

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FONOAUDIOLOGIA**

GRAZIELA LIGIA DA SILVA SANTOS

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO E RECEPTORES DE
MELATONINA EM CENTROS ENCEFÁLICOS DA VIA AUDITIVA NO
ENVELHECIMENTO**

Marília

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FONAUDIOLOGIA

GRAZIELA LIGIA DA SILVA SANTOS

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO E RECEPTORES DE
MELATONINA EM CENTROS ENCEFÁLICOS DA VIA AUDITIVA NO
ENVELHECIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP- Campus de Marília-SP, para obtenção do título de mestre em Fonoaudiologia.

Área de concentração: Distúrbios da Comunicação Humana.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Figueiredo Frizzo

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Marília

2019

S237e Santos, Graziela Ligia da Silva
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGANTES DE
CÁLCIO E RECEPTORES DE MELATONINA EM
CENTROS ENCEFÁLICOS DA VIA AUDITIVA NO
ENVELHECIMENTO / Graziela Ligia da Silva Santos. --
Marília, 2019
67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Filosofia e Ciências, Marília
Orientadora: Ana Claudia Figueiredo Frizzo

1. Envelhecimento. 2. Sistema Auditivo. 3. CaBPs. 4.
Melatonina. 5. Presbiacusia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Filosofia e Ciências, Marília. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

GRAZIELA LIGIA DA SILVA SANTOS

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO E RECEPTORES DE
MELATONINA EM CENTROS ENCEFÁLICOS DA VIA AUDITIVA NO
ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia, Área de Concentração Distúrbios da Comunicação Humana, da Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Marília (SP), para obtenção do título de mestre em Fonoaudiologia.

Área de concentração: Distúrbios da Comunicação Humana

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): _____

Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Figueiredo Frizzo
Universidade Estadual Paulista – UNESP FFC/Marília-SP.

Examinador (a): _____

Prof.^a Dr.^a Leila Maria Guissoni Campos
UNIVERSIDADE DE MARÍLIA – UNIMAR/ MARÍLIA – SP.

Examinador (a): _____

Prof.^a Dr.^a Luciana Pinato
Universidade Estadual Paulista – UNESP FFC/Marília-SP.

Marília, 06 de maio de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais Teodoro e Beatriz, por me guiar e incentivar a sempre seguir os melhores caminhos e por me darem a oportunidade de ter uma educação de qualidade desde a infância. Por serem meu porto seguro!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me guiar e iluminar meus caminhos, pelo dom concedido de poder contribuir para ciência e a vida do próximo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela aprovação e concessão do auxílio financeiro (processo: 2017/ 09484-1) para o desenvolvimento deste estudo.

À minha querida orientadora e amiga Prof^a. Dra. Ana Claudia Figueiredo Frizzo, por todo incentivo, ensinamentos sobre audiologia, orientações e conselhos, mas principalmente por todo companheirismo ao longo desses anos. Meu muito obrigada!

À Prof^a. Dra. Luciana Pinato, orientadora de coração, pela grande contribuição e sugestões para que este estudo fosse realizado, por cada conversa e orientação, por ter plantado em mim a semente da pesquisa.

À Prof^a. Dra. Leila Maria Guissoni Campos pelas sugestões, pelo conhecimento compartilhado e tempo dedicado a fim de contribuir para a melhora deste trabalho e minha formação.

Ao Prof^o. Dr. Roelf Justino Cruz-Rizzolo pela colaboração neste trabalho, por compartilhar seus conhecimentos a respeito da ciência e estereologia, e por sempre nos receber de braços abertos durante as idas a Araçatuba.

Aos meus pais, Teodoro e Beatriz por me ensinarem os verdadeiros valores da vida, que sem respeito, amor e gratidão não chegamos a lugar algum, por sempre estarem ao meu lado me incentivando a seguir estudando e a conquistar meus sonhos, e por sonharem comigo cada conquista. A vocês que são minha inspiração diária!

Ao meu companheiro e melhor amigo Leonardo Terra, por acreditar na minha capacidade, compreender minhas ausências, me ouvir, ajudar e apoiar em cada momento, por sempre estar ao meu lado.

A todos os membros do Laboratório de Estudos em Neuroinflamação, em especial às melhores companheiras de laboratório e mestrado, Isis Zion Vieira e Ana Luiza Decanini, por juntas descrevermos o verdadeiro significado de trabalho em equipe, e ao técnico e amigo

Augusto Santana Nascimento, pelas noites de perfusão e contribuições para a realização de cada experimento.

Aos alunos José Ferreira Maia Neto e Maria Clara Bertolini Botelho da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP Araçatuba, pela paciência, disponibilização e ajuda. Muito obrigada!

Aos docentes, funcionários e alunos do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP Araçatuba, em especial aos professores Claudio Casatti, Edilson Ervolino e Roberta Okamoto pela recepção e acolhimento durante minha estadia em Araçatuba.

A todos os membros do Laboratório de Avaliação Objetiva da Audição, pelo conhecimento dividido e por contribuírem para a realização deste estudo.

À minha família em especial aos meus avós Leuelim e Terezinha, meu tio Dinho e ao Felici Colozza, pelo carinho, preocupação, incentivo e orações para que eu tivesse forças e fé para concretizar cada etapa.

Às minhas amigas e irmãs Lívia Gomes e Nathalia Pizzi, meus presentes da fonoaudiologia e da UNESP, e minhas queridas amigas paulistanas Giovanna Di Giacomo, Karina Vergílio, Rayssa Pacheco e Rafaelly Pacheco, por sempre estar presente, me ouvirem e vibrarem comigo cada etapa e conquista realizada.

Às queridas amigas Cristiane Pedroni e Aila Dahwache, por ensinar-me a ter confiança em mim mesma e acreditar que no final tudo daria certo.

À Beatriz Merola, pela amizade que nasceu na graduação e só cresceu ao longo do mestrado, e às amigas que o mestrado me proporcionou, Taína Maiza e Liliam Vilela.

À Prof^a. Dra Célia Maria Giacheti e ao Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências – FFC – UNESP – Marília.

Aos funcionários da Faculdade de Filosofia e Ciências – FFC – UNESP – Marília.

Resumo

Introdução: Durante o envelhecimento, em mamíferos, é comum o desenvolvimento da presbiacusia, caracterizada por perda de células ciliadas na cóclea associada a alterações nas funções neuronais dos núcleos do sistema auditivo central (SAC) que acarretam prejuízos auditivos. Dentre as alterações neuronais comuns no envelhecimento estão mudanças na expressão neuronal das proteínas ligantes de cálcio (CaBPs), fundamentais para o processamento nas estações da via auditiva, que podem compor assim o mecanismo da presbiacusia. Dentre as possíveis formas de tratamento e/ou prevenção da presbiacusia está a suplementação com substâncias antioxidantes e/ou neuroprotetoras que possam retardar a perda neuronal e/ou alterações funcionais dos neurônios. Dentre estas, o hormônio melatonina, tem demonstrado importante ação antioxidante e otoprotetora que podem ocorrer independente ou dependente dos receptores de melatonina MT₁ e MT₂. No entanto, não está claro, se nas estações do SAC encontram-se expressos tais receptores e se essa expressão poderia variar no envelhecimento. Considerando que as CaBPs estão alteradas em idosos, propõe-se verificar se estas alterações cursam com possíveis alterações na expressão dos receptores de melatonina no envelhecimento. Tal informação contribuirá para o entendimento dos mecanismos envolvidos na presbiacusia e para investigações sobre possíveis terapias otoprotetoras no envelhecimento. **Objetivos:** Avaliar a expressão das CaBPs e dos receptores de melatonina MT₁ e MT₂ em neurônios das estações sinápticas que compõem o SAC em ratos jovens e idosos. Comparar a morfologia dos neurônios imunorreativos as CaBPs entre ratos jovens e idosos. **Materiais e Métodos:** Cortes encefálicos de ratos jovens e idosos foram processados utilizando a técnica de imuno-histoquímica para identificar as proteínas parvalbumina (PV), calbindina (CB), calretinina (CR) e os receptores MT₁ e MT₂. **Resultados:** A densidade de células imunorreativas à PV (PV-ir) foi menor e o volume dos neurônios PV-ir no colículo inferior foi maior no grupo idoso. O número células CB-ir e CR-ir no complexo olivar superior também foi menor no grupo idoso quando comparado ao grupo jovem. No núcleo coclear, o número células CR-ir foi menor no grupo idoso quando comparado ao grupo jovem. No corpo geniculado medial não houve diferença na densidade de células e foi observado diminuição do volume dos neurônios CB-ir no grupo idoso. Houve aumento da expressão de MT₁ no núcleo coclear, complexo olivar superior e colículo inferior de ratos idosos. A presença do MT₁ foi verificada no corpo geniculado medial apenas no grupo idoso. Foi observado a presença do receptor MT₂ na região do núcleo coclear, complexo olivar superior, colículo inferior e corpo geniculado medial apenas no grupo idoso.

Discussão: A menor expressão de CaBPs e a alteração morfológica em neurônios CB-ir e PV-ir em núcleos da via auditiva central em ratos idosos indica que estes núcleos sofrem ação do envelhecimento. Já o aumento na expressão do receptor MT_1 e a presença do receptor MT_2 com o envelhecimento sugere que esta molécula tenha uma importante ação neuroprotetora nos núcleos da via auditiva. **Conclusão:** As CaBPs apresentaram menor expressão nos núcleos do SAC no grupo idoso. Os receptores de melatonina MT_1 e MT_2 apresentaram maior expressão nos núcleos do SAC no grupo idoso. O grupo idoso apresentou ainda maior volume dos neurônios PV-ir no colículo inferior e menor volume dos neurônios CB-ir no corpo geniculado medial.

Palavras-chave: envelhecimento; sistema auditivo; CaBPs; melatonina; presbiacusia

Abstract

During aging, in mammals, it is common the development of presbycusis, characterized by loss of cells in the cochlea associated with changes in the neuronal functions of the nuclei of the central auditory system (SAC) that cause auditory impairment. Among the common neuronal changes in aging are changes in the neuronal expression calcium-binding proteins (CaBPs), which are essential for processing in the auditory pathway stations, which can thus constitute the mechanism of presbycusis. Among the possible forms of treatment and/ or prevention of presbycusis is the supplementation with antioxidant and/ or neuroprotective substances that may delay the neuronal loss and/ or functional alterations of the neurons. Among these, the hormone melatonin, has demonstrated important antioxidant and otoprotective action that can occur independent or dependent on the melatonin receptor MT_1 and MT_2 . However, it is unclear whether SAC stations express such receptors and whether such expression could vary in aging. Considering that the CaBPs are altered in the elderly, it is proposed to verify if these alterations occur with possible alterations in the expression of the melatonin receptors in aging. Such information will contribute to understanding the mechanisms involved in presbycusis and to investigating possible otoprotective therapies in aging. **Objective:** To evaluate the expression of CaBPs and melatonin MT_1 and MT_2 receptors in synaptic stations neurons that compose SAC in young and elderly rats. To compare the morphology of immunoreactive neurons to CaBPs between young and elderly rats. **Methods:** Encephalic cords from young and elderly rats were processed using immunohistochemistry technique to identify the proteins of parvalbumin (PV), calbindin (CB), calretinin (CR) and the MT_1 and MT_2 receptors. Quantification of the number of CaBPs positive cells will be performed by stereology and receptor expression will be assessed by optical density. **Results:** The density of PV immunoreactive cells (PV-ir) was lower and the PV-IR neuron volume in the inferior colliculus was higher in the elderly group. The number of CB-IR and CR-IR cells in the superior olivary complex was also lower in the elderly group when compared to the young group. In the cochlear nucleus, the numbers of CR-IR cells was lower in the elderly group when compared to the young group. In the medial geniculate body there was no difference in cell density and a decrease in the volume of CB-IR neurons was observed in the elderly group. There was an increase in MT_1 expression in the cochlear nucleus, superior olivary complex and inferior colliculus of elderly rats. The presence of MT_1 was verified in the medial geniculate body only in the elderly group. The presence of the MT_2 receptor was observed in the cochlear nucleus region, superior olivary

complex, inferior colliculus and medial geniculate body only in the elderly group.

Discussion: The lower expression of CaBPs and the morphological alteration in CB-IR and PV-IR neurons in central auditory pathways in elderly rats indicates that these nuclei undergo aging. Already the increase in MT₁ receptor expression and the presence of the MT₂ receptor with aging suggests that this molecule has an important neuroprotective action in the nuclei of the auditory pathway. **Conclusion:** The CaBPs presented lower expression in the nuclei of the SAC in the elderly group. The MT₁ and MT₂ melatonin receptors presented greater expression in the SAC nuclei in the elderly group. The older group presented an even higher volume of the PV-IR neurons of the inferior colliculus and lower volume of the CB-IR in the medial geniculate body.

Key words: elderly; auditory system; CaBPS; melatonin; presbycusis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	30
FIGURA 2	31
FIGURA 3	32
FIGURA 4	33
FIGURA 5	34
FIGURA 6	35
FIGURA 7	36
FIGURA 8	37
FIGURA 9	38
FIGURA 10	39
FIGURA 11	40
FIGURA 12	41
FIGURA 13	42
FIGURA 14	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
A1	Área auditiva primária
A2	Área auditiva secundária
Ach	Acetilcolina
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CaBPS	Proteínas ligantes de cálcio
CB	Calbindina
CB-IR	Imuno reativo à calbindina
CGM	Corpo geniculado medial
CI	Colículo inferior
COS	Complexo olivar superior
CR	Calretinina
CR-IR	Imuno reativo à calretinina
CT	Corpo trapezoide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
FFC	Faculdade de Filosofia e Ciências
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Ácido glutâmico descarboxilase
Glu	Glutamato
MT ₁	Receptor de melatonina Tipo 1
MT ₁ -IR	Imuno reativo à receptor de melatonina tipo 1
MT ₂	Receptor de melatonina tipo 2

MT ₂ -IR	Imuno reativo à receptor de melatonina tipo 2
MtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	Cloreto de sódio
NC	Núcleo coclear
NCD	Núcleo coclear dorsal
NCPV	Núcleo coclear póstero-ventral
NDS	Soro normal produzido em burro
NLL	Núcleo do leminisco lateral
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSM	Oliva superior medial
PBS	Salina tamponada
PEA	Potencial evocado auditivo
PEATE	Potencial evocado auditivo de tronco encefálico
PV	Parvalbumina
PV-IR	Imunorreativo à parvalbumina
SAC	Sistema auditivo central
SAP	Sistema auditivo periférico
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Audição e o Sistema Auditivo	18
2.2 Neuroquímica dos Centros Neurais da Via Auditiva	20
2.3 Proteínas Ligantes de Cálcio - CaBPs	21
2.4 Melatonina e Receptores	22
2.5 Envelhecimento e Seus Efeitos no Sistema Auditivo.....	23
3 JUSTIFICATIVA	25
4 OBJETIVO	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 Animais.....	26
5.2 Perfusão Transcardíaca.....	26
5.3 Imunoperoxidase	27
5.4 Imunofluorescência	27
5.5 Estereologia	27
5.6 Análise Microscópica e Quantitativa.....	29
5.7 Análise Estatística	30
6 RESULTADOS	31
7 DISCUSSÃO	44
8 CONCLUSÃO.....	51
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
10 ANEXO.....	67

1. INTRODUÇÃO

A audição é uma das mais importantes habilidades sensoriais para qualquer ser vivo, especialmente para o ser humano. Por meio dela o homem é capaz de adquirir a linguagem e conseqüentemente se comunicar com o mundo. No entanto, a diminuição dessa habilidade pode causar um retrocesso da linguagem, podendo desencadear até quadros demenciais (FORD et al., 2018).

As funções auditivas ocorrem a partir de um conjunto complexo de estruturas presentes no sistema nervoso (LITOVSKY, 2015). O sistema auditivo periférico (SAP) constitui-se do pavilhão auricular até o nervo vestibulo-coclear (VIII par de nervos cranianos) e é responsável pela detecção e transmissão do som até o sistema auditivo central (SAC) (ALTMAN, 2012; DELACROIX e MALGRANGE, 2015). Já o SAC relacionado atividades de detecção, localização e discriminação de sons complexos é formado por estações sinápticas (núcleo coclear, complexo olivar superior, colículo inferior e o corpo geniculado medial) presentes em quase todas as grandes divisões do sistema nervoso central (SNC), localizadas no tronco encefálico, tálamo e córtex auditivo (HUDSPETH, 2000; LENT, 2010).

Ao longo do envelhecimento, em mamíferos, déficits funcionais em estruturas da via auditiva levam a diminuição da função auditiva, conhecida como presbiacusia, sendo esta o distúrbio da comunicação mais comum em idosos (Frisina, 2016). Sabe-se que essa condição também acomete animais, como primatas (Rhesus) e roedores (*Long-Evans e Wistar*) (OUDA et al., 2012b; GRAY et al., 2013; ALVARADO et al., 2014).

A presbiacusia é atribuída à alteração da sensibilidade ao sinal sonoro por perda de células ciliadas na cóclea. Já a perda de funções de estruturas do SAC vem sendo chamada de presbiacusia central e pode contribuir para a dificuldade de idosos em compreender a fala em ambientes com ruído ou localizar a fonte sonora (MARTIN DEL CAMPO et al., 2012; PROFANT et al., 2013; PRONK et al., 2013).

Prejuízos nos núcleos do SAC no envelhecimento podem ser decorrentes da diminuição de neurotransmissores inibitórios que permeiam o processamento temporal dos estímulos acústicos complexos (SAMELLI et al., 2016). Em roedores, há diminuição do neurotransmissor inibitório GABA que coincide com a diminuição da expressão das proteínas ligantes de Cálcio (CaBPs) em neurônios destas estações (MARTIN DEL CAMPO et al.,

2012; OUDA et al., 2012a; OUDA et al., 2012b; BURIANOVA et al., 2015; BRECHT et al., 2017).

Considerando-se que as CaBPs contribuem em diversas atividades neuronais como na sinalização intracelular de Cálcio, transporte e armazenamento de Cálcio, atividade e plasticidade neuronal, e processamento de informações (GONCHAR et al., 2007; CHRISTEL et al., 2012), alterações na sua expressão afetam diretamente as funções auditivas. De fato, no sistema auditivo as CaBPs são fundamentais para o processamento dos núcleos do SAC e estão co-localizadas com GABA (FREDRICH et al., 2009).

