

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

EFEITOS AUDITIVOS DA TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS BALB/c

BIANCA CRISTINA EUGÊNIO

Belo Horizonte
2016

BIANCA CRISTINA EUGÊNIO

**EFEITOS AUDITIVOS DA TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS BALB/c**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fonoaudiológicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Luciana Macedo de Resende

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Sirley Alves da Silva
Carvalho

Belo Horizonte

2016

E87e Eugênio, Bianca Cristina.
Efeitos auditivos da Toxoplasmose adquirida experimental em camundongos BALB/c [manuscrito]. / Bianca Cristina Eugênio. - - Belo Horizonte: 2016.
85f.: il.
Orientador (a): Luciana Macedo de Resende.
Coorientador (a): Sirley Alves da Silva Carvalho.
Área de concentração: Ciências Fonoaudiológicas.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Toxoplasmose. 2. Camundongos Endogâmicos BALB C. 3. Audição. 4. Emissões Otoacústicas Espontâneas. 5. Potenciais Evocados Auditivos. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Resende, Luciana Macedo de. II. Carvalho, Sirley Alves da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NI M · WC: 725

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró- Reitor de Pós-Graduação: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró- Reitora de Pesquisa: Profa. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Humberto José Alves

Coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Profa. Sandhi Maria Barreto

Subcoordenadora: Profa. Ana Cristina Côrtes Gama

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FONOAUDIOLÓGICAS

Coordenadora: Stela Maris Aguiar Lemos

Subcoordenadora: Maria Augusta de Lima Friche

COLEGIADO

Profa. Andréa Rodrigues Motta - Titular

Profa. Helena Maria Gonçalves Becker - Suplente

Profa. Adriane Mesquita de Medeiros - Titular

Profa. Vanessa de Oliveira Martins-Reis - Suplente

Profa. Amélia Augusta de Lima Friche - Titular

Profa. Patrícia Cotta Mancini - Suplente

Profa. Ana Cristina Côrtes Gama - Titular

Prof. Marco Aurélio Rocha Santos - Suplente

Profa. Luciana Macedo de Resende - Titular

Prof. Juliana Nunes Santos - Suplente

Nayara Caroline Barbosa da Silva - Disc. titular

Renata Cristina Cordeiro D. Oliveira - Disc. suplente

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que sou e por tudo que tenho. E por sempre guiar e iluminar o meu caminho.

À Luciana Macedo de Resende por ter me recebido com muito carinho. Pela oportunidade de fazer parte desta pesquisa, pelo incentivo, paciência e atenção na orientação.

À Sirley Alves da Silva Carvalho pela co-orientação, carinho, atenção e ensinamentos.

Aos meus pais e irmã pelo amor, carinho, apoio e alicerce em todos os momentos de minha vida.

Ao Ivan, pela compreensão nos momentos difíceis, incentivo, amor e motivação.

Aos meus queridos amigos, por me ouvirem e apoiarem sempre, tornando esta caminhada mais leve.

À Equipe do Laboratório de Biofísica Neurosensorial da Université d' Auvergne pelo empréstimo do equipamento para registro dos exames audiológicos, principalmente o coordenador Professor Dr. Paul Avan e Professor Fabrice Giraudet, cujas valiosas observações e sugestões enriqueceram o desenvolvimento deste estudo.

À equipe de engenharia da empresa Echodia pelo apoio técnico prestado sempre que necessário.

À Marion Souchal que muito contribuiu no apoio técnico, na coleta e análise de dados, na discussão dos resultados, estando sempre apta a ajudar e compartilhar todos os seus conhecimentos, que foram de inestimável valor para este trabalho, além da sua constante paciência em tirar as minhas dúvidas quantas vezes fossem necessárias.

Ao professor Ricardo, que cedeu o espaço de seu laboratório para a realização da coleta de dados deste trabalho, e também por sempre compartilhar seus conhecimentos e dar sugestões válidas que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

À Rosa, por todo apoio técnico ofertado inteiramente em cada etapa deste trabalho, além de sua amizade, generosidade e conselhos.

À Jacqueline pelas orientações e conselhos no trabalho estatístico.

À querida Ludimila Labanca pela gentileza, apoio na coleta de dados e troca de conhecimentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro ao meu desenvolvimento no curso.

Ao CNPq pelo financiamento deste projeto.

Ao NUPAD/UFMG e PRPq/UFMG pelo apoio institucional à pesquisa.

RESUMO

Introdução: A toxoplasmose adquirida é uma infecção parasitária transmitida pelo *Toxoplasma gondii*. Embora essa infecção seja um possível fator de risco para perda auditiva, há poucos relatos na literatura sobre a patogenia da toxoplasmose adquirida no sistema auditivo. **Objetivo:** verificar e caracterizar os efeitos auditivos causados pela toxoplasmose adquirida em camundongos BALB/c. **Material e Métodos:** estudo experimental, realizado em camundongos fêmeas BALB/c, entre 4 e 12 semanas de idade. Em um primeiro momento, foram pesquisados os efeitos auditivos cocleares causados pela cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*. Foi realizado o exame de Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção, nas frequências de 08 e 10 kHz, com o equipamento Audx Plus (Biologic ©). Posteriormente, pesquisou-se os efeitos auditivos periféricos e centrais causados pela cepa brasileira TgCTBr5. Nessa etapa foi utilizado o equipamento OtoPhyLab[®] (RT Conception), específico para o registro de respostas auditivas em experimentação animal. As Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção foram pesquisadas nas frequências de 08, 12, 16, 24 e 32 kHz. Além das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção, foi feito também o Potencial Evocado Auditivo de Tronco-Encefálico, nas frequências de 10, 16, 24 e 32 kHz. Em ambas as etapas, após o término do experimento, todos os camundongos foram eutanasiados e anticorpos IgG anti *T. gondii* foram pesquisados por Elisa. Na segunda etapa as cócleas foram removidas para análise óptica e microscópica. Cérebro e tronco-encefálico foram retirados para estudo histopatológico. A análise estatística foi realizada no *software* SPSS, versão 19, e o nível de significância adotado foi 5% ($p \leq 0,05$). Foi feita comparação das respostas intrasujeitos em relação à etapa de infecção e comparação intersujeito com os grupos experimentais e os grupos controles correspondentes. **Resultados:** A cepa ME-49 não causou alterações cocleares significativas nas frequências de 08 e 10 kHz. A cepa TgCTBr5 não prejudicou o sistema auditivo periférico e central. O Elisa confirmou o sucesso da infecção tanto pela cepa ME-49, quanto pela cepa TgCTBr5. A microscopia eletrônica da cóclea não evidenciou alterações nas células ciliadas externas tanto para os grupos controles como para os grupos experimentais infectados pela cepa TgCTBr5. O *Toxoplasma gondii* não foi observado na cóclea, cérebro e tronco-encefálico por meio da análise histopatológica. Camundongos infectados na fase aguda apresentaram discreto espessamento de meninge, e os infectados na fase crônica apresentaram linfócitos no sistema nervoso central. **Conclusão:** A região coclear correspondente às frequências de 08 e 10 kHz não

foi prejudicada pela infecção com a cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*. A cepa brasileira TgCTBr5 não afetou o sistema auditivo periférico e central dos camundongos BALB/c.

Descritores: Toxoplasmose, Camundongos endogâmicos BALB C, Audição, Emissões Otoacústicas Espontâneas, Potenciais Evocados Auditivos , Cóclea

ABSTRACT

Introduction: acquired toxoplasmosis is a parasitic infection transmitted by *Toxoplasma gondii*. Although this infection is a possible risk factor for hypoacusis, there are few reports in the literature on the pathogeny of acquired toxoplasmosis in the auditory system. **Objective:** to verify and characterize hearing effects caused by acquired toxoplasmosis in BALB/c mice. **Material and methods:** experimental study in female BALB/c mice. In a first moment, we researched the cochlear auditory effects caused by ME-49 strain of *T. gondii*. Distortion Product Otoacoustic Emissions examination was recorded, in the frequencies of 08 and 10 kHz, with Audx Plus (Biologic©) equipment. Later, the effects on peripheral and central hearing caused by brazilian strain TgCTBr5 were investigated. At this stage, it was used the OtoPhyLab® (RT Conception), the specific equipment for recording auditory responses in animal experimentation. Distortion Product Otoacoustic Emissions were surveyed in the frequencies of 08, 12, 16, 24 and 32 kHz. Auditory Brainstem Responses in the frequencies of 10, 16, 24 e 32 kHz were also performed. In both steps, after the end of the experiment, all mice were euthanized and *Toxoplasma gondii* IgG antibodies were researched by Elisa. Cochleas were removed for optical and microscopic analyses. Brain and brainstem were taken out for histopathological study. The statistical analysis was carried out in SPSS software, version 19, and the significance level adopted was 5% ($p \leq 0.05$). It was made a comparison by intra subject responses and the stage of infection and also an inter subject comparison by the experimental groups and the corresponding control groups. Microscopic and histopathological analyses were descriptive. **Results:** the ME-49 strain did not cause significant cochlear changes in the frequencies of 08 and 10 kHz. The TgCTBr5 strain did not damage the peripheral and central auditory systems. The Elisa confirmed the success of infection, both for ME-49 strain and TgCTBr5 strain. Electron microscopy of the cochlea did not show changes in external ciliated cells for both control groups as to the experimental groups infected by TgCTBr5 strain. *Toxoplasma gondii* was not observed in the cochlea, brain and brainstem by histopathological analysis. Mice infected in the acute phase disclosed subtle increasing of meninges, and the ones infected in the chronic phase presented lymphocytes in the central nervous system. **Conclusion:** the cochlear region corresponding to 08 and 10 kHz frequencies was not impaired by infection with the ME-49 strain of *Toxoplasma gondii*. The brazilian strain TgCTBr5 did not affect the peripheral and central auditory systems of BALB/c mice.

Keywords: Toxoplasmosis; Mice, Inbred BALB C; Hearing; Otoacoustic Emissions, Spontaneous; Evoked Potentials, Auditory; Cochlea

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma do estudo

Distribuição dos grupos para o artigo 1	22
Distribuição dos grupos para o artigo 2	22

Artigo 1

Figura 1: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção em 8 kHz.....	35
Figura 2: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção em 10 kHz.....	36
Figura 3: Análise do limiar das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção intragrupo	38
Figura 4: Análise do limiar das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção entregupos	39

Artigo 2

Figura 1: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção apresentadas pelos grupos controle 1 e experimental 1.....	55
Figura 2: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção apresentadas pelos grupos controle 2 e experimental 2.....	56
Figura 3: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção apresentadas intragrupos controle 1 e experimental 1.....	59
Figura 4: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção apresentadas intragrupos controle 2 e experimental 2.....	60
Figura 5: Traçado do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico para a frequência de 10 kHz.....	63
Figura 6: Traçado do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico para a frequência de 32 kHz.....	63
Figura 7: Limiar eletrofisiológico da onda II apresentados pelos grupos controles e experimentais, para as fases aguda e crônica recente de toxoplasmose adquirida.....	70
Figura 8: Limiar eletrofisiológico da onda II na comparação intragrupos	71
Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura das cócleas de camundongos dos grupos controles e experimentais	72

Figura 10: Análise histopatológica das cócleas de camundongos dos grupos controles e experimentais.....	73
Figura 11: Análise histopatológica dos cérebros e tronco-encefálicos de camundongos dos grupos controles e experimentais.....	74

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Artigo 1

Tabela 1: peso corporal dos camundongos BALB/c após inoculação com <i>Toxoplasma gondii</i>	34
Quadro 1: distribuição dos camundongos BALB/c em grupos.....	31

Artigo 2

Tabela 1: peso corporal dos camundongos BALB/c após inoculação com <i>Toxoplasma gondii</i>	54
Tabela 2: Média, desvio padrão e p valor para a relação sinal/ruído apresentada pelos grupos controles e experimentais nas Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção	58
Tabela 3: Amplitudes médias das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção, apresentadas por frequência testada intragrupos.....	61
Tabela 4: Médias da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção, apresentadas por frequência testada intragrupos.....	62
Tabela 5: Médias das latências absolutas, desvio padrão e p valor das ondas I, II, III, IV e V a 80 dB no Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico intragrupos	65
Tabela 6: Médias dos intervalos-interpicos em milissegundos, desvio padrão e p valor na intensidade de 80 dB no Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico intragrupos.....	66
Tabela 7: Médias das latências absolutas, desvio padrão e p valor das ondas I, II, III, IV e V a 80 dB no Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico apresentadas pelos grupos controles e experimentais	68
Tabela 8: Médias dos intervalos-interpicos em milissegundos, desvio padrão e p valor a 80 dB no Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico apresentadas pelos grupos controles e experimentais	69
Quadro 1: distribuição dos camundongos BALB/c em grupos	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CEBIO	Centro de Bioterismo
Cepa ME-49	Cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> ME-49
Cepa RH	Cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> RH
Cepa TgCTBr5	Cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> TgCTBr5
CETEA-UFMG	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais
CEUA-UFMG	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTBG-UFMG	Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita da Universidade Federal de Minas Gerais
dB	Decibel
dBNA	Decibel nível de audição
dBNPS	Decibel nível de pressão sonora
DP	Desvio Padrão
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
EOAPD	Emissões Otoacústicas Evocadas por Produto de Distorção
F1	Frequência 1 do tom puro para desencadear EOAPD
F2	Frequência 2 do tom puro para desencadear EOAPD
g	Gramas
H&E	Hematoxilina-eosina
Hz	Hertz (ciclos por segundo)
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ICB-UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
IgG	Imunoglobulina G
Kg	Quilograma
kHz	Quilohertz

L1	Intensidade 1 do tom puro para desencadear EOAPD
L2	Intensidade 2 do tom puro para desencadear EOAPD
mg	Miligrama
mm	Milímetros
mL	Mililitros
Nm	Nanômetro
p	Nível de significância estatística
PBS	Tampão fosfato
PBS-T	Tampão fosfato <i>tween</i>
PEATE	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
pH	Potencial de hidrogênio
STAg	Antígeno solúvel de taquizoíta (<i>Soluble Tachyzoite Antigen</i>)
S/R	Relação sinal ruído
TgCTBr	<i>Toxoplasma gondii</i> Congenital Toxoplasmosis from Brazil
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
°C	Graus Celsius
%	Porcento
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
=	Igual
>	Maior
≤	Menor ou igual

SUMÁRIO

1. Considerações iniciais	16
2. Objetivo	20
3. Métodos	21
3.1 Estudo da função coclear na infecção adquirida por <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos BALB/c	22
3.2 Estudo da função auditiva periférica e central na infecção adquirida por <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos BALB/c.....	23
3.3 Referências	24
4. Resultados	27
4.1 Artigo 1: Estudo da função coclear na infecção adquirida por <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos BALB/c	27
4.1.1 Resumo/Descritores.....	28
4.1.2 Introdução.....	28
4.1.3 Materiais e Métodos	31
4.1.4 Resultados.....	34
4.1.5 Discussão	40
4.1.6 Conclusão	41
4.1.7 Referências Bibliográficas.....	41
4.2 Artigo 2: Estudo da função auditiva periférica e central na infecção adquirida por <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos BALB/c	45
4.2.1 Resumo/Descritores.....	46
4.2.2 Introdução.....	46
4.2.3 Materiais e Métodos	48
4.2.4 Resultados.....	54
4.2.5 Discussão	74
4.2.6 Conclusão	78
4.2.7 Referências Bibliográficas.....	78
5. Considerações Finais	83
6. Anexos	84
6.1- Termo de aprovação do projeto de pesquisa no CEUA	84
6.2- Folha de aprovação.....	85

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A toxoplasmose adquirida é uma infecção que atinge aproximadamente um terço da população mundial ⁽¹⁾, e sua prevalência varia de acordo com a localização geográfica, fatores sócio-econômicos, culturais e ambientais ^(2,3). Na América Latina, em especial no Brasil, a soroprevalência da toxoplasmose adquirida é elevada, afetando cerca de 70 a 95% da população brasileira ⁽⁴⁾.

O agente etiológico dessa afecção é o protozoário parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Há apenas uma espécie desse protozoário, havendo, entretanto diversas cepas (genótipos) que se diferenciam em relação à virulência e formação de cistos ⁽⁵⁾.

Na Europa e na América do Norte os genótipos são basicamente divididos em tipo I, II e III ⁽⁶⁾. As cepas pertencentes às linhagens tipo I e II estão relacionadas à toxoplasmose congênita, sendo a tipo II associada à toxoplasmose congênita na Europa e América do Norte ^(7,8). As linhagens tipos I e III são encontradas no Brasil, entretanto a linhagem tipo II não é observada de modo isolado ⁽⁹⁾. Em relação à virulência destas cepas clonais de *T. gondii* para os camundongos, considera-se a do tipo I muito virulenta, e as do tipo II e III avirulentas ⁽⁶⁾.

Na América do Sul, as cepas apresentam uma ampla diversidade genética em relação às que são encontradas no hemisfério norte ⁽¹⁰⁻¹²⁾. No Brasil há outros quatro tipos de linhagens: BrI, BrII, BrIII e BrIV, sendo todos estes genótipos atípicos ⁽⁹⁾. Acredita-se que neste país a toxoplasmose seja mais grave do que nos países do hemisfério norte, uma vez que as cepas brasileiras são consideradas mais patogênicas ⁽¹³⁾. Ao comparar crianças com toxoplasmose congênita nascidas no Brasil com aquelas com toxoplasmose congênita nascidas no hemisfério norte, a doença ocular (retinocoroidite) é mais grave no primeiro grupo ⁽¹⁴⁾. Além disso, 30 a 50% de todos os casos de uveíte da região sul do Brasil estão relacionados à toxoplasmose ⁽¹⁵⁾. Conhecimentos sobre a patogenia destes genótipos em diferentes hospedeiros ainda hoje não estão muito elucidados ⁽¹⁶⁾, entretanto sabe-se que para os camundongos a cepa do tipo BrI isolada é virulenta, a tipo BrIII isolada é avirulenta, e as tipos BrII e BrIV isoladas apresentam virulência intermediária para camundongos ⁽⁹⁾.

Os sinais e sintomas da toxoplasmose adquirida são diversos e variam de acordo com a imunidade dos indivíduos. Geralmente em pessoas com a imunidade comprometida, as manifestações clínicas desta doença são mais graves, comprometendo órgãos vitais como cérebro, pulmão e coração ⁽⁵⁾. Em indivíduos imunocompetentes a

toxoplasmose adquirida é na maioria das vezes assintomática, ou podem ser observados sintomas de gripe comum, linfadenopatia ocular ou cervical ⁽¹⁷⁾, ficando sua identificação condicionada ao exame sorológico ^(5,18). Outra possível consequência da toxoplasmose adquirida é a perda auditiva ⁽¹⁹⁾.

A relação entre toxoplasmose adquirida e sistema auditivo tem sido pouco estudada, tanto em humanos, quanto em modelo animal, sendo escassas as pesquisas sobre o tema. A possibilidade de comprometimento auditivo como consequência da toxoplasmose adquirida é um evento extremamente raro, tendo sido descrita apenas em alguns relatos de casos, e, portanto a relação de causa e efeito entre audição e toxoplasmose adquirida ainda não está estabelecida.

Segundo um relato de caso apresentado em 1991, uma mulher jovem apresentou problemas auditivos e vestibulares bilateralmente. A única doença identificada foi a toxoplasmose adquirida. O tratamento com sulfadiazina e pirimetamina proporcionou completa recuperação da função vestibular, e discreta melhora nos limiares de audibilidade das frequências baixas, entretanto o grau da perda auditiva permaneceu profundo bilateralmente ⁽¹⁹⁾.

Cinco anos depois foi publicado outro relato de caso no qual uma criança de nove anos de idade, imunocompetente apresentou perda auditiva súbita unilateral e zumbido. Todos os exames realizados para investigar a causa desta perda auditiva estavam normais, exceto o exame sorológico para toxoplasmose, uma vez que o título de anticorpos para o *T. gondii* estava muito elevado. O paciente foi tratado com pirimetamina e sulfadiazina, além do tratamento padrão para perda auditiva súbita. Houve desaparecimento do zumbido, entretanto a perda auditiva súbita se manteve ⁽²⁰⁾.

Em 1998 foi publicado um relato de caso de toxoplasmose adquirida neurológica em indivíduo imunocompetente. Esse indivíduo apresentou dor de cabeça, febre, encefalite e surdez unilateral. Também neste caso o tratamento foi realizado com pirimetamina e sulfadiazina. Ocorreu melhora de todos os sintomas, exceto para a perda auditiva neurossensorial de grau severo, que permaneceu como sequela do quadro agudo ⁽²¹⁾.

Alterações auditivas podem ser observadas em indivíduo com sistema imune comprometido e toxoplasmose adquirida. Indivíduo do sexo masculino, portador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), apresentou toxoplasmose adquirida que se manifestou sob a forma de abscesso cerebral no ângulo ponto-cerebelar, ocasionando surdez súbita e síndrome cerebelar. Um estudo mostra que, quando a

toxoplasmose adquirida atinge o sistema nervoso central de indivíduos com AIDS, uma das consequências pode ser a perda auditiva neurossensorial ⁽²²⁾.

Não há na literatura estudos sobre os efeitos auditivos da toxoplasmose adquirida em modelo animal, mas há inúmeros registros de pesquisas auditivas experimentais no modelo animal camundongo ⁽²³⁻²⁵⁾ que é amplamente utilizado neste tipo de pesquisa devido às semelhanças entre a fisiologia e morfologia dos sistemas auditivos de camundongos e de humanos ⁽²⁶⁾.

Partindo da necessidade de melhor entender os mecanismos patogênicos nesta afecção, foi elaborado um projeto de pesquisa: “Efeitos da Toxoplasmose sobre os sistemas auditivo e visual”. Este estudo está em desenvolvimento pelo Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita da Universidade Federal de Minas Gerais (CTBG-UFMG), que é constituído por uma formação multiprofissional. Este projeto amplo conta com financiamento para ciência, tecnologia e inovação do CNPq, contemplado pelo edital MCTI/CNPq no. 14/2014 (processo 445026/2014-6).

O projeto completo conta com o estudo de quatro cepas brasileiras isoladas de recém-nascidos com toxoplasmose congênita genotipadas por Su *et al* ⁽²⁷⁾. Duas destas cepas são avirulentas para o camundongo (TgCTBr5 e TgCTBr10), e as outras duas são virulentas para o camundongo (TgCTBr8 e TgCTBr9) ⁽¹⁶⁾. As cepas virulentas para os camundongos foram isoladas de crianças com toxoplasmose congênita grave, e as cepas avirulentas foram isoladas de crianças assintomáticas, o que indica uma provável correlação entre as cepas isoladas de humanos e patogenicidade nos camundongos ^(16,28).

Neste projeto de mestrado foram estudadas as cepas ME-49 e a brasileira TgCTBr5. Na primeira etapa realizada, no estudo piloto, foi avaliada a função coclear dos camundongos com o registro das EOAPD em 8 e 10 kHz. A cepa utilizada foi a ME-49, originalmente isolada da musculatura de um carneiro, cistogênica, tipo II, considerada de baixa virulência para os camundongos BALB/c e comum no hemisfério norte. Nos camundongos BALB/c esta cepa produz cistos que são evidentes no cérebro. O aparecimento destes caracteriza a fase crônica da doença, que persiste por toda a vida destes camundongos ⁽²⁹⁾.

Na segunda etapa foi estudada a cepa brasileira TgCTBr5, isolada de um recém-nascido do estado de Minas Gerais, com 31 dias de vida e portador de toxoplasmose congênita. Esta criança não apresentou sinais clínicos desta doença ao nascimento. A cepa TgCTBr5 apresenta genótipo tipo BrIII (ou genótipo 8) sendo avirulenta para os camundongos BALB/c ⁽¹⁶⁾. A função auditiva foi avaliada com o registro das EOAPD e

dos Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE). Além destes exames auditivos, foram realizados também o estudo histopatológico e microscópico eletrônico de varredura da cóclea.

Espera-se que esse estudo inicial auxilie na elucidação dos mecanismos patogênicos da ação do *T. gondii* sobre o sistema auditivo, em relação às diferentes cepas e graus de virulência do parasito. Além disso, espera-se também que esse estudo possa agregar conhecimentos para a realização de outros estudos de experimentação básica em modelo animal na Fonoaudiologia.

De acordo com as normas do programa de Mestrado em Ciências Fonoaudiológicas, Resolução nº01/2015, de 26 de março de 2015, os resultados e discussão desta dissertação são apresentados em formato de artigos originais, que serão submetidos à avaliação e possível publicação na revista *Hearing Research*.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Verificar os efeitos auditivos causados pela toxoplasmose adquirida experimental em camundongos.

Objetivos específicos:

- Caracterizar as respostas auditivas em modelo animal;
- Comparar os resultados auditivos em modelos com e sem a infecção;
- Realizar o estudo microscópico óptico e eletrônico da cóclea para verificar a existência e tipos de alterações decorrentes da infecção, bem como sua relação com os achados auditivos.
- Realizar o estudo microscópico óptico do tronco-encefálico e cérebro.

MÉTODOS

Desenho do estudo e local de realização:

Este estudo experimental básico foi realizado em duas etapas. A primeira etapa foi desenvolvida entre os meses de maio e julho de 2015, e a segunda entre os meses de outubro e dezembro de 2015. A coleta de ambas as fases foi efetuada no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), Departamento de Parasitologia – laboratório de *Toxoplasma gondii* coordenado pelo professor Doutor Ricardo Wagner Almeida Vítor.

Aspectos Éticos:

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-UFMG) sob o protocolo número 261/14.

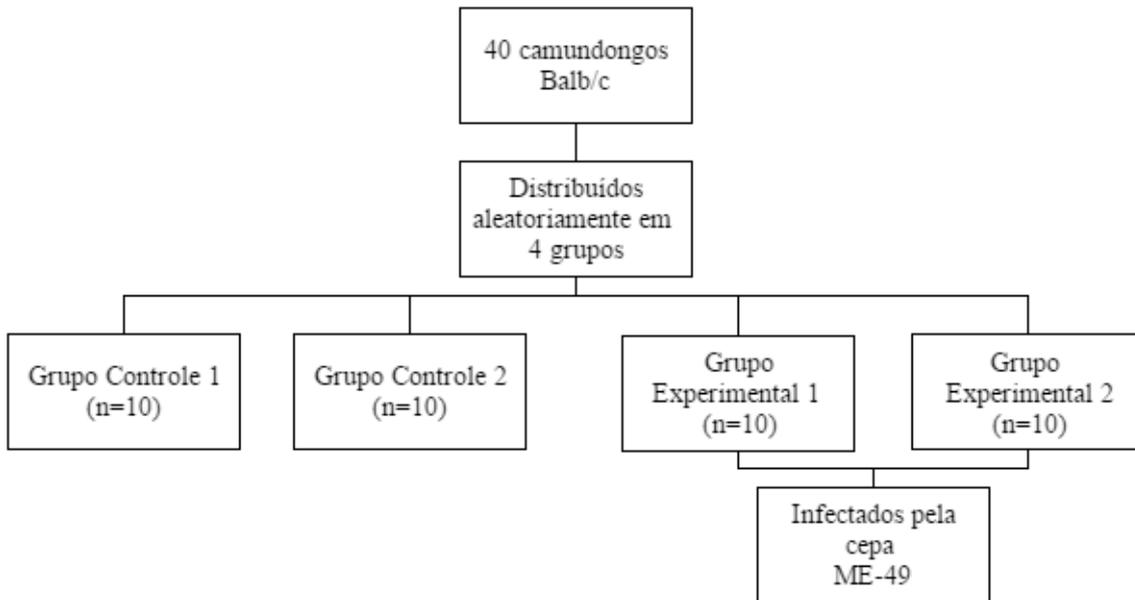
Tamanho amostral:

Para calcular o tamanho amostral utilizou como referência o estudo de Lawrence, 1996⁽³⁰⁾. Foram consideradas as estimativas deste estudo, com um poder estatístico de 90%, nível de confiança de confiança de 95% e margem de erro (diferença entre o efeito médio da exposição ao ruído observado e o verdadeiro efeito médio) de 2,5 dB e desvio-padrão de 6,249 dB.

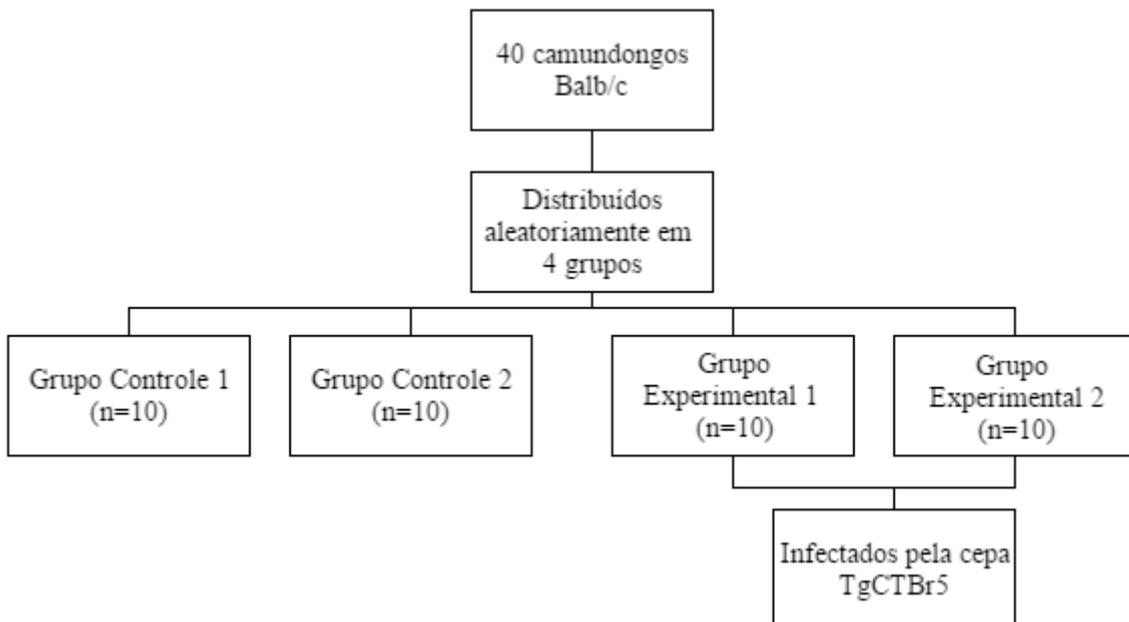
Após os cálculos, o tamanho da amostra necessário foi de 80 observações, distribuída em 10 grupos. Ao considerarmos uma perda de 20% (morte antes da medição do efeito) seriam necessários 10 animais por grupo, totalizando 100 observações, sendo 10 por grupo.

Fluxograma do estudo

Distribuição dos grupos para o artigo 1:



Distribuição dos grupos para o artigo 2:



Artigo 1: Estudo da função coclear na infecção adquirida por *Toxoplasma gondii* em camundongos BALB/c

O estudo foi realizado em quarenta fêmeas de camundongos BALB/c entre aproximadamente quatro e doze semanas. Vinte destes camundongos foram inoculados

com a cepa ME-49 de *T. gondii*. Os outros vinte constituíram o grupo controle, foram inoculados apenas com PBS, não tendo sido infectados. Todos os camundongos foram avaliados auditivamente por meio das EOAPD, no equipamento AuDX (Biologic©), nas frequências f2 08 e 10 kHz, em ambiente acusticamente controlado.

As EOAPD foram realizadas antes da infecção experimental (dia 0), 14 dias pós-infecção (14 dpi) - correspondente à fase aguda da toxoplasmose, e 42 dias pós-infecção (42 dpi) - correspondente à fase crônica recente de toxoplasmose. IgG anti *T. gondii* foi pesquisado por Elisa nos dias 0, 14 dpi e 42 dpi, em todos os camundongos. Após o término do experimento, todos os camundongos foram eutanasiados. Foi realizada análise intragrupos e entregrupos. O detalhamento dos métodos empregados no estudo, bem como seus resultados e conclusões, estão descritos no Artigo 1, na seção de resultados deste volume de dissertação.

Artigo 2: Estudo da função auditiva periférica e central na infecção adquirida por *Toxoplasma gondii* em camundongos BALB/c

Este estudo foi realizado em quarenta fêmeas de camundongos BALB/c entre aproximadamente quatro e doze semanas. Vinte destes camundongos foram inoculados com a cepa brasileira TgCTBr5 de *T. gondii*. Os outros vinte constituíram o grupo controle, foram inoculados apenas com PBS, não tendo sido infectados. Todos os camundongos foram avaliados auditivamente por meio das EOAPD e PEATE. Foi utilizado o equipamento *OtoPhyLab*[®] da empresa *RT Conception*. As EOAPD foram realizadas nas frequências 08, 12, 16, 24 e 32 kHz. O PEATE foi efetuado nas frequências 10, 16, 24 e 32 kHz. Os exames auditivos foram realizados no dia 0, 14 dpi e 42 dpi, assim como o exame sorológico Elisa. Após o término do experimento todos os camundongos foram eutanasiados. As cócleas foram retiradas e analisadas por microscopia eletrônica e óptica. Os cérebros e tronco-encefálico foram submetidos à análise histopatológica. Foi realizada comparação intragrupos e entregrupos. O detalhamento dos métodos empregados no estudo, bem como seus resultados e conclusões, estão descritos no Artigo 2, na seção de resultados deste volume de dissertação.

Referências Bibliográficas

1. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet Semin. 2004;363(9425):1965–1976.
2. Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: Do different strains cause different disease? Curr Opin Microbiol. 2002;5(4):438–42.
3. Jones JL, Kruszon-moran D, Wilson M, Mcquillan G, Navin T, Mcauley JB. *Toxoplasma gondii* Infection in the United States: Seroprevalence and Risk Factors. Am J Epidemiol. 2001;154(4):357–65.
4. Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Cad Saude Publica. 2010;22(11):2498–2498.
5. Filha ES, Oliveira SM. Toxoplasmose. Biológico. 2009;71(1):13–5.
6. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* Comprises of Parasite Three Clonal Lineages: Correlation with Human Disease Genotype. Oxford Univ Press behalf Infect Dis Soc Am. 1995;172(6):1561–6.
7. Howe DK, Honore S, Derouin FSL. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 1997;35:1411–1414.
8. Dardé ML. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. Parasite. 2008;15:366–71.
9. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int J Parasitol. 2008;38(5):561–9.
10. Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme BD, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2004;34:1185–1196.
11. de Melo Ferreira A, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. Infect Genet Evol. 2006;6(1):22–31.
12. Ferreira IMR, Vidal JE, de Mattos C de CB, de Mattos LC, Qu D, Su C, et al. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. Exp Parasitol. 2011;129(2):190–5.
13. Gilbert R. Treatment for congenital toxoplasmosis: Finding out what works. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(2):305–11.

14. Gilbert R, Freeman K. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe.[Internet]. 2008;2e:277. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/18698419>
15. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier JM, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol.* 1992;114:136–44.
16. Carneiro ACAV, Andrade GM, Costa JGL, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira AM, et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):901–7.
17. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, de Oliveira RC, de Faria Garcia SM, Leite J. [Seroepidemiology of toxoplasmosis and ocular evaluation by Amsler grid in patients from the rural area treated at the Jaguapita county health center, Parana State, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(6):671–6.
18. Carvalho CMCN, Farhat CK. Toxoplasmose adquirida. *J Pediatr (Rio J).* 1999;75(Supl 1):S63.
19. Katholm M, Johnsen NJ, Siim C, Willumsen L. Bilateral sudden deafness and acute acquired toxoplasmosis. *J Laryngol Otol.* 1991;105(2):115–8.
20. Schlottmann A, Kleemann D, Kranz K, Schmal G. Hörsturz und erhöhter IgM-Titer für Toxoplasmose*. *Laryngo-Rhino-Otologie.* 1996;75(11):687–90.
21. Rösch D, Handrick W, Lietz R, Blatz R, König E. Erworbene Toxoplasmose mit zerebraler Beteiligung und nachfolgender Hörstörung. *Klinische Pädiatrie.* 1998;210:125–7.
22. Bohadana SC, Lima S, Maia LMSV, Gonzalez F, Silveira EGC, Júnior OM, et al. Surdez Súbita como Primeira Manifestação da Síndrome da imunodeficiência Adquirida. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1998;64:151–6.
23. Jimenez AM, Stagner BB, Martin GK, Lonsbury-Martin BL. Age-related loss of distortion product otoacoustic emissions in four mouse strains. *Hear Res.* 1999;138(1–2):91–105.
24. Willott JF, Turner JG, Carlson S, Ding D, Seegers Bross L, Falls WA. The BALB/c mouse as an animal model for progressive sensorineural hearing loss. *Hear Res.* 1998;115(1–2):162–74.
25. Ahn JH, Joo HS, Suh JK, Kim H, So HS, Chung JW. Effects of cigarette smoking on hearing recovery from noise-induced temporary hearing threshold

- shifts in mice. *Otol Neurotol*. 2011 Aug;32(6):926–32.
26. Karolyi IJ, Dootz GA, Halsey K, Beyer L, Probst FJ, Johnson KR, et al. Dietary thyroid hormone replacement ameliorates hearing deficits in hypothyroid mice. *Mamm Genome*. 2007;18(8):596–608.
 27. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2010;137(1):1–11.
 28. Pinheiro BV. Toxoplasmose congênita humana: Caracterização de cepas de *Toxoplasma gondii* em linhagens isogênicas de camundongos. Belo Horizonte. Dissertação [mestrado em parasitologia] - Universidade Federal de Minas Gerais; 2014.
 29. Lunde MN, Jacobs L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1983;69(5):806–8.
 30. Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF. Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res*. 1996;93(1–2):181–7.

RESULTADOS

Artigo 1: Estudo da função coclear na infecção adquirida por *Toxoplasma gondii* em camundongos BALB/c

Artigo 2: Estudo da função auditiva periférica e central na infecção adquirida por *Toxoplasma gondii* em camundongos BALB/c

Artigo original 1: Estudo da função coclear na infecção adquirida por *Toxoplasma gondii* em camundongos BALB/c

*Versão em português para avaliação da banca examinadora e publicação do volume de dissertação.

Bianca Cristina Eugênio¹, Ricardo Wagner de Almeida Vitor², Sirley Alves da Silva Carvalho¹, Jacqueline Domingues Tibúrcio³, Daniel Vitor Vasconcelos-Santos⁴, Luciana Macedo de Resende^{1*}

Para o CTBG-UFMG (*Congenital Toxoplasmosis Brazilian Group* - Universidade Federal de Minas Gerais: Ana Carolina de Aguiar Vasconcelos Carneiro, Daniel Vítor de Vasconcelos Santos, Danuza de Oliveira Machado Azevedo, Ericka Viana Machado Carellos, Glaucia Manzan Queiroz Andrade, José Nélio Januário, Luciana Macedo de Resende, Olindo Assis Martins Filho, Ricardo Wagner de Almeida Vítor, Roberta Maia de Castro Romanelli, Waleska Teixeira Caiaffa.)

1. Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências Fonoaudiológicas, Departamento de Fonoaudiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais
2. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais
3. Departamento de Medicina, campus Dom Bosco, Universidade Federal de São João Del Rey
4. Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais

Abreviações: EOAPD, Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção; PEATE, Potencial Evocado Auditivo de Tronco-Encefálico; *T. gondii*, *Toxoplasma gondii*.

*Autor correspondente

Endereços de email: bibi.eugenio@hotmail.com, ricardovitor@icb.ufmg.br,
salves.carvalho@gmail.com, jacqueline_tiburcio@ufsj.edu.br, dvitorvs@gmail.com,
lmacedo.luciana@gmail.com

Resumo

Embora a infecção causada por *Toxoplasma gondii* seja um possível fator de risco para perda auditiva, há poucos relatos na literatura sobre os efeitos da toxoplasmose adquirida no sistema auditivo. O objetivo do presente estudo foi verificar e caracterizar os efeitos auditivos cocleares causados pela toxoplasmose adquirida em camundongos BALB/c, infectados experimentalmente com a cepa ME-49. Foi realizado o registro das Emissões Otoacústicas Evocadas por Produto de Distorção nas frequências de 8 e 10 kHz. Anticorpos IgG anti *T. gondii* foram pesquisados por ELISA, que confirmou o sucesso da infecção pela cepa ME-49 nos camundongos dos grupos experimentais. Os resultados mostraram ausência de alterações cocleares significativas nos camundongos infectados. Estes dados sugerem que as frequências pesquisadas não foram prejudicadas pela infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*.

Palavras-chave: Toxoplasmose experimental, camundongos BALB/c, audição, emissões otoacústicas espontâneas, cóclea.

1) Introdução

A toxoplasmose adquirida é uma infecção parasitária causada por *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Estima-se que um terço da população mundial tenha sido infectada por este parasita (Montoya and Liesenfeld, 2004), porém, a prevalência desta infecção varia de acordo com a localização geográfica, fatores sócio-econômicos, culturais, ambientais e genótipo do parasita (Boothroyd and Grigg, 2002; Jones et al., 2001; Suzuki et al., 1996).

Na Indonésia a prevalência é elevada, 70% (Terazawa et al., 2003). No Chile e na França as prevalências são aproximadamente 37% (Contreras et al., 1996) e 47% (Fromont et al., 2009), respectivamente. Em outros países da América Latina, em especial no Brasil, a prevalência da toxoplasmose adquirida é uma das mais elevadas no mundo afetando, aproximadamente, de 70 a 95% da população (Ministério da Saúde, 2010). Entretanto, em alguns países observa-se uma redução significativa na soroprevalência da toxoplasmose adquirida nos últimos anos, tais como Holanda, com

redução de 40,5% para 26% (Hofhuis et al., 2011) e os Estados Unidos, de 14% para 09% (Jones et al., 2007).

As consequências clínicas da toxoplasmose adquirida são classificadas de acordo com o predomínio de sinais e sintomas, podendo ser linfonodal, exantemática, neurológica, miocárdica, pulmonar e ocular (Carvalho and Farhat, 1999). Geralmente em pessoas com a imunidade comprometida, as manifestações clínicas desta doença são mais graves, comprometendo órgãos vitais como o cérebro, o pulmão e o coração (Filha and Oliveira, 2009).

Em indivíduos imunocompetentes a toxoplasmose adquirida é na maioria das vezes assintomática, ou são observados sintomas de gripe comum, linfadenopatia ocular ou cervical (Garcia et al., 1999). Em alguns casos raros, indivíduos imunocompetentes podem apresentar a forma neurológica da doença, que inclui paralisia facial, meningite e meningoencefalite. Nesta última, ainda podem ocorrer, entre outros sintomas, alterações auditivas, que podem permanecer como seqüela do quadro agudo (Rösch et al., 1998). No entanto, problemas auditivos podem ser evidenciados na toxoplasmose adquirida, mesmo que não existam sintomas clínicos de encefalite (Schlottmann et al., 1996).

A associação entre toxoplasmose adquirida e sistema auditivo tem sido pouco estudada, tanto em humanos, quanto no modelo animal, sendo escassa a literatura sobre o tema. Em um relato de caso, observou-se perda auditiva de grau severo e alteração vestibular bilateralmente em uma paciente jovem, cuja única doença confirmada foi a toxoplasmose adquirida. Após o tratamento com sulfadiazina e pirimetamina, houve melhora nos limiares de audibilidade das frequências baixas e completa recuperação da função vestibular (Katholm et al., 1991).

Em outro relato de caso, indivíduo do sexo masculino, portador de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e toxoplasmose adquirida no sistema nervoso central apresentou perda auditiva neurossensorial de grau profundo à orelha direita, sendo esta súbita, e disacusia neurossensorial de grau moderado à orelha esquerda, além de tonturas rotatórias. Exames de imagem evidenciaram lesão nodular no ângulo ponto-cerebelar direito e lesão anelar na profundidade parietal esquerda. Segundo os autores, a possível causa destas alterações pode ser atribuída à toxoplasmose adquirida que, ao atingir o sistema nervoso central de indivíduos com AIDS, causa perda auditiva neurossensorial. Neste caso, a toxoplasmose manifestou-se sob a forma de abscesso cerebral ocasionando síndrome cerebelar devido à localização no ângulo ponto-cerebelar e surdez súbita (Bohadana et al., 1998).

A relação entre deficiência auditiva e a infecção adquirida por *T. gondii* ainda precisa ser melhor elucidada. Um estudo recente, realizado em motoristas de caminhão interestadual no México, objetivou determinar se estes profissionais apresentavam risco aumentado de infecção por *T. gondii*. Além da realização de testes laboratoriais para verificar IgG e IgM, foi aplicado um questionário, no qual entre outros aspectos, pesquisou-se sobre a presença de deficiência auditiva. Foi observada maior prevalência de toxoplasmose na população de caminhoneiros em relação à população geral da região estudada, bem como maior prevalência nos indivíduos que relataram problemas auditivos ou algum tipo de prejuízo nos reflexos. Entretanto, as causas das alterações auditivas e os tipos de alterações auditivas não são relatados pelos autores, podendo tratar-se de um achado circunstancial. Estes resultados sugerem que a exposição ao *T. gondii* pode impactar negativamente na saúde dos motoristas (Alvarado-Esquível et al., 2015).

Não há na literatura estudos que tenham pesquisado os efeitos auditivos da toxoplasmose adquirida em modelo animal, mas há inúmeros registros de pesquisas auditivas experimentais no modelo animal camundongo (Ahn et al., 2011; Jimenez et al., 1999; Willott et al., 1998), que é amplamente utilizado neste tipo de pesquisa devido às semelhanças entre a fisiologia e morfologia dos sistemas auditivos de camundongo e de humano (Károlyi, I.J., Dootz, G.A., Halsey, 2007).

Devido à necessidade de esclarecer os possíveis efeitos da toxoplasmose adquirida sobre o sistema auditivo, o objetivo deste estudo foi investigar a função coclear de camundongos BALB/c infectados pela cepa ME-49 de *T. gondii*. As respostas de Emissões Otoacústicas Evocadas por Produto de Distorção (EOAPD) foram registradas e comparadas antes da infecção e nas fases aguda e crônica recente por *T. gondii* para verificar a existência de alterações auditivas cocleares causadas pela toxoplasmose adquirida.

2) Materiais e Métodos

2.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado em conformidade com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) – Brasil. O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil (Protocolo CEUA 261/2014). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. O método de eutanásia realizado no final deste estudo, para obter cistos cerebrais e taquizoítos, foi overdose de cetamina e xilazina, seguido por deslocamento cervical.

2.2 Animais

Quarenta fêmeas de camundongos BALB/c foram obtidas junto ao Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos foram agrupados de 10 em 10, em caixas próprias, observando-se temperatura, umidade e iluminação de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) – Brasil, com ração *ad libitum* (Nuvilab CR1, Nuvital, Brasil), e água tratada. As caixas eram compostas de polipropileno e dimensões aproximadas 41x34x16cm tampadas com grade zincada, e com depressão central para deposição da ração e para garrafa de água. As caixas foram repostas semanalmente. No momento da infecção experimental os camundongos tinham aproximadamente quatro e seis semanas de vida.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, com dez animais em cada:

Quadro 1: Distribuição dos camundongos BALB/c em grupos:

Grupo controle 1	Controle não infectado para animais com toxoplasmose aguda
Grupo controle 2	Controle não infectado para animais com toxoplasmose crônica
Grupo experimental 1	Toxoplasmose aguda
Grupo experimental 2	Toxoplasmose crônica

2.3 Infecção experimental

Camundongos BALB/c foram infectados com a cepa ME-49, tipo clonal II, de baixa virulência para os camundongos. A inoculação foi realizada por gavagem de 10 cistos cerebrais em tampão fosfato (PBS) com potencial de hidrogênio (pH) de 7,2,

coletados de um camundongo previamente infectado com a cepa ME-49 há dois meses. Camundongos dos grupos controles foram inoculados apenas com PBS. Todos os camundongos foram pesados imediatamente antes da infecção e imediatamente antes da realização dos testes audiológicos, realizados 14 dias após a infecção (dpi) (fase aguda) e 42 dpi (fase crônica). Os animais foram avaliados clinicamente duas vezes por semana até o momento da avaliação auditiva.

2.4 Exame sorológico: ELISA

O sangue foi coletado em papel filtro pela técnica de lancetamento da cauda dos animais. Elisa foi realizado como previamente descrito (Brandão et al., 2009) quanto à presença de IgG anti *T. gondii* no eluato de sangue seco. Resumidamente, microplacas foram revestidas com antígeno de taquizoíta solúvel (STAg) da cepa RH (0.5 µg/well). Um picote de 0,5 mm de papel filtro com sangue seco foi eluído durante a noite em 0,5 ml de PBS pH 7,2 a 4°C, resultando em uma diluição de aproximadamente 1:100 e incubado a 37 °C por 45 min. Conjugado com peroxidase anti-IgG (1:10000) de camundongo (Sigma) foi adicionado. A reação foi visualizada com H₂O₂ mais ortofenilenodiamina e parada com 4 N H₂SO₄. Para realizar a leitura automatizada foi utilizado um leitor de microplacas da BIO RAD modelo 3550 e filtro de 490nm. Amostras com valores em absorbância maiores que o *cut off* foram consideradas positivas. O *cut off* foi calculado pela média de absorbância de doze eluatos de sangue obtidos de camundongos normais mais três desvios-padrão. Cada amostra foi analisada em duplicata, considerando a média como resultado final. Os controles negativos e positivos foram incluídos em cada placa. ELISA foi realizado em três momentos distintos do estudo: antes da infecção pela cepa ME-49, 14 (dpi) e 42 dpi.

2.5 Avaliações Auditivas

O registro das EOAPD foi realizado em sala acusticamente controlada com o analisador de emissões otoacústicas AuDX Plus (*Biologic*®). Foi aplicado protocolo "dp-gram", quatro pontos por oitava, e estudadas as frequências f2 8 e 10 kHz, proporção de f2/f1 = 1,22. A relação de intensidade foi de L1=L2, com intensidade inicial de 40 dBNPS, seguida por 45, 50, 55, 60, 65 e 70 dBNPS, obtendo-se 5 "dp-grams" por camundongo avaliado.

Os resultados de amplitude e relação sinal/ruído obtidos em 2f1-f2, por frequência, foram registrados em cada intensidade de testagem.

As EOAPD não foram realizadas em camundongos que apresentaram alteração de orelha média.

As avaliações ocorreram em três momentos distintos: antes da infecção, na fase aguda (14 dpi) e na fase crônica da infecção (42 dpi).

No primeiro momento, antes da infecção pela cepa ME-49, todos os 40 camundongos foram testados. Na infecção aguda, 14 dpi, as EOAPD foram realizadas apenas no grupo experimental 1 - toxoplasmose aguda e no grupo controle 1 - não infectado. Na infecção crônica recente, 42 dpi, as EOAPD foram realizadas no grupo experimental 2 - toxoplasmose crônica e no grupo controle 2 - não infectado.

Todos os camundongos foram anestesiados com Cetamina (60mg/kg) e Xilazina (10mg/kg), por via intraperitoneal (ip). Para a realização do exame, foi acoplado o microfone do analisador de emissões otoacústicas no meato acústico externo do camundongo com o auxílio de uma oliva de silicone.

Os limiares das EOAPD foram analisados em cada frequência pesquisada. Considerou-se como limiar a menor intensidade na qual foi observada relação sinal/ruído maior ou igual a 6 dBNPS.

Após concluir as avaliações auditivas, os camundongos foram anestesiados com overdose de Cetamina e Xilazina e eutanasiados por deslocamento cervical.

2.6 Análise Estatística

Para a construção do banco de dados e análises foi utilizado o *software* SPSS, versão 19.

Para a seleção do teste estatístico apropriado, a normalidade dos dados foi verificada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Foi feita a comparação das respostas intragrupos em relação à etapa de infecção (pré-infecção e infecção aguda, e pré-infecção e infecção crônica). Também foi realizada a comparação entregrupos com os grupos experimentais e o grupo controle correspondente.

Para análises dependentes, quando a distribuição da amostra foi normal, foi utilizado o Teste T de Student pareado para a média (limiar das EOAPD para grupo experimental 1), e quando assimétrica foi utilizado o teste para mediana Wilcoxon (limiar das EOAPD para grupo experimental 2, amplitude do produto de distorção). Para as análises independentes em casos de distribuição normal da amostra, foi

utilizado o teste T de Student para a média (peso corporal dos camundongos) e, quando assimétrica, foi utilizado o teste para mediana Mann Whitney (comparação entre grupos para o limiar das EOAPD e amplitude do produto de distorção acústica).

Em todos os casos foi adotado como nível de significância o valor de 5% ($p \leq 0,05$).

3) Resultados

O teste ELISA confirmou o sucesso da infecção pela cepa ME-49 nos camundongos infectados experimentalmente. A diferença de peso entre os camundongos dos grupos controles e dos grupos experimentais foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (tabela 1), mostrando queda significativa de peso dos camundongos infectados com *T. gondii*.

Todos os camundongos dos grupos experimentais apresentaram pelo arrepiado, apatia, mas sobreviveram à infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii*. Características como arqueamento postural e debilidade motora não foram observadas nos animais infectados.

Tabela 1: Peso corporal dos camundongos BALB/c após inoculação com *T. gondii*

Grupos	N	Média	Desvio Padrão	P*
Controle 1 - não infectado ^a	10	21,350	0,743	0,000
Experimental 1 - toxoplasmose aguda ^a	10	15,950	1,312	
Controle 2 - não infectado ^b	10	22,390	1,157	0,000
Experimental 2 - toxoplasmose crônica ^b	10	19,450	1,099	

^aPeso corporal avaliado 14 dias após infecção; ^b Peso corporal avaliado 42 dias após infecção; N: número de camundongos avaliados; * teste T de Student.

3.1 Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção

Amplitude do Produto de Distorção

A análise da amplitude do produto de distorção entre os grupos na fase aguda (controle 1 e experimental 1) e os grupos na fase crônica (controle 2 e experimental 2), assim como a análise da amplitude do produto de distorção intragrupos - grupo experimental 1 na pré-infecção e infecção aguda e grupo experimental 2 na pré-infecção e infecção crônica - não mostrou diferença estatística tanto para a frequência f2 8 kHz (figura 1), quanto para a frequência f2 10 kHz (figura 2).

Na figura 1 são apresentadas as médias das amplitudes e o desvio padrão de f2 08 kHz, e na figura 2 as médias das amplitudes e o desvio padrão de f2 10 kHz.

Amplitude PD 8kHz

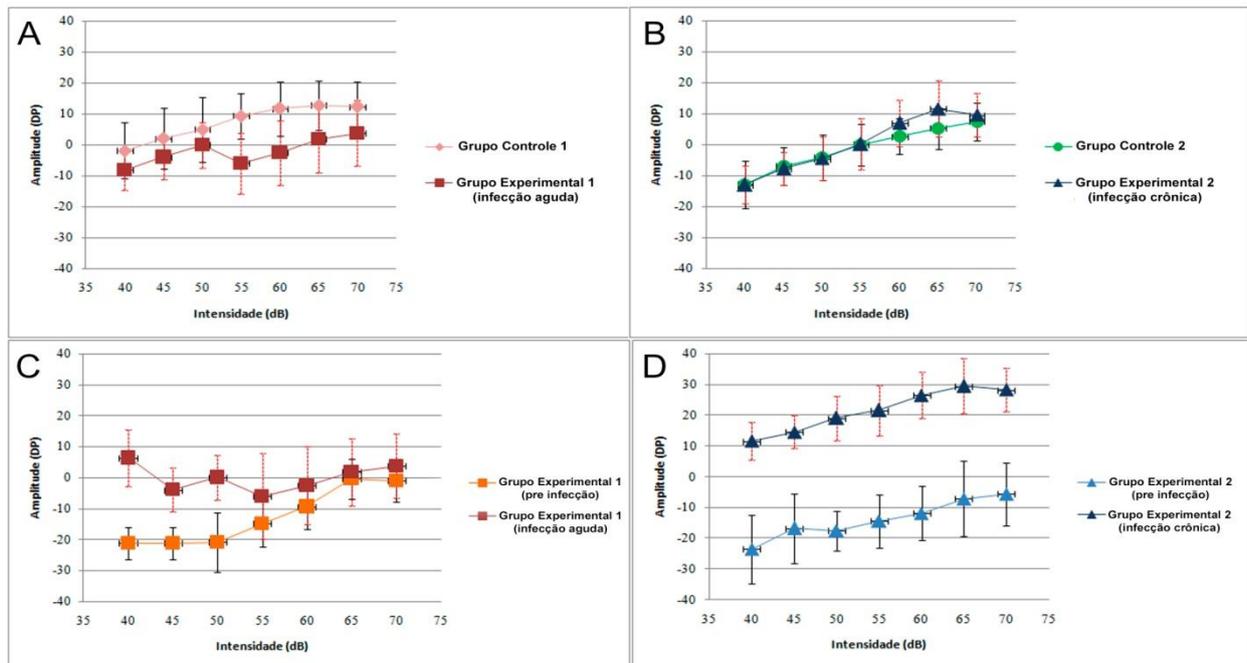


Figura 1: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção em 8 kHz de camundongos BALB/c infectados com *T. gondii*. A e B: comparação entregrupos nas fases aguda e crônica de toxoplasmose, respectivamente. C e D: comparação intragrupos nas fases aguda e crônica recente de toxoplasmose, respectivamente ($p > 0,05$).

Amplitude PD 10kHz

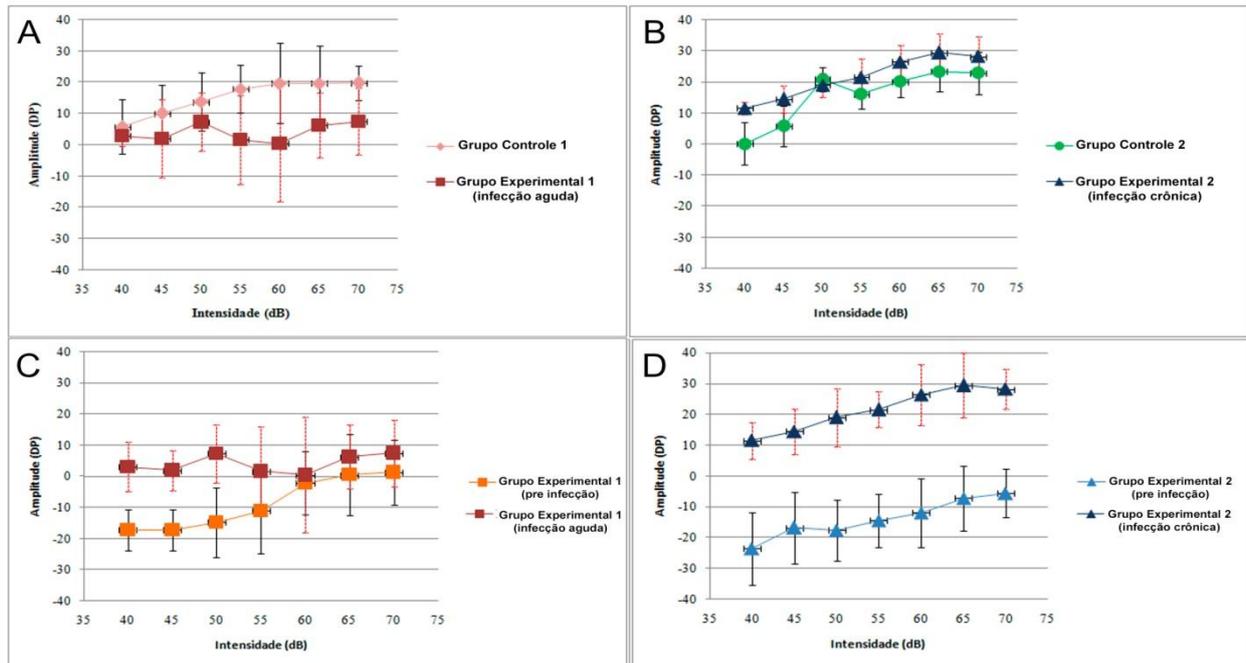


Figura 2: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção em 10 kHz de camundongos BALB/c infectados com *T. gondii*. A e B: comparação entre grupos nas fases aguda e crônica de toxoplasmose, respectivamente. C e D: comparação intragrupos nas fases aguda e crônica recente de toxoplasmose, respectivamente ($p > 0,05$).

Limiar das EOAPD

Os limiares das EOAPD apresentados pelo grupo experimental 1, antes da infecção pela cepa ME-49 e 14 dias após a infecção não mostraram diferença estatística significativa ($p>0,05$) para nenhuma das frequências pesquisadas (figura 3A).

O grupo experimental 2 antes da infecção e 42 dias após infecção pela cepa ME-49, apresentou diferença estatística significativa no limiar das EOAPD para a frequência 8414 Hz ($p=0,017$), estando os resultados dos limiares melhores na fase crônica recente de toxoplasmose do que na pré-infecção. Para a frequência de 10008 não foi observada diferença estatística significativa ($p>0,05$) (figura 3B).

Em relação à análise do limiar das EOAPD entre os grupos controles e seus respectivos grupos experimentais não foram observadas diferenças com significância estatística tanto para os grupos controle 1 e experimental 1 ($p>0,05$) (figura 4A), quanto para os grupos controle 2 e experimental 2 ($p>0,05$) (figura 4B).

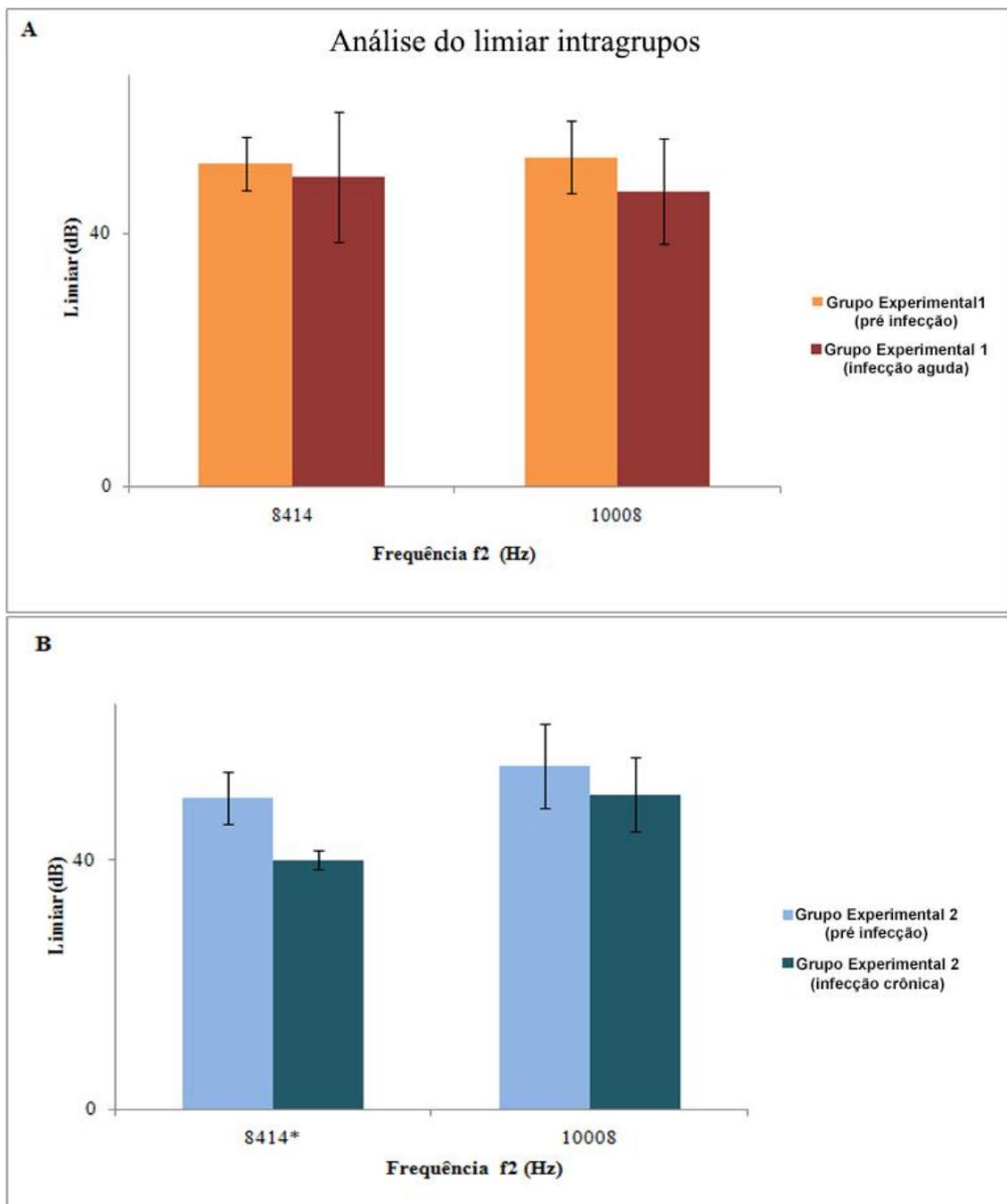


Figura 3: Análise do limiar das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção intragrupos de camundongos BALB/c infectados com *T. gondii*. Pré-infecção e toxoplasmose aguda (Figura 3A), e pré-infecção e toxoplasmose crônica recente (Figura 3B). *p=0,017.

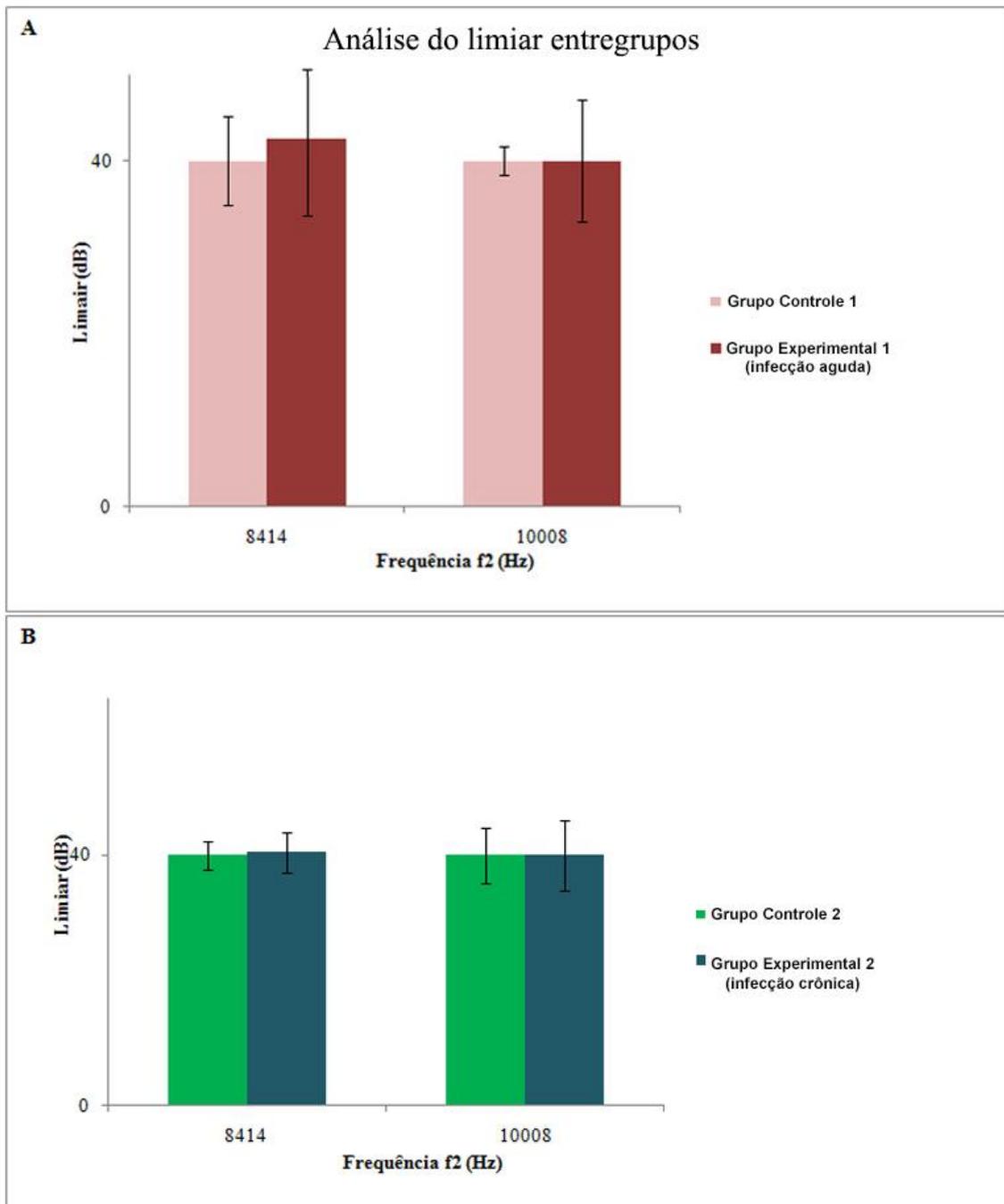


Figura 4: Análise do limiar das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção entregrupos de camundongos BALB/c infectados com *T. gondii*. Grupo controle 1 e grupo experimental 1 com toxoplasmose aguda (figura 4A). Grupo controle 2 e grupo experimental 2 com toxoplasmose crônica recente (figura 4B).

4) Discussão

A inter-relação entre toxoplasmose adquirida e sistema auditivo tem sido sugerida em alguns relatos de casos (Bohadana et al., 1998; Katholm et al., 1991), nos quais indivíduos com toxoplasmose adquirida apresentaram alterações tanto nas frequências baixas, quanto nas altas, além da presença de queixas vestibulares. Entretanto os mecanismos patofisiológicos da infecção adquirida por *T. gondii* na audição, assim como os reais efeitos dessa infecção no sistema auditivo ainda carecem de elucidação.

No presente estudo, ao comparar os camundongos na pré-infecção e na fase aguda (14 dias após inoculação pela cepa ME-49), não foram observadas diferenças estatísticas significantes para as amplitudes do produto de distorção em relação à intensidade de estimulação, e nem para a média dos limiares de 8 e 10 kHz, demonstrando que, na fase aguda, a função coclear não foi afetada pelo *T. gondii*.

Ao comparar os camundongos na pré-infecção e na fase crônica recente da doença (42 dias após inoculação pela cepa ME-49) as amplitudes do produto de distorção para 8 e 10 kHz não apresentaram diferença com relevância estatística. Na análise do limiar, observou-se diferença com significância estatística na frequência 8 kHz, estando os limiares melhores na toxoplasmose crônica. Assim como na análise anterior, a função coclear não foi afetada pelo parasito. A melhora do limiar auditivo pode ser justificada pela maturação coclear, que melhora com o decorrer dos dias (Karolyi, I.J., Dootz, G.A., Halsey, 2007). Na pré-infecção os camundongos estavam com seis a sete semanas de vida, e na fase crônica estavam com 12 a 13 semanas de vida.

Na análise entre os grupos controle e experimental da fase aguda da doença, assim como entre os grupos controle e experimental da fase crônica recente da toxoplasmose adquirida, não foi observada diferença estatística significativa para os limiares e amplitudes das EOAPD em nenhuma das frequências pesquisadas, mostrando que, também nesses casos, o parasito não foi capaz de prejudicar a resposta das células ciliadas externas.

Ainda não existem relatos na literatura sobre a caracterização do funcionamento coclear em casos de toxoplasmose adquirida em camundongos, mas assim como em outros estudos auditivos realizados em camundongos (Hatzopoulos et al., 2003), neste também não foram pesquisadas frequências inferiores a 8 kHz, pois elas apresentam

baixas amplitudes nas EOAPD, o que dificulta a distinção entre as emissões e o ruído de fundo (Carlos et al., 2008; Gorga et al., 1997).

Um fator que pode ter influenciado a ausência de alterações cocleares, o que constitui uma das limitações deste estudo, é que a faixa de audição dos camundongos é mais extensa que a dos humanos (Karolyi, I.J., Dootz, G.A., Halsey, 2007). Neste estudo foram pesquisadas apenas as frequências f2 8 e 10 kHz, consideradas baixas frequências (região apical da cóclea) para os camundongos, o que não nos permite afirmar que as frequências mais altas (região basal da cóclea) também não tenham sido afetadas pela infecção. Em contrapartida, os resultados não foram influenciados pela presbiacusia, que afeta, primeiramente, as frequências mais altas, a partir dos 50 dias de vida nos camundongos BALB/c (Willott et al., 1998).

Além disso, os camundongos BALB/c são resistentes à infecção crônica pela cepa ME-49 de *T. gondii* (Suzuki et al., 1993), que apresenta baixa virulência para estes animais (Lunde and Jacobs, 1983) e, talvez, este seja outro motivo pelo qual a função coclear não tenha sido afetada.

5) Conclusão

As frequências pesquisadas neste estudo pelas EOAPD, não foram prejudicadas pela infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, tanto na fase aguda, quanto na fase crônica recente da toxoplasmose adquirida.

Referências

- Ahn, J.H., Joo, H.S., Suh, J.K., Kim, H., So, H.S., Chung, J.W., 2011. Effects of cigarette smoking on hearing recovery from noise-induced temporary hearing threshold shifts in mice. *Otol. Neurotol.* 32, 926–32.
- Alvarado-Esquível, C., Pacheco-Vega, S.J., Hernandez-Tinoco, J., Salcedo-Jaquez, M., Sanchez-Anguiano, L.F., Berumen-Segovia, L.O., Rabago-Sanchez, E., Liesenfeld, O., 2015. *Toxoplasma gondii* infection in interstate truck drivers: a case-control seroprevalence study. *Parasit. Vectors* 8, 77.
- Bohadana, S.C., Lima, S. de, Maia, L.M.S. V., Gonçalves, F., Silveira, Em.G.C., Júnior, O.M., Rausís, M.B.G., Silveira, J.A.M. da, 1998. Surdez Súbita como Primeira Manifestação da Síndrome da imunodeficiência Adquirida. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 64, 151–156.
- Boothroyd, J.C., Grigg, M.E., 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its

- relevance to human infection: Do different strains cause different disease? *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 438–442.
- Brandão, G.P., Melo, M.N., Gazzinelli, R.T., Caetano, B.C., Ferreira, A.M., Silva, L.A., Vitor, R.W.A., 2009. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: Involvement of IFN- γ and IL-10. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 241–245.
- Carlos, F., Lavinsky, L., Möllerke, R.O., Soares, M.E., 2008. Emissões otoacústicas por produtos de distorção em ovinos normais e após indução de hiperinsulinemia 74, 181–187.
- Carvalho, C.M.C.N., Farhat, C.K., 1999. Toxoplasmose adquirida. *J. Pediatr. (Rio. J.)* 75, S63.
- Contreras, M.D.C., Schenone, H., Salinas, P., Sandoval, L., Rojas, A., Villarroel, F., Solis, F., 1996. Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38, 431–435.
- Filha, E.S., Oliveira, S.M., 2009. TOXOPLASMOSE 13–15.
- Fromont, E.G., Riche, B., Rabilloud, M., 2009. *Toxoplasma* seroprevalence in a rural population in France: detection of a household effect. *BMC Infect. Dis.* 9, 76.
- Garcia, J.L., Navarro, I.T., Ogawa, L., de Oliveira, R.C., de Faria Garcia, S.M., Leite, J., 1999. [Seroepidemiology of toxoplasmosis and ocular evaluation by Amsler grid in patients from the rural area treated at the Jaguapita county health center, Parana State, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 32, 671–676.
- Gorga, M.P., Neely, S.T., Ohlrich, B., Hoover, B., Redner, J., Peters, J., 1997. From Laboratory to Clinic: A Large Scale Study of Distortion Product Otoacoustic Emissions in Ears with Normal Hearing and Ears with Hearing Loss. *Ear Hear.* 18, 440–455.
- Hatzopoulos, S., Petruccelli, J., Laurell, G., Previati, M., Martini, A., 2003. Electrophysiological findings in the Sprague-Dawley rat induced by moderate-dose carboplatin. *Hear. Res.* 182, 48–55.
- Hofhuis, A., W, V.P., Duynhoven, V., H., Y.T.P., M, N.C.D., Mollema, L., Klis, V. der, M, F.R., Havelaar, A.H., Kortbeek, L.M., 2011. Decreased prevalence and age-specific risk factors for *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007. *Epidemiol. Infect.* 139, 530–538.
- Jimenez, a M., Stagner, B.B., Martin, G.K., Lonsbury-Martin, B.L., 1999. Age-related loss of distortion product otoacoustic emissions in four mouse strains. *Hear. Res.*

138, 91–105.

- Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Sanders-Lewis, K., Wilson, M., 2007. Toxoplasma gondii Infection in the United States, 1999–2004, Decline from the Prior Decade. *Am J Trop Med Hyg* 77, 405–410.
- Jones, J.L., Kruszon-moran, D., Wilson, M., Mcquillan, G., Navin, T., Mcauley, J.B., 2001. Toxoplasma gondii Infection in the United States : Seroprevalence and Risk Factors. *Am. journal Epidemiol.* 154, 357–365.
- Karolyi, I.J., Dootz, G.A., Halsey, K. et al, 2007. Dietary thyroid hormone replacement ameliorates hearing deficits in hypothyroid mice. *Mamm Genome* 18, 596–608.
- Katholm, M., Johnsen, N.J., Siim, C., Willumsen, L., 1991. Bilateral sudden deafness and acute acquired toxoplasmosis. *J. Laryngol. Otol.* 105, 115–118.
- Lunde, M.N., Jacobs, L., 1983. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of Toxoplasma gondii. *J Parasitol* 69, 806–808.
- Ministério da Saúde, 2010. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. *Cad. Saude Publica* 22, 2498–2498.
- Montoya, J., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet Semin.* 363, 1965–1976.
- Rösch, D., Handrick, W., Lietz, R., Blatz, R., König, E., 1998. Erworbene Toxoplasmose mit zerebraler Beteiligung und nachfolgender Hörstörung. *Klin. Pädiatrie.*
- Schlottmann, A., Kleemann, D., Kranz, K., Schmal, G., 1996. Hörsturz und erhöhter IgM-Titer für Toxoplasmose*. *Laryngo-Rhino-Otologie* 75, 687–690.
- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Wong, S.Y., Conley, F.K., Remington, J.S., 1993. Susceptibility to chronic infection with Toxoplasma gondii does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. *Infect. Immun.* 61, 2284–2288.
- Suzuki, Y., Wong, S.Y., Grumet, F.C., Fessel, J., Montoya, J.G., Zolopa, a R., Portmore, A., Schumacher-Perdreau, F., Schrappe, M., Köppen, S., Ruf, B., Brown, B.W., Remington, J.S., 1996. Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J. Infect. Dis.* 173, 265–8.
- Terazawa, A., Muljono, R., Susanto, L., Margono, S.S., Konishi, E., 2003. High Toxoplasma antibody prevalence among inhabitants in Jakarta, Indonesia. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56, 107–109.
- Willott, J.F., Turner, J.G., Carlson, S., Ding, D., Seegers Bross, L., Falls, W.A., 1998. The BALB/c mouse as an animal model for progressive sensorineural hearing loss.

Hear. Res. 115, 162–174.

Agradecimentos

À Sra Rosalida Estevam Nazar Lopes, os autores agradecem todo o apoio técnico e generosa assistência no desenvolvimento do estudo. Ao CNPq, o financiamento (processo 445026/2014-6) do edital MCTI/CNPq, número 14/2014. Os autores agradecem ainda o NUPAD/UFMG, PRPq/UFMG e CAPES pelo apoio institucional à pesquisa.

Artigo original 2: Estudo da função auditiva periférica e central na infecção adquirida por *Toxoplasma gondii* em camundongos BALB/c

*Versão em português para avaliação da banca examinadora e publicação do volume de dissertação.

Bianca Cristina Eugênio¹, Ricardo Wagner de Almeida Vitor², Sirley Alves da Silva Carvalho¹, Jacqueline Domingues Tibúrcio³, Daniel Vitor Vasconcelos-Santos⁴, Paula Vieira Teixeira Vidigal⁵, Marion Souchal⁶, Ludimila Labanca⁷, Luciana Macedo de Resende^{1*}

Para o CTBG-UFMG (*Congenital Toxoplasmosis Brazilian Group* - Universidade Federal de Minas Gerais: Ana Carolina de Aguiar Vasconcelos Carneiro, Daniel Vítor de Vasconcelos Santos, Danuza de Oliveira Machado Azevedo, Ericka Viana Machado Carellos, Glaucia Manzan Queiroz Andrade, José Nélio Januário, Luciana Macedo de Resende, Olindo Assis Martins Filho, Ricardo Wagner de Almeida Vítor, Roberta Maia de Castro Romanelli, Waleska Teixeira Caiaffa.)

1. Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências Fonoaudiológicas, Departamento de Fonoