolhidos são os destacados pelas setas. Fase 1 (seta branca: E1 - E6); Fase 2 (seta azul: E7 - E12).

Além disso, foi necessária a troca da oliva ao longo do experimento, haja vista que o conduto auditivo do animal cresceu durante esse período. A troca da oliva foi necessária a partir do sétimo exame (E7).

#### 4.5. Procedimentos para seleção de grupos

Os animais foram inicialmente submetidos à inspeção geral de saúde, por Médico Veterinário, e otoscopia, com objetivo de verificar a integridade da orelha média. Em seguida, foram submetidos à avaliação por EOAPD. As EOAPD foram coletadas nas frequências de 6, 8, 10 a 12 kHz por um período de 12 meses.

Após a realização do primeiro exame em todos os animais, eles foram sorteados e divididos em três grupos:

- **Controle Basal (CB):** composto por 13 animais que não sofreram intervenção medicamentosa;
- **Controle Veículo (CV):** composto por 16 animais que receberam solução veículo (soro + álcool) por via oral (50µl) diariamente durante um período de 12 meses;
- **Melatonina (GM):** composto por 16 animais que receberam 10mg/kg/dia de melatonina por via oral (50µl) diariamente durante um período de 12 meses.

#### 4.6. Critério de Exclusão

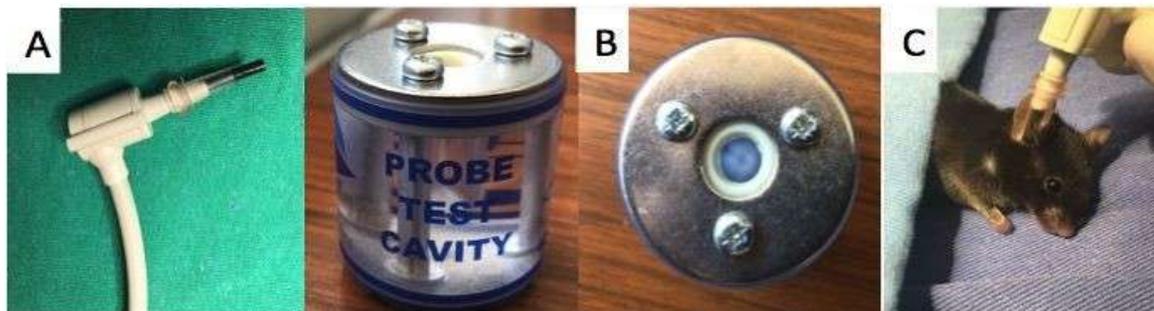
Foram excluídos da pesquisa os animais que apresentaram alterações na otoscopia e parâmetros de amplitude do sinal ou relação S/R negativa em todas as bandas de frequências testadas no primeiro exame (E1).

#### 4.7. Exames de EOAPD

Os animais foram avaliados com exame de EOAPD mensalmente, sendo o E1 realizado em julho de 2017, aos 2 meses de idade e o último exame (E13), em julho de 2018, aos 14 meses de idade.

Para viabilizar a realização do exame de EOA, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina (65 mg/kg [50 mg/ml]) e Xylasina (6,5 mg/kg [20mg/ml]). Após a administração da anestesia, os animais foram pesados e levados para a caixa de exames, confeccionada pela pesquisadora com vistas à redução da interferência do ruído ambiental.

Os exames foram realizados com um aparelho de Emissões Otoacústicas Evocadas (ERO-SCAN® - MAICO Diagnostics) utilizando-se uma oliva adaptada tamanho recém-nascido e calibrada em uma cavidade teste antes de cada bateria de exames. Cada animal foi acomodado dentro da caixa de exame e aquecido para que não houvesse risco de hipotermia durante o procedimento (Figura 7).



**Figura 7:** A – Oliva adaptada tamanho recém-nascido; B – Cavidade teste para calibração; C – Animal acomodado dentro da caixa de exame. Fonte: elaborado pela autora.

Para a obtenção do produto de distorção ( $2f_1-f_2$ ), foram usados dois tons puros na razão de  $f_2/f_1=1,22$ , apresentados na intensidade média de 65 dB NPS para  $f_1$  e 55 dB NPS para  $f_2$ .

Não foi determinado valor de referência para considerar normalidade do exame, uma vez que não foi encontrada padronização dos valores de normalidade de emissões otoacústicas para essa linhagem de animal.

#### **4.8. Administração da Medicação**

Os animais receberam uma dose de melatonina na concentração de 10 mg/kg/dia. O medicamento foi adquirido do Laboratório Sigma Aldrich, que era pesado e diluído em etanol na concentração de 50 mg/ml, conforme orientação do fabricante (Figura 8).

A administração foi feita pela pesquisadora diariamente dentro da sala do biotério, onde os animais ficaram alojados. Cada animal era colocado por vez em uma mesa, onde era posicionado e imobilizado manualmente (Figura 8), e recebia o medicamento por via oral. O medicamento era medido e ofertado com o auxílio de um pipetador ajustável com ponteira plástica descartável. Cada animal ingeria um volume de 50  $\mu$ l de melatonina ou do veículo, de acordo com o grupo a que

pertencesse.



**Figura 8.** (A) Pesagem do medicamento; (B) pesquisadora administrando o medicamento por via oral ao animal.

#### **4.9. Medida dos níveis de ruído no alojamento de animais**

Em virtude de o presente estudo abordar o tema da perda auditiva, foi necessário realizar um experimento secundário no qual foram verificados os níveis de ruído aos quais os animais ficaram expostos durante o período de permanência no alojamento da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM/UnB).

A mensuração dos níveis de ruído foi realizada nas salas de alojamento e nos corredores de entrada e principal do biotério da Universidade em dias, horários e turnos distintos, definidos por sorteio.

As medidas foram obtidas com o decibelímetro (Instrutherm® modelo DEC-415). A mensuração foi iniciada pelo corredor de entrada, em seguida, foi realizada nas salas que estivessem acessíveis.

A ordem de medida das salas seguia a numeração 1, 2, 3, 7, 9 e 11. Por último, era medido o ruído no corredor principal. Este procedimento era repetido por

três vezes seguidas em cada dia com intervalo de 5 minutos entre as mensurações e o valor adotado era a média das 3 mensurações de cada ambiente.

Para medir o ruído dentro das salas, a porta era fechada e o equipamento era posicionado a um metro do chão, para que fosse mantido o mesmo padrão da realização da coleta. Todas as coletas foram realizadas pelas mesmas pesquisadoras, que foram previamente treinadas por um período de cinco dias.

As coletas foram realizadas na primeira quinzena de novembro de 2018 por um período de 10 dias.

#### **4.10. Eutanásia**

Para a análise histológica, os animais foram eutanasiados com 14 meses de idade, após o E13.

No momento programado da eutanásia, os animais eram colocados em uma câmara de vidro com concentração de 40% de CO<sub>2</sub>, resultando em morte por depressão do SNC e hipóxia, devido ao deslocamento do oxigênio durante a troca gasosa alveolar. O emprego desse método se sobressai aos demais por ser rápido, indolor, de baixo custo e por manter os tecidos sem resíduos químicos.

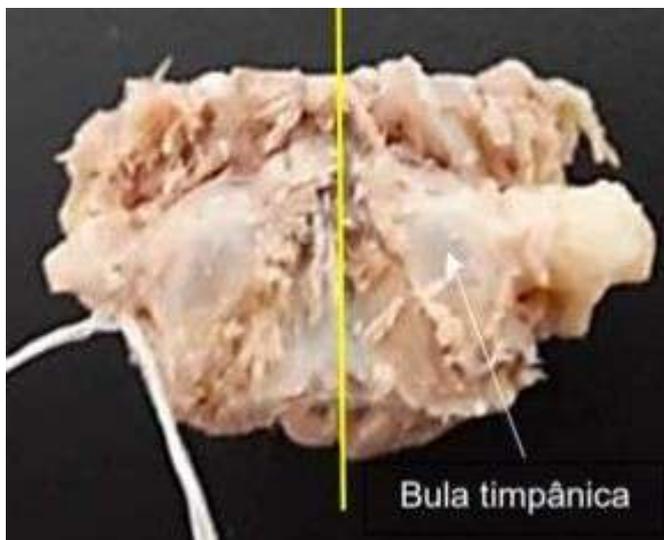
#### **4.11. Processamento histológico**

Após a eutanásia, os animais foram perfundidos por via cardíaca com soro fisiológico para a remoção do sangue, e, em seguida, foi injetada uma solução de paraformaldeído a 10% para a fixação dos tecidos.

As cabeças foram excisadas para os estudos histológicos e as peças anatômicas foram processadas segundo protocolo padrão de processamento histológico de rotina, pela imersão em soluções com concentrações crescentes de álcool para a desidratação (70%, 80%, 90% e 3x 99,8%) por até uma hora cada, seguida de três banhos em xilol por até uma hora cada, para a remoção das gorduras (diafanização), e, posteriormente, incluídas em parafina a 60 °C ou resina sintética Paraplast® (Sigma-Aldrich).

O emblocamento das peças foi feito em dois planos anatômicos, transversal e sagital. Para o plano transversal, a superfície visível da bula timpânica foi colocada para baixo no molde de inclusão. Para o sagital, a bula com a superfície visível para

cima, como mostrado na Figura 9, foi girada 90 graus no sentido da membrana timpânica e foi, então, incluída.



**Figura 9.** Fotografia da peça preparada para o processo de emblocamento.

A microtomia teve como ponto de partida a superfície das bulas (faces anterior e lateral) e os cortes histológicos foram feitos com espessura de 6  $\mu\text{m}$  em ambos os planos. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina.

As imagens foram capturadas no digitalizador Aperio ScanScope® com objetiva de 20x e analisadas qualitativamente por um único observador no programa ImageScope version 11.2.0.780 (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA).

#### **4.12. Obtenção dos dados histológicos**

Foram realizadas análises monocego das fotomicrografias das lâminas dos grupos. Durante análise, foi considerado o critério de células viáveis por área. A análise da densidade celular foi realizada pela quantificação das células viáveis presentes em cada fotomicrografia do material, fracionado pela área selecionada ( $100 \mu\text{m}^2$ ). Foram realizadas análises morfométricas e histopatológicas das CCE e CCI, gânglio espiral, estria vascular e ligamento espiral.

#### **4.13. Procedimentos analíticos**

O tamanho da amostra foi definido com base no cálculo realizado pela CEUA/UnB.

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias empregando-se o teste de Bartlett. Para comparações entre dois grupos com distribuição normal, foi usado o Teste t para os dados paramétricos ou Mann-Whitney para os dados não paramétricos.

Foram consideradas significativas, diferenças com  $p < 0,05$ .

As análises foram realizadas empregando-se o programa Prism® 5 Software Package (GraphPad, USA, 2005).

#### **4.14. Considerações éticas**

Este protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade de Brasília (CEUA) com o número de protocolo 57/2017 (ANEXO A). Desde o início da fase experimental, os animais foram mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina, em gaiolas com enriquecimento ambiental, acesso a ração balanceada, água potável, temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  ° C), ciclos naturais de sono e vigília e foram manuseados conforme as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (100).

## 5. RESULTADOS

Como descrito na seção Material e Métodos, todos os animais foram submetidos à avaliação de higidez por Médico Veterinário, otoscopia e avaliação de EOAPD.

Após o E1, foi excluído um animal por apresentar todos os valores de amplitude de EOAPD negativos.

### 5.1. Análises das amplitudes e relação sinal ruído

Foi realizada uma análise por pares entre os CB e CV, na qual, se verificou que não havia diferença (Teste t,  $p = 0.896$ ) entre os grupos. Assim, esses grupos foram combinados e são apresentados aqui como um único grupo, denominado Grupo Controle (GC).

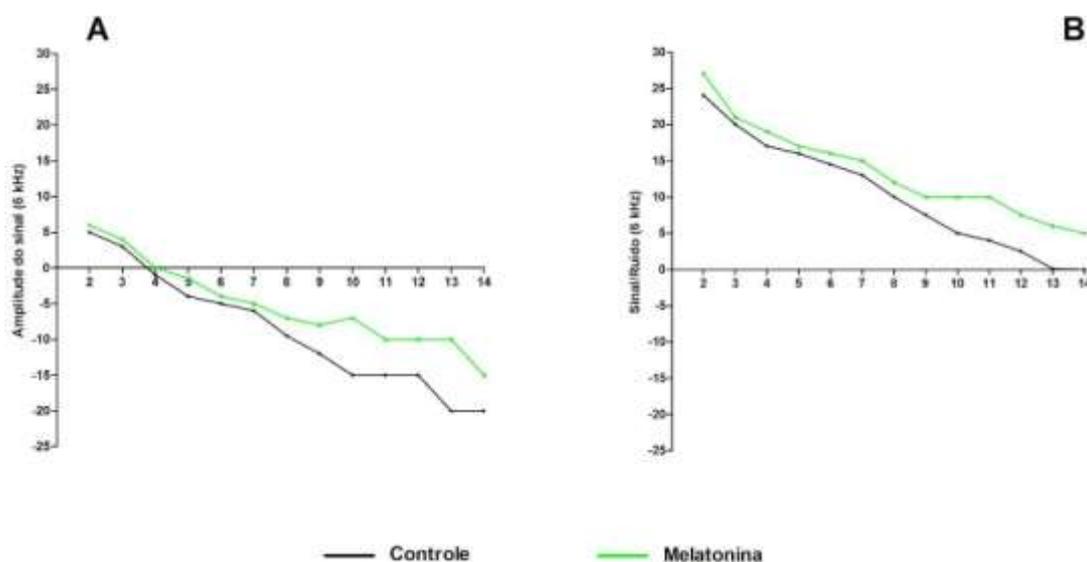
#### 5.1.1. Frequência de 6 kHz

Na análise da amplitude na frequência de 6kHz não houve diferença entre as medianas do GC e GE nos E1 (5.0 e 6.0, MW  $p = 0.505$ ), E2 (3.0 e 4.0, MW  $p = 0.615$ ) e E5 (-5.0 e -4.0, MW  $p = 0.168$ ). Foi verificada diferença entre os GC e GM nos E3 (-1.0 e 0.0, MW,  $p = 0.019$ ), E4 (-4.0 e -1.5, MW  $p = 0.011$ ), E6 (-6.0 e -5.0, MW  $p = 0.042$ ), E7 (-9.5 e -7.0, MW  $p = 0.000$ ), E8 (-12.0 e -8.0, MW,  $p < 0.001$ ), E9 (-15.0 e -7.0, MW  $p < 0.001$ ), E10 (-15.0 e -10.0, MW  $p < 0.001$ ), E11 (-15.0 e -10.0, MW  $p = 0.000$ ), E12 (-20.0 e -10.0, MW  $p = 0.000$ ) e E13 (-20.0 e -15.0, MW  $p = 0.000$ ).

Na análise da relação S/R não houve diferença entre as medianas do GC e GM nos E1 (24.0 e 27.0, MW  $p = 0.226$ ), E2 (20.0 e 21.0, MW  $p = 0.143$ ), E3 (17.0 e 19.0, MW  $p = 0.061$ ), E5 (14.5 e 16.0, MW  $p = 0.069$ ) e E6 (13.0 e 15.0, MW  $p = 0.057$ ). Houve diferença entre os GC e GM nos E4 (16.0 e 17.0, MW  $p = 0.042$ ), E7 (10.0 e 12.0, MW  $p = 0.022$ ), E8 (7.5 e 10.0, MW  $p = 0.019$ ), E9 (5.0 e 10.0, MW  $p = 0.002$ ), E10 (4.0 e 10.0, MW  $p = 0.003$ ), E11 (2.5 e 7.5, MW  $p = 0.009$ ), E12 (0.1 e 6.0, MW  $p < 0.001$ ) e E13 (0.0 e 5.0, MW  $p < 0.001$ ).

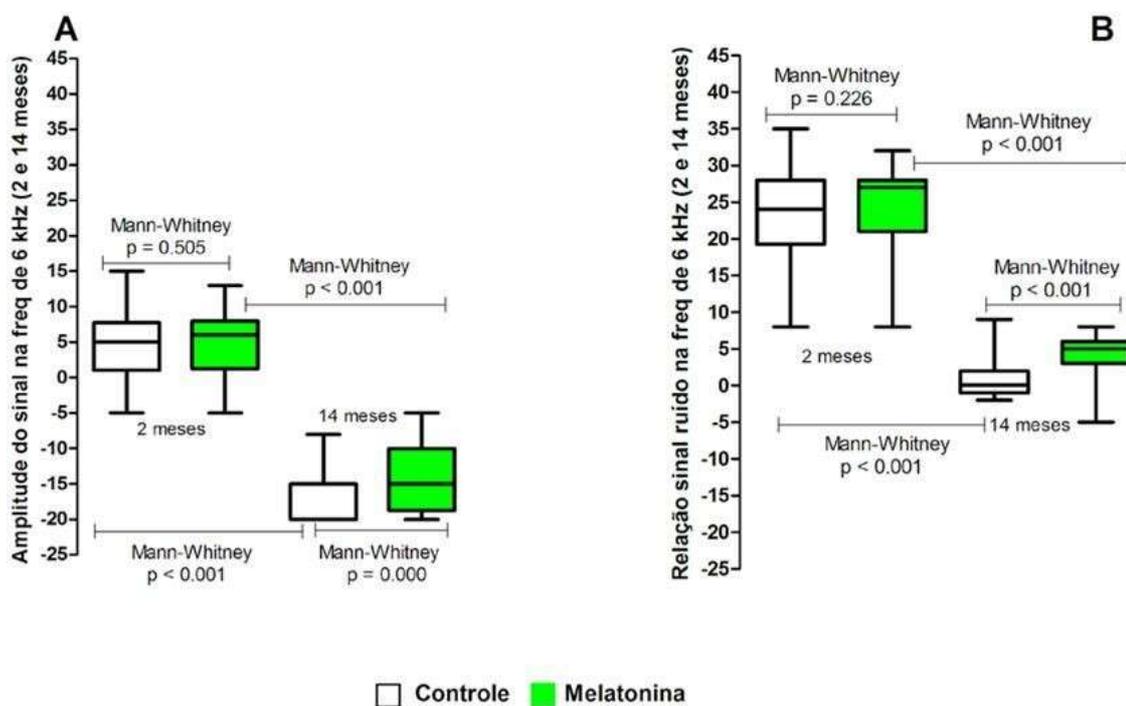
A Figura 10 ilustra os resultados obtidos nos dois parâmetros ao longo dos 14 meses de acompanhamento dos animais. Observe-se que há uma redução dos

valores das medianas tanto na amplitude do sinal quanto na relação S/R, com perfil de variação semelhante entre os GC e GM.



**Figura 10.** Perfil de variação da amplitude do sinal (A) e da relação sinal/ruído (B) na frequência de 6 kHz em camundongos C57BL/6J ao longo de 14 meses. Os dados foram obtidos mensalmente. Em preto estão expressos os valores do grupo controle e em verde os do grupo tratado com melatonina.

Ao se comparar o E13 dos GC e GM, observou-se que houve diferença entre as medianas da amplitude do sinal (-20 e -15, MW  $p = 0.000$ ) e ao se comparar os E1 e E13 do GC (5.0 e -20.0, MW  $p < 0.001$ ) e GM (6.0 e -15, MW  $p < 0.001$ ). Quanto à relação S/R, o mesmo padrão de resposta foi observado com diferença entre as medianas do GC e GM no E13 (0.0 e 5.0, MW  $p < 0.001$ ) e quando comparados os E1 e E13 dos GC (24.0 e 0.0, MW  $p < 0.001$ ) e GM (27 e 5.0, MW  $p < 0.001$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Boxplot da variação da amplitude do sinal (A) e da relação sinal/ruído (B) na frequência de 6 kHz em camundongos C57BL/6J obtidas entre o primeiro e o último exame em um período de 14 meses. Houve diferença intra e intergrupos durante o período. Em branco, boxplot do grupo controle e, em verde, do grupo tratado com melatonina).

As tabelas 1 e 2 apresentam, respectivamente, os valores das médias, dos desvios padrões e das medianas da amplitude do sinal e da relação S/R na frequência de 6 kHz.

**Tabela 1** - Valores de média, desvio padrão e mediana da análise da amplitude do sinal na frequência de 6 kHz.

Exames	Amplitude do sinal 6 kHz				p
	Controle		Melatonina		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
E1	4,3 ± 4,9	5,0	4,9 ± 4,8	6,0	0,505
E2	2,9 ± 4,2	3,0	3,4 ± 3,2	4,0	0,615
E3	-0,6 ± 3,2	-1,0	1,1 ± 2,4	0,0	0,019*
E4	-4,7 ± 4,8	-4,0	-1,8 ± 4,1	-1,5	0,011*
E5	-6,1 ± 5,1	-5,0	-4,2 ± 3,0	-4,0	0,168
E6	-7,8 ± 5,5	-6,0	-5,0 ± 3,4	-5,0	0,042*
E7	-9,7 ± 4,9	-9,5	-6,7 ± 3,2	-7,0	0,000*
E8	-12,5 ± 5,9	-12,0	-7,6 ± 3,1	-8,0	<0,001*
E9	-14,7 ± 5,6	-15,0	-7,7 ± 3,5	-7,0	<0,001*
E10	-14,6 ± 4,9	-15,0	-9,6 ± 3,6	-10,0	<0,001*
E11	-15,2 ± 5,3	-15,0	-10,3 ± 5,3	-10,0	0,000*
E12	-16,4 ± 4,9	-20,0	-11,3 ± 5,1	-10,0	0,000*
E13	-17,6 ± 3,5	-20,0	-13,1 ± 5,4	-15,0	0,000*

**Tabela 2** - Valores de média, desvio padrão e mediana da análise da relação sinal ruído na frequência de 6 kHz.

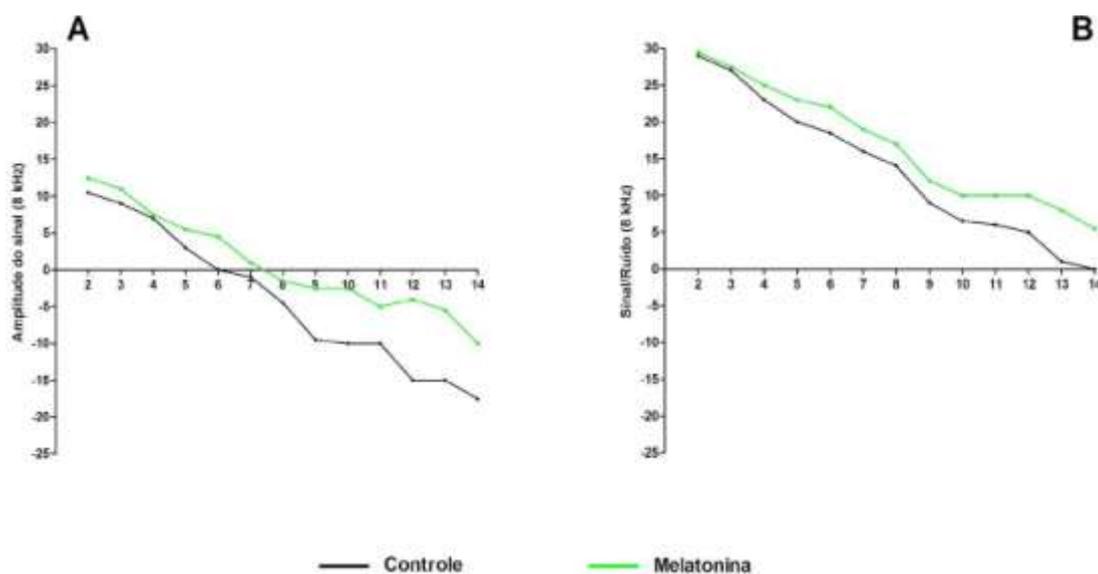
Exames	Relação sinal/ruído 6 kHz				p
	Controle		Melatonina		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
E1	23.18 ± 6.41	24.0	24.50 ± 5.88	27.0	0.226
E2	20.21 ± 5.85	20.0	22.0 ± 4.06	21.0	0.143
E3	16.50 ± 5.09	17.0	18.77 ± 3.55	19.0	0.061
E4	14.66 ± 5.42	16.0	17.63 ± 4.16	17.0	0.042*
E5	13.38 ± 5.28	14.5	15.70 ± 3.17	16.0	0.069
E6	11.77 ± 5.70	13.0	14.50 ± 3.27	15.0	0.057
E7	9.67 ± 4.83	10.0	12.17 ± 3.68	12.0	0.022*
E8	6.91 ± 5.95	7.50	9.40 ± 2.81	10.0	0.019*
E9	5.11 ± 5.12	5.0	9.10 ± 3.12	10.0	0.002*
E10	4.45 ± 4.52	4.0	8.59 ± 3.50	10.0	0.003*
E11	3.44 ± 3.79	2.5	6.91 ± 3.36	7.50	0.009*
E12	1.76 ± 3.14	0.1	5.75 ± 3.52	6.0	<0.001*
E13	1.0 ± 2.30	0.0	4.16 ± 2.95	5.0	<0.001*

### 5.1.2. Frequência de 8 kHz

Na análise da amplitude na frequência de 8 kHz não houve diferença entre as medianas do GC e GM nos E1 (10.5 e 12.5, MW  $p = 0.298$ ), E2 (9.0 e 11.0, MW  $p = 0.139$ ) e E3 (7.0 e 7.5, MW  $p = 0.204$ ). Nos E4 (3.0 e 5.5, MW  $p = 0.011$ ), E5 (0.0 e 4.5, MW  $p = 0.007$ ), E6 (-1.0 e 1.0, MW  $p = 0.012$ ), E7 (-4.5 e -1.5, MW  $p = 0.002$ ), E8 (-9.5 e -2.5, MW  $p < 0.001$ ), E9 (-10.0 e -2.5, MW  $p < 0.001$ ), E10 (-10.0 e -5.0, MW  $p < 0.001$ ), E11 (-15.0 e -4.0, MW  $p < 0.001$ ), E12 (-15.0 e -5.5, MW  $p < 0.001$ ) e E13 (-17.5 e -10.0, MW,  $p = 0.004$ ) houve diferença entre os GC e GM.

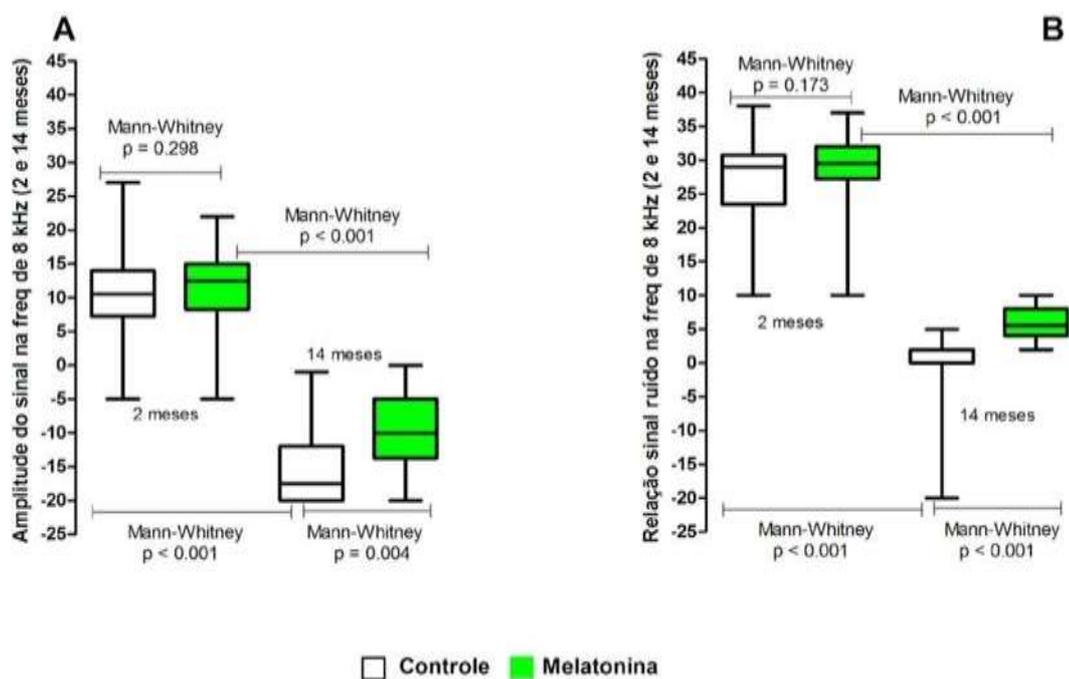
Quanto à relação S/R não houve diferença entre as medianas do GC e GM nos E1 (29.0 e 29.5, MW  $p = 0.173$ ) e E3 23.0 e 25.0, MW  $p = 0.072$ ). A diferença entre os GE e GM foi observada nos E2 (27.0 e 27.5, MW  $p = 0.043$ ), E4 (20.0 e 23.0, MW  $p = 0.010$ ), E5 (18.5 e 22.0, MW  $p = 0.009$ ), E6 (16.0 e 19.0, MW  $p = 0.009$ ), E7 (14.0 e 17.0, MW  $p = 0.006$ ), E8 (9.0 e 12.0, MW  $p = 0.006$ ), E9 (6.5 e 10.0, MW,  $p < 0.001$ ), E10 (6.0 e 10.0, MW,  $p < 0.001$ ), E11 (5.0 e 10.0, MW  $p < 0.001$ ), E12 (1.0 e 8.0, MW,  $p < 0.001$ ) e E13 (0.0 e 5.5, MW,  $p < 0.001$ ).

A Figura 12 ilustra os resultados obtidos nos dois parâmetros ao longo dos 14 meses de acompanhamento dos animais. Observe-se que há uma redução dos valores das medianas tanto na amplitude do sinal quanto na relação S/R, com perfil de variação semelhante entre os GC e GM.



**Figura 12.** Perfil de variação da amplitude do sinal (A) e da relação sinal/ruído (B) na frequência de 8 kHz em camundongos C57BL/6J ao longo de 14 meses. Os dados foram obtidos mensalmente. Em preto estão expressos os valores do grupo controle e em verde os do grupo tratado com melatonina.

Ao se comparar o E13 dos GC e GM, observou-se que houve diferença entre as medianas da amplitude do sinal (-17.5 e -10.0, MW,  $p = 0.004$ ) e ao se comparar os E1 e E13 do GC (10.5 e -17.5, MW  $p < 0.001$ ) e do GM (12.5 e -10.0, MW  $p < 0.001$ ). Quanto à relação S/R, o mesmo padrão de resposta foi observado com diferença entre as medianas do GC e GM no E13 (0.0 e 5.5, MW  $p < 0.001$ ) e quando comparados os E1 e E13 dos GC (29.0 e 0.0, MW  $p < 0.001$ ) e GM (29.5 e 5.5, MW  $p < 0.001$ ) (Figura 13).



**Figura 13.** Boxplot da variação da amplitude do sinal (A) e da relação sinal/ruído (B) na frequência de 8 kHz em camundongos C57BL/6J obtidas entre o primeiro e o último exame em um período de 14 meses. Houve diferença intra e intergrupos durante o período. Em branco, boxplot do grupo controle e, em verde, do grupo tratado com melatonina.

As tabelas 3 e 4 apresentam os valores das médias, dos desvios padrões e das medianas da amplitude do sinal e da relação S/R na frequência de 8 kHz.

**Tabela 3** - Valores de média, desvio padrão e mediana da análise da amplitude do sinal na frequência de 8kHz.

Exames	Amplitude do sinal 8 kHz				p
	Controle		Melatonina		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
E1	10.13 ± 6.67	10.5	10.75 ± 6.83	12.5	0.298
E2	8.09 ± 6.39	9.0	10.07 ± 4.60	11.0	0.139
E3	4.42 ± 7.18	7.0	6.90 ± 3.96	7.5	0.204
E4	0.42 ± 8.31	3.0	5.10 ± 3.90	5.5	0.011*
E5	-1.10 ± 7.52	0.0	3.16 ± 4.39	4.5	0.007*
E6	-3.27 ± 7.60	-1.0	1.36 ± 4.51	1.0	0.012*
E7	-5.65 ± 7.16	-4.5	-1.10 ± 3.79	-1.5	0.002*
E8	-9.17 ± 6.87	-9.5	-2.36 ± 3.27	-2.5	<0.001*
E9	-10.86 ± 6.16	-10.0	-2.80 ± 3.32	-2.5	<0.001*
E10	-11.41 ± 5.96	-10.0	-3.83 ± 3.17	-5.0	<0.001*
E11	-12.32 ± 6.89	-15.0	-4.41 ± 3.68	-4.0	<0.001*
E12	-13.79 ± 6.68	-15.0	-6.54 ± 4.0	-5.5	<0.001*
E13	-15.22 ± 5.94	-17.5	-9.62 ± 5.25	-10.0	0.004*

**Tabela 4** - Valores de média, desvio padrão e mediana da análise da relação sinal ruído na frequência de 8kHz.

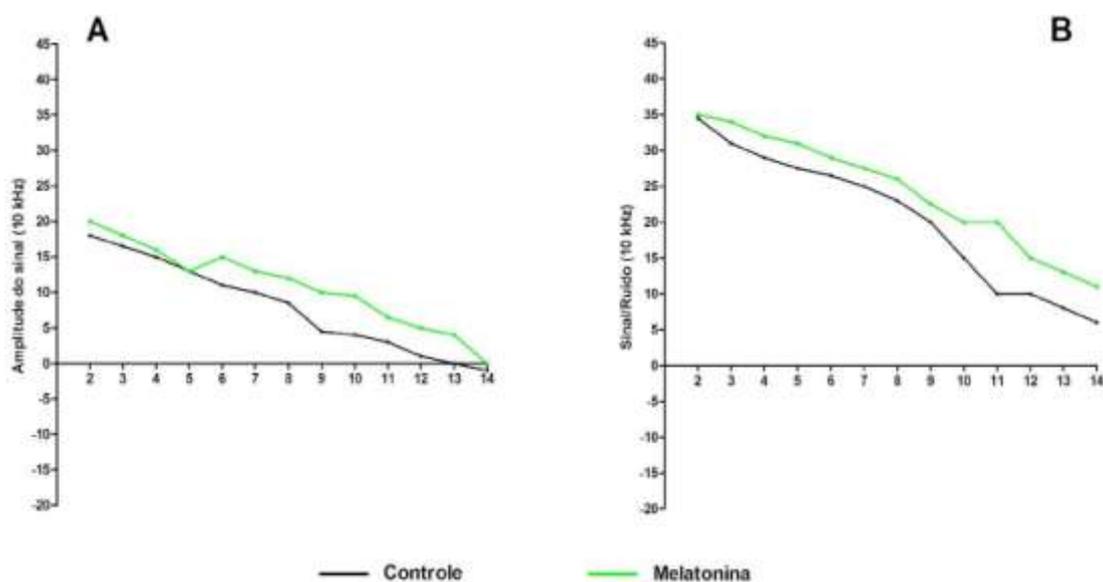
Exames	Relação sinal/ruído 8 kHz				p
	Controle		Melatonina		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
E1	26.91 ± 5.97	29.0	28.22 ± 5.97	29.5	0.173
E2	24.48 ± 5.74	27.0	27.17 ± 3,72	27.5	0.043*
E3	20.95 ± 8.14	23.0	24.90 ± 3.75	25.0	0.072
E4	17.90 ± 8.32	20.0	23.07 ± 3.88	23.0	0.010*
E5	16.77 ± 7.34	18.5	21.20 ± 3.94	22.0	0.009*
E6	14.33 ± 7.11	16.0	18.93 ± 4.11	19.0	0.009*
E7	12.80 ± 6.41	14.0	16.50 ± 4.04	17.0	0.006*
E8	8.91 ± 6.29	9.0	12.50 ± 3.73	12.0	0.006*
E9	7.11 ± 4.94	6.5	11.90 ± 3.51	10.0	<0.001*
E10	5.47 ± 3.90	6.0	10.29 ± 2.97	10.0	<0.001*
E11	4.58 ± 3.10	5.0	9.58 ± 2.94	10.0	<0.001*
E12	2.26 ± 2.62	1.0	7.54 ± 2.14	8.0	<0.001*
E13	0.97 ± 1.64	0.0	5.95 ± 2.45	5.5	<0.001*

### 5.1.3. Frequência de 10 kHz

Na análise da amplitude na frequência de 10 kHz não houve diferença entre as medianas dos GC e GE nos E1 (18.0 e 20.0, MW  $p = 0.155$ ). Nos E2 (16.5 e 18.0, MW  $p = 0.012$ ) e E3 (15.0 e 16.0, MW  $p = 0.018$ ), E4 (13.0 e 13.0, MW  $p = 0.003$ ), E5 (11.0 e 15.0, MW  $p = 0.015$ ), E6 (10.0 e 130.0, MW,  $p = 0.014$ ), E7 (8.5 e 12.0, MW,  $p = 0.027$ ), E8 (4.5 e 10.0, MW,  $p = 0.008$ ), E9 (4.0 e 9.5, MW,  $p < 0.001$ ), E10 (3.0 e 6.5, MW,  $p < 0.001$ ), E11 (1.0 e 5.0, MW,  $p < 0.001$ ), E12 (0.0 e 4.0, MW  $p < 0.001$ ) e E13 (-1.0 e 0.0, MW,  $p = 0.005$ ) foi verificada diferença entre os GC e GM.

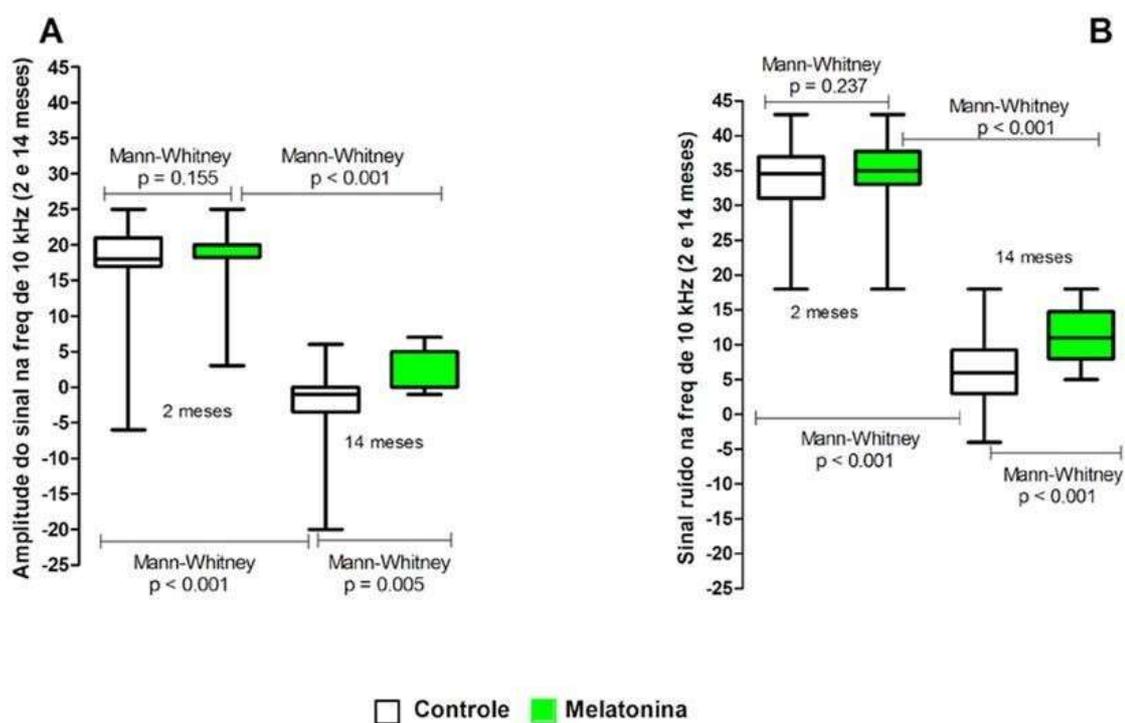
Na análise do parâmetro de relação S/R não houve diferença entre as medianas dos GC e GM no E1 (34.5 e 35.0, MW  $p = 0.237$ ). Enquanto nos E2 (31.0 e 34.0, MW  $p = 0.001$ ), E3 (29.0 e 32.0, MW  $p = 0.005$ ), E4 (27.5 e 31.0, MW  $p = 0.014$ ), E5 (26.5 e 29.0, MW  $p = 0.039$ ), E6 (25.0 e 27.5, MW  $p = 0.015$ ), E7 (23.0 e 26.0, MW  $p = 0.001$ ), E8 (20.0 e 22.0, MW  $p = 0.006$ ), E9 (15.0 e 20.0, MW,  $p < 0.001$ ), E10 (10.0 e 20.0, MW,  $p < 0.001$ ), E11 (10.0 e 15.0, MW,  $p < 0.001$ ), E12 (8.0 e 13.0, MW,  $p < 0.001$ ) e E13 (6.0 e 11.0, MW,  $p < 0.001$ ) foi observada diferença entre os GC e GM.

A Figura 14 ilustra os resultados obtidos nos dois parâmetros ao longo dos 14 meses de acompanhamento dos animais. Observe-se que há uma redução dos valores das medianas tanto na amplitude do sinal quanto na relação S/R, com perfil de variação semelhante entre os GC e GM.



**Figura 14.** Perfil de variação da amplitude do sinal (A) e da relação sinal/ruído (B) na frequência de 10 kHz em camundongos C57BL/6J ao longo de 14 meses. Os dados foram obtidos mensalmente. Em preto estão expressos os valores do grupo controle e em verde os do grupo tratado com melatonina.

Ao se comparar o E13 dos GC e GM, observou-se que houve diferença entre as medianas da amplitude do sinal (-1.0 e 0.0, MW  $p = 0.005$ ) e ao se comparar os E1 e E13 do GC (18.0 e -1.0, MW  $p < 0.001$ ) e GM (20.0 e 0.0, MW  $p < 0.001$ ). Quanto à relação S/R, o mesmo padrão de resposta foi observado com diferença entre GC e GM (6.0 e 11, MW  $p < 0.001$ ) no E13 e quando comparados os E1 e E13 dos GC (34.5 e 6.0, MW  $p < 0.001$ ) e GM (35 e 11, MW  $p < 0.001$ ) (Figura 15).



**Figura 15.** Boxplot da variação da amplitude do sinal (A) e da relação sinal/ruído (B) na frequência de 10 kHz em camundongos C57BL/6J obtidas entre o primeiro e o último exame em um período de 14 meses. Houve diferença intra e intergrupos durante o período. Em branco, boxplot do grupo controle e, em verde, do grupo tratado com melatonina).

As tabelas 5 e 6 apresentam os valores das médias, dos desvios padrões e das medianas da amplitude do sinal e da relação S/R na frequência de 10 kHz.

**Tabela 5** - Valores de média, desvio padrão e mediana da análise da amplitude do sinal na frequência de 10kHz.

Exames	Amplitude do sinal 10 kHz				p
	Controle		Melatonina		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
E1	17.54 ± 5.91	18.0	19.03 ± 3.86	20.0	0.155
E2	15.88 ± 5.63	16.5	18.53 ± 2.55	18.0	0.012*
E3	13.54 ± 6.50	15.0	16.73 ± 2.77	16.0	0.018*
E4	11.16 ± 7.44	13.0	15.43 ± 2.96	13.0	0.003*
E5	10.10 ± 7.82	11.0	13.83 ± 3.16	15.0	0.015*
E6	7.64 ± 9.38	10.0	12.27 ± 3.19	13.0	0.014*
E7	6.04 ± 8.45	8.5	11.10 ± 3.14	12.0	0.027*
E8	1.97 ± 9.81	4.5	8.66 ± 3.42	10.0	0.008*
E9	-0.04 ± 9.22	4.0	7.83 ± 3.26	9.5	<0.001*
E10	-0.31 ± 8.36	3.0	6.20 ± 3.06	6.5	<0.001*
E11	-1.64 ± 8.24	1.0	5.04 ± 3.05	5.0	<0.001*
E12	-3.25 ± 8.13	0.0	3.70 ± 3.35	4.0	<0.001*
E13	-4.17 ± 8.14	-1.0	1.95 ± 2.80	0.0	0.005*

**Tabela 6** - Valores de média, desvio padrão e mediana da análise da relação sinal ruído na frequência de 10kHz.

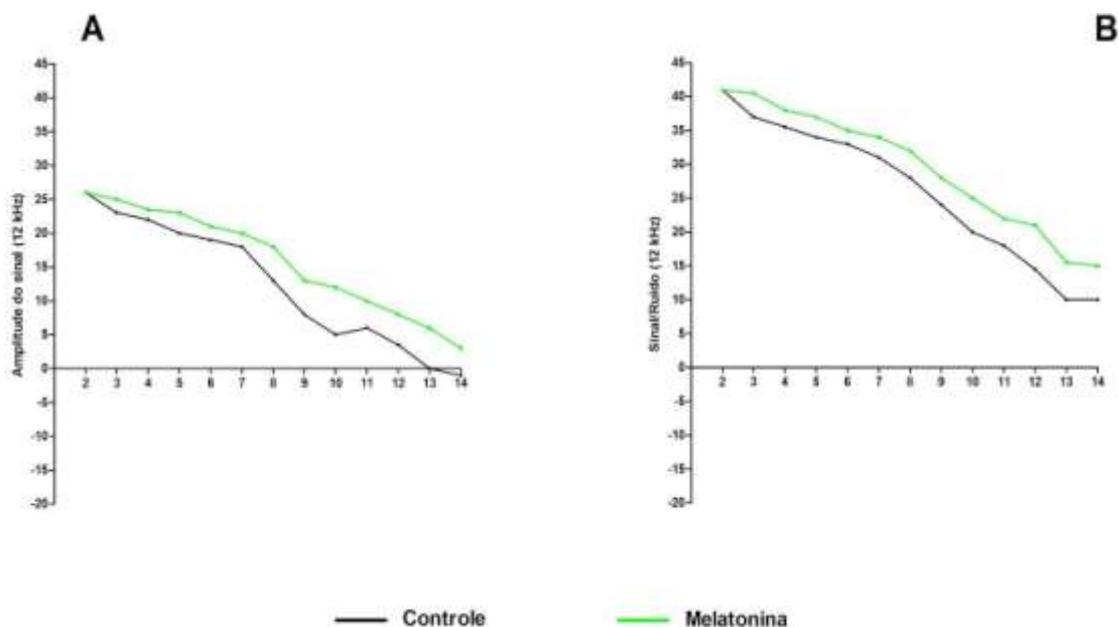
Exames	Relação sinal/ruído 10 kHz				p
	Controle		Melatonina		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
E1	33.50 ± 4.88	34.5	34.78 ± 4.34	35.0	0.237
E2	30.13 ± 5.67	31.0	33.70 ± 2.87	34.0	0.001*
E3	27.40 ± 7.10	29.0	31.93 ± 3.34	32.0	0.005*
E4	25.94 ± 7.34	27.5	30.37 ± 3.22	31.0	0.014*
E5	25.13 ± 7.58	26.5	28.50 ± 2.86	29.0	0.039*
E6	22.23 ± 9.16	25.0	26.77 ± 3.51	27.5	0.015*
E7	20.30 ± 8.34	23.0	25.43 ± 3.44	26.0	0.001*
E8	16.52 ± 9.32	20.0	21.93 ± 3.81	22.0	0.006*
E9	13.34 ± 8.36	15.0	20.43 ± 4.47	20.0	<0.001*
E10	11.09 ± 7.08	10.0	18.33 ± 5.48	20.0	<0.001*
E11	9.11 ± 6.39	10.0	16.08 ± 4.12	15.0	<0.001*
E12	7.35 ± 5.35	8.0	13.79 ± 4.07	13.0	<0.001*
E13	5.88 ± 4.71	6.0	11.29 ± 3.94	11.0	<0.001*

#### 5.1.4. Frequência de 12 kHz

A análise da amplitude na frequência de 12kHz não houve diferença entre as medianas do GC e GM no E1 (26.0 e 26.0, MW  $p = 0.759$ ). Foi verificada diferença entre os GC e GM nos E2 (23.0 e 25.0, MW  $p = 0.006$ ), E3 (22.0 e 23.5, MW  $p = 0.020$ ), E4 (20.0 e 23.0, MW  $p = 0.002$ ), E5 (19.0 e 21.0, MW,  $p = 0.006$ ), E6 (18.0 e 20.0, MW,  $p = 0.002$ ), E7 (13.0 e 18.0, MW,  $p = 0.003$ ), E8 (8.0 e 13.0, MW,  $p = 0.018$ ), E9 (5.0 e 12.0, MW  $p = 0.003$ ), E10 (6.0 e 10.0, MW,  $p = 0.009$ ), E11 (3.5 e 8.0, MW,  $p < 0.001$ ), E12 (0.0 e 6.0, MW  $p < 0.001$ ) e E13 (-1.0 e 3.0, MW,  $p = 0.003$ ).

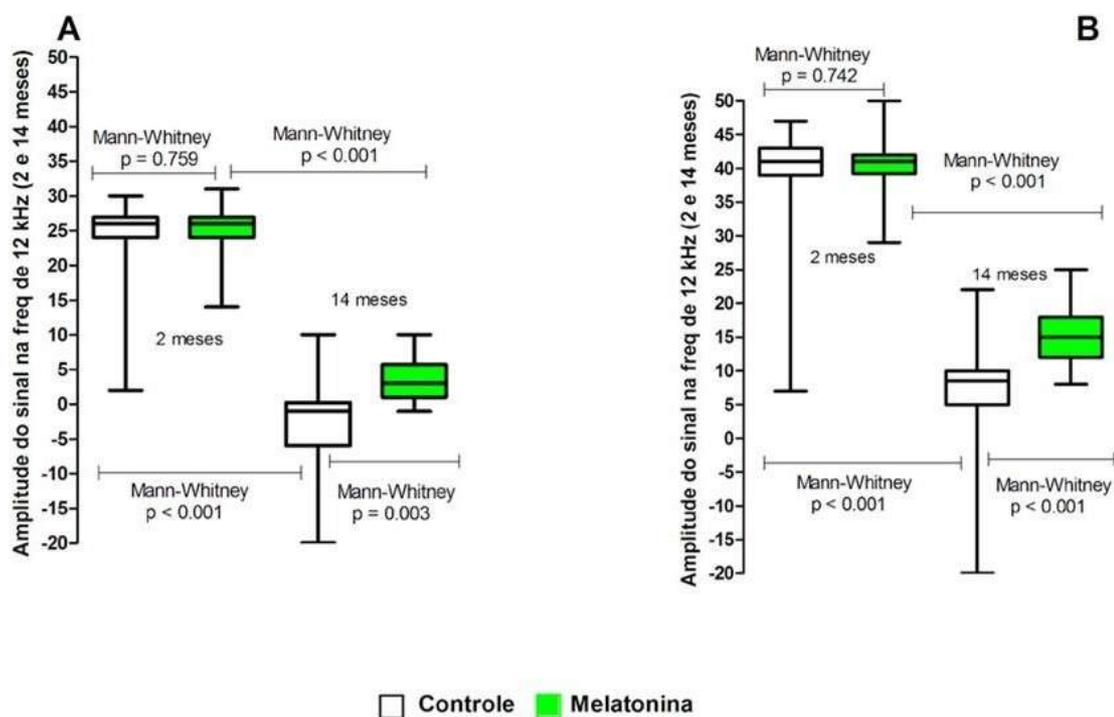
Na análise do parâmetro de relação S/R não houve diferença entre as medianas do GC e GM nos E1 (41.0 e 41.0, MW  $p = 0.742$ ) e no E8 (24.0 e 28.0, MW  $p = 0.062$ ). Foi verificada diferença entre os GC e GM nos E2 (37.0 e 40.5, MW  $p = 0.003$ ), E3 (35.5 e 38.0, MW  $p = 0.012$ ), E4 (34.0 e 37.0, MW  $p = 0.002$ ), E5 (33.0 e 35.0, MW  $p = 0.004$ ), E6 (31.0 e 34.0, MW  $p = 0.005$ ), E7 (28.0 e 32.0, MW  $p = 0.005$ ), E9 (20.0 e 25.0, MW  $p = 0.001$ ), E10 (18.0 e 22.0, MW,  $p = 0.003$ ), E11 (14.5 e 21.0, MW  $p = 0.001$ ), E12 (10.0 e 15.5, MW  $p = 0.002$ ) e E13 (10.0 e 15.0, MW,  $p < 0.001$ ).

A Figura 16 ilustra os resultados obtidos nos dois parâmetros ao longo dos 14 meses de acompanhamento dos animais. Observe-se que há uma redução dos valores das medianas tanto na amplitude do sinal quanto na relação S/R, com perfil de variação semelhante entre os GC e GM.



**Figura 16.** Perfil de variação da amplitude do sinal (A) e da relação sinal/ruído (B) na frequência de 12 kHz em camundongos C57BL/6J ao longo de 14 meses. Os dados foram obtidos mensalmente. Em preto estão expressos os valores do grupo controle e em verde os do grupo tratado com melatonina.

Ao se comparar o E13 dos GC e GM, observou-se que houve diferença entre as medianas da amplitude do sinal (-1.0 e 3.0, MW  $p = 0.003$ ) e ao se comparar os E1 e E13 do GC (26.0 e -1.0, MW  $p < 0.001$ ) e do GM (26.0 e 3.0, MW  $p < 0.001$ ). Quanto à relação S/R, o mesmo padrão de resposta foi observado com diferença entre as medianas do GC e GM no E13 (10.0 e 15.0, MW  $p < 0.001$ ) e quando comparados os E1 e E13 dos GC (41.0 e 10.0, MW  $p < 0.001$ ) e GM (41.0 e 15.0, MW  $p < 0.001$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Boxplot da variação da amplitude do sinal (A) e da relação sinal/ruído (B) na frequência de 12 kHz em camundongos C57BL/6J obtidas entre o primeiro e o último exame em um período de 14 meses. Houve diferença intra e intergrupos durante o período. Em branco, boxplot do grupo controle e, em verde, do grupo tratado com melatonina).

As tabelas 7 e 8 apresentam os valores das médias, dos desvios padrões e das medianas da amplitude do sinal e da relação S/R na frequência de 12 kHz.

**Tabela 7** - Valores de média, desvio padrão e mediana da análise da amplitude do sinal na frequência de 12 kHz.

Exames	Amplitude do sinal 12 kHz				p
	Controle		Melatonina		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
E1	24.68 ± 5.02	26.0	25.28 ± 3.76	26.0	0.759
E2	22.33 ± 6.08	23.0	25.20 ± 3.11	25.0	0.006*
E3	20.69 ± 6.33	22.0	23.37 ± 2.61	23.5	0.020*
E4	17.88 ± 8.20	20.0	22.13 ± 2.72	23.0	0.002*
E5	16.23 ± 9.26	19.0	20.57 ± 3.60	21.0	0.006*
E6	13.46 ± 11.25	18.0	19.27 ± 4.11	20.0	0.002*
E7	11.41 ± 10.93	13.0	17.07 ± 5.67	18.0	0.003*
E8	5.52 ± 12.39	8.0	12.37 ± 5.72	13.0	0.018*
E9	2.20 ± 12.24	5.0	11.17 ± 5.20	12.0	0.003*
E10	0.77 ± 11.9	6.0	8.95 ± 3.38	10.0	0.009*
E11	-0.61 ± 10.44	3.5	7.59 ± 2.75	8.0	<0.001*
E12	-2.26 ± 9.87	0.0	5.91 ± 2.73	6.0	<0.001*
E13	-3.76 ± 9.31	-1.0	-3.25 ± 3.09	3.0	0.003*

**Tabela 8** - Valores de média, desvio padrão e mediana da análise da relação sinal ruído na frequência de 12kHz.

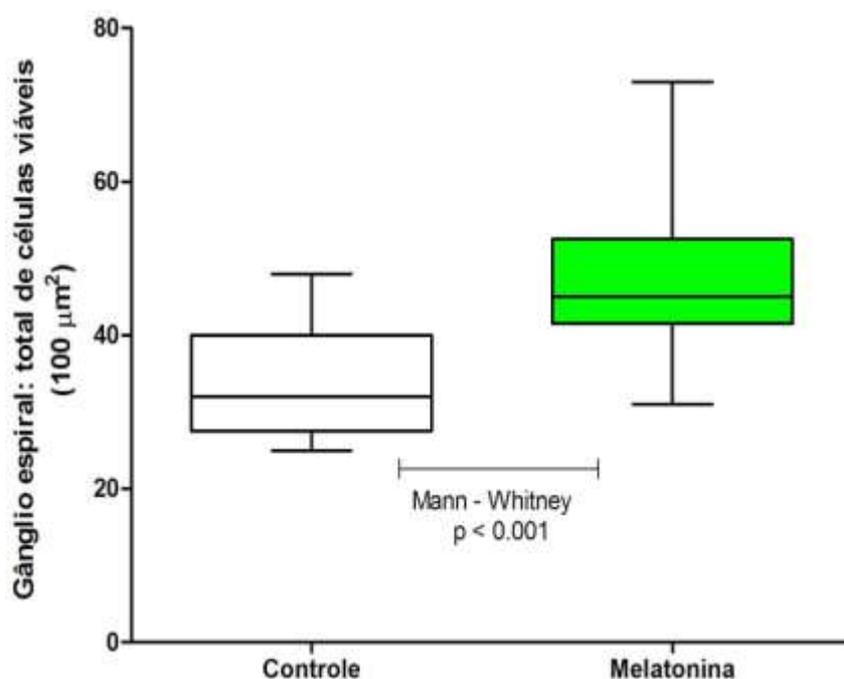
Exames	Relação sinal/ruído 12 kHz				p
	Controle		Melatonina		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
E1	39.89 ± 6.30	41.0	40.50 ± 3.75	41.0	0.742
E2	36.75 ± 6.47	37.0	39.70 ± 4.45	40.5	0.003*
E3	34.63 ± 6.93	35.5	37.90 ± 3.23	38.0	0.012*
E4	31.88 ± 8.39	34.0	36.30 ± 2.81	37.0	0.002*
E5	30.17 ± 9.39	33.0	34.43 ± 4.60	35.0	0.004*
E6	27.60 ± 11.0	31.0	33.50 ± 2.93	34.0	0.005*
E7	25.74 ± 10.22	28.0	30.87 ± 5.53	32.0	0.005*
E8	21.13 ± 10.49	24.0	25.77 ± 6.69	28.0	0.062
E9	17.75 ± 9.91	20.0	24.70 ± 5.97	25.0	0.001*
E10	16.05 ± 8.79	18.0	22.54 ± 5.22	22.0	0.003*
E11	13.74 ± 7.94	14.5	20.13 ± 5.76	21.0	0.001*
E12	10.47 ± 6.44	10.0	17.08 ± 5.96	15.5	0.002*
E13	8.97 ± 6.19	10.0	15.63 ± 5.21	15.0	<0.001*

## 5.2. Avaliação estrutural da cóclea

As células ciliadas externas e internas não permitiram análise quantitativa devido à degeneração dessas estruturas em ambos os grupos.

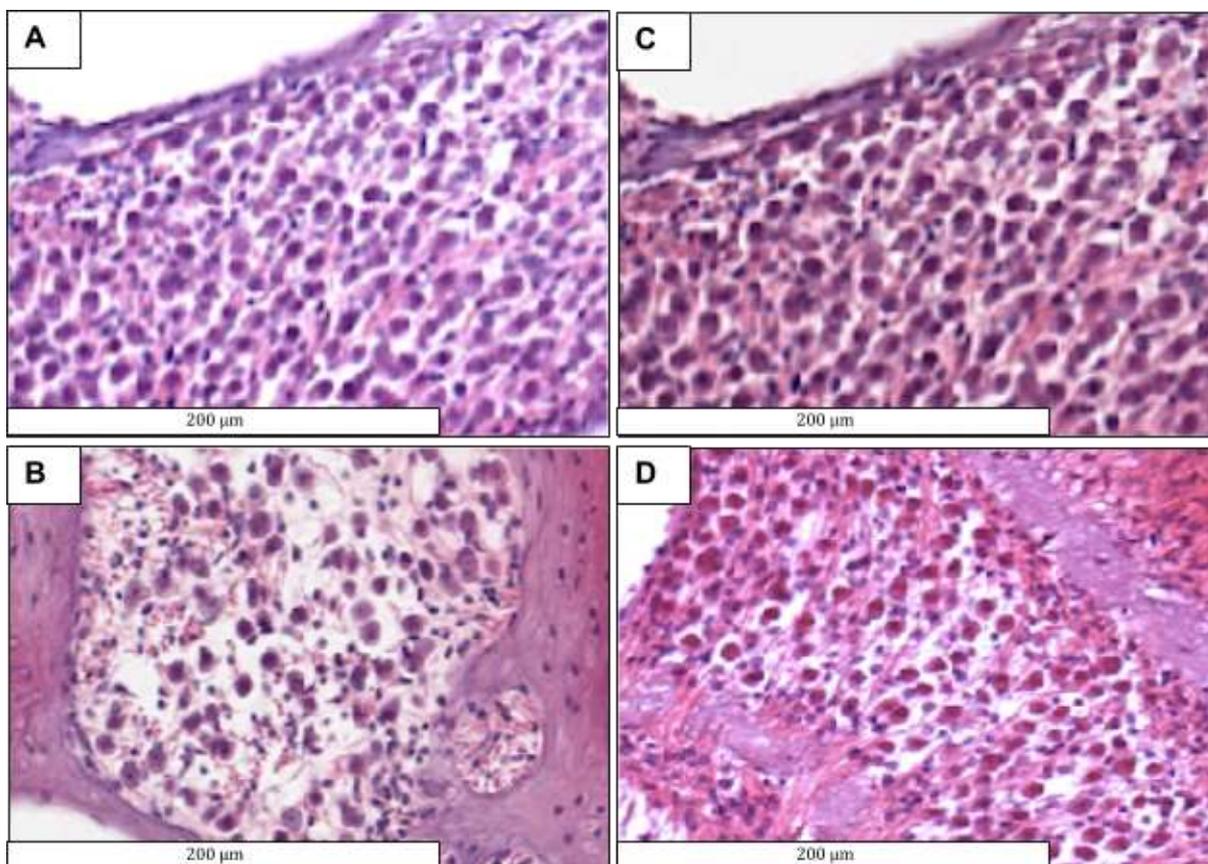
### 5.2.1. Gânglio espiral

Os resultados mostraram que, no GM, a mediana do total de neurônios ganglionares viáveis (45 céls/100  $\mu\text{m}^2$ ) foi maior (MW,  $p < 0,001$ ) do que no grupo controle (32 céls/100  $\mu\text{m}^2$ ) (Figura 18).



**Figura 18.** Total de neurônios ganglionares viáveis por 100  $\mu\text{m}^2$ . Box plot controle (branco) e tratado com melatonina (verde).

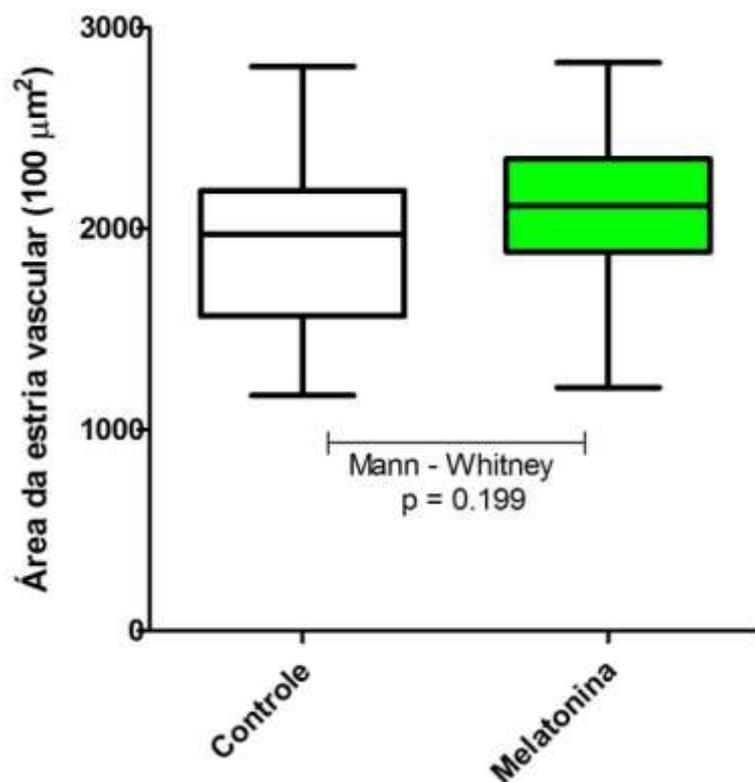
A Figura 19 mostra a fotomicrografia do gânglio espiral de um animal do GC (A e B) e um do GM (C e D). As fotomicrografias de A e C foram obtidas da região apical e as fotomicrografias de B e D são da região basal da cóclea. É possível observar maior densidade celular nos quadros C e D, quando comparado com A e B.



**Figura 19.** Fotomicrografias do gânglio espiral de um animal do grupo controle (A, B) e um tratado diariamente com 10 mg/kg de melatonina (C,D) por 2 a 14 meses. A, C foram obtidas da região apical e B, D da região basal da cóclea. Observa-se maior densidade celular em C e D, quando comparado com A e B. Coloração H&E.

### 5.2.2. Estria vascular

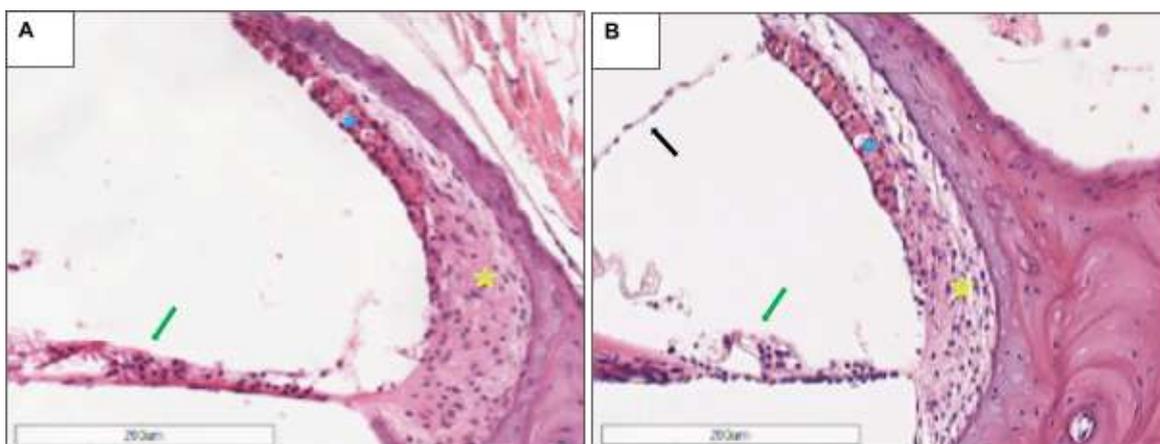
Não houve diferença estatística entre os GC e GM (MW,  $p = 0.199$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** Boxplot do valor total de células viáveis na área da estria vascular por 100  $\mu\text{m}^2$ . Boxplot controle (branco) e tratado com melatonina (verde).

Na Figura 21 é possível visualizar o ducto coclear de um animal do GC (A) e um do GM (B). Os resultados morfométricos mostraram que a densidade celular na estria vascular (estrela azul) não difere entre os dois grupos.

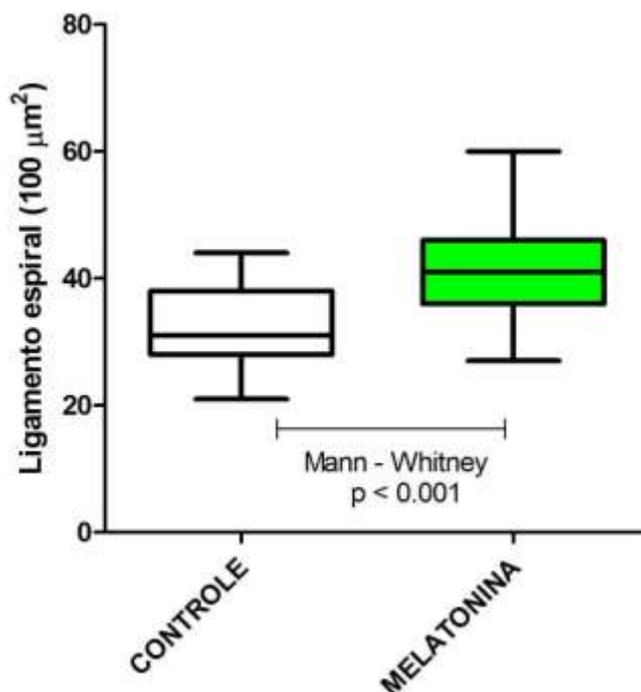
Na figura é possível ainda identificar o ligamento espiral (estrela amarela) e o órgão de Corti (seta verde). No quadro B (GM) o órgão de Corti pode ser mais facilmente visualizado com as células mais preservadas. A membrana de Reissner é vista no quadro B (seta preta).



**Figura 21.** Fotomicrografias do ducto coclear de um animal do grupo controle (A) e um tratado diariamente com 10 mg/kg de melatonina (de 2 a 14 meses). Observar a estria vascular (estrela azul), o ligamento espiral (estrela amarela) e o órgão de Corti (seta verde); a membrana de Reissner é vista em B (seta preta). Os resultados morfométricos mostraram que a densidade celular na estria vascular não difere entre os grupos. Coloração H&E.

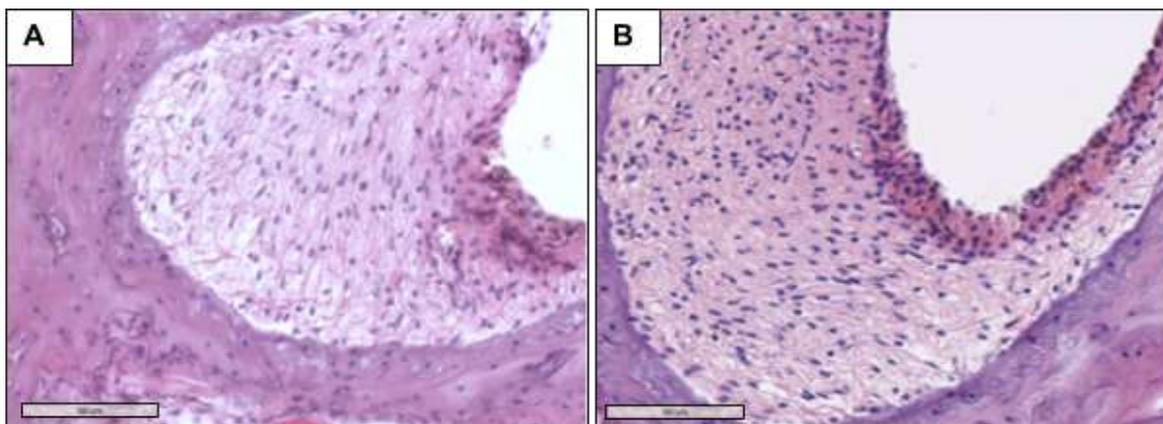
### 5.2.3. Ligamento espiral

No GM, a mediana do total de neurônios viáveis ( $41 \text{ céls}/100 \mu\text{m}^2$ ) foi maior (MW,  $p < 0,001$ ) do que no grupo controle ( $31 \text{ céls}/100 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 22).



**Figura 22.** Total de células viáveis na área do ligamento espiral por  $100 \mu\text{m}^2$ . Box plot controle (branco) e tratado com melatonina (verde).

A Figura 23 apresenta fotomicrografias dos ligamentos espirais de uma animal do GC (A) e um do GM (B). Observa-se que no GM houve preservação das células.



**Figura 23.** Fotomicrografias do ligamento espiral de um animal do grupo controle (A) e um tratado diariamente com 10 mg/kg de melatonina (2 a 14 meses). Observar maior densidade celular em B. Coloração H&E.

### 5.3. Medida dos níveis de ruído do alojamento de animais

Os níveis de ruído nos ambientes do Biotério da FM/UnB variaram entre 53,6 dB NA e 71,0 dB NA, com valor médio de  $61,2 \pm 4,1$  dB NA.

Dentre os ambientes avaliados, o ambiente com maior nível de ruído foi o *hall* de entrada, com ruído médio de  $64,8 \pm 4,1$  dB NA (61,0-71,0), e onde o menor nível de ruído foi registrado foi na sala 2 (S2), com média de  $54,5 \pm 0,6$  dB NA (53,6-55,2).

Os animais utilizados neste experimento estavam alojados na sala 3 (S3), cujos níveis de ruído variaram entre 57,2 dB NA e 59,6 dB NA, com média de  $58,5 \pm 0,8$  dB NA (Tabela 9).

**Tabela 9** - Níveis médios de ruído (em dB NA) nos ambientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Os animais utilizados neste estudo estavam alojados na sala de número 3 (S3), cujos valores estão em destaque.

<b>Ambiente</b>	<b>Entrada</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S7</b>	<b>S9</b>	<b>S11</b>	<b>Corredor</b>
<b>Coleta</b>								
<b>D1</b>	65,2	62,6	53,6	<b>58,8</b>	61,3	63,0	57,6	61,8
<b>D2</b>	64,9	62,3	55,2	<b>58,7</b>	62,3	62,7	57,2	61,0
<b>D3</b>	65,0	62,0	54,0	<b>58,8</b>	61,5	62,9	57,4	61,6
<b>D4</b>	69,1	62,4	54,2	<b>59,3</b>	62,1	63,7	57,1	70,3
<b>D5</b>	67,6	62,2	53,9	<b>58,3</b>	62,4	63,1	57,2	71,0
<b>D6</b>	67,6	66,7	54,6	<b>59,6</b>	62,2	62,9	57,3	70,2
<b>D7</b>	66,3	63,9	54,4	<b>58,6</b>	61,4	62,4	58,1	62,2
<b>D8</b>	66,4	63,5	55,1	<b>57,2</b>	61,8	63,3	57,9	62,4
<b>D9</b>	66,1	63,5	55,1	<b>57,2</b>	61,8	63,3	57,9	62,4
<b>D10</b>	66,3	63,2	54,7	<b>58,8</b>	61,84	63,1	57,5	64,7
<b>MÉDIA±DP</b>	66,5±1,3	63,2±1,4	54,2±0,6	<b>58,5±0,8</b>	61,9±0,4	63,0±0,4	57,5±0,3	64,8±4,1

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo a administração diária de 10 mg/kg de melatonina em animais suscetíveis à perda auditiva relacionada à idade foi capaz de reduzir o impacto dessa condição, fazendo com que os valores de EOAPD do GM se mantivessem maiores em todas as frequências testadas, comparados aos do GC.

Em ambos os grupos, nas quatro frequências estudadas, foi possível observar significativa queda nos níveis de EOAPD dos animais na comparação intra e intergrupos no intervalo de tempo compreendido entre E1 e o E13. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de o C57BL/6J apresentar uma mutação genética no gene da caderina 23, a qual faz com que esse animal apresente presbiacusia em uma idade precoce, comparado aos demais modelos.

Outros estudos realizados nessa linhagem de camundongos mostraram que esses animais começam a exibir valores de EOAPD elevados a partir dos três ou seis meses de idade e, aos 20 meses, não era mais possível captá-las (35,73). No presente estudo foi possível acompanhar o declínio gradual dos níveis de EOAPD ao longo do tempo em ambos os grupos, à semelhança do padrão exibido pelos humanos no processo de perda auditiva relacionada à idade.

O uso da melatonina no período experimental fez com que os animais do GM mantivessem valores mais altos de EOAPD do que aqueles do GC, embora o uso dessa substância não tenha impedido o aparecimento da presbiacusia.

A melatonina atualmente é utilizada por várias pessoas ao redor do mundo como um suplemento natural para regulação do sono e pesquisas têm demonstrado que, além da função de regulação circadiana, essa substância é um eficiente eliminador de radicais livres com importante papel na proteção do envelhecimento das células e em algumas doenças neurodegenerativas (96).

O envelhecimento é um processo decorrente do dano oxidativo que acontece em virtude do acúmulo de EROS em vários tecidos do organismo, inclusive na cóclea. O prejuízo celular que ocorre em virtude do acúmulo de EROS causa disfunção mitocondrial, com redução da produção energética e consequente disfunção do tecido (73).

A melatonina é um antioxidante que se apresenta em maior concentração nas mitocôndrias, uma organela na qual os radicais livres são produzidos em

abundância, desse modo, essa substância possui uma vantagem posicional que outros antioxidantes não compartilham. Além da localização privilegiada a melatonina conta ainda com seus metabólitos, que também funcionam como sequestradores de EROS. Assim, enquanto outros antioxidantes eliminam um único radical livre através de sua cascata de reações, a melatonina, em conjunto com seus metabólitos, é capaz de eliminar vários radicais livres (3).

Em virtude dessa privilegiada posição e de contar com metabólitos que também possuem importante atuação sistêmica, a melatonina pode ser uma alternativa promissora para reduzir os prejuízos celulares ocorridos em função do envelhecimento, pois é uma substância que inibe a ação dos radicais livres, reduz o estresse oxidativo, atravessa grande parte das barreiras morfofisiológicas, o que aumenta sua eficácia nos mecanismos de neutralização das EROS.

Foi possível observar neste estudo uma variação com relação às diferenças entre os grupos verificadas nos exames de EOAPD, principalmente nas frequências de 6 e 8 kHz. Nos meses iniciais não havia diferença entre os grupos, em seguida, houve variação, e surgia a diferença intergrupos, que novamente deixava de existir. A partir do E6, na frequência de 6 kHz, a diferença entre os grupos se estabeleceu e perdurou até o fim do período experimental tanto no parâmetro de amplitude do sinal quanto no de relação S/R. Já na frequência de 8 kHz, a diferença entre os grupos foi estabelecida a partir do E4.

O exame de EOAPD é uma técnica sensível para identificar mudanças ocorridas na função coclear ao longo do tempo, porém, apresenta grande variabilidade. Assim, embora os camundongos utilizados neste estudo fossem isogênicos, foram observados comportamentos distintos de velocidade de declínio dos parâmetros de EOAPD ao longo do período experimental em ambos os grupos.

Nas frequências mais altas analisadas neste estudo (10 e 12 kHz) o padrão de diferenciação entre os grupos ficou evidente desde o início do estudo, a partir do E2. Esse padrão permaneceu igual até o último exame na frequência de 10 kHz. Na frequência de 12 kHz, no E8, os grupos não apresentaram diferença e, em seguida, no E9 esta diferença voltou a aparecer.

Esse comportamento ocorreu, provavelmente, em virtude da piora dos valores relativos ao GM nesse período. Estudos apontam que a perda auditiva relacionada à

idade tem início em frequências mais elevadas (13,41), o que também foi observado neste estudo.

Uma hipótese para que a perda de células ocorra inicialmente nessas frequências pode ser o fato de o giro basal ser o primeiro local onde o som entra em contato com a cóclea de forma mais intensa, assim, essas células são mais expostas aos danos causados pela exposição ao ruído, além do estresse oxidativo e do processo de envelhecimento celular. A Figura 19 mostra esse padrão de forma bastante clara. Nela é possível perceber que a região basal do gânglio espiral apresenta um número menor de células, com mais apoptose celular na área e neurônios menos densos quando comparadas às do giro apical.

O efeito dos antioxidantes (melatonina, vitamina C, E e lizaróides) e da restrição calórica no desenvolvimento da presbiacusia foi tema de um estudo realizado, no qual a dosagem de melatonina ofertada foi de 0,1 mg/dia por meio de uma pastilha implantada no animal. Os autores concluíram que o grupo que desenvolveu menores índices de presbiacusia foi aquele submetido à restrição calórica. O grupo tratado com melatonina foi estatisticamente melhor do que o placebo em todas as frequências do exame auditivo, exceto na de 12 kHz (o estudo testou as frequências de 3, 6, 9, 12 e 18kHz). De modo geral, todos os grupos que fizeram uso de antioxidantes tiveram a sensibilidade auditiva melhor quando comparados ao placebo (40). No presente estudo, as frequências analisadas foram as de 6, 8 10 e 12 kHz e em todas elas, o GM apresentou resultados melhores quando comparados ao GC.

É necessário ressaltar que os animais que fizeram parte deste estudo receberam o mesmo tipo e quantidade de ração ao longo de todo o período de acompanhamento e que não houve qualquer restrição calórica imposta a qualquer dos grupos. Os pesos dos animais foram acompanhados mensalmente sem que houvesse diferença estatística entre os grupos, conforme a tabela de pesos (APÊNDICE A).

Estudos estabelecem que na linhagem de camundongo C57BL/6J, utilizada neste experimento, o dano oxidativo no DNA aumenta com a idade e possui uma relação de causa com a presbiacusia através da indução de apoptose (15,101). O uso de suplementação dietética com vários antioxidantes, inclusive melatonina na

dose de 20 mg/kg, demonstrou que a suplementação com antioxidantes mitocondriais reduziram a morte das células cocleares e atrasaram o início da perda auditiva relacionada à idade (101).

A melatonina é um antioxidante mitocondrial que tem ação antiapoptótica, já que apresenta ação tanto na via extrínseca da apoptose, ao modular a expressão dos receptores de morte, quanto na via intrínseca, ao eliminar radicais oxidantes que podem ser gerados pelas mitocôndrias.

Pesquisas demonstraram que o aumento da idade está diretamente relacionado ao declínio dos níveis de melatonina no organismo (98). Isso pode resultar na redução da proteção antioxidante do organismo e contribuir para o aparecimento de doenças, como, por exemplo, a presbiacusia. Essa condição pode trazer vários comprometimentos funcionais ao indivíduo e recentemente tem sido correlacionada ao declínio cognitivo (24,25), causando ainda mais prejuízos à qualidade de vida do indivíduo idoso.

A presbiacusia é uma alteração multifatorial (ambiental e genética), que se manifesta com a perda bilateral da audição causada pela degeneração progressiva de estruturas cocleares, como CCE, CCI, estria vascular, gânglio espiral, ligamento espiral, além da degeneração das vias auditivas centrais (18). Neste estudo foram realizadas análises histológicas nestas estruturas, e, em relação às CCE e CCI, não foi possível realizar uma análise quantitativa das estruturas. Isso ocorreu em virtude de a maioria das amostras já não terem mais um número adequado de células que viabilizasse esta análise. Ainda assim, em algumas amostras foi possível captar as imagens dessas estruturas, conforme mostrado na Figura 21. Um estudo feito para identificar estruturas da cóclea do C57BL/6J demonstrou que aos 50 dias de vida esse animal já apresenta sinais claros de degeneração de células ciliadas (102).

A perda auditiva verificada nessa linhagem de camundongos está associada à degeneração das células ciliadas, que é uma característica da presbiacusia sensorial. Isso inclui perda progressiva das CCI e CCE de maneira dependente da idade, evoluindo da base ao ápice da cóclea, com perda de CCE na base da cóclea a partir dos três meses de idade (35). Apesar desse achado, não se pode afirmar que os animais que fizeram parte deste estudo apresentaram uma presbiacusia puramente sensorial, pois, assim como em pesquisas feitas com seres humanos,

outras estruturas também se encontram danificadas com o processo de envelhecimento.

Uma recente pesquisa realizada com objetivo de analisar macrófagos em células cocleares de camundongos C57BL/6J observou degeneração das células sensoriais relacionadas à idade que iniciavam na base da cóclea com progressão apical. Em camundongos jovens (um mês de idade), pouca ou nenhuma degeneração foi verificada. Aqueles com idade intermediária (três a cinco meses), exibiam perda de células inicialmente na base da cóclea. Em animais idosos (12 meses), as lesões sensoriais se expandiram com perda completa das CCE na região da base e aumento significativo de perda no ápice. Ainda segundo o mesmo estudo, essas descobertas são consistentes com achados de estudos anteriores (103). Na presente pesquisa também não foi possível achar uma quantidade de células que fornecesse condições de realizar análises quantitativas nos animais com 14 meses de idade, porém, foi possível a identificação dessas células em algumas lâminas analisadas. Talvez, o uso de outras tecnologias, como por exemplo, a microscopia eletrônica viabilizasse achados mais consistentes, no entanto, este estudo ficou restrito a análises de microscopia de luz.

Foi realizada neste estudo uma análise do número de células viáveis no gânglio espiral dos animais aos 14 meses de idade. O GM apresentou um número maior de células viáveis comparado ao GC. Outros trabalhos realizados verificaram que nessa linhagem de camundongos é possível visualizar perda de células no gânglio espiral a partir dos sete meses de idade. Além da redução de células viáveis no gânglio espiral, alterações relacionadas à idade são observadas no ligamento espiral e na estria vascular (35).

No presente estudo não foram verificadas diferenças entre os grupos na análise da área da estria vascular. Vários estudos relatam a ocorrência de um afinamento na estria vascular desses animais com o envelhecimento (13,74). Esse afinamento provavelmente ocorreu nas amostradas analisadas nesta pesquisa, porém, o uso da melatonina não parece ter tido influência nesse aspecto.

No que se refere ao ligamento espiral, foi possível verificar que houve diferença entre o GM e o GC. Um estudo realizado com objetivo de descrever a histopatologia coclear do C57BL/6J mostrou que nessa linhagem ocorre perda de

células no ligamento espiral associada aos fibrócitos do tipo IV. Em animais com sete meses de idade, os pesquisadores observaram perda significativa de fibrócitos do ligamento espiral em toda metade apical da cóclea, sem perda significativa de células ciliadas. Esse mesmo estudo mostrou ainda que a perda de células no ligamento espiral precede a perda de CCE e CCI (74). No presente estudo, o uso da melatonina mostrou retardar a perda de células no ligamento espiral quando comparado ao GC.

Um aspecto importante deste estudo foi a dose e a forma de oferta. A dose utilizada foi de 10 mg/kg/dia, ofertada por via oral, de modo que se replicasse o modo mais aproximado de como a substância é utilizada clinicamente por humanos. Em vários estudos realizados com oferta de antioxidantes, a administração, em geral, é realizada na dieta, por implantação subcutânea ou a substância é colocada na água (15,40,104).

A opção de administrar o antioxidante diretamente na boca do animal assegurou a ingestão do volume exato ofertado diariamente, pois o animal só era devolvido a sua caixa após a completa ingestão de todo o volume ofertado.

Estudos acerca do envelhecimento humano, de modo geral, são difíceis de ser realizados devido a alguns aspectos, como, por exemplo, a heterogeneidade e longevidade da população. Outro aspecto acerca de estudos sobre envelhecimento humano é que grande parte deles tem início somente com o indivíduo senil, sendo que seria ideal que o acompanhamento fosse iniciado antes do período de senescência. Além disso, seriam necessários grandes coortes, em virtude da perda de indivíduos ao longo do tempo, o que torna esse tipo de estudo bastante oneroso. Nesse aspecto, o estudo com uso de modelos animais assegura o conhecimento que não seria possível de adquirir com pesquisas clínicas em seres humanos (105).

O presente estudo acompanhou animais que chegaram ao alojamento de animais ainda jovens até o 14<sup>o</sup> mês de vida, idade em que já são considerados idosos. Isso possibilitou a reprodução de um ambiente controlado e também foi possível iniciar as intervenções propostas nos sujeitos ainda jovens.

Por um lado, este tipo de estudo é ideal, pois possibilita a reprodução de um ambiente sem riscos de interferências desconhecidas que possam atrapalhar o percurso natural do efeito que se deseja observar. Por outro, é necessário ponderar

que nenhum ser humano está livre de fatores ambientais que possam ter interferência nos processos fisiológicos de envelhecimento, principalmente em se tratando de presbiacusia, que é uma patologia conhecida por seu caráter multifatorial.

Este estudo teve algumas limitações. A primeira delas é o fato de não termos processado lâminas de animais no início e na metade do estudo, o que faria com que tivéssemos parâmetros de comparação entre os grupos durante todas as etapas, além de nos permitir maior conhecimento da anatomia do C57BL/6J. Outra limitação reside no fato de não ter sido realizada a análise por microscopia eletrônica, o que permitiria uma visualização mais fidedigna das estruturas, bem como a comparação dos níveis de degeneração entre os grupos.

Até a presente data, poucos foram os estudos realizados utilizando a melatonina como um fator de proteção na perda auditiva relacionada à idade. No entanto, por se tratar de uma substância segura, que não demonstrou efeitos adversos em humanos ou animais, o seu uso, no futuro, pode contribuir com a melhoria da qualidade de vida da população idosa e permitir um nível de independência na realização das atividades de vida diária por mais tempo.

Embora a melatonina seja um potente antioxidante, suas propriedades não foram capazes de neutralizar a ocorrência da presbiacusia, mas o uso da substância foi capaz de reduzir o impacto dessa condição.

Pesquisas realizadas com animais agregam um grande aprendizado e servem de referência para os estudos que podem ser desenvolvidos no futuro. No caso da melatonina, há uma grande variedade de estudos comprovando diversos benefícios no organismo humano e animal, no entanto, vale ressaltar que ainda há muito o que se descobrir no que se refere ao uso dessa substância na prevenção da prebiacusia.

Quanto à necessidade de adaptação de uma oliva da sonda de EOA para realização deste estudo, pode ser destacado que uma parcela dos estudos internacionais realizados com modelos animais utiliza equipamentos, sondas e olivas de EOA produzidas nos próprios laboratórios onde as pesquisas são realizadas, o que faz com que seja possível a escolha de parâmetros variáveis, bem como favorece a adaptação de olivas de acordo com o porte físico do animal utilizado

(106–108).

No Brasil, os estudos auditivos experimentais ainda não contam com essa opção e os pesquisadores têm utilizado equipamentos desenvolvidos para humanos com resultados que, em geral, atendem adequadamente aos objetivos propostos.

Neste estudo, o modelo de equipamento definido foi escolhido com base no maior número de frequências que era possível de ser analisada e na possibilidade de adaptação da oliva na sonda do equipamento.

Para que fosse possível captar o sinal do equipamento de EOAPD no conduto auditivo externo dos animais C57BL/6J, foi necessário realizar uma adaptação na oliva utilizada no exame. A estrutura utilizada na adaptação foi a haste de uma oliva de um equipamento de PEATE, que foi seccionada e adaptada à oliva tamanho recém-nascido do equipamento utilizado. O modelo foi considerado ideal, a partir do momento que o encaixe ficou justo o suficiente para que fosse possível a calibração na cavidade teste. Essa adaptação foi necessária para que os exames fossem reproduzidos de forma fidedigna, assegurando a qualidade da captação das EOAPD. Outro aspecto abordado por esta pesquisa, e que merece destaque, é a análise dos níveis de ruído do alojamento de animais. A partir das mensurações realizadas ao longo dos dias, foi possível verificar que os níveis de ruído no Biotério da FM/UnB estão dentro daqueles preconizados pela Resolução Normativa nº 15 das normas CONCEA para biotérios.

A média de ruído no alojamento da FM/UnB, especificamente na sala onde ficaram os animais do presente estudo, ficou em torno de  $58,5 \pm 0,8$  dB NA. De acordo com essa Norma, ratos e camundongos podem tolerar até 85 dB NA, porém, a mesma Norma relata que foram observadas alterações importantes em ratos expostos a um ruído intermitente de 83 dB NA. Assim, o nível de exposição de ruído permitido pela legislação não atende aos preceitos de bem-estar animal e podem fazer com que lesões no sistema auditivo se estabeleçam ao longo da vida.

Considerando que esses animais são utilizados em pesquisas auditivas, faz-se necessário rigoroso controle do ruído nesses ambientes, uma vez que a inobservância desse aspecto pode lançar dúvidas e até mesmo invalidar os resultados gerados por estudos que utilizem animais expostos a elevados níveis de ruído.

No que se refere a seres humanos, pesquisas demonstram que a exposição a elevados níveis de ruído pode gerar alterações fisiológicas, podendo resultar no aumento da pressão arterial, mudança no ritmo cardíaco, vasoconstrição periférica e midríase (109). A legislação trabalhista brasileira permite que o trabalhador fique exposto a um nível de ruído de 85 dB NA por um período máximo de 8 horas. Períodos de exposição mais prolongados devem seguir o Anexo 1 da Norma Regulamentadora nº 15, da Secretaria de Trabalho, do Ministério da Economia.

Em animais, alterações semelhantes podem ser encontradas. Em estudo realizado no qual os animais ficaram expostos a níveis de ruído médio de 72 dB com picos de 85 dB, por um período de quatro dias, os autores verificaram aumento nos níveis de pressão arterial sistólica, noradrenalina plasmática e aumento na produção de EROS (109).

Neste estudo, o *hall* de entrada foi o ambiente que apresentou a maior média de ruído ( $64,8 \pm 4,1$  dB NA). Isso se deve ao fato de nesse local se encontrar disposto um aparelho de ar condicionado, que, em funcionamento, faz com que o nível do ruído do ambiente aumente sensivelmente.

O segundo ambiente mais ruidoso do biotério foi o corredor ( $64,8 \pm 4,1$  dB NA). Essa ocorrência de maiores níveis de ruído era esperada em virtude de ser um local de circulação de pessoas e carrinhos para troca de caixas, água, alimentação e transporte dos animais para outros lugares de pesquisa.

Nas salas onde os animais ficaram alojados, o nível de ruído durante os dias de mensuração deste estudo variou entre 57,2 dB NA e 59,6 dB NA, com média de  $58,5 \pm 0,8$  dB NA. Esses níveis podem ser considerados adequados para animais de pesquisas, no entanto, para pesquisas específicas da área de Audiologia, o adequado seria se ter a mínima exposição possível ao ruído. A sugestão é que o nível ideal de ruído para esses animais esteja em torno de 35 dB NA até 50 dB NA. Esses valores têm como base o preconizado pela Organização Mundial de Saúde como sendo o nível de ruído recomendado para ambientes hospitalares. Para que seja possível atingir esses níveis de ruído, adaptações ambientais seriam necessárias como, por exemplo, redução dos ruídos emitidos pelos exaustores das estantes, onde ficam alojados os animais, além de adaptações nos carrinhos de transporte dos animais que geram elevados níveis de ruído (108,109).

Especificamente para os animais alojados para estudos na área da Audiologia, é interessante assegurar uma sala exclusiva durante a execução do experimento, o que foi observado para este estudo. Essa única ação já é capaz de reduzir o ruído, considerando que o acesso a essa sala é restrito aos pesquisadores envolvidos. Concomitantemente a essas ações, faz-se necessário um trabalho de conscientização para que os frequentadores e funcionários do biotério tenham a cultura de diminuir o tom de fala e, assim, assegurar o bem-estar auditivo de todos os animais alojados nesse ambiente.

Não foi possível realizar a mensuração em todas as salas do biotério, pois algumas delas, em virtude da especificidade dos experimentos, estavam vedadas, o que impossibilitou o acesso e a análise.

Ao final do experimento, foi sugerido à equipe de Médicos Veterinários responsáveis, que a mensuração dos níveis de ruído em todo o biotério seja realizada pelo menos uma vez ao mês para que, assim, fique evidente a necessidade de os usuários e funcionários se atentarem para a redução dos níveis de ruído e conseqüentemente se oferecer maior bem-estar aos animais de pesquisa.

## **7. CONCLUSÃO**

A melatonina na dose utilizada foi capaz de reduzir o impacto da disfunção das células ciliadas externas no processo de perda auditiva relacionada à idade no modelo murino suscetível C57BL/6J.

Os valores médios da amplitude do sinal e da relação sinal ruído decresceram ao longo do período de acompanhamento em ambos os grupos.

Gânglio espiral e ligamento espiral apresentaram maiores números de células viáveis no GM em comparação do GC.

Não houve diferença na análise da estria vascular entre os grupos.

O nível de ruído ao qual os animais estavam expostos não foi capaz de induzir perda auditiva.

## REFERÊNCIAS

1. Schaffazick SR. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
2. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie* [Internet]. 2015 Apr;61(2–3):77–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028377015000545>
3. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B. Mitochondria: Central organelles for melatonins antioxidant and anti-Aging actions. *Molecules*. 2018;23(2):1–25.
4. Höhn A, Weber D, Jung T, Ott C, Hugo M, Kochlik B, et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol*. 2017;11(November 2016):482–501.
5. Rommel Almeida Fechine B. O Processo De Envelhecimento: As Principais Alterações Que Acontecem Com O Idoso Com O Passar Dos Anos. *Inter Sci Place* [Internet]. 2012;1(20):106–32. Available from: <http://www.interscienceplace.org/interscienceplace/article/view/382/268>
6. IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. No Title [Internet]. CENSO. 2010 [cited 2017 Jan 3]. Available from: [sidra.ibge.gov.br](http://sidra.ibge.gov.br)
7. Cheng W-H, Bohr VA, de Cabo R. Nutrition and aging. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2010 Apr;131(4):223–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637410000710>
8. Eckhart L, Tschachler E, Gruber F. Autophagic Control of Skin Aging. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2019 Jul 30;7. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00143/full>
9. Boechat EM. Tratado de Audiologia. 2 ed. Koogan G, editor. Rio de Janeiro; 2015. CAP.37.
10. Lombardi CM. Programas de Reabilitação Auditiva para idosos: uma proposta alternativa de avaliação de eficiência. Universidade Católica de São Paulo; 2008.
11. Fischer N, Weber B, Riechelmann H. Presbyakusis – Altersschwerhörigkeit. *Laryngo-Rhino-Otologie* [Internet]. 2016 Jul 8;95(07):497–510. Available from:

- <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-106918>
12. Paiva KM. Deficiência Auditiva referida e condições de saúde de idosos: um estudo de base populacional. Universidade de São Paulo - USP; 2010.
  13. Bowl MR, Dawson SJ. Age-Related Hearing Loss. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2018 Oct 5;a033217. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a033217>
  14. Yamasoba T, Someya S, Yamada C, Weindruch R, Prolla TA, Tanokura M. Role of mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in age-related hearing loss. *Hear Res.* 2007;226(1–2):185–93.
  15. Someya S, Xu J, Kondo K, Ding D, Salvi RJ, Yamasoba T, et al. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2009;106(46):19432–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0908786106>
  16. IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Agencia de Notícias [Internet]. Available from: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/>
  17. Russo, Iêda; Almeida K. Considerações sobre a seleção e adaptação de próteses auditivas para o idoso. In: Lovise, editor. *Próteses Auditivas: Fundamentos Teóricos e Aplicações Clínicas*. 1996. p. 224.
  18. Tavanai E, Mohammadkhani G. Role of antioxidants in prevention of age-related hearing loss: a review of literature. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2017;274(4):1821–34.
  19. Salehi P, Ge MX, Gundimeda U, Michelle Baum L, Lael Cantu H, Lavinsky J, et al. Role of Neuropilin-1/Semaphorin-3A signaling in the functional and morphological integrity of the cochlea. Hamilton BA, editor. *PLOS Genet [Internet]*. 2017 Oct 23;13(10):e1007048. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1007048>
  20. Howarth A, Shone GR. Ageing and the auditory system. *Postgrad Med J*. 2006;82(965):166–71.
  21. Caspary DM, Ling L, Turner JG, Hughes LF. Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J Exp Biol*

- [Internet]. 2008;211(11):1781–91. Available from:  
<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.013581>
22. Burianova J, Ouda L, Profant O, Syka J. Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol*. 2009;44(3):161–9.
  23. Viana LM, O'Malley JT, Burgess BJ, Jones DD, Oliveira CACP, Santos F, et al. Cochlear neuropathy in human presbycusis: Confocal analysis of hidden hearing loss in post-mortem tissue. *Hear Res* [Internet]. 2015 Sep;327:78–88. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378595515001069>
  24. Dong Y, Guo C, Chen D, Chen S, Peng Y, Song H, et al. Association between age-related hearing loss and cognitive decline in C57BL/6J mice. *Mol Med Rep* [Internet]. 2018 Jun 1; Available from:  
<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.9118>
  25. Tretbar K, Basilowski M, Wiedmann K, Bartels C, Heßmann P, Kownatka M, et al. Lebensqualität und Depression bei Hörminderung. *HNO* [Internet]. 2019 Jan 15;67(1):36–44. Available from:  
<http://link.springer.com/10.1007/s00106-018-0576-4>
  26. Lin FR, Yaffe K, Xia J, Xue Q-L, Harris TB, Purchase-Helzner E, et al. Hearing Loss and Cognitive Decline in Older Adults. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2013 Feb 25;173(4):293. Available from:  
<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamainternmed.2013.1868>
  27. Quaranta N, Coppola F, Casulli M, Barulli O, Lanza F, Tortelli R, et al. The Prevalence of Peripheral and Central Hearing Impairment and Its Relation to Cognition in Older Adults. *Audiol Neurotol* [Internet]. 2014;19(1):10–4. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/371597>
  28. Gurgel RK, Ward PD, Schwartz S, Norton MC, Foster NL, Tschanz JT. Relationship of Hearing Loss and Dementia. *Otol Neurotol* [Internet]. 2014 Jun;35(5):775–81. Available from:  
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00129492-201406000-00007>
  29. Golub JS, Brewster KK, Brickman AM, Ciarleglio AJ, Kim AH, Luchsinger JA,

- et al. Association of Audiometric Age-Related Hearing Loss With Depressive Symptoms Among Hispanic Individuals. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2019 Feb 1;145(2):132. Available from: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoto.2018.3270>
30. Lin FR, Albert M. Hearing loss and dementia – who is listening? *Aging Ment Health* [Internet]. 2014 Aug 18;18(6):671–3. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13607863.2014.915924>
  31. Chételat G, Landeau B, Eustache F, Mézenge F, Viader F, de la Sayette V, et al. Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: A longitudinal MRI study. *Neuroimage* [Internet]. 2005 Oct;27(4):934–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811905003277>
  32. Dalton DS, Cruickshanks KJ, Klein BEK, Klein R, Wiley TL, Nondahl DM. The Impact of Hearing Loss on Quality of Life in Older Adults. *Gerontologist* [Internet]. 2003 Oct;43(5):661–8. Available from: <http://academic.oup.com/gerontologist/article/43/5/661/633851/The-Impact-of-Hearing-Loss-on-Quality-of-Life-in>
  33. Hogan A, O’Loughlin K, Miller P, Kendig H. The Health Impact of a Hearing Disability on Older People in Australia. *J Aging Health* [Internet]. 2009 Dec 6;21(8):1098–111. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0898264309347821>
  34. Fortunato S, Forli F, Guglielmi V, De Corso E, Paludetti G, Berrettini S, et al. A review of new insights on the association between hearing loss and cognitive decline in ageing. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2016;36:155–66.
  35. Bowl MR, Dawson SJ. The Mouse as a Model for Age-Related Hearing Loss - A Mini-Review. *Gerontology* [Internet]. 2014 Nov 28;61(2):149–57. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/368399>
  36. Cherko M, Hickson L, Bhutta M. Auditory deprivation and health in the elderly. *Maturitas* [Internet]. 2016;88:52–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.03.008>
  37. Hong JY, Oh I-H, Jung TS, Kim TH, Kang HM, Yeo SG. Clinical Reasons for Returning Hearing Aids. *Korean J Audiol* [Internet]. 2014;18(1):8. Available

- from: <http://ejao.org/journal/view.php?doi=10.7874/kja.2014.18.1.8>
38. Mosnier I, Bebear J-P, Marx M, Fraysse B, Truy E, Lina-Granade G, et al. Improvement of Cognitive Function After Cochlear Implantation in Elderly Patients. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2015 May 1;141(5):442. Available from: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoto.2015.129>
  39. Bednar MM, DeMartinis N, Banerjee A, Bowditch S, Gaudreault F, Zumpano L, et al. The Safety and Efficacy of PF-04958242 in Age-Related Sensorineural Hearing Loss. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2015 Jul 1;141(7):607. Available from: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoto.2015.0791>
  40. Seidman MD. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope*. 2000;110(May):727–38.
  41. Polanski JF, Cruz OL. Evaluation of antioxidant treatment in presbycusis: Prospective, placebo-controlled, double-blind, randomised trial. *J Laryngol Otol*. 2013;127(2):134–41.
  42. Grivicich I, Regner A, da Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Cancrol* [Internet]. 2007;53(3):335–43. Available from: [http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_53/v03/pdf/revisao4.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf)
  43. Morrill S, He DZZ. Apoptosis in inner ear sensory hair cells. *J Otol* [Internet]. 2017;12(4):151–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1672293017300752>
  44. Cheng AG1, Cunningham LL RE. Mechanisms of hair cell death and protection. *Send to Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;13(6):343–8.
  45. Wong ACY, Ryan AF. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Front Aging Neurosci*. 2015;7(APR):1–15.
  46. Miziara ID, Magalhães AT de M, Santos M d'Aparecida, Gomes EF, Oliveira RA de. Research ethics in animal models. *Braz J Otorhinolaryngol* [Internet]. 2012 Apr;78(2):128–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22499381>
  47. Fagundes, Djalma; Taha M. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Bras*. 2004;19(1):59–65.

48. MATFIELD M. The ethics of animal research. A special lecture to the Japanese Association of Laboratory Animal Science 6th June 1995. *Exp Anim* [Internet]. 1996;45(3):209–15. Available from: <http://joijlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/expanim/45.209?from=CrossRef>
49. ANDRADE, A; PINTO, SC; OLIVEIRA R. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [Internet]. Rio de Janeiro; 2002. 388 p. Available from: <http://books.scielo.org>
50. Özel HE, Özdoğan F, Gülşen Gürgen S, Esen E, Selçuk A, Genç S. Effect of transtympanic betamethasone delivery to the inner ear. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* [Internet]. 2016 Oct 29;273(10):3053–61. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00405-016-3905-9>
51. Oliveira JAA de, Canedo DM, Rossato M. Otoproteção das células ciliadas auditivas contra a ototoxicidade da amicacina. *Rev Bras Otorrinolaringol* [Internet]. 2002 May 13;68(1):7–13. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-72992002000100002&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992002000100002&lng=pt&tlng=pt)
52. Soyaliç H, Gevrek F, Koç S, Avcu M, Metin M, Aladağ İ. Intraperitoneal curcumin and vitamin E combination for the treatment of cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016;89(2016):173–8.
53. Wan G, Corfas G. Transient auditory nerve demyelination as a new mechanism for hidden hearing loss. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Apr 17;8(1):14487. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms14487>
54. Hong BN, Nam YH, Woo SH, Kang TH. Chlorogenic acid rescues sensorineural auditory function in a diabetic animal model. *Neurosci Lett* [Internet]. 2017 Feb;640:64–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030439401730040X>
55. Hu H, Ye B, Zhang L, Wang Q, Liu Z, Ji S, et al. Efr3a Insufficiency Attenuates the Degeneration of Spiral Ganglion Neurons after Hair Cell Loss. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2017 Mar 29;10. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00086/full>
56. Nhan C, Bezdjian A, Alarfaj A, Daniel SJ. Can floreal™ be applied safely during otologic surgery? Assessment of ototoxicity in a chinchilla animal

- model. *J Otolaryngol - Head Neck Surg* [Internet]. 2017 Dec 29;46(1):24. Available from:  
<http://journalotohns.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40463-017-0203-5>
57. Jin SG, Kim MJ, Park SY, Park SN. Stress hormonal changes in the brain and plasma after acute noise exposure in mice. *Auris Nasus Larynx* [Internet]. 2017 Jun;44(3):272–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S038581461630219X>
  58. Hyppolito MA, De Oliveira JAA. Ototoxicidade, otoproteção e autodefesa das células ciliadas da cóclea. *Medicina (B Aires)*. 2005;38(3–4):279–89.
  59. Todd DW, Philip RC, Niihori M, Ringle RA, Coyle KR, Zehri SF, et al. A Fully Automated High-Throughput Zebrafish Behavioral Ototoxicity Assay. *Zebrafish* [Internet]. 2017 Aug;14(4):331–42. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/zeb.2016.1412>
  60. Majumder P, Moore PA, Richardson GP, Gale JE. Protecting Mammalian Hair Cells from Aminoglycoside-Toxicity: Assessing Phenoxybenzamine's Potential. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2017 Apr 18;11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2017.00094/full>
  61. Li S, Peng Q, Liao S, Li W, Ma Q, Lu X. A reverse dot blot assay for the screening of twenty mutations in four genes associated with NSHL in a Chinese population. Sharon D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 May 15;12(5):e0177196. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0177196>
  62. Liu JF, Dai JS, Wang NY. [Advances in effect of unilateral auditory deprivation on sound localization]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* [Internet]. 2017 Feb 7;52(2):136–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28219180>
  63. Warchol ME, Stone J, Barton M, Ku J, Veile R, Daudet N, et al. ADAM10 and  $\gamma$ -secretase regulate sensory regeneration in the avian vestibular organs. *Dev Biol* [Internet]. 2017 Aug;428(1):39–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160617301252>
  64. Tagoe T, Deeping D, Hamann M. Saturation of long-term potentiation in the dorsal cochlear nucleus and its pharmacological reversal in an experimental

- model of tinnitus. *Exp Neurol* [Internet]. 2017 Jun;292:1–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488617300456>
65. Ghazaleh N, Zwaag W van der, Clarke S, Ville D Van De, Maire R, Saenz M. High-Resolution fMRI of Auditory Cortical Map Changes in Unilateral Hearing Loss and Tinnitus. *Brain Topogr* [Internet]. 2017 Sep 6;30(5):685–97. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10548-017-0547-1>
  66. Makowiec K, McCaslin DL, Jacobson GP, Hatton K, Lee J. Effect of Electrode Montage and Head Position on Air-Conducted Ocular Vestibular Evoked Myogenic Potential. *Am J Audiol* [Internet]. 2017 Jun 13;26(2):180–8. Available from: [http://pubs.asha.org/doi/10.1044/2017\\_AJA-16-0108](http://pubs.asha.org/doi/10.1044/2017_AJA-16-0108)
  67. Gökdoğan Ç, Genç A, Gülbahar Ö, Gökdoğan O, Helvacı A, Bezgin SÜ, et al. Auditory evoked potentials in a newborn Wistar rat model of hyperbilirubinemia. *Braz J Otorhinolaryngol* [Internet]. 2016 Mar;82(2):144–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1808869415002025>
  68. Chen X, Zhao X, Cai H, Sun H, Hu Y, Huang X, et al. The role of sodium hydrosulfide in attenuating the aging process via PI3K/AKT and CaMKK $\beta$ /AMPK pathways. *Redox Biol* [Internet]. 2017 Aug;12:987–1003. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231717302264>
  69. Laboratory J. No Title [Internet]. [cited 2018 Jan 3]. p. jax.org. Available from: <https://jax.org>
  70. Liu S, Li S, Zhu H, Cheng S, Zheng QY. A mutation in the *cdh23* gene causes age-related hearing loss in *Cdh23<sup>nmf308/nmf308</sup>* mice. *Gene* [Internet]. 2012 May;499(2):309–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111912001400>
  71. Mock BE, Vijayakumar S, Pierce J, Jones TA, Jones SM. Differential effects of *Cdh23* 753A on auditory and vestibular functional aging in C57BL/6J mice. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2016 Jul;43:13–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458016002116>
  72. Narui Y, Minekawa A, Iizuka T, Furukawa M, Kusunoki T, Koike T, et al. Development of distortion product otoacoustic emissions in C57BL/6J mice. *Int*

- J Audiol [Internet]. 2009 Jan 13;48(8):576–81. Available from:  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14992020902858959>
73. Fujimoto C, Yamasoba T. Oxidative Stresses and Mitochondrial Dysfunction in Age-Related Hearing Loss. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2014;2014:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/582849/>
  74. Hequembourg S, Liberman MC. Spiral Ligament Pathology: A Major Aspect of Age-Related Cochlear Degeneration in C57BL/6 Mice. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2001 Jun;2(2):118–29.
  75. Treuting PM, Dintzis SM. Special Senses. In: *Comparative Anatomy and Histology* [Internet]. Elsevier; 2012. p. 419–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123813619000226>
  76. Kemp DT. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* [Internet]. 1978 Nov;64(5):1386–91. Available from: <http://asa.scitation.org/doi/10.1121/1.382104>
  77. Robinette, Martin; Glatke T. *Otoacoustic emissions: clinical applications*. 3rd ed. Thieme, editor. 2007. 456 p.
  78. Granjeiro R. . *Relação do incômodo do zumbido com a função das células ciliadas externas e os transtornos de ansiedade e depressão em indivíduos com limiar auditivo normal*. Universidade de Brasília; 2011.
  79. Durante A. *Emissões Otoacústicas*. In: Livraria Santos, editor. *Tratado de Audiologia*. 1st ed. Santos; 2014. p. 880.
  80. Durante, AS; Dhar S. *Mecanismos Fisiológicos Subjacentes à Geração de Emissões Otoacústicas*. In: Guanabara Koogan, editor. *Tratado de Audiologia*. 2. Rio de Janeiro; 2015. p. 565.
  81. Sousa, LCA; Piza, MRT; Alvarenga, KF; Cóser P. *Eletrofisiologia da Audição e Emissões Otoacústicas: princípios e aplicações clínicas*. 2.ed. Conceito N, editor. Ribeirão Preto; 2010. 370 p.
  82. Ryan S, Kemp DT. The influence of evoking stimulus level on the neural suppression of transient evoked otoacoustic emissions. *Hear Res*. 1996;94(1–2):140–7.
  83. Gorga MP, Neely ST, Bergman B, Beauchaine KL, Kaminski JR, Peters J, et al. *Otoacoustic emissions from normal-hearing and hearing-impaired subjects:*

- Distortion product responses. *J Acoust Soc Am* [Internet]. 1993 Apr;93(4):2050–60. Available from: <http://asa.scitation.org/doi/10.1121/1.406691>
84. Gorga MP, Neely ST, Ohlrich B, Hoover B, Redner J, Peters J. From Laboratory to Clinic: A Large Scale Study of Distortion Product Otoacoustic Emissions in Ears with Normal Hearing and Ears with Hearing Loss. *Ear Hear* [Internet]. 1997 Dec;18(6):440–55. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00003446-199712000-00003>
85. Soken H, Robinson BK, Goodman SS, Abbas PJ, Hansen MR, Kopelovich JC. Mouse cochleostomy: A minimally invasive dorsal approach for modeling cochlear implantation. *Laryngoscope* [Internet]. 2013 Dec;123(12):E109–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lary.24174>
86. Ueberfuhr MA, Fehlberg H, Goodman SS, Withnell RH. A DPOAE assessment of outer hair cell integrity in ears with age-related hearing loss. *Hear Res* [Internet]. 2016;332:137–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2015.11.006>
87. Wagner W, Heppelmann G, Vonthein R, Zenner HP. Test-Retest Repeatability of Distortion Product Otoacoustic Emissions. *Ear Hear* [Internet]. 2008 Jun;29(3):378–91. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003446-200806000-00007>
88. Willott JF. Handbook of mouse auditory research. CRC, editor. Florida; 2001. 738 p.
89. Ye L-F, Tao Z-Z, Hua Q-Q, Xiao B-K, Zhou X-H, Li J, et al. Protective effect of melatonin against gentamicin ototoxicity. *J Laryngol Otol* [Internet]. 2009 Jun 28;123(06):598. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S002221510800385X](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S002221510800385X)
90. YA-FENG YU, WEN-YING WU, GEN-SHENG XIAO H-YL and CP. Protection of the cochlear hair cells in adult C57BL/6J mice by T-type calcium channel blockers. *Exp Ther Med*. 2016;11:1039–44.
91. DE ARAUJO JG, SERRA LSM, LAUAND L, KÜCKELHAUS SAS, SAMPAIO ALL. Protective Effect of Melatonin on Cisplatin-induced Ototoxicity in Rats. *Anticancer Res* [Internet]. 2019 May 15;39(5):2453–8. Available from:

- <http://ar.iijournals.org/lookup/doi/10.21873/anticanres.13364>
92. Cipolla-Neto J, Amaral FG do. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocr Rev* [Internet]. 2018 Dec 1;39(6):990–1028. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article/39/6/990/5094958>
  93. Amaral FG do, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab* [Internet]. 2018 Aug;62(4):472–9. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2359-39972018000400472&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-39972018000400472&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
  94. Volquind D. Daniel Volquind Efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse. 2016;
  95. Carpentieri A, Díaz de Barboza G, Areco V, Peralta López M, Tolosa de Talamoni N. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res* [Internet]. 2012 Apr;65(4):437–44. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661812000047>
  96. Tosini G, Owino S, Guillaume J-L, Jockers R. Understanding melatonin receptor pharmacology: Latest insights from mouse models, and their relevance to human disease. *BioEssays* [Internet]. 2014 Aug;36(8):778–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201400017>
  97. Ferreira R. Efeitos da reposição terapêutica central de melatonina em animais pinealectomizados-implicações no comportamento alimentar e peso corporal. Universidade de São Paulo; 2014.
  98. Damiani A. Avaliação de parâmetros comportamentais, genotóxicos e de estresse oxidativo em camundongos suplementados com melatonina por diferentes tempos até o envelhecimento. Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2018.
  99. Tarocco A, Caroccia N, Morciano G, Wieckowski MR, Ancora G, Garani G, et al. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019 Apr 8;10(4):317. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41419-019-1556-7>
  100. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - COBEA.

101. Park S-N, Back S-A, Park K-H, Kim D-K, Park SY, Oh J-H, et al. Comparison of Cochlear Morphology and Apoptosis in Mouse Models of Presbycusis. *Clin Exp Otorhinolaryngol* [Internet]. 2010;3(3):126. Available from: <http://e-ceo.org/journal/view.php?doi=10.3342/ceo.2010.3.3.126>
102. Shnerson A, Devigne C, Pujol RMY. Age-related changes in the C57BL/6J mouse cochlea. II ULTRASTRUCTURAL FINDINGS. *Dev Brain Res*. 1982;2:77–88.
103. Frye MD, Yang W, Zhang C, Xiong B, Hu BH. Dynamic activation of basilar membrane macrophages in response to chronic sensory cell degeneration in aging mouse cochleae. *Hear Res* [Internet]. 2017 Feb;344:125–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378595516303525>
104. Le T, Keithley EM. Effects of antioxidants on the aging inner ear. *Hear Res*. 2007;226(1–2):194–202.
105. Belsky DW, Caspi A, Houts R, Cohen HJ, Corcoran DL, Danese A, et al. Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015 Jul 28;112(30):E4104–10. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1506264112>
106. Martin GK, Stagner BB, Lonsbury-Martin BL. Assessment of Cochlear Function in Mice: Distortion-Product Otoacoustic Emissions. *Curr Protoc Neurosci* [Internet]. 2006 Jan;34(1):8.21C.1-8.21C.18. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142301.ns0821cs34>
107. Parham K. Distortion product otoacoustic emissions in the C57BL / 6J mouse model of age-related hearing loss. *Hear Res*. 1997;112(June):216–34.
108. Narui Y, Minekawa A, Iizuka T, Furukawa M, Kusunoki T, Koike T, et al. Development of distortion product otoacoustic emissions in C57BL/6J mice. *Int J Audiol*. 2009;48(8):576–81.
109. Münzel T, Schmidt FP, Steven S, Herzog J, Daiber A, Sørensen M. Environmental Noise and the Cardiovascular System. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2018 Feb;71(6):688–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109717419309>

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO ESTUDO NO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 5 de junho de 2017.

Declaramos que o projeto intitulado “EFEITO ANTIOXIDANTE DA MELATONINA NA PREVENÇÃO DA DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS DECORRENTES DO PROCESSO DE PRESBIACUSIA EM ROEDORES C57BL/6J.”, Protocolo n.º 57/2017, sob responsabilidade do Professor Carlos Augusto Costa Pires de Oliveira foi avaliada e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de:

A presente aprovação é válida pelo período de: 19/06/2017 a 19/06/2020.

Prof. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB

\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.



**APÊNDICE A (cont.)**

Todos os valores são expressos em gramas (g).

Espaços marcados com “X” indicam o óbito do animal.

**Grupo Veículo**

Animal	Meses												
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	21.6	22.6	23.9	27.4	27.1	27.6	27.1	28.1	28.1	29.6	X	X	X
2	24.7	25.5	26.1	27.8	28.7	27.8	29.2	X	X	X	X	X	X
3	23.9	25.0	26.2	28.0	28.9	28.4	29.4	29.3	29.3	30.5	X	X	X
4	21.4	23.0	23.7	26.3	26.2	26.3	26.8	28.4	28.5	27.9	X	X	X
5	20.7	22.2	24.6	27.2	27.4	27.6	27.8	28.9	28.9	29.6	30.6	29.8	30.9
6	20.4	22.5	24.2	26.2	26.1	X	X	X	X	X	X	X	X
7	23.1	23.4	25.1	25.9	26.6	27.1	27.7	28.3	28.3	29.1	29.4	27.8	29.3
8	22.1	25.5	26.4	28.7	29.1	30.7	30.9	31.1	31.0	31.7	32.3	31.4	32.2
9	23.1	24.2	27.0	28.1	29.1	28.5	30.6	30.0	30.0	31.1	30.8	30.7	29.0
10	22.8	24.2	26.2	27.5	28.7	28.0	29.8	28.7	28.9	29.3	29.2	30.2	30.6
11	23.4	25.3	28.1	30.4	30.3	29.8	33.2	31.6	31.9	32.6	31.5	32.2	29.0
12	22.2	23.6	25.9	27.5	27.4	28.1	29.1	28.1	28.7	29.0	30.1	30.0	29.0
13	23.2	23.8	25.0	25.7	26.7	27.8	28.6	29.1	29.3	30.0	X	X	X
14	24.6	24.5	26.1	26.9	27.6	28.6	28.7	29.0	29.6	29.6	29.0	29.8	29.3
15	24.1	24.5	27.1	28.0	28.9	29.5	29.9	30.0	30.6	31.0	30.0	30.2	30.9
16	22.8	25.1	28.1	28.3	29.2	30.7	31.4	30.1	30.1	32.8	31.5	31.4	32.3