Outra possível alteração no sistema auditivo durante o envelhecimento seria o aumento do estresse oxidativo celular nas diferentes estações da via. Sobre este aspecto, foi demonstrado que a suplementação com antioxidantes pode minimizar a perda auditiva (SAIDMAN, 2000). Um dos possíveis fármacos a serem utilizados como otoprotetor durante o envelhecimento seria o hormônio melatonina cujas ações anti-oxidante e neuroprotetora poderiam prevenir a perda auditiva (ESPERANZA et al., 2009; DEMIR et al., 2015; PINATO et al., 2015).

Apesar de não estar claro qual a função fisiológica da melatonina na via auditiva, a síntese extra-pineal de melatonina foi demonstrada na cóclea (BIESALSKI et al., 1988). Considerando que o efeito neuroprotetor da melatonina é dependente da expressão de seus receptores (PINATO et al., 2015), torna-se importante à descrição do padrão de expressão e de possíveis mudanças na expressão do receptor de melatonina MT₁ e MT₂ na via auditiva durante o envelhecimento. Tal descrição é essencial para o melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos fisiológicos e terapêuticos desta molécula (PINATO et al., 2017) no sistema auditivo.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2025, haverá 1,2 bilhões de pessoas com idade acima dos 60 anos. Apesar da relevância dos efeitos do envelhecimento no SAC, os mecanismos envolvidos na presbiacusia causada por alterações centrais que poderiam resultar em perda auditiva ainda não foram totalmente elucidados (SCHUKNECHT e GACEK, 1993; SYKA, 2002; GATA e MILLS, 2005; BUCKIOVA et al., 2007; CASPARY et al., 2008; CANLON et al., 2010; PROFANT et al., 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AUDIÇÃO E O SISTEMA AUDITIVO

A Audição é uma modalidade sensorial especializado na percepção do estímulo sonoro que é captado, conduzido e transformado em algumas formas de energia até ocorrer à integração da informação auditiva a níveis centrais (BEVILACQUA et al., 2013).

A parte periférica é responsável pela captação e transdução da pressão sonora em energia elétrica (COSTANZO, 2011; ZORZETTO, 2013). A orelha externa (pavilhão auricular e meato acústico externo) canaliza e amplifica o som em direção à orelha média (membrana timpânica, cadeia ossicular e tuba auditiva) localizada entre a membrana timpânica e a cóclea, é nessa porção do SAP que o som é transformado em energia mecânica e direcionado a orelha interna (cóclea, sáculo, utrículo e canais semicirculares). A cóclea apresenta o *órgão de corti*, local onde há a transdução das ondas sonoras em impulsos nervosos, esses impulsos são enviados ao SAC por meio do nervo coclear, seus corpos celulares estão localizados nos gânglios espirais e seus axônios fazem sinapse com núcleos presentes no tronco encefálico (AQUINO, 2002; ZORZETTO, 2013; BONALDI, 2015).

De acordo com Lent (2010), um conjunto de estações sinápticas (núcleo coclear, complexo olivar superior, colículo inferior, corpo geniculado medial) mais o córtex auditivo formam o SAC. A porção central do sistema auditivo tem grande parte de seus neurônios organizados tonotopicamente e se diferencia de outros sistemas por apresentar estruturas localizadas nas grandes principais divisões do sistema nervoso central (SNC), desde o tronco encefálico, tálamo e córtex auditivo, tais estruturas são responsáveis pelos aspectos de discriminação, localização, reconhecimento e compreensão do som (HUDSPETH, 2000; TEIXEIRA, 2015).

O núcleo coclear (NC), primeira estação sináptica da via auditiva, localiza-se na junção entre o bulbo e a ponte, dorsolateralmente aos pedúnculos cerebelares inferiores, e é subdividido em núcleo coclear ventral anterior, núcleo coclear ventral posterior e núcleo coclear dorsal. Os neurônios da porção ventral se projetam em direção à segunda estação sináptica da via auditiva central, enquanto a porção dorsal desde núcleo ascende em direção ao mesencéfalo (LENT, 2010; BEZERRA, 2017). Teixeira (2015) e Hudspeth (2000) afirmam a função do NC está relacionada à codificação de intensidade, apresentando características tonotópicas para a resolução de tons complexos, essa característica se dá por

conta das fibras nervosas do nervo coclear que chegam organizadas tonotopicamente aos núcleos cocleares.

A segunda estação sináptica desta via, o complexo olivar superior (COS), recebe estímulos de ambas as orelhas sendo capaz de realizar as funções de localização sonora, codificação temporal de vocalizações e modulação descendente da cóclea (NORTHERN e DOWNS, 2002; GUIDA et al., 2013; FECH et al., 2017). Subdividido em núcleo olivar superior lateral, núcleo olivar superior medial e o núcleo do corpo trapezoide, o COS projeta-se em direção ao colículo inferior, no mesencéfalo (TEIXEIRA et al., 2015; VETTER, 2015).GG

Hudspeth (2000) descreveu que sinais eferentes provenientes do COS fornecem retroalimentação para a cóclea, onde um grupo de neurônios com axônios mielinizados terminam bilateralmente nas células ciliadas externas e outro grupo não mielinizado termina ipsilateralmente nas células ciliadas internas. Embora a via auditiva eferente ainda apresente papel pouco conhecido, autores afirmam que esse feixe olivococlear atue na produção motora da resposta auditiva, modulação das respostas das células ciliadas externas, diminuição do potencial de ação do nervo coclear, proteção contra ruído e discriminação de sons de fala no ruído (KATZ, 1999).

O colículo inferior (CI), a terceira estação da via auditiva, localiza-se no tecto do mesencéfalo e é dividido em três porções: central, córtex dorsal e córtex externo. A porção central do CI se projeta para o tálamo, enquanto neurônios do córtex dorsal e córtex externo convergem para o próprio mesencéfalo, além disso, há fibras que convergem para o CI do lado oposto (LENT, 2010; MACHADO, 2014; ITO et al., 2015). Este núcleo, organizado tonotopicamente, responde a estimulação biauricular e tem a capacidade de codificar a localização do som com padrões de descarga espaço-temporal, auxiliando na identificação dos fonemas da fala (MANGABEIRA, 2002; CHAMPOUX et al., 2007; RESS e CHANDRASEKARAN, 2013).

O CGM, localizado no tálamo posterior, é a última estação sináptica antes de o sinal chegar à região do córtex auditivo primário, recebe as informações auditivas das estações subtalâmicas e por meio de projeções talamocorticais as projetam para o córtex auditivo. Subdivide-se em medial, dorsal e ventral, sendo a sua porção ventral a principal subdivisão

por estar organizada tonotopicamente (HACKETT, 2011; IMAIZUMI e LEE, 2014; CAMPOS et al., 2015).

O CGM além de responsável pela atenção auditiva e codificação da intensidade e frequência do som, regula o fluxo de informações enviadas ao córtex auditivo (MUSIEK e CHERMAK, 2014; MOEREL et al., 2015; TOKORO et al., 2015).

O córtex auditivo, no lobo temporal, recebe as terminações axônicas provenientes do CGM, sendo que a área auditiva primária (A1) está localizada dentro do sulco lateral mais especificamente no giro temporal transversal e a área auditiva secundária (A2) ao seu redor no giro temporal superior (TEIXEIRA, 2015; MACHADO, 2014; LENT, 2010). Aquino (2002) relata que a organização tonotópica da A1, demonstra plasticidade em caso de lesão coclear, pois a via auditiva ao contrário de outras vias, não é totalmente cruzada e cada cóclea está representada em ambos os hemisférios.

Posterior à A2 está a Área de Wernicke, responsável pela compreensão de estímulos linguísticos e da linguagem falada (BHATANAGAR, 2004). Quanto às áreas de associação terciárias, a via aferente do sistema auditivo sofre influência do sistema límbico e do hipocampo, estando relacionados ao comportamento emocional e memória diante do estímulo auditivo (MACHADO, 1993).

2.2 NEUROQUÍMICA DOS CENTROS NEURAIS DA VIA AUDITIVA

A comunicação neuronal depende da capacidade do neurônio em responder a um determinado estímulo. Quando o neurônio é excitado e está apto para enviar sinais para outros neurônios, são gerados potenciais de ação, que fazem com que esses neurônios liberem neurotransmissores (SILVA, 2011; KOLB e WHISHAW, 2002).

Diversos neurotransmissores e substâncias neuroativas participam da regulação dos mecanismos encefálicos, controlam fenômenos como a cognição, a linguagem, a fala, audição, bem como a atenção e a memória (BHATANAGAR, 2004; VON BOHLEN UND HALBACH e DEMIETZEL, 2006).

Burt (1995) afirma que na maioria das sinapses há um neurotransmissor principal e outras substâncias neuroativas moduladoras da atividade do neurotransmissor principal, capaz de excitar ou inibir uma ação.

Nos centros encefálicos que formam a via auditiva pode ser identificada uma variedade de neurotransmissores, tais como acetilcolina (Ach), ácido gama-amino-butírico (GABA), glutamato (Glu), serotonina (5-HT) e outras substâncias químicas como as proteínas ligantes de cálcio, calbindina (CB), calretinina (CR) e parvalbumina (PV) (SILVA, 2011).

A Ach está relacionada com a via eferente do sistema auditivo no feixe olivococlear, inibindo a atividade das células ciliadas na cóclea o que reduz a amplificação causada pelo movimento da membrana basilar (FUCHS, 2018; 2002; IM, 2012). Além disso, autores já descreveram a presença de Ach na porção cortical e central do colículo inferior de gato (GLENDEENING E BAKER, 1988).

Godfrey e cols. (2017) descreveram a presença da glicina no núcleo do corpo trapezoide, do neurotransmissor excitatório glutamato e dos neurotransmissores inibitórios e GABA na via auditiva central em menor concentração em ratos idosos em comparação aos ratos jovens.

O neurotransmissor inibitório GABA também já foi descrito na via auditiva central de ratos e em gatos especificamente, no núcleo coclear dorsal, no núcleo do lemnisco lateral e nas regiões central e cortical do colículo inferior (GLENDEENING E BAKER, 1988; JAMAL et al., 2011). Na região mesencefálica o GABA auxilia na formação de respostas robustas frente ao sinal acústico, além de filtrar esse sinal removendo o ruído (Mossop et al., 2000; CASPARY et al., 2002; BRECHT et al., 2017).

A presença do neurotransmissor serotonina e de seu receptor (5-HT) no SAC está relacionado com a modulação estímulo auditivo no nível do tronco encefálico, com presença de fibras serotoninérgicas em todas as estações sinápticas do SAC, indicando que a serotonina seja liberada durante eventos comportamentais específicos (THOMPSON, et al., 1994; HURLEY e HÁLL, 2011; PAPESH e HURLEY, 2016).

Além disso, há a presença de outras moléculas circulantes ou mesmo sintetizadas em estruturas da via auditiva. Biesalski e cols. (1988) descreveram a síntese de melatonina na cóclea, mais especificamente na região do órgão de corti, membrana basilar, nervo coclear e ligamento espiral, porém com funcionalidade de desconhecida.

2.3 PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO – CaBPs

As proteínas ligantes de cálcio (CaBPs), encontradas ao longo do SNC, apresentam afinidade ao íon cálcio (Ca^{2+}), isso permite a sua passagem pela membrana celular. As CaBPs atuam na transmissão sináptica por meio do controle dos níveis de Ca^{2+} intracelular, e estão divididas no grupo das anexinas e das EF hand, composto pela calmodulina, S100, calbindina (CB), calretinina (CR), parvalbumina (PV) e a secretogonina (BENTLEY e RETY, 2000; SILVA, 2011; ALPAR et al., 2012; ZIMMERMANN et al., 2013; SPILLA, 2018).

Entre as CaBPs, a CB, CR e PV são as mais notáveis devido sua abundância e especificidade de sua distribuição e por atuarem no tamponamento e transporte do Ca^{2+} , contribuem em diversas atividades celulares, entre elas, atividade e plasticidade neuronal, processamento de memória (BAIMBRIDGE et al., 1992). Desta forma alterações na sua expressão afetam diretamente as funções auditivas (KUBOTA et al., 1994; GONCHAR E BURKHALTER, 1997; JINNO E KOSAKA, 2006; GONCHAR et al., 2007; SILVA, 2011; CHRISTEL et al., 2012). Além disso, são importantes marcadores de subpopulações neuronais para estudos anatômicos e de desenvolvimento (CELIO, 1990; BAIMBRIDGE et al., 1992; HOF et al., 1999).

No sistema auditivo as CaBPs são fundamentais para o processamento dos núcleos do SAC e estão co-localizadas com o neurotransmissor GABA (FREDRICH et al., 2009). Idrizbegovic e cols. (1998) mostraram que a estimulação sonora em níveis elevados, como o ruído, causa aumento da expressão de CB e PV na região do núcleo coclear, indicando que essas proteínas possivelmente apresentem papel protetor na via auditiva.

2.4 MELATONINA e RECEPTORES

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio secretado principalmente pela glândula pineal, mas também em outros locais do nosso corpo como em outras glândulas, no tecido nervoso, no trato gastrointestinal e retina (TAKE et al., 2009; LUCHETTI et al., 2010; SRINIVASAN et al., 2011; BOTAS, 2014; PINATO et al., 2015). A síntese de melatonina também já foi descrita por Biesalski e cols. (1988) no órgão de Corti, membrana basilar, nervo coclear e ligamento espiral. Além de ser sintetizada em diferentes órgãos, uma das explicações para sua ampla distribuição em tecidos, órgãos e fluidos seria sua facilidade em atravessar membranas celulares e barreiras fisiológicas, como a barreira hematoencefálica (REITER, et al., 2013).

De acordo com Jung-Hynes e cols (2010), a síntese da melatonina é maior durante o período noturno, onde a concentração deste hormônio na corrente sanguínea é em torno de 80-120 pg/ml, enquanto de dia situa-se entre 2-20 pg/ml. Os Autores também afirmam que estes valores tendem a diminuir com o aumento da idade.

Esse hormônio é conhecido principalmente por seu papel nos ritmos circadianos e regulação do sono, porém atualmente sabe-se que a melatonina também apresenta ação antioxidante, anti-inflamatória, antioncostática, e na eliminação de radicais livres (SAIDMAN, 2000; ARENDT e SKENE, 2005; BOTAS, 2014; ZHANG e ZHANG, 2014; VIELMA, et al., 2014).

Fisiologicamente muitas das ações da melatonina são decorrentes de sua interação com receptores de membrana acoplados a proteína G, denominados MT₁ (Mel_{1a}) e MT₂ (Mel_{2b}). Estes receptores encontram-se distribuídos tanto no SNC como no periférico (DUBOCOVICH, et al., 2005; SLOMINKI, et al., 2012).

No sistema auditivo poucos são os estudos que exploraram a expressão e a função da melatonina e seus receptores. Em 1989, Rivkess et al., caracterizaram no cérebro de aves a presença de receptores de melatonina nos núcleos da via auditiva. Lacoste e cols. (2015) investigaram a expressão de MT₁ e MT₂ no cérebro de roedores em idade adulta, onde descreveram a presença do receptor MT₂ no colículo inferior.

Sobre as ações da melatonina no sistema auditivo, a administração via oral da melatonina poderia ainda minimizar os efeitos do zumbido e da perda auditiva causada por ototoxicidade (LOPES-GONZALES et al., 2007; BAS et al., 2012; DEMIR et al., 2015).

2.5 ENVELHECIMENTO E SEUS EFEITOS NO SISTEMA AUDITIVO

Considerado um processo multidimensional, os fatores ambientais ou fisiológicos podem proteger ou agravar os sinais do envelhecimento, proporcionando possíveis mudanças funcionais, fisiológicas e neurocomportamentais, além de mudanças estruturais em vias do SNC (MATAS et al., 2006; SCHMIDT et al., 2012; NICOLA, 2018).

Tortora e Derrikson (2013) descreveram os efeitos do envelhecimento nos sentidos especiais, mostrando que a partir dos 60 anos de idade, um quarto da população apresenta perda auditiva relacionada à idade, a presbiacusia, decorrente da perda de células ciliadas no órgão de corti ou da degeneração da via auditiva central. A presbiacusia é a

doença neurodegenerativa e o distúrbio de comunicação mais prevalente da população idosa, podendo levar ao declínio cognitivo desses indivíduos (FRISINA et al., 2016).

De acordo com Parra et al. (2004) mesmo indivíduos idosos com SAP íntegro podem apresentar dificuldade no processamento da informação auditiva a nível central. Normalmente esses indivíduos escutam o estímulo sonoro, porém queixam-se de não compreendê-lo (TONELOTTI, 2017). Isso ocorre porque o envelhecimento pode acometer também o SAC, pela diminuição de neurotransmissores inibitórios que participam do processamento auditivo (SAMELLI, 2016).

Raza e cols. (1994) avaliaram em estudo com ratos jovens, adultos e idosos se haveria alterações relacionadas à idade na expressão de ácido glutâmico descarboxilase (GAD) e GABA no CI, NC e nos núcleos do leminisco lateral (NLL). Foi descrito que a perda auditiva relacionada à idade não estaria relacionada à captação ou depravação de GABA, mas sim a diminuição da capacidade biossintética do GAD presente. Demonstraram também que há déficits neuroquímicos relacionados com a idade e que essas alterações contribuem para danos na percepção auditiva observadas na presbiacusia central.

Nos últimos anos diversos autores mostraram que no SAC de roedores há diminuição na expressão de GAD, parvalbumina e calbindina, mais precisamente, no CI, CGM e córtex auditivo, além da diminuição de terminais nervosos, o que poderia estar relacionado a uma possível deterioração da função auditiva relacionada com a idade (BURIANOVA et al., 2009; OUDA et al., 2008; OUDA et al., 2012b; BURIANOVA et al., 2015).

A deterioração da habilidade auditiva ao longo da idade pode também resultar de alterações pré e pós-sinápticas na ação de neurotransmissores inibitórios em alguns núcleos da via auditiva (BURIANOVA et al., 2015) principalmente estações inibitórias na região leminiscal, uma vez que estas estão relacionadas com a codificação de sinais acústicos (CASPARY et al., 2008).

Gray et al. (2014) levantaram a hipótese de que mudanças na densidade de calbindina e parvalbumina relacionadas à idade poderia ser um mecanismo de compensação inibitória a fim de combater a hiperexcitabilidade do sistema auditivo.

Ao longo do envelhecimento ocorre também o aumento do estresse oxidativo celular. Acredita-se que essa condição esteja envolvida em mais de 100 condições clínicas

dentre elas alterações otológicas como perda por ototoxicidade, perda auditiva induzida por ruído (PAIR), zumbido e a presbiacusia (HALLIWELL et al., 1992; POIRRIER et al., 2010; KIDD e BAO, 2012; TAVANAI e MOHAMMADKHANI, 2017).

Saidman (2000) demonstrou que a suplementação com antioxidantes como a melatonina pode minimizar os efeitos da perda auditiva e do envelhecimento em geral por diminuir as deleções do DNA mitocondrial (mtDNA).

A ação antioxidante da melatonina se dá pela eliminação de radicais livres e por aumentar a capacidade de defesa de muitas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e óxido nítrico sintase (SAIDMAN, 2000; TAVANAI e MOHAMMADKHANI, 2017). Estas ações são independentes de receptores, porém a função neuroprotetora da melatonina em locais como cerebelo e hipocampo já foram descritas como dependente dos seus receptores (PINATO et al., 2015). No entanto, nenhum estudo até o momento explorou a expressão dos receptores de melatonina e sua ação na via auditiva ao longo do envelhecimento.

3. JUSTIFICATIVA

A perda auditiva relacionada à idade acomete grande parte dos indivíduos idosos mundialmente. A etiologia dessa condição não se encontra totalmente esclarecida, podendo estar relacionada à multifatores, sendo eles exógenos e/ou endógenos, dentre eles a alteração neuroquímica do SAC. Contudo, ainda são poucos os estudos que descrevem a fisiologia da via auditiva durante o envelhecimento. Dessa forma, investigações neuroquímicas das áreas auditivas centrais podem contribuir para melhor compreensão das bases envolvidas na presbiacusia central e para futuras pesquisas que avaliem formas de prevenção e tratamento para a perda auditiva na população idosa.

4. OBJETIVO

Avaliar a expressão das CaBPs e dos receptores de melatonina MT₁ e MT₂ em neurônios das estações sinápticas que compõem o SAC em ratos jovens e idosos. Comparar a morfologia dos neurônios imunorreativos as CaBPs entre ratos jovens e idosos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Os animais utilizados no presente estudo, ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) foram provenientes do biotério da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Botucatu. Seis ratos considerados jovens com idade ao redor de 60 dias e seis idosos com idade ao redor de 18 meses ficaram alojados no biotério de manutenção da FFC-UNESP, campus de Marília, em caixas de polipropileno com as seguintes dimensões: 38x32x16cm forradas com maravalha, com água filtrada e ração (Nuvilab) “*ad libitum*”.

Os experimentos realizados seguiram as normas estabelecidas pela Lei nº 11.794, de 2008, regulamentada pelo Decreto nº 6.899, de 2009. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética local, CEUA-FFC, proc. N.891/2017

5.2 PERFUSÃO TRANSCARDÍACA

Os animais de ambos os grupos foram anestesiados com 1ml do anestésico Rompum (solução com Acepromazina 1,8ml, Ketamina 4,5ml, Xylazina 4,5ml e H₂O_d 7,2ml) e perfundidos na fase escura (ZT 17) (considerando início da fase clara aproximadamente as 06:00 h, considerado o Zeitgeber Time 0, ZT 0 como referência; e a fase escura com início aproximado as 19:00 h). Na perfusão transcardíaca foram utilizados 200 ml de salina a 0,9%, seguida de 400 ml de paraformaldeído 4% (pH 6,0, 4° C).

A região torácica do animal foi exposta propiciando o acesso ao coração, a artérias aorta descendente foi clampeada e uma pequena fissura foi feita na parede do ventrículo esquerdo, permitindo a inserção da cânula (conectada a bomba de perfusão), por último a aurícula direita foi cortada, permitindo a disseminação das soluções citadas acima.

Os encéfalos foram então retirados e colocados em solução de pós-fixação (25mL de paraformaldeído e 5g de sacarose) por 12 horas e em seguida crioprotetidos em solução composta por 25ml de PBS (água destilada, fosfato monobásico, fosfato bifásico e cloreto de sódio pH 7,4) e 5g de sacarose até serem congelados e crio-seccionados em secções de 30 µm de espessura utilizando criostato (Leica CM 1850, Microsystems AG, Alemanha). Os cortes encefálicos foram armazenados em seis séries em solução anti-congelante a -20°C até o momento do processamento imuno-histoquímico ou da coloração de Nissl.

5.3 IMUNOPEROXIDASE

Os cortes encefálicos foram processados utilizando a técnica de imuno-histoquímica pelo método “free-floating” para as CaBPs: calbidina (CB), parvalbumina (PV) e calretinina (CR). Inicialmente, os cortes foram lavados em solução tampão PBS em pH 7,4 e pré-incubados em solução 0,05 M PBS contendo 2% soro normal produzido em burro (NDS) (Vector Laboratories, USA); após 2h foram incubados com anticorpos primários anti-PV (1:5000, Abcam, USA), anti-CB (1:5000, Abcam, USA), anti-CR (1:5000, Millipore, USA) separadamente a 4 °C. Após 48 h os cortes foram lavados por 30 min em 0.05 M PBS e incubados por duas horas em solução contendo 0.05 M PBS e o anticorpo secundário (1:1000) específico para a espécie de cada anticorpo primário. Após lavagem por 30 min em 0.05 M PBS ocorreu a incubação por duas horas em solução contendo o complexo avidina-biotina (Vector Laboratories, USA). A marcação foi revelada utilizando 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma - Aldrich, USA) como cromógeno. Na sequência as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e desidratadas; lamínulas foram colocadas sobre as lâminas usando DPX como meio para a montagem (Sigma - Aldrich, USA). Os controles negativos dos anticorpos foram realizados repedindo-se as soluções, porém retirando-se os anticorpos primários.

5.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Algumas séries de cortes encefálicos (30 μm) foram processadas usando anticorpos primários para MT₁ e MT₂ ambos anti-cabra (1: 200, Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA). Após pré-incubação por 2h em PBS 0,1 M pH 7,4 contendo 2% de soro normal foi adicionada uma combinação do anticorpo MT₁ primário. Após 48h, os cortes foram lavados em PBS por 30 minutos e incubados por 2h em anticorpo secundário fluorescente (CY3) anti-cabra (1: 200, Jackson Immuno pesquisa, West Grove, PA, EUA) específicos para cada anticorpo primário. Os núcleos das células foram corados com 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Sigma Chemical, D9542, St. Louis MO, EUA) durante 5 minutos, e então os cortes encefálicos foram montados em lâminas e cobertos com glicerol e lamínula. As lâminas foram analisadas por microscopia de epifluorescência.

5.5 ESTEREOLOGIA

A análise estereológica foi realizada no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), UNESP – Campus de Araçatuba, utilizando o método do fracionador óptico (West et al., 1991) e nucleador (Gundersen, et al., 1988).

Para isso, lâminas contendo os cortes histológicos reagidos de acordo com o anticorpo proposto (CR, PV e CB) foram analisadas em um microscópio Zeiss Imager Z2 equipado com platina motorizada e câmera digital conectada a um computador executando o programa Stereo Investigator (Microbrightfield, EUA). Foram utilizados todos os cortes de uma série contendo desde a extremidade anterior até a extremidade posterior das estações sinápticas da via auditiva (corpo geniculado medial, colículo inferior, complexo olivar superior e núcleo coclear), resultando aproximadamente em 25 cortes (distância de 240 µm entre cortes) para cada animal.

Dependendo do anticorpo utilizado, a superfície da caixa de contagem e seu número dentro de cada ROI (region of interest) foram estimados em contagem de teste de forma a incluir um mínimo de 200 células contadas em cada animal, quando esse número não foi alcançado, foi realizada a contagem por meio do software de processamento e análise de imagens digitais ImageJ (McMaster Bio0photonics Facility, Canadá). A espessura do disector óptico (Z) foi ajustada de acordo com a espessura real do corte determinada após os processos imuno-histoquímicos e de desidratação.

Para determinar a estimativa do número de células dentro da ROI (N) o programa utiliza a fórmula:

$$N = (\Sigma Q) (1/ssf) (1/asf) (1/tsf)$$

Onde:

N = número total de células

ΣQ = número de células efetivamente contadas

ssf = “section sampling fraction” (número de secções contadas/total de secções)

asf = “area sampling fraction” (área bloco de contagem/área da grade)

tsf = “tissue sampling fraction” (altura bloco/média da espessura da secção)

Os parâmetros de contagem serão ajustados de forma a obter um coeficiente de erro (Gundersen) < 0,08.

Para estimar o volume médio da célula é utilizada a fórmula:

$$\overline{v_N} = \frac{4\pi}{3} \overline{l_n^3}$$

Onde:

$\overline{v_N}$ = estimativa média de volume de todas as partículas amostradas

$\overline{l_n^3}$ = média do cubo do comprimento dos raios desde o ponto arbitrário até a intersecção com o limite da partícula.

Também foi realizada a estimativa da área celular por meio do Nucleador, onde é considerada a fórmula para a área de um círculo. Estimativa da área média de todas as partículas amostradas = π multiplicada pela média dos quadrados dos comprimentos do ponto arbitrário até o limite da partícula.

5.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA E QUANTITATIVA

A análise da expressão dos receptores de melatonina foi realizada em microscopia fluorescente (Olympus BX50) adaptado a câmera digital (DP73), e microcomputador com software cellSens (USA). Foram capturadas imagens de todos os cortes encefálicos de uma das séries (25) que continham os núcleos auditivos centrais (NC, COS, CI e CGM). Foram realizadas duas fotos para o NC e COS, seis fotos para o CI e de duas a quatro fotos dependendo região antero-posterior para o CGM.

Por meio do software de processamento e análise de imagens digitais ImageJ (McMaster Bio0photonics Facility, Canadá) foi realizada a contagem dos receptores de melatonina nos núcleos descritos, conforme descrito em Pinato et al. (2017). A contagem foi realizada no foco em que era possível ter melhor visualização dos núcleos da células e receptores. Todas as células marcadas neste foco foram contadas.

As áreas encefálicas foram identificadas para ambas as análises realizadas neste estudo, utilizando o atlas “The Rat Brain” (PAXINOS e WATSON, 1998) (Figura 1).

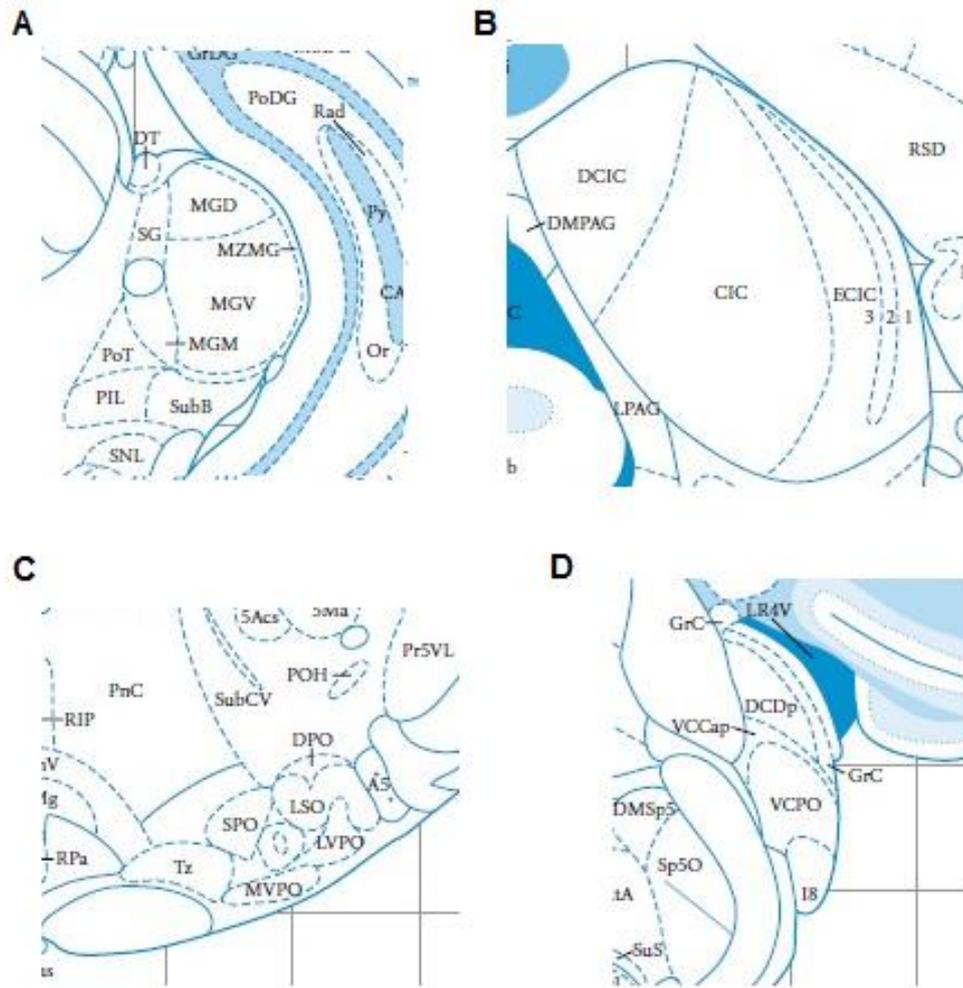


Figura 1. Núcleos do sistema auditivo central, evidenciados em desenhos adaptados de Paxinos e Watson (1998). Em, A, bregma -6.00mm referente ao corpo geniculado medial e suas subdivisões, porção medial (MGM), porção dorsal (MGD), porção ventral (MGV), zona marginal do CGM (MZMG). Em B, bregma -8,64 mm referente ao colículo inferior e suas subdivisões, núcleo central (CIC), córtex dorsal (DCIC) e córtex externo (ECIC). Em C, bregma -9,72 mm referente ao complexo olivar superior e subdivisões, oliva superior medial (MSO), oliva superior lateral (LSO), núcleo do corpo trapezóide (Tz). Em D, bregma -10,80 mm referente ao núcleo coclear e subdivisões, porção posterior do núcleo coclear anterior (VCPO) e núcleo coclear dorsal (DCD).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média, e o teste t Student's t-test foi utilizado para comparar as médias entre os ratos jovens e idosos.

6. RESULTADOS

Observou-se diminuição da expressão de neurônios CR-IR no grupo idoso ($347,2 \pm 10,0$) (Figura 2C e 2D) quando comparado ao grupo jovem ($432,8 \pm 9,8$) (Figura 2A e 2B) ($P= 0,0003$) no NC (Figura 2E).

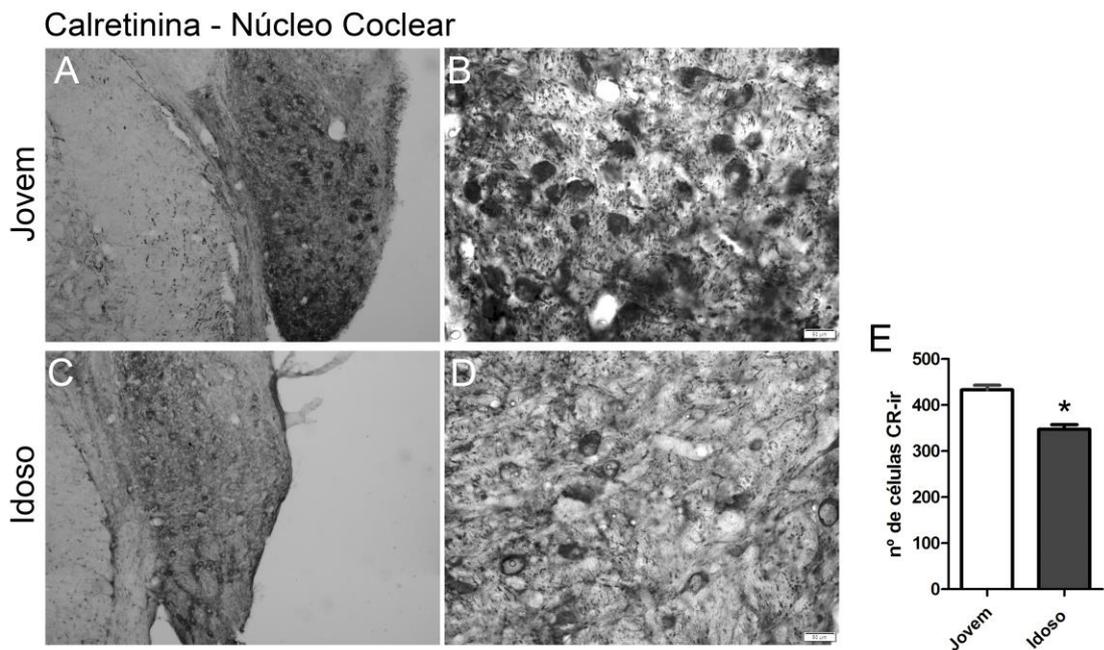


Figura 2. Fotomicrografias em campo claro (em escala de cinza) de cortes coronais encefálicos de ratos ao nível do núcleo coclear (NC) submetidos à técnica de imunohistoquímica para calretinina (CR) e gráficos comparativos entre os grupos jovem e idoso. Em A e B, núcleo coclear (NC) referente ao grupo controle (jovem). Em C e D, núcleo coclear (NC) referente ao grupo idoso. Em E, gráfico comparativo do total de células calretinina imunorreativas (CR-IR) no núcleo coclear (NC) entre os grupos jovem e idoso (* $P= 0,0003$) ($N=5$ para cada grupo). (Barra de calibração = $50\mu\text{m}$).

A análise por meio do fracionador óptico, o NC não mostrou diferença significativa para densidade de células PV-IR entre o grupo jovem ($0,012 \pm 0,001$) e idoso ($0,010 \pm 0,0005$) (Figura 2C) ($P= 0,2234$). O mesmo ocorreu para o total de células PV-IR ao comparar o grupo jovem ($440,7 \pm 38,26$) e grupo idoso ($361,7 \pm 24,11$) ($P=0,1556$) (Figura 3D).

A análise estereológica utilizando o nucleador no NC não mostrou diferença significativa no volume dos neurônios PV-IR ao comparar o grupo jovem ($13,6 \pm 71,9$) ao grupo idoso ($12,3 \pm 65,9$) ($P= 0,1934$) (Figura 3E).

Parvalbumina - Núcleo Coclear

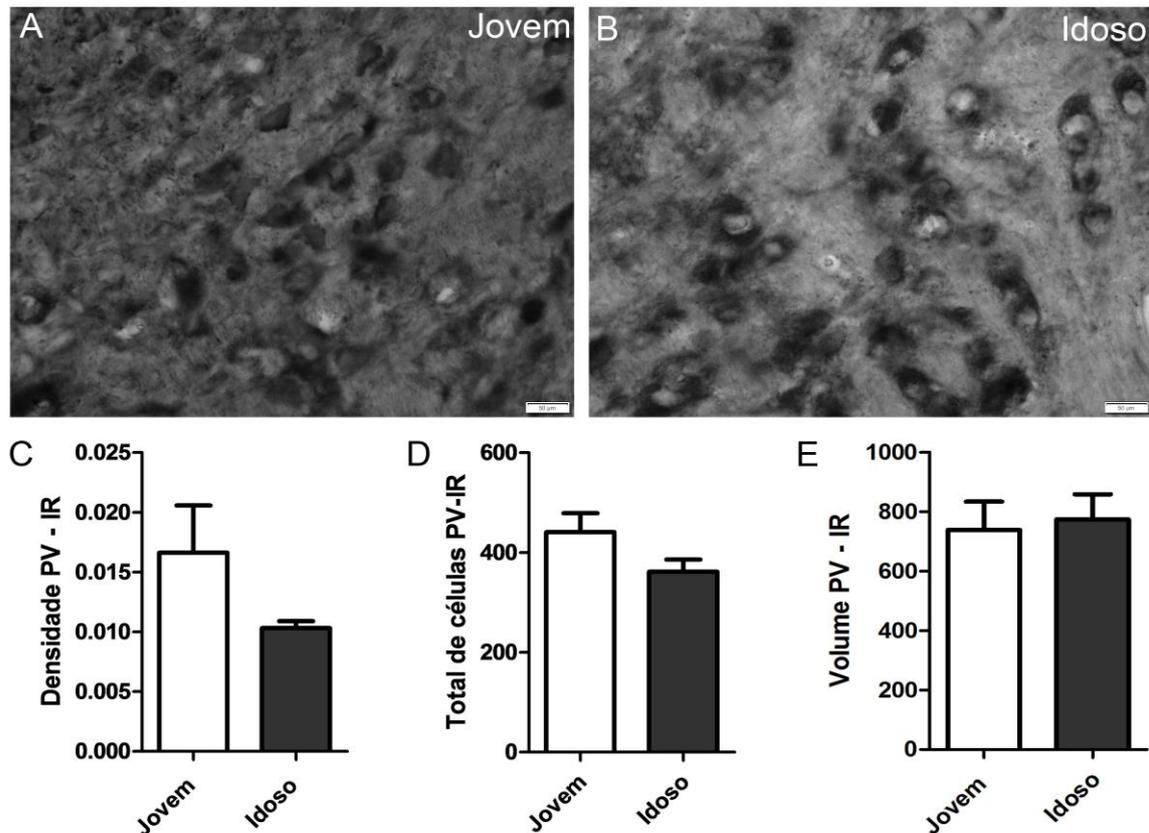


Figura 3. Fotomicrografias em campo claro (em escala de cinza) de cortes coronais encefálicos de ratos ao nível do núcleo coclear (NC) submetidos à técnica de imunohistoquímica para parvalbumina (PV) e gráficos comparativos entre os grupos jovem e idoso. Em A, núcleo coclear (NC) referente ao grupo controle (jovem). Em B, núcleo coclear (NC) referente ao grupo idoso. Em C, gráfico comparativo da densidade ($D=N/V$) de células parvalbumina imunorreativas (PV-IR) no núcleo coclear (NC) entre os grupos jovem e idoso. Em D, gráfico comparativo do total de células parvalbumina imunorreativas (PV-IR) no núcleo coclear (NC). Em E, gráfico comparativo da média do volume (μm^3) neuronal de células parvalbumina imunorreativas (PV-IR) no núcleo coclear (NC) entre os grupos jovem e idoso ($N=4$ para ambos os grupos). (Barra de calibração = $50\mu\text{m}$).

O total de células CR-IR no COS encontrado foi menor no grupo idoso ($272,0 \pm 11,2$) (Figura 4B) se comparado com o grupo jovem ($427,2 \pm 23,9$) (Figura 4A) ($P=0,0004$) (Figura 4C).

Calretinina - COS

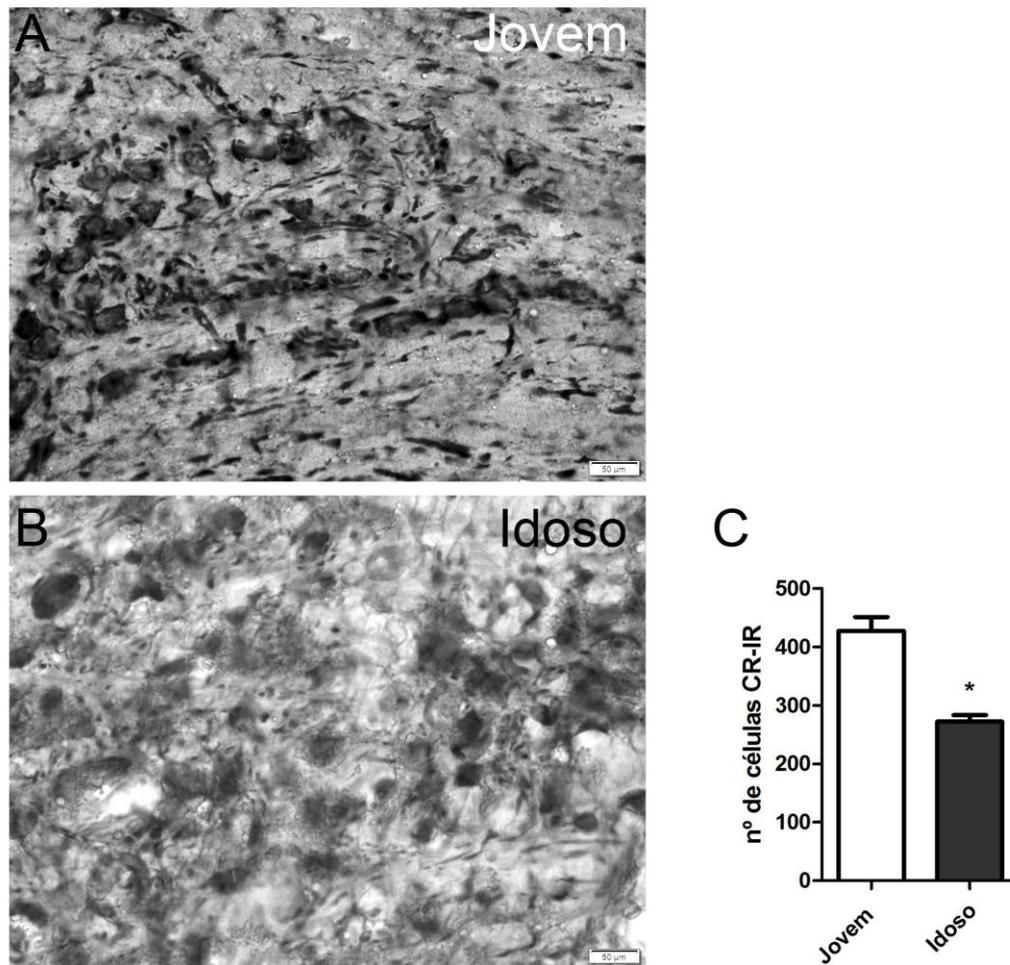


Figura 4. Fotomicrografias em campo claro (em escala de cinza) de cortes coronais encefálicos de ratos ao nível do complexo olivar superior (COS) submetidos à técnica de imuno-histoquímica para calretinina (CR) e gráficos comparativos entre os grupos **jovem e idoso**. Em A, complexo olivar superior (COS) referente ao grupo jovem. Em B, complexo olivar superior (COS) referente ao grupo idoso. Em C, Gráfico comparativo do total de células calretinina imunorreativas (CR-IR) no complexo olivar superior (COS) entre os grupos jovem e idoso ($P=0,0004$) ($N=5$ para cada grupo). (Barra de calibração = $50\mu\text{m}$).

No COS a análise mostrou menor número de células CB-IR no grupo idoso (Figura 5B) ($272,0 \pm 11,2$) se comparado com o grupo jovem (Figura 5A) ($427,2 \pm 23,9$) ($P=0,0004$) (Figura 5C).

Calbindina - COS

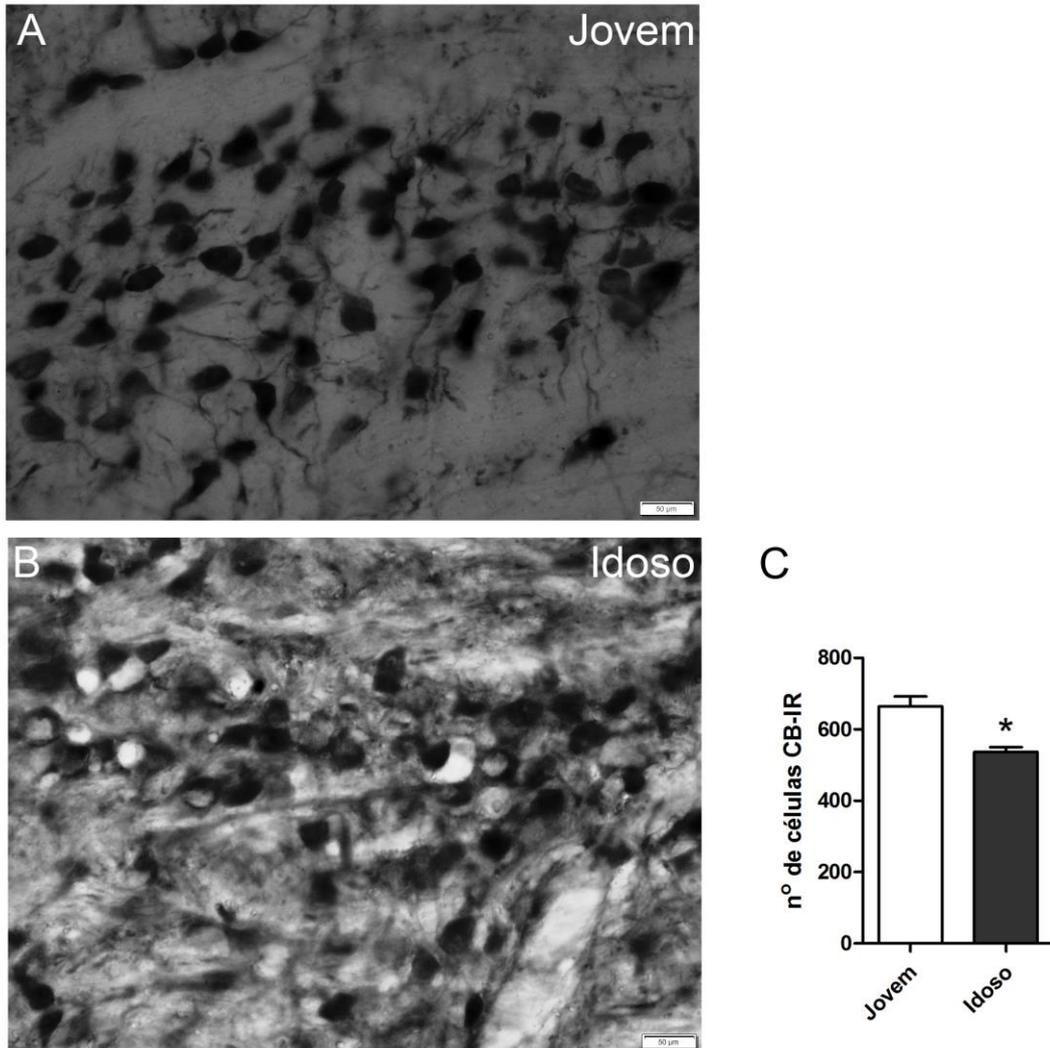


Figura 5. Fotomicrografias em campo claro (em escala de cinza) de cortes coronais encefálicos de ratos ao nível do complexo olivar superior (COS) submetidos à técnica de imuno-histoquímica para calbindina (CB) e gráficos comparativos entre os grupos jovem e idoso. Em A, complexo olivar superior (COS) referente ao grupo jovem. Em B, complexo olivar superior (COS) referente ao grupo idoso. Em C, Gráfico comparativo do total de células calbindina imunorreativas (CB-IR) no complexo olivar superior (COS) entre os grupos jovem e idoso ($P=0,0004$) ($N=6$ para cada grupo). (Barra de calibração = $50\mu\text{m}$).

A análise por meio do fracionador óptico no COS não mostrou diferença significativa para densidade de células PV-IR entre o grupo jovem ($0,015 \pm 0,004$) e idoso ($0,018 \pm 0,006$) no CI ($P=0,6406$) (Figura 6C). O mesmo ocorreu para o total de células PV-IR ao comparar o grupo jovem (12460 ± 1027) e grupo idoso ($12320 \pm 891,7$) ($P=0,9169$) (Figura 6E).

A análise estereológica utilizando o nucleador no COS não mostrou diferença significativa no volume dos neurônios PV-IR ao comparar o grupo jovem ($13,6 \pm 71,9$) ao grupo idoso ($12,3 \pm 65,9$) ($P= 0,1934$) (Figura 6D).

Parvalbumina - Complexo Olivar Superior

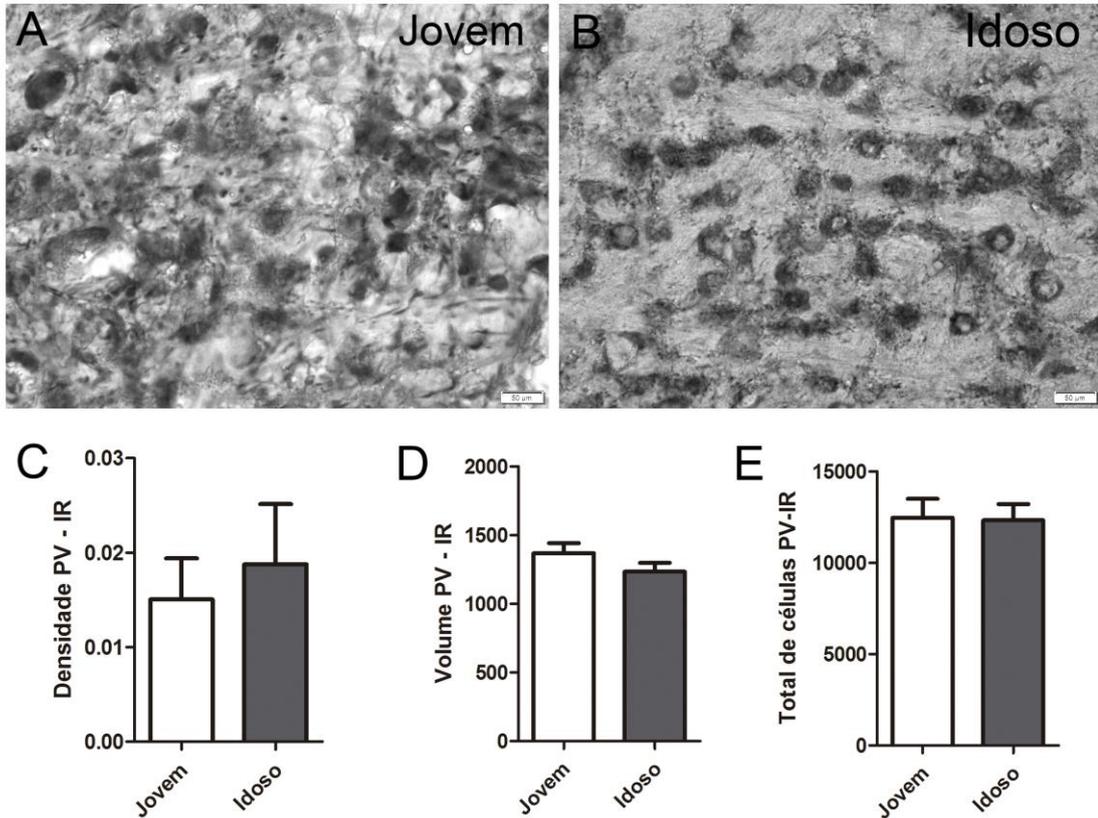


Figura 6. Fotomicrografias em campo claro (em escala de cinza) de cortes coronais encefálicos de ratos ao nível do complexo olivar superior (COS) submetidos à técnica de imuno-histoquímica para PV e gráficos comparativos entre os grupos jovem e idoso. Em C, gráfico comparativo da densidade ($D=N/V$) de células parvalbumina imunorreativas (PV-IR). Em D, gráfico comparativo da média do volume (μm^3) neuronal de células parvalbumina imunorreativas (PV-IR) no complexo olivar superior (COS) entre os grupos jovem e idoso. Em E, gráfico comparativo do total de células parvalbumina imunorreativas (PV-IR) ($N=6$ para cada grupo). (Barra de calibração = $50\mu\text{m}$).

A análise estereológica por meio do fracionador óptico que o número de células (Figura 7C) PV-IR no CI não apresentou diferença significativa quando comparados grupo idoso (23420 ± 3179) e grupo jovem (26480 ± 1556) ($P= 0,2197$). Já a densidade de neurônios (Figura 7E) PV-IR no CI foi menor no grupo idoso ($0,008 \pm 0,0004$) se comparado ao grupo jovem ($0,006 \pm 0,0006$) ($P= 0,0373$).

Ao realizar análise estereológica por meio do nucleador em células PV-IR do CI verificou-se que o volume dos neurônios PV-IR foi maior no grupo idoso ($6086 \pm 1582 \mu\text{m}^3$) se comparado ao grupo jovem ($1134 \pm 59,80 \mu\text{m}^3$) ($P= 0,0197$) (Figura 7D).

Parvalbumina - Colículo inferior

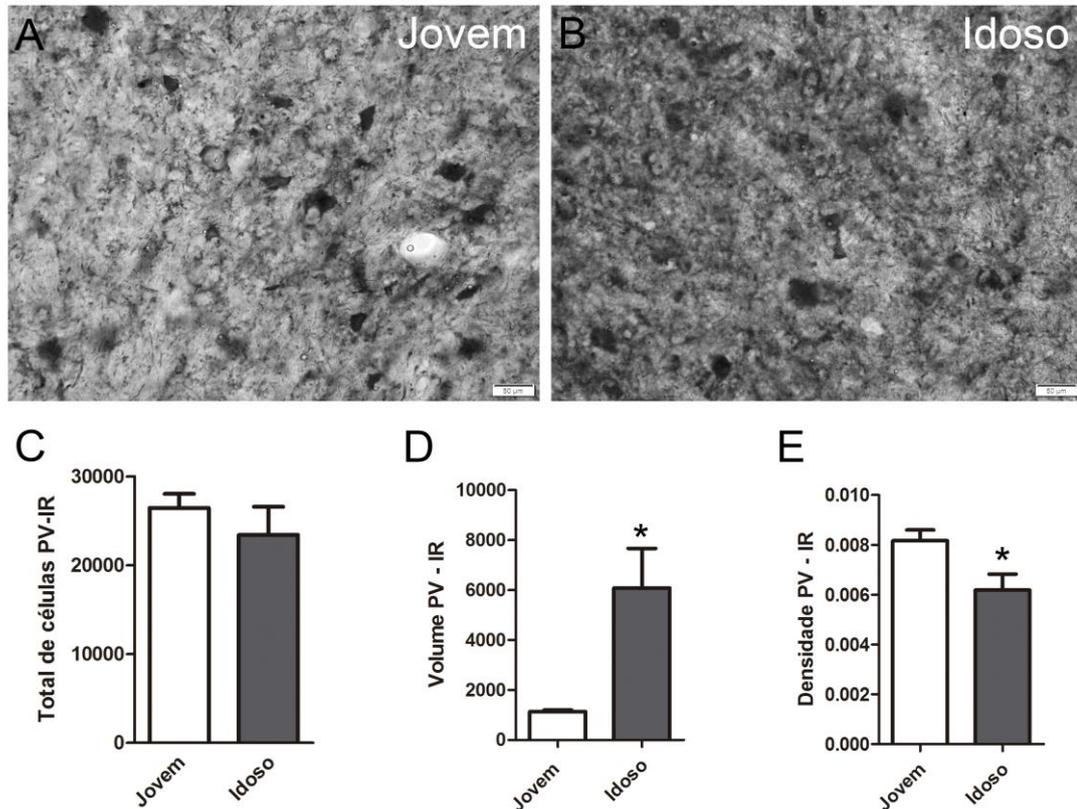


Figura 7. Fotomicrografias em campo claro (em escala de cinza) de cortes coronais encefálicos de ratos aonível do colículo inferior submetidos à técnica de imunohistoquímica para PV e gráficos comparativos entre os grupos jovem e idoso. Em A, imagem representativa do colículo inferior no grupo jovem. Em B, imagem representativa do colículo inferior no grupo idoso. Em C, Gráfico comparativo do total de células parvalbumina imunorreativas (PV-IR) no colículo inferior entre os grupos jovem e idoso. Em D, Gráfico comparativo da média do volume (μm^3) neuronal de células parvalbumina imunorreativas PV-IR no colículo inferior entre os grupos jovem e idoso (* $P= 0.0197$). Em E, gráfico comparativo da densidade ($D=N/V$) de células parvalbumina imunorreativas (PV-IR) entre os grupos jovem e idoso no colículo inferior (* $P= 0,0373$) ($N=6$ para cada grupo). (Barra de calibração = $50\mu\text{m}$).

Na região do CGM, a análise a partir do fracionador óptico não mostrou diferença significativa para total de células (Figura 8C) CB-IR entre o grupo jovem ($13550 \pm 584,2$) e idoso ($13010 \pm 905,8$) ($P= 0,6291$), também não houve diferença estatisticamente significativa para a densidade de células (Figura 8D) CB-IR ao comparar o grupo jovem ($0,015 \pm 0,0007$) e grupo idoso ($0,011 \pm 0,002$) ($P= 0,1236$) (Figura 8).

A análise da região do CGM por meio do nucleador mostrou diminuição do volume neuronal de células CB-IR no grupo idoso ($551,0 \pm 34,83 \mu\text{m}^3$) se comparado ao grupo jovem ($651,4 \pm 31,10 \mu\text{m}^3$) ($P=0,0375$) (Figura 8E).

Corpo Geniculado Medial - Calbindina

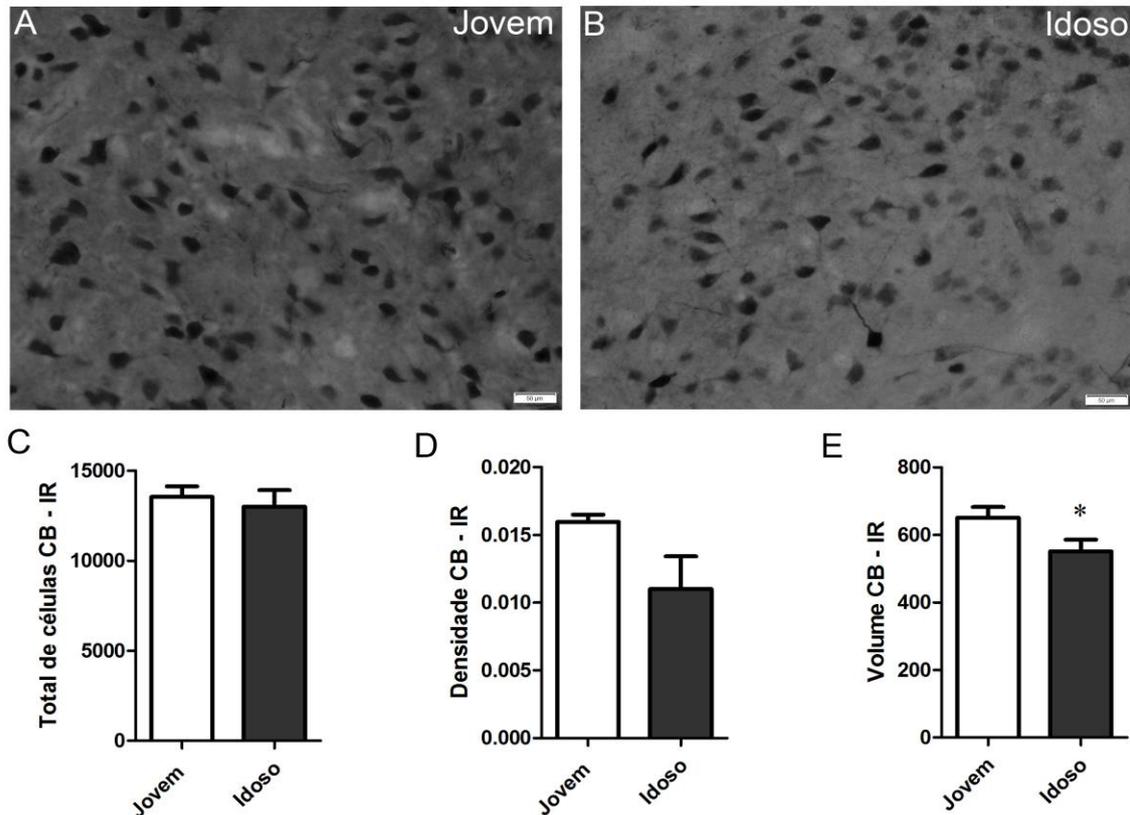


Figura 8. Fotomicrografias em campo claro (em escala de cinza) de cortes coronais encefálicos de ratos ao nível do corpo geniculado medial submetidos à técnica de imunohistoquímica para Calbindina (CB) e gráficos comparativos entre os grupos jovem e idoso. Em A, imagem representativa do corpo geniculado medial no grupo jovem. Em B, imagem representativa do corpo geniculado medial no grupo idoso. Em C, Gráfico comparativo do total de células calbindina imunorreativas (CB-IR) no corpo geniculado medial entre os grupos jovem e idoso. Em D, gráfico comparativo da densidade ($D=N/V$) de células calbindina imunorreativas (CB-IR) entre os grupos jovem e idoso no colículo inferior. Em E, gráfico comparativo da média do volume (μm^3) neuronal de células calbindina imunorreativas (CB-IR) no corpo geniculado medial entre os grupos jovem e idoso (* $P=0,0375$) ($N=4$ para o grupo jovem e $N=5$ para o grupo idoso). (Barra de calibração = $50\mu\text{m}$).

Na análise microscópica observou-se ausência de neurônios PV-IR na região do CGM para ambos os grupos. Além disso, não foi observado expressão de neurônios CB-IR na região do NC e CI tanto no grupo jovem quanto no idoso.

A imunofluorescência mostrou aumento na expressão de receptores MT₁-IR no NC do grupo idoso ($288,3 \pm 14,5$) (Figura 9B) comparado ao grupo jovem ($132,8 \pm 8,9$) (Figura 9A) (*P= 0,0002) (Figura 9C).

MT1 - Núcleo Coclear

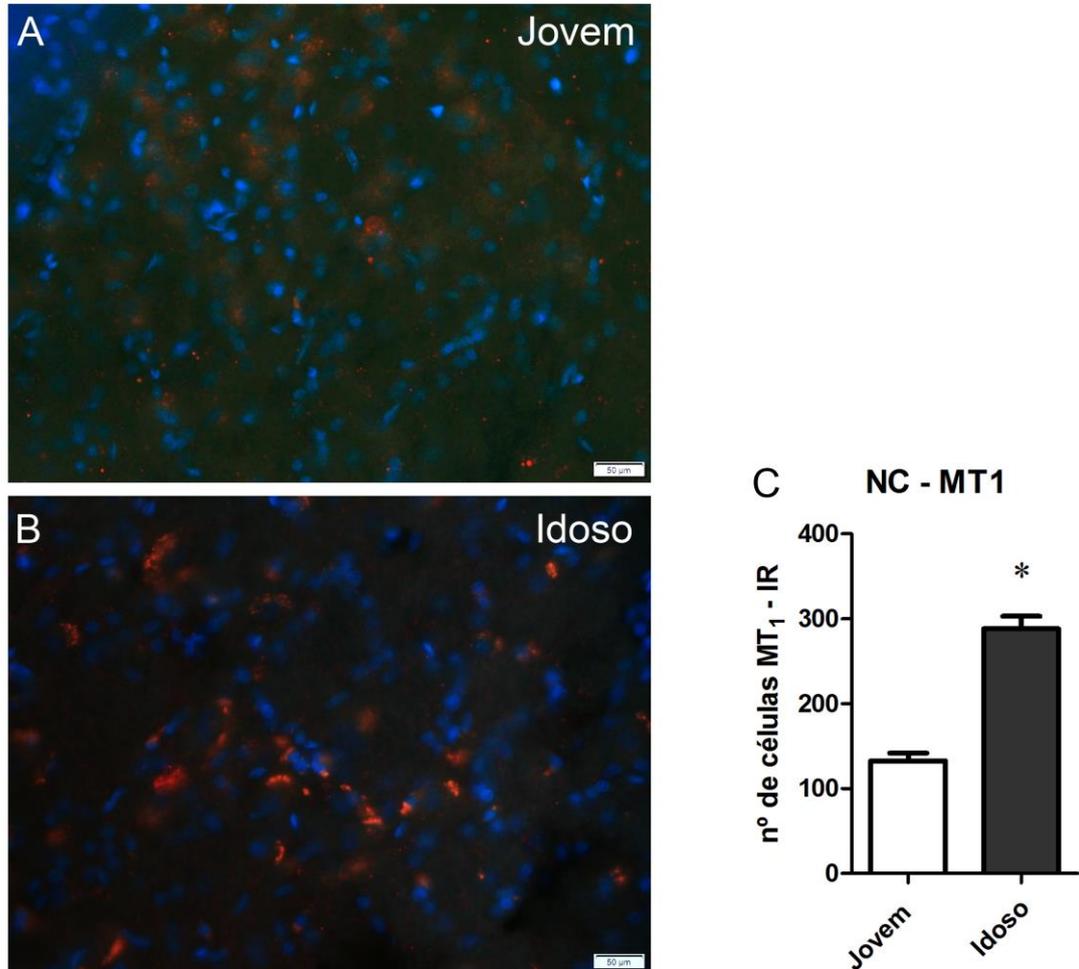


Figura 9. Fotomicrografias de alta ampliação de cortes coronais de ratos ao nível do núcleo coclear (NC) submetidos à técnica de imunofluorescência para receptor de melatonina tipo 1 (MT₁) (vermelho). Os núcleos das células foram corados com 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (azul). Em A, núcleo coclear (NC) referente ao grupo jovem. Em B, núcleo coclear (NC) referente ao grupo idoso. Em C, gráfico comparativo da média do número de células imunorreativas ao receptor de melatonina tipo 1 (MT₁- IR) no núcleo coclear entre os grupos jovem e idoso (*P= 0,0002). (N= 4 para o grupo idoso e N= 3 para o grupo jovem). (Barra de calibração = 50µm).

Houve aumento de expressão de receptores MT₁-IR no grupo idoso ao realizar a análise do COS e comparar ambos os grupos, jovem ($171,8 \pm 9,5$) e idoso ($221,3 \pm 12,0$) (P= 0,0219) (Figura 10C).

MT1 - Complexo olivar superior

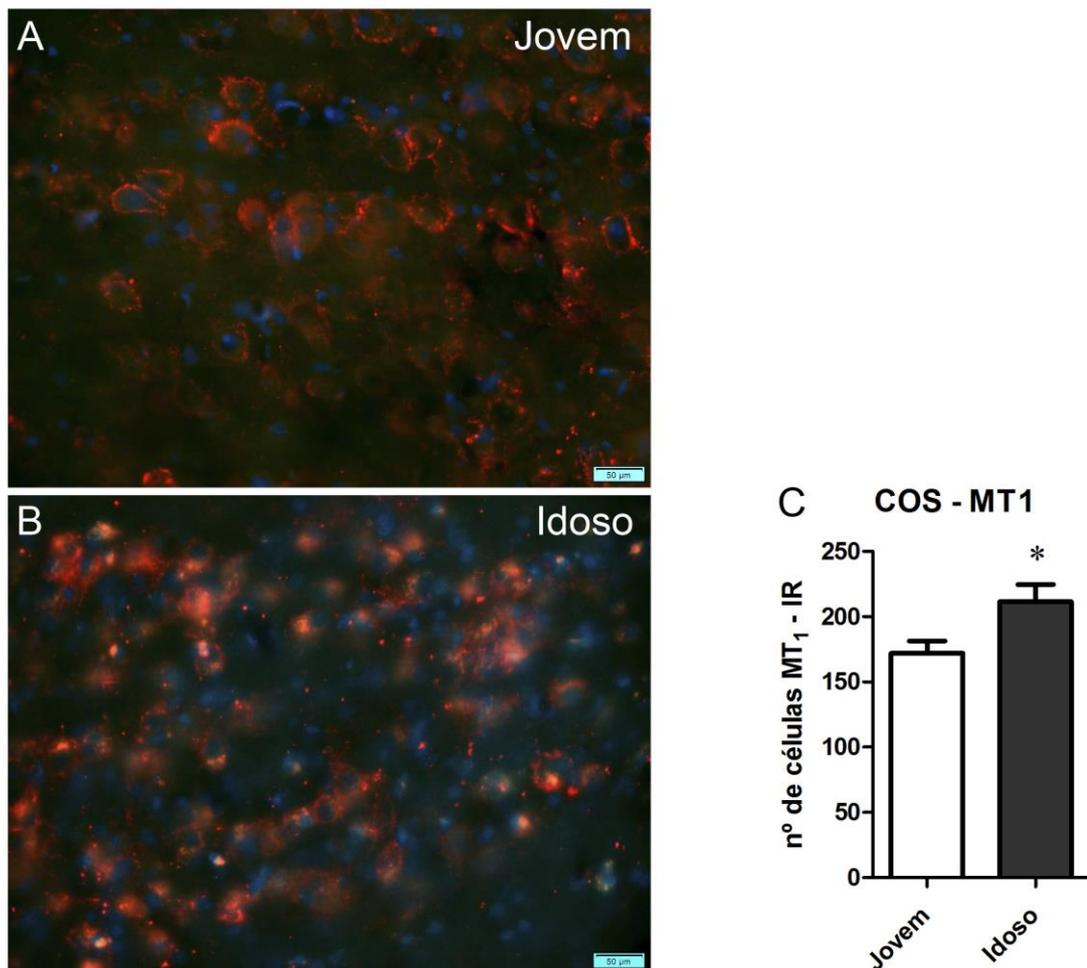


Figura 10. Fotomicrografias de alta ampliação de cortes coronais de ratos à nível do complexo olivar superior (COS) submetidos à técnica de imunofluorescência para receptor de melatonina tipo 1 (MT₁) (vermelho). Os núcleos das células foram corados com 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (azul). Em A, complexo olivar superior referente ao grupo jovem. Em B, complexo olivar superior (COS) referente ao grupo idoso. Em C, gráfico comparativo da média do número de células receptor de melatonina tipo 1 imuno-reativas (MT₁- IR) no região do complexo olivar superior (COS) entre os grupos jovem e idoso (*P= 0,0219). (N= 4 para o grupo o jovem e e N= 3 para o grupo idoso). (Barra de calibração = 50µm).

O aumento da expressão de receptores MT₁-IR também foi verificado para o grupo idoso (242,5 ± 11,4) (Figura 11B) no colículo inferior (CI) quando comparado com o grupo jovem (195,3 ± 11,1) (Figura 11A) (P=0,0351) (Figura 11C).

MT1 - Colículo Inferior

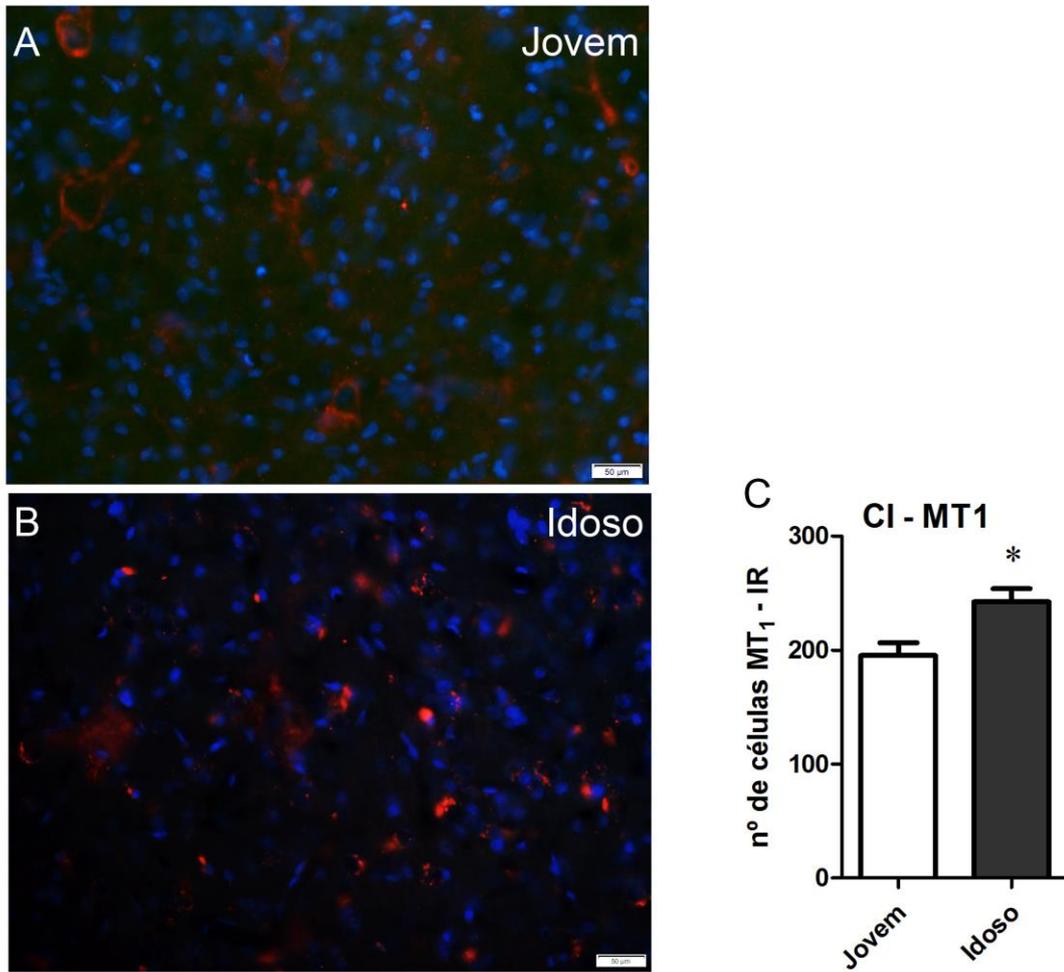


Figura 11. Fotomicrografias de alta ampliação de cortes coronais de ratos ao nível do colículo inferior (CI) submetidos à técnica de imunofluorescência para receptor de melatonina tipo 1 (MT₁) (vermelho). Os núcleos das células foram corados com 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (azul). Em A, colículo inferior (CI) referente ao grupo jovem. Em B, colículo inferior (CI) referente ao grupo idoso. Em C, gráfico comparativo da média do número de células melatonina tipo 1 imunorreativas (MT₁- IR) no colículo inferior (CI) entre os grupos jovem e idoso (*P= 0,0351) (N= 4 para o grupo idoso e N=3 para o grupo jovem). (Barra de calibração = 50µm).

Na região do CGM não foi possível quantificar e comparar entre os grupos jovem e idoso o número de células MT₁-IR, pois não houve expressão de MT₁ no grupo jovem (Figura 12A), enquanto no grupo idoso pode ser observado neurônios imunorreativos a MT₁ (Figura 12B).

Corpo Geniculado Medial - MT1

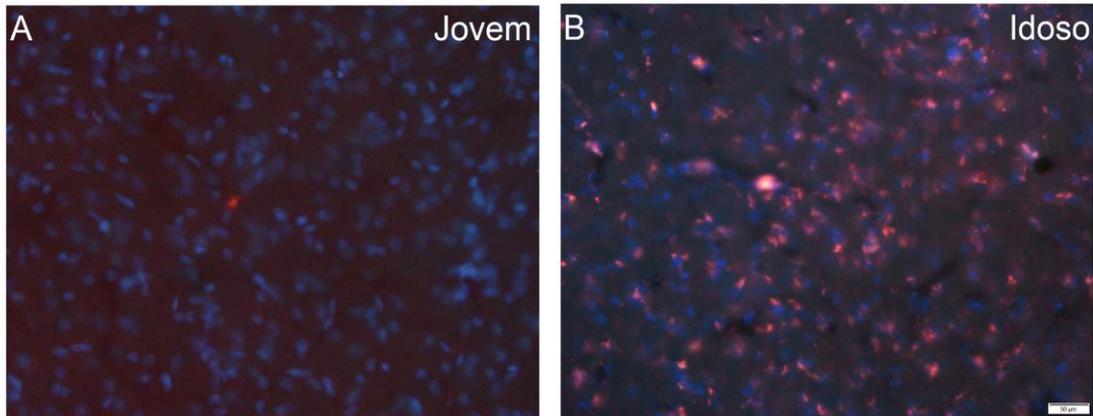


Figura 12. Fotomicrografias de alta ampliação de cortes coronais de ratos ao nível do corpo geniculado medial (CGM) submetidos à técnica de imunofluorescência para receptor de melatonina tipo 1 (MT₁) (vermelho). Os núcleos das células foram corados com 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (azul). Em A, corpo geniculado medial (CGM) referente ao grupo jovem. Em B, corpo geniculado medial (CGM) referente ao grupo idoso. (Barra de calibração = 50µm).

Ao analisar a imunofluorescência para o receptor de melatonina tipo 2 (MT₂) verificou-se ausência de expressão de MT₂-IR em todos os núcleos analisados do grupo jovem (Figura 13A e 14A), não sendo possível quantificar e comparar numericamente ambos os grupos. O grupo idoso apresentou alta imunorreatividade ao receptor MT₂ no NC (Figura 13B), COS (Figura 14B), CI (Figura 14C) e CGM (Figura 14D).

Núcleo Coclear - MT₂

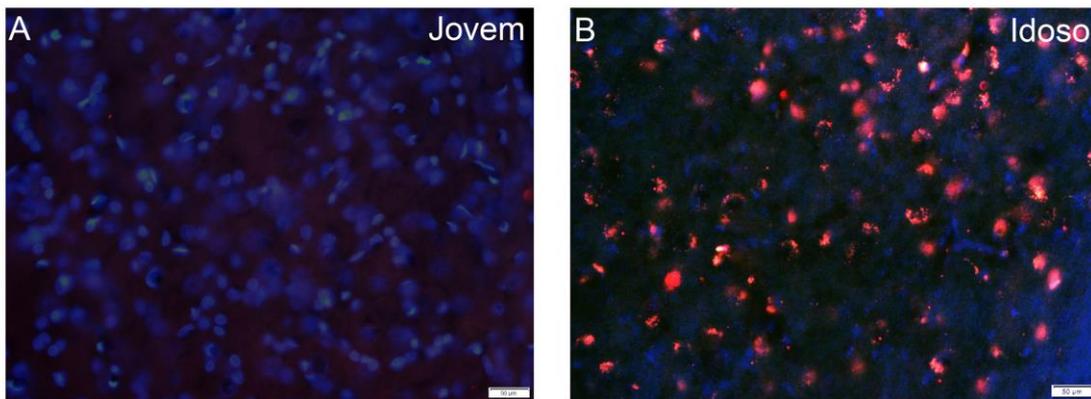


Figura 13. Fotomicrografias de alta ampliação de cortes coronais de ratos ao nível do núcleo coclear (NC) submetidos à técnica de imunofluorescência para receptor de melatonina tipo 2 (MT₂) (vermelho). Os núcleos das células foram corados com 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (azul). Em A, núcleo coclear (NC) referente ao grupo jovem. Em B, núcleo coclear (NC) referente ao grupo idoso. (Barra de calibração = 50µm).

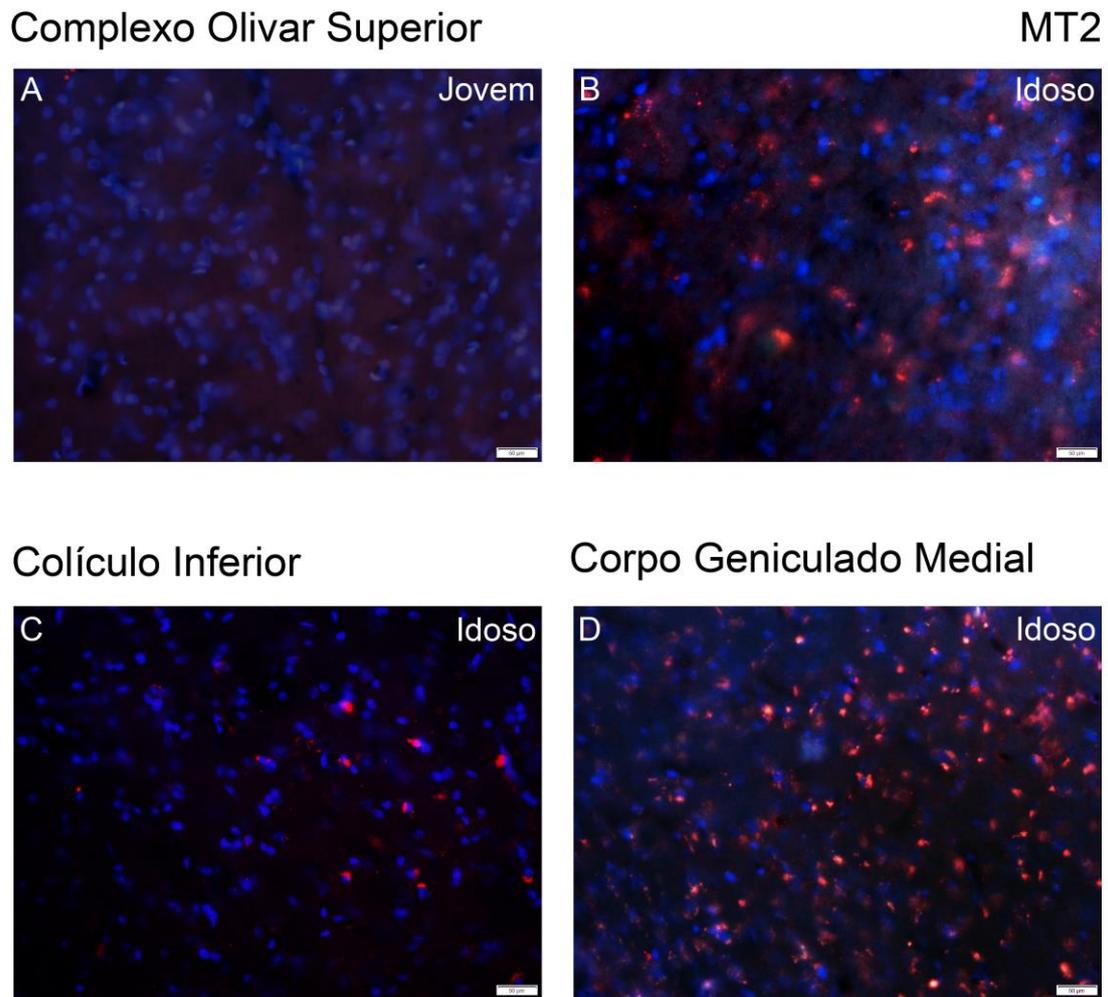


Figura 14. Fotomicrografias de alta ampliação de cortes coronais de ratos ao nível do complexo olivar superior (COS), colículo inferior (CI) e corpo geniculado medial (CGM) submetidos à técnica de imunofluorescência para receptor de melatonina tipo 2 (MT₂) (vermelho). Os núcleos das células foram corados com 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (azul). Em A, núcleo coclear (NC) referente ao grupo jovem. Em B, núcleo coclear (NC) referente ao grupo idoso. Em B, núcleo coclear (NC) referente ao grupo idoso. Em C, colículo inferior (CI) referente ao grupo idoso. Em D, corpo geniculado medial (CGM), referente ao grupo idoso. (Barra de calibração = 50µm).

7. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar alterações neuroquímicas e morfológicas no SAC em ratos idosos a fim de contribuir para uma melhor compreensão das bases envolvidas nas alterações auditivas centrais que ocorrem ao longo do envelhecimento.

Este estudo mostrou que a expressão das CaBPs variou de acordo com a estação sináptica e a respectiva proteína analisada, confirmando que a via estudada sofre efeitos do envelhecimento. O declínio da expressão de neurônios CB- IR, CR-IR E PV-IR nos núcleos centrais do SAC no grupo idoso pode estar relacionado aos prejuízos nas funções auditivas, uma vez que as CaBPs estão envolvidas no processamento e modulação das respostas neurais e espectro temporais da via auditiva (FREDRICH et al., 2009; MARTIN DEL CAMPO et al., 2012).

O presente estudo mostrou diminuição de neurônios CR-IR no NC e COS com o envelhecimento, o que pode estar relacionado à diminuição das habilidades auditivas por qual cada um dos dois núcleos é responsável, como detecção da informação auditiva e localização da fonte sonora (SAMELLI, 2016). Estudos anteriores mostraram que a expressão dessa mesma proteína não mostrou alteração com a idade em humanos (SHARMA et al., 2014) ou ainda apresentou maior quantidade de neurônios CR-IR na porção da MSO e no núcleo do corpo trapezoide (NCT) com o aumento da idade (KULESZA, 2014). Tais diferenças podem ser devidas a diferenças interespecíficas ou ainda a diferenças metodológicas de contagem já que no presente estudo foi realizada a contagem pelo método estereológico e em estudos anteriores pelo método manual com auxílio do software ImageJ.

No presente estudo não foram observadas diferenças de densidade, número e volume neuronal entre ratos jovens e idosos no NC e COS para células PV-IR. Estudo anterior em camundongos mostrou aumento de parvalbumina no NC em relação com a perda de células ciliadas internas e externas da cóclea e neurônios do gânglio espiral (IDRIZBEGOVIC et al., 2006). Em macaco Rhesus, o número e a densidade de células PV-IR também aumentaram com o envelhecimento, juntamente com aumento dos limiares na resposta do potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE). Isso poderia ocorrer para compensar a perda de eficácia auditiva no idoso, uma vez que a habilidade de localização sonora nessa população apresenta déficits marcantes (GRAY et al., 2013a).

A diminuição de células CB-IR no COS no presente estudo não corrobora com resultado de estudo anterior em primatas onde foi demonstrado aumento de células CB-IR na região OSM (GRAY et al., 2014). A diminuição de CB e de outras CaBPs ao longo da via auditiva de roedores e o aumento dessas proteínas na via de primatas não humanos pode indicar diferenças no processamento auditivo, e na distribuição de neurônios inibitórios entre espécies, indicando que comparações entre roedores e primatas no caso da via auditiva devem ser feitas com ressalvas (MOORE 1991; POLLACK et al., 2002; GROTHE e KOCH, 2011; GRAY et al., 2014).

No presente estudo observou-se diminuição da densidade de neurônios PV-IR no CI em roedores da linhagem Wistar relacionada ao envelhecimento, indicando que há uma alteração na concentração dessas células ao longo do núcleo. Em pesquisa realizada em ratos Fischer 344 também houve diminuição do total de neurônios PV-IR, enquanto que para a espécie Long-Evans foi notado aumento do número de neurônios PV-IR no CI, essa variação pode ser explicada pela diferença que há entre espécies. Além disso, sabe-se que a espécie Fischer 344 e a espécie Wistar, estudada no momento, são modelos ideais para o estudo de modificações auditivas decorrentes ao envelhecimento (ALVARADO et al., 2014; GROTHE e KOCH, 2011; FETONI et al., 2011; OUDA et al., 2008). Apesar dos ratos Fischer 344 terem apresentado diminuição do total de neurônios PV-IR, estes, assim como ratos Long-Evans não apresentaram variação de densidade de células no CI (OUDA et al., 2008). Outros estudos demonstraram que a densidade de neurônios que expressam PV e outras CaBPs alteram com o envelhecimento em roedores e em primatas não humanos (OUDA et al., 2003, 2008, 2012; SANCHEZ- ZURIAGA et al., 2007; HUH et al., 2008; GRAY et al., 2013^a).

A análise estereológica por meio da ferramenta nucleador capaz de medir o volume celular mostrou o aumento do volume neuronal de neurônios PV-IR no CI. A literatura não aponta estudos nessa mesma região que tenha apresentado aumento do volume neuronal, porém cita a sua diminuição para neurônios imunorreativos a PV no CI em roedores da espécie Fischer 344 e Long-Evans (OUDA et al., 2008).

Uma possível justificativa para o aumento do volume neuronal no CI seria decorrente ao aumento de atividade elétrica que a célula necessita produzir para processar a informação auditiva. Essa informação pode ser captada por medida eletrofisiológica por meio de potenciais evocados auditivos (PEA) em humanos, conforme mostra um estudo realizado em indivíduos idosos que mostrou haver aumento da amplitude Na-Pa de idosos sem perda

auditiva, sugerindo maior atividade celular para processamento do sinal acústico a níveis mesencefálicos e talâmicos ascendendo para o córtex auditivo (OLIVEIRA, 2017). Outros estudos confirmam o aumento da amplitude de Pa em função do avanço da idade (HALL, 2006; AMENEDO e DIAZ, 1998). A geração da onda Na das respostas auditivas cerebrais de média latência recebe contribuição das regiões subcorticais do SAC, especialmente do CGM e de porções do CI (HALL, 2006; HASHIMOTO, 1982; FISCHER et al., 1995). A perda de células nas estações sinápticas da via auditiva em indivíduos idosos seria compensada por células remanescentes, aumentando a atividade das mesmas (AMENEDO e DIAZ, 1998).

Em oposição aos achados do aumento do volume neuronal de células PV-IR no CI, no CGM neurônios CB-IR tiveram diminuição do volume no grupo idoso. Estes resultados do presente estudo corroboram com o estudo de Ouda e cols. (2012) que descreveram redução do volume neuronal médio de neurônios CB-IR no CGM. De acordo Andersent e cols. (2003), a redução do volume neuronal pode estar relacionada com a redução de sinapses.

Esse dado sugere que o volume neuronal está sujeito a variações não uniformes que ocorrem durante o processo de envelhecimento (ALHO et al., 2016). A variação do volume neuronal já foi demonstrada em estudo que investigou neurônios piramidais no giro temporal superior e que abrangeu uma população com idade que variou de 4 a 48 anos de idade com correlação negativa entre o volume somal e o aumento da idade (BARGER et al., 2015)

A ausência da CB no CI não corrobora com estudo anterior, que demonstrou diminuição tanto da expressão de neurônios CB-IR quanto do volume neuronal com o envelhecimento ao longo de todas as subdivisões do CI em ratos Fisher 344 e Long-Evans (OUDA et al., 2012b). Isso confirma a variação no padrão de expressão neuroquímico que poder ser explicada pelo fato de que a co-localização mútua de CB, PV e CR em um neurônio GABAérgico é rara, e que essas populações neuronais diferem entre regiões e também ao longo de toda vida (OUDA, et al., 2012b; GONCHAR et al., 2007; JINNO e KOSAKA , 2006; MARKRAM et al., 2004; KUBOTA et al., 1994).

Ainda a respeito da imunorreatividade das CaBPs no CGM, no presente estudo não foram observadas diferenças no número total de células e na densidade de células CB-IR. Estudos anteriores descreveram redução no número de células CB-IR no CGM de ratos Fischer 344 e Long-Evans envelhecidos (OUDA et al., 2012). Além disso, no presente estudo não foi encontrada expressão de células PV-IR e CR-IR no CGM em ambos os grupos

estudados. Estudo anterior também não encontrou expressão de CR no CGM (OUDA et al., 2012a). A ausência de uma das CaBPs em núcleos da via não compromete as funções dependentes do cálcio (GRAY et al., 2014) pois essas mesmas funções podem ser desempenhadas por outras ligantes de Cálcio, como a CB cuja presença foi demonstrada neste núcleo no presente estudo.

Em macacos Rhesus houve aumento da expressão de PV em toda a porção do CGM com a idade, o mesmo aumento pode ser observado em toda a via ascendente de primatas (GRAY et al., 2013b, 2014; ENGLE et al., 2014), na região mesencefálica, essa característica pode estar relacionada a mudanças no processamento relativas à organização tonotópica (ENGLE et al., 2014).

A expressão de CR com alterações relacionadas à idade são mais complexas em comparação com as alterações relacionadas à idade de outras CaBPs, nosso resultado poder ser reflexo da diferença de espécies (OUDA et al., 2012; IDRIZBEGOVIC et al., 2006). A expressão de CR já foi verificada em cérebros de hamsters e se mostrou inalterada com a idade (KISHIMOTO et al., 1998).

Nossos dados a respeito da variação do padrão de expressão de neurônios que expressam CaBPs corroboram com estudo anterior (IDRIZBEGOVIC et al., 2004), que descreve que a expressão das CaBPs pode variar de acordo com a região do núcleo analisada. Estudos anteriores já analisaram a expressão das CaBPs na presbiacusia em outras espécies de roedores e primatas (MARTIN DEL CAMPO et al., 2012; OUDA et al., 2012; GRAY et al., 2014). No entanto, os resultados variaram de acordo com a espécie, essa variação acontece devido diferenças morfológicas, neuroquímicas e hodológicas existente entre espécies (BELEKHOVA et al., 2002; OUDA et al., 2008).

A literatura descreve que as densidades relativas de neurônios que expressam essas proteínas alteram com o envelhecimento fisiológico nas estruturas auditivas de roedores, carnívoros e primatas não humanos e humanos, acredita-se que essa resposta ocorre devido à plasticidade neuronal relacionada à idade do sistema auditivo (ZETTEL et al., 1997; REUSS et al., 2000; IDRIZBEGOVIC et al., 2004; SANCHEZ-ZURIAGA et al., 2007; STARK, et al., 2007; HUH et al., 2008; GRAY et al., 2013, 2014a,b; ENGLE et al., 2014) e a variação no padrão de expressão dessas proteínas específica a cada espécie pode estar relacionada a diferenças adaptativas das funções auditivas (BAZWINSKY et al., 2008).

A redução do neurotransmissor inibitório decorrente da idade pode ser consequência da queda de codificação de GAD envolvida na síntese do GABA e do efeito compensatório causado pelas mudanças fisiológicas causadas pelo envelhecimento (BURIANOVA et al., 2009; CASPARY et al., 2013; GAO et al., 2015). As CaBPs estão ligadas à atividade e plasticidade neuronal, e processamento sensorial (BAIMBRIDGE et al., 1992; SILVA, 2011; CHRISTEL et al., 2012). Assim, o declínio dessas proteínas no SAC pode trazer consequências funcionais, como mudanças no processamento auditivo central, especialmente na via auditiva ascendente (CASPARY et al., 2008; YU et al., 2009; GLEICH e STRUTZ, 2011; LEONG et al., 2011; ENGLE e RECANZONE, 2013; RICHARDSON et al., 2013; TURNER et al., 2013; BRECHT et al., 2017).

Além disso, a diminuição das CaBPs pode restringir a homeostase do cálcio intracelular, e assim essas células se tornam vulneráveis a processos patológicos que podem levar à degeneração neuronal (BU et al., 2003).

As alterações químicas medidas em ratos idosos diferem das alterações após manipulações que danificam diretamente a cóclea, sugerindo que as mudanças químicas durante o envelhecimento não são necessariamente secundárias ao dano coclear (GODFREY et al., 2017), considera-se também que o sistema auditivo sofre os efeitos de agentes externos.

Tais informações sobre as alterações morfológicas e neuroquímicas têm sido confirmadas em estudos clínicos que empregam exames eletrofisiológicos do tipo potenciais evocados auditivos (PEA). A literatura aponta que as amplitudes apresentadas no PEATE para diferentes faixas etárias correlacionam-se significativamente com as densidades de células PV-IR do CI e COS, isso sugere o envolvimento desses tipos de células às mudanças ocasionadas em função da idade no processamento auditivo, e seus papéis compensatórios para participar de tarefas distintas. No entanto, no NC não houve correlação entre a densidade de células e a idade, mas sim com histopatologias cocleares (GRAY et al., 2013a; ENGLE et al., 2014).

Os dados do presente estudo mostraram pela primeira vez a presença do receptor de melatonina tipo 1 (MT₁) e do receptor de melatonina tipo 2 (MT₂) em todas as estações sinápticas que compõem a via auditiva central. Além disso, foi investigado se a expressão desses receptores poderiam apresentar variações ao longo do envelhecimento. Estudo

neuroanatômico anterior havia descrito a presença dos receptores MT₂ no CI (LACOSTE et al., 2015).

No presente estudo os receptores MT₁ e MT₂ apresentaram maior expressão nos núcleos da via auditiva central no rato idoso, sendo que tal aumento de expressão dos receptores na via auditiva central pode indicar um efeito neuroprotetor dos mesmos, pois se sabe que a ação neuroprotetora da melatonina é dependente de seus receptores (EKMEKCIOGLU, 2006).

Não há na literatura estudos que descrevem a imunorreatividade de MT₁ ou MT₂ no SAC ao longo do envelhecimento. Estudo realizado em roedores da espécie *gerbilo* investigou a imunorreatividade do receptor MT₂ no hipocampo durante o envelhecimento normal, e concluiu que a expressão do receptor citado mostrou-se mais baixa no estágio adulto jovem, e mais alta no estágio idoso (LEE et al., 2010).

A melatonina tem sido estudada para o controle de diversos processos onde age por ação direta em seus receptores cuja presença em diferentes regiões sugere especialização no controle de funções fisiológicas (REITER et al., 2007; LACOSTE et al., 2015).

Sabe-se que a produção de melatonina é alterada durante o envelhecimento, porém autores descrevem a possibilidade de haver aumento do número de receptores de melatonina como forma compensatória da queda de produção de melatonina na senescência (MAGRI et al., 1997; JUNG-HYNES et al., 2010; LEE et al., 2010). Portanto, o aumento da imunorreatividade de MT₁ e MT₂ ao longo do SAC demonstrado nesse estudo e também no SNC indica efeito compensatório já que com o envelhecimento a síntese da melatonina produzida pela glândula pineal e liberada na corrente sanguínea tende a diminuir.

O aumento de neurônios imunorreativos a ambos receptores com a idade, demonstrado no presente estudo sugere que em casos de neuropatologias onde há queda da concentração de melatonina ocorra o aumento desses receptores, conforme mostrou um grupo de autores que estudou a imunorreatividade dos receptores MT₁ e MT₂ em pacientes com depressão, onde afirmaram haver um aumento de receptores MT₁ no núcleo supraquiasmático desses pacientes, já a respeito de MT₂ não houve alterações (WU et al., 2013). Por outro lado, em pacientes com Alzheimer foi notado queda na expressão do receptor MT₂ no hipocampo (BAHNA et al., 2014).

Um estudo mostrou que após administração da melatonina em ratos com privação de sono houve redução do estresse oxidativo e regulação do equilíbrio entre a transmissão GABAérgica e glutamatérgica que encontrava-se alterada devido a privação de sono e consequentemente da alteração de melatonina no organismo (ZHANG et al. 2019). Além disso, já foi descrito na região do hipocampo que a melatonina intensifica o sistema GABAérgico tornando uma via potencial para os efeitos neuroprotetores da melatonina (CHENG et al., 2012).

Essa informação pode indicar que o aumento dos receptores de melatonina na via auditiva central pode agir como reguladora da transmissão GABAérgica, que pode estar alterada conforme mostramos a partir da análise das CaBPs, co-localizadas com o neurotransmissor GABA.

Os receptores de melatonina são abundantes no SNC e também no SNP, porém suas funções e vias subjacentes permanecem desconhecidas para algumas estruturas específicas como no caso da via auditiva central e periférica responsáveis pela transmissão do sinal acústico até níveis corticais (NG et al., 2017).

Os resultados dessa pesquisa evidenciam as alterações neuroquímicas do SNC das áreas auditivas em ratos idosos, especificamente o declínio na expressão das CaBPs e o aumento do número de receptores de melatonina nos núcleos centrais da via auditiva e contribuem para a melhor compreensão das alterações do SAC com o envelhecimento. Torna-se importante ainda a realização de estudos futuros que ampliem e produzam outras evidências nesse âmbito a partir de medidas audiológicas funcionais para uma melhor compreensão das bases envolvidas na presbiacusia central. Ressalta-se também que futuras investigações a respeito das ações dos receptores de melatonina na via auditiva central e suas variações ao longo do envelhecimento podem contribuir para ampliar as formas de prevenção e tratamento de saúde auditiva na população idosa.

8. CONCLUSÃO

As CaBPs apresentaram menor expressão nos núcleos do SAC no grupo idoso. Os receptores de melatonina MT_1 e MT_2 apresentaram maior expressão nos núcleos do SAC no grupo idoso. O grupo idoso apresentou ainda maior volume dos neurônios PV-IR no colículo inferior e menor volume dos neurônios CB-IR no corpo geniculado medial.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHO, A.T.D.L., et al., 2016. Three-dimensional and stereological characterization of the human *Substantia Nigra* during aging. **Brain Struct Funct.**, v. 221, n. 7, p. 3393-403, 2016.

ALTMAN, Y.A. About functional evolution of peripheral part of the auditory system. 2012. **J Evol Biochem Physiol.**, v. 48, n.1, p. 117-125. 2012.

ALVARADO, J. C., et al. Wistar rats: a forgotten model of age-related hearing loss. **Frontiers in aging neuroscience.**, n. 6, p. 29, 2014

AMENEDO, E., DÍAZ, F. Effects of aging on middle-latency auditory evoked potentials: a cross-sectional study. **Biological psychiatry**, v. 43, n. 3, p. 210-219, 1998.

ANDERSEN, B.B., GUNDERSEN, H.J., PAKKENBERG, B. Aging of the human cerebellum: a stereological study. **J Comp Neurol.**, n. 466, v. 3, p. 356-65, 2003.

AQUINO, A.M.C.M. Processamento auditivo eletrofisiologia e psicoacustica. São Paulo: Lovise; 2002.

ARENDDT, J., SKENE, D.J. Melatonin as a chronobiotic. **Sleep Med. Rev.**, v. 9, p. 25–39, 2005.

BAHNA, S.G., et al. Regional upregulation of hippocampal melatonin MT2 receptors by valproic acid: therapeutic implications for Alzheimer's disease. **Neurosci Lett.**, n. 25., v. 576, p. 84-7, 2014.

BAIMBRIDGE, K.G., CELIO, M.R., ROGERS, J.H. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends Neurosci.**, v. 15, n. 8, p. :303-8, 1992.

BARGER, N., SHELEY, M.F., SCHUMANN, C.M. Stereological study of pyramidal neurons in the human superior temporal gyrus from childhood to adulthood. **J Comp Neurol.**, v. 523, n. 7, p. 1054-72, 2015.

BAS, E., et al. Efficacy of three drugs for protecting against gentamicin-induced hair cell and hearing losses. **Br J Pharmacol.**, v. 166, n. 6, p. 1888-904, 2012.

BAZWINSKY, L. HÄRTING, W., RÜBSAMEN, R. Characterization of cochlear nucleus principal cells of *Meriones unguiculatus* and *Monodelphis domestica* by use of calcium-binding protein immunolabeling. **J Chem Neuroanat.**, n. 1, v. 35, p. 158-74, 2008.

BENTLEY, A. L., RÉTY, S. EF-hand calcium-binding proteins. **Current Opinion in Structural Biology.**, v. 10, n. 6, p.637-43, 2000.

BEVILACQUA, Maria Cecília et al. **Tratado de Audiologia.** São Paulo: Santos, 2013.

BEZERRA, M.S. Análise Citoarquitetônica e Neuroquímica das proteínas ligantes de cálcio do Complexo Coclear do Morcego *Artibeus planirostris*. 2017. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)- Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2017.

BHATNAGAR, S.C. Sistema Auditivo. In: Neurociências para o estudo dos distúrbios da comunicação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 185-195.

BIESALSKI, H.K., et al. Melatonin and other serotonin derivatives in the guinea pig membranous cochlea. **Neuroscience Letters.**, v. 91, p. 41 – 6, 1988.

BLOOM, S., WILLIAMS, A., MACLEOD, K.M. Heterogeneous calretinin expression in the avian cochlear nucleus angularis. **J Assoc Res Otolaryngol.**, v. 15, n. 4, p. 603-20, 2014.

BRECHT, E.J., et al. Increasing GABA reverses age-related alterations in excitatory receptive fields and intensity coding of auditory midbrain neurons in aged mice. **Neurobiol Aging.**, v. 56, p. 87-99, 2017.

BU, J., SATHYENDRA, V., NAGYKERY, N., GEULA, C. Age-related changes in calbindin- D28k, calretinin, and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex. **Exp. Neurol.**, v. 182, n. 1, p. 220-31, 2003.

BUCKIOVA, D., POPELAR, J., SYKA, J. Aging cochleas in the F344 rat: morphological and functional changes. **Exp. Gerontol.**, n. 42, v. 7, p. 629-38, 2007.

BURIANOVÁ, J., et al. Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat. **Exp Gerontol.**, n. 44, v. 3, p.161-69, 2009.

BURIANOVÁ, J., OUDA, L., SYKA, J. The influence of aging on the number of neurons and levels of non-phosphorylated neurofilament proteins in the central auditory system of rats. **Frontiers in Aging Neuroscience.**, v. 11, n. 7, p. 27, 2015.

BURT, A.M. Transmissão química. In: Neuroanatomia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 86-87.

CAMPOS, L.M., et al. Temporal changes in calcium-binding proteins in the medial geniculate nucleus of the monkey *Sapajus apella*. **J. Chem Neuroanat.**, v. 68, p. 45-54, 2015

CANLON, B., ILLING, R., WALTON, J. 2010. "Cell Biology and physiology of the aging central auditory pathway". In: GORDON-SALANT, S., et al. **The Aging Auditory System**. New York: Springer, 2010. p. 39 – 74.

CASPARY, D.M., et al. Inhibitory Neurotransmission, Plasticity and Aging in the Mammalian Central Auditory System. **The Journal of experimental biology.**, v. 211, p. 1781-91, 2008.

CASPARY, D. M., HUGHES, L. F., LING, L. L. Age-related GABAA receptor changes in rat auditory cortex. **Neurobiology of aging.**, n. 34, v. 5, p. 1486–96, 2013.

CASPARY, D.M., PALOMBI, P.S., HUGHES, L.F. GABAergic inputs shape responses to amplitude modulated stimuli in the inferior colliculus. **Hear Res.**, n. 168, p. 163–73. 2002

CELIO, M.R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. **Neuroscience.**, v.35, n.2, p.375-475, 1990.

CHAMPOUX, F., et al. Auditory processing in a patient with a unilateral lesion of the inferior colliculus. **Eur J Neurosci.**, v. 25, p. 291-7, 2007.

CHENG, X.P., et al. Melatonin modulates the GABAergic response in cultured rat hippocampal neurons. **J Pharmacol Sci.**, n. 119, v. 2, p. 177-85

CHRISTEL, C.J., et al. 2012. Calretinin regulates Ca^{2+} -dependent inactivation and facilitation of $Ca(v)2.1$ Ca^{2+} channels through a direct interaction with the $\alpha 12.1$ subunit. **J Biol Chem.**, v. 287, n. 47, p. 39766-75, 2012.

CIORBA, A. et al. The impact of hearing loss on the quality of life of elderly adults. **Clinical interventions in aging**, v. 7, p. 159–63, 2012.

COSTANZO, L.S. Fisiologia. 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

DELACROIX, L., MALGRANGE, B. Cochlear afferent innervation development. **Hear. Res.**, v. 330(Pt B), 157-69, 2015.

DEMIR, M.G. et al. Effect of Transtympanic Injection of Melatonin on Cisplatin-Induced Ototoxicity. **J Int Adv Otol.**, v. 11, n. 3, p. 202-6, 2015.

DUBOCOVICH, M.L., MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. **Endocrine.**, v. 27, n. 2, p. 101–10, 2005.

EKMEKCIOGLU, C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. **Biomed Pharmacother.**, n. 60, v. 3, p. 97-108, 2006.

ENGLE, J.R., RECANZONE, G.H. Characterizing spatial tuning functions of neurons in the auditory cortex of young and aged monkeys: a new perspective on old data. **Front Aging Neurosci.**, n. 4, v.4, p.36, 2013.

ENGLE, J.R., et al. Age-related neurochemical changes in the Rhesus macaque inferior colliculus. **Front Aging Neurosci.**, v. 21, n. 6, p. 73, 2014.

ESPERANZA, B., et al. An experimental comparative study of dexamethasone, melatonin and tacrolimus in noise-induced hearing loss. **Acta Oto-Laryngologica.**, v. 129, n. 4, p. 385-89, 2009.

EYLER, L.T., et al. A review of functional brain imaging correlates of successful cognitive aging. **Biol Psychiatry.**, v. 70, n. 2, p. 115-22, 2011.

FECH, T., CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L., KULESZA, R.J. Jr. Characterization of the superior olivary complex of *Canis lupus domesticus*. **Hear Res.**, v. 294 n. 1-2, p. 31-9, 2012.

FETONI, A.R., et al. Pathogenesis of presbycusis in animal models: a review. **Exp Gerontol.**, n. 46, v.6, p. 413-25, 2011.

FORD, A.H., et al. Hearing loss and the risk of dementia in later life. **Maturitas**, v.112, p. 1-11, 2018.

FREDRICH, M., REISCH, A., BENJAMIN-ILLING, R. Neuronal subtype identity in the rat auditory brainstem as defined by molecular profile and axonal projection. **Exp Brain Res.**, v., 195, p. 241–260, 2009.

FRISINA, R.D., et al. Age-related hearing loss: prevention of threshold declines, cell loss and apoptosis in spiral ganglion neurons. **Aging (Albany NY).**, v. 8, n. 9, p. 2081-99, 2016.

FUCHS, P.A. The synaptic physiology of cochlear hair cells. **Audiol Neurootol.**, v. 7, n. 1, p. 40-4, 2002.

FUCHS, P.A., LAUER, A.M. Efferente inhibition of the cochlea. **Cold Spring Harb. Perspect Med.**, v. 6, 2018.

GAO, F., et al. Decreased auditory GABA⁺ concentrations in presbycusis demonstrated by edited magnetic resonance spectroscopy. **NeuroImage.**, n. 1, v. 106, p. 311–16, 2015.

GLENDENNING, K.K., BAKER, B.N. Neuronatomical distribution of receptors for three potent inhibitory neurotransmitters in the brainstem auditory nuclei of the cat. **J Comp Neurol.**, v. 275, n. 2, p. 288-308, 1988.

GODFREY, D.A., et al. Amino acid and acetylcholine chemistry in the central auditory system of young, middle-aged and old rats. **Hear Res.**, v. 350, p. 173-188, 2017.

GONCHAR, Y., WANG, Q., BURKHALTER, A. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. **Front. Neuroanat.**, v. 28, n. 1, p. 3, 2007.

GRAFTON S.T. et al. Comparison of postmortem magnetic resonance imaging and neuropathologic findings in the cerebral white matter. **Arch Neurol.**, v. 48, p. 293–98, 1991.

GRAY, D. T., ENGLE, J.R., RECANZONE, G. H. Age-related neurochemical changes in the Rhesus macaque superior olivary complex. **J Com Neurol.**, v. 522, n. 3, p. 573-91, 2014a.

GRAY, D.T., ENGLE, J.R., RECANZONE, G.H. Age-related neurochemical changes in the Rhesus Macaque cochlear nucleus. **J Comp Neurol.**, v. 522, n. 7, p. 1527-41, 2014b.

GRAY, D.T., et al. Parvalbumin increases in the medial and lateral geniculate nuclei of aged rhesus macaques. **Front Aging Neurosci.**, v. 8, n. 5, p. 69, 2013.

GRAY, D.T., et al. Regional and age-related differences in GAD67 expression of parvalbumin and calbindin expressing neurons in the rhesus macaque auditory midbrain and brainstem. **The Journal of comparative neurology.**, v. 522, n. 18, p. 4074-84, 2014.

GROTHER, B., KOCH, U. Dynamics of binaural processing in the mammalian sound localization pathway--the role of GABA(B) receptors. **Hear Res.**, n. 279, v. 1-2, p. 43-50, 2011.

GUIDA, H.L., GIACHETI, C.M, ZORZETTO, NL. Neuroanatomia do Processamento Auditivo. In: GIACHETI, C.M., PASCHOAL, S.R.G. (Org.). **Perspectivas multidisciplinares em Fonoaudiologia: da avaliação à intervenção**. 1. ed. Marília, SP. Cultura acadêmica. 2013. p. 57-72.

HACKETT, T.A., et al. Linking topography to tonotopy in the mouse auditory thalamocortical circuit. **J Neurosci.**, v.31, n. 8, p. 2983-95, 2011.

HALL, J.W. New Handbook of auditory evoked responses. Florida: Pearson education. 2006.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M., CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J Lab Clin Med.**, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HASHIMOTO, I. Auditory evoked potentials from the human midbrain: slow brain stem responses. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 53, n. 6, p. 652-657, 1982.

HOF, P.R. et al. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. **J.Chem. Neuroanat.**, v.16, p.77-116, 1999.

HUDSPETH, A.J. Sensory transduction in the ear. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, editors. Principles of neural science. New York: McGraw-Hill. 2000^b p. 614-624.

HUDSPETH, A.J., et al. Principles of neural science. New York: McGraw-Hill. 2000^a p. 590-612.

HUH, Y., et al. Evidence for increased NADPH-diaphorase-positive neurons in the central auditory system of the aged rat. **Acta Otolaryngol.**, v. 128, n. 6, p. 648-53.

HURLEY, L.M, HALL, I.C. Context-dependent modulation of auditory processing by serotonin. **Hear Res.**, n. 1-2, v. 279., p. 74-84, 2011.

IDRIZBEGOVIC, E., BOGDANOVIC, N., CANLON, B. Auditory peripheral influences on calcium binding protein in the cochlear nucleus during aging in the C57BL/6J mouse. **Hear Res.**, v. 179, p. 33-42, 1998.

IDRIZBEGOVIC, E., et al. Age-related increases in calcium-binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus of hearing impaired C57BL/6J mice. **Neurobiol Aging.**, v. 25, n. 8, p. 1085-93, 2004.

IDRIZBEGOVIC, E., et al. Presbycusis and calcium-binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus of BALB/c mice. **Hear. Res.**, v. 216–217, p. 198–206, 2006.

IM, G.J. Role of nicotinic acetylcholine receptor on efferent inhibition in cochlear hair cell. **Korean J. Audiol.**, v. 16, n. 3, p. 108-13, 2012.

IMAIZUMI, K., LEE, C.C. Frequency transformation in the auditory lemniscal thalamocortical system. **Front Neural Circuits.**, v. 8, n. 8, p. 75, 2014.

ITO, T., BISHOP, D.C., OLIVER, D.L. Functional organization of the local circuit in the inferior colliculus. **Anat Sci Int.**, v. 91, n. 1, p. 22-34, 2015.

JAMAL, L. et al. The level and distribution of the GABABR2 receptor subunit in the rat's central auditory system. **Neuroscience.**, n.5, v. 181, p.243-56, 2011.

JINNO, S., KOSAKA, T. Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. **Neurosci. Res.**, n. 56, p. 229–45, 2006.

JUNG-HYNES, B., REITER, R.J., AHMAD, N. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. **Journal of Pineal Research.**, v. 48, n. 1, p. 9–19, 2010.

KIDD III, A.R., BAO, J. Recent advances in the study of age-related hearing loss: a mini-review. **Gerontology.**, v. 58, n. 6, p. 490–96, 2012.

KISHIMOTO, J., et al. Age-related changes of calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin mRNAs in the hamster brain. **Neurobiol. Aging.**, n. 19, p. 77–82, 1998.

KUBOTA, Y., HATTORI, R., YUI, Y. Three distinct subpopulations of GABA-ergic neurons in rat frontal agranular cortex. **Brain Res.**, n. 649, p. 159–73, 1994.

KULESZA, R.J. Jr. Characterization of human auditory brainstem circuits by calcium-binding protein immunohistochemistry. **Neuroscience.**, n. 31, v. 258, p. 318-31, 2014.

LACOSTE, B., et al. Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. **J Pineal Res.**, v. 58, p. 397 – 417, 2015.

LEE, C.H., et al., MT2 melatonin receptor immunoreactivity in neurons is very high in the aged hippocampal formation in gerbils. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 30, n. 2, p. 255-63, 2010.

LENT, R. Cem Bilhões de Neurônios? São Paulo. Atheneu. 2010. p. 265-296.

LITOVSKY, R. Development of the auditory system. **Handb Clin Neurol.**, v. 129, p. 55-72, 2015.

LOHAMANN, C., FRIAUF, E. Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. **J Comp Neurol.**, v. 367, n.1, p. 90-109, 1996.

LOPEZ-GONZALES, M.A., SANTIAGO, A.M., ESTEBAN-ORTEGA, F. Sulpiride and melatonin decrease tinnitus perception modulating the audiolimbic dopaminergic pathway. **J Otolaryngol.**, v. 36 n. 4, p. 213-9, 2007

LUCHETTI, F., et al. Melatonin signaling and cell protection function. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 10, p. 3603–624, 2010.

MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia funcional. 2. Ed. Sao Paulo: Atheneu, 1993.

MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia Funcional. 3. Ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

MAGRI, F., et al. Changes in endocrine circadian rhythms as markers of physiological and pathological brain aging. **Chronobiol Int.**, v. 14, n. 4, p. 385–96, 1997.

MANGABEIRA ALBERNAZ, P.L. Vias auditivas centrais. In: CAMPOS, C.A., COSTA HOO, T. (Org.). **Tratado de otorrinolaringologia**. Sao Paulo: Roca; 2002. p. 401-405.

MARKRAM, H., et al. Interneurons of the neocortical inhibitory system. **Nat. Rev. Neurosci.**, n. 5, p. 793–807, 2004.

MARTIN DEL CAMPO, H.N., MEASOR, K. R., RAZAK, K.A. Parvalbumin immunoreactivity in the auditory cortex of a mouse model of presbycusis. **Hear Res.**, v. 294(1-2), p. 31-9, 2012.

MOEREL, M., et al. 2015. Processing of frequency and location in human subcortical auditory structures. **Sci Rep.**, v. 24, n. 5, p. 17048, 2015.

MOSSOP J.E., et al. Down-regulation of inhibition following unilateral deafening. **Hear Res.**, n. 147, p 183–87, 2000.

MUSIEK, F.E., CHERMAL, G.D. Handbook of central auditory processing disorder. 2.ed. San Diego. Plural Publishing. 2014.

NICOLA, A.C. Atuação das proteínas do relógio na senescência reprodutiva de ratas *Wistar*. 2017. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, 2017.

NORTHERN, J.L., DOWNS, M.P. The auditory system. In: **Hearing in children**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002. p 33-63.

OLIVEIRA, A.C.S. Potencial evocado auditivo de média latência (PEAML) monoaural e binaural em idosos). 2017. 70f. Dissertação (Mestrado em Fonoaudiologia) Universidade Estadual Paulista, Marília, SP, 2017.

OUDA, L., BURIANOVA, J., SYKA, J. Age-related changes in calbindin and calretinin immunoreactivity in the central auditory system of the rat. **Exp. Gerontol.**, v. 47, p. 497–506, 2012a.

OUDA, L., DRUGA, R., SYKA, J., 2008. Changes in parvalbumin immunoreactivity with aging in the central auditory system of the rat. **Exp. Gerontol.**, v. 43, n. 8, p. 782-9, 2008.

PAPESH, M.A., HURLEY, L.M. Modulation of auditory brainstem responses by serotonin and specific serotonin receptors. **Hear Res.**, n. 332, p.121-36. 2016

PAXINOS, G., WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam. Elsevier. 2004.

PINATO, L., et al. Day/night expression of MT₁ and MT₂ receptors in hypothalamic nuclei of the primate *Sapajus paella*. **J. of Chemical Neuroanatomy.**, v. 81, p. 10 – 7, 2017.

PINATO, L., et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. **Brain Struct Funct.**, v. 220, n. 2, p. 827-40, 2015.

POIRRIER, A.L. et al. Oxidative stress in the cochlea: an update. **Curr Med Chem.**, v. 17, n. 30, p. 3591–604, 2010.

PROFANT, O., et al. Metabolic changes in the auditory cortex in presbycusis demonstrated by MR spectroscopy. **Exp Gerontol.**, v. 48, n. 8, p. 795-800, 2013.

PRONK, M., et al. Decline in older persons ability to recognize speech in noise: the influence of demographic, health-related, environmental, and cognitive factors. **Ear Hear.**, v. 34, p. 722–732, 2013.

RAZA, A., et al. Age-related changes in brainstem auditory neurotransmitters: measures of GABA and acetylcholine function. **Hear Res.**, v. 15, n. 77(1-2), p. 221-30, 1994.

REITER, R.J., et al. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. **International Journal of Molecular Sciences.**, v. 14, n. 4, p. 7231–72, 2013.

RESS, D., CHANDRASEKARAN, B. Tonotopic organization in the depth of human inferior colliculus. **Front Hum Neurosci.**, v. 19, n. 7, p. 586, 2012.

REUSS, S., et al. Evidence for increased nitric oxide production in the auditory brain stem of the aged dwarf hamster (*Phodopus sungorus*): an NADPH-diaphorase histochemical study. **Mech Ageing Dev.**, v. 112, n. 2, p. 125-34, 2000.

RICHARDSON B.D., et al. Reduced GABA(A) receptor-mediated tonic inhibition in aged rat auditory thalamus. **J Neurosci.**, n. 33, v. 3, p. 1218–27a, 2013.

RIVKEES, S.A., et al. Melatonin receptors in chick brain: characterization and localization. **Endocrinology.**, v. 125, n. 1, p. 363-8, 1989.

SAMELLI, A.G., et al. Avaliação auditiva periférica e central em idosos. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 839-49, 2016.

SANCHES-ZURIAGA, et al. Age-related changes of NADPH-diaphorase-positive neurons in the rat inferior colliculus and auditory córtex. **Microsc Res Tech.**, v. 70, n. 12, p. 1051-59, 2007.

SCHMIDT, C., PEIGNEUX, P., CAJOCHEM, C. Age-related changes in sleep and circadian rhythms: impact on cognitive performance and underlying neuroanatomical networks. **Front Neurol.**, v. 3 p. 118, 2012.

SCHUKNECHT, F.C., GACEK, M.R. Cochlear pathology in presbycusis. **Ann Otol Rhinol Laryngol.**, n. 102, v. 1(2), p. 1-16, 1993.

SEIDMAN, M.D. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. **The Laryngoscope.**, v. 110, p. 727 – 38, 2000.

SHARMA, S., et al. The aging human cochlear nucleus: Changes in the glial fibrillary acidic protein, intracellular calcium regulatory proteins, GABA neurotransmitter and cholinergic receptor. **J Chem Neuroanat.**, v. 56, p. 1-12, 2014.

SILVA, J. G. Caracterização de subpopulações de interneuronios imunorreativos para proteínas ligante de cálcio no córtex pré-frontal do Saguí (*Callithrix jacchus*): distribuição e morfologia. 2011. 113f. Tese (Doutorado Psicobiologia) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2011.

SLOMINSKI, R.M. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology.**, v. 351 n. 2, p. 152–66, 2012.

SRINIVASAN, V., et al. Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. **International Journal of Alzheimer's Disease.**, v. 2011, n. 326320, 2011.

STARK, A.K., et al., The effect of age and gender on the volume and size distribution of neocortical neurons. **Neuroscience.**, v. 150, n. 1, p. 121-30, 2007.

TAKE, G, et al. Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 42 n. 7, p. 621–28, 2009.

TAVANAI, E., MOHAMMADKHANI, G. Role of antioxidants in prevention of age-related hearing loss: a review of literature. **Eur Arch Otorhinolaryngol.**, v. 274, n. 4, p. 1821-34, 2017.

TEIXEIRA, C., et al. Sistema auditivo central. In: BOECHAT, E.M., et al., (Org.). **Tratado de Audiologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015. p. 9-14.

THOMPSON, G.C., et al. Serotonin and serotonin receptors in the central auditory system. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, n. 1, v. 110, p. 93-102, 1994.

TOKORO, K., et al. Thalamus and attention. **Brain Nerve.**, v. 67, n. 12, p.1471-80, 2015.

TONELOTTI, F.T.F. Potenciais evocados auditivos de tronco encefálico em idosos. 2017. 60f. Dissertação (Mestrado em Fonoaudiologia) Universidade Estadual Paulista, Marília, SP, 2017.

VETTER, D.E. The mammalian olivocochlear system – A legacy of non-cerebellar research in the mugnaini lab. **The Cerebellum.**, v. 14, n. 5, p. 557-69, 2015.

VIELMA, J.R., et al. Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: a review. **Acta Tropica.**, v. 137, p. 31–8, 2014.

VON BOHLEN UND HALBACH, O., DERMIETZEL, R. Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of receptors and biological effects. 2. Ed. Weinheim: Wiley – VCH. 403, 2006.

WEST, M.J., SLOMIANKA, L., GOUNDERSEN, H.J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anat Rec.**, v. 231, p. 482-97, 1991.

WU, Y.H., et al. Alterations of melatonin receptors MT1 and MT2 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus during depression. **J Affect Disord.**, n. 148, v. 2-3, p. 357-67, 2013.

WU, Y.H., et al. Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging.**, v. 28, n. 8, p. 1239-47, 2007.

ZETTEL, M.L., et al. Age-related changes in calbindin D-28k and calretinin immunoreactivity in the inferior colliculus of CBA/CaJ and C57Bl/6 mice. **J Comp Neurol.**, v. 386, n. 1, p. 92-110, 1997.

ZHANG, H.-M., ZHANG, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 2, p. 131–46, 2014.

ZHANG, L., et al. Melatonin prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: role of oxidative stress and balance between GABAergic and glutamatergic transmission. **American journal of translational research.**, n. 9, v. 5, p. 2231–242, 2017.

ZIMMERMANN, B. et al. Expression of the calcium binding proteins Necab-1,-2 and -3 in the adult mouse hippocampus and dentate gyrus. **Brain Res.**, v.1528, p.1-7, 2013.

ZORZETTO, NL. A Morfologia e a Fonoaudiologia. In: GIACHETI, C.M., PASCHOAL, S.R.G. (Org.). **Perspectivas multidisciplinares em Fonoaudiologia: da avaliação à intervenção.** 1. ed. Marília, SP. Cultura acadêmica. 2013 p. 15-56

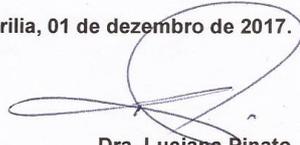
10. ANEXO

CERTIFICADO 002/2017

Certificamos que a proposta intitulada "EXPRESSÃO DE SUBSTÂNCIAS NEUROATIVAS NOS CENTROS ENCEFÁLICOS DA VIA AUDITIVA NO ENVELHECIMENTO", registrada sob o protocolo nº 891/2017, sob a responsabilidade de Ana Cláudia Figueiredo Frizzo, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da FFC – UNESP do Campus de Marília, em reunião de 30/11/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De 12/2017 a 04/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato/ Wistar
Nº de animais	12
Peso/Idade	60 dias (6 animais) e 24 meses (6 animais)
Sexo	M
Origem	Biotério da UNESP de Botucatu

Marília, 01 de dezembro de 2017.


Dra. Luciana Pinato
 Presidente da CEUA-FFC da UNESP-
 Câmpus de Marília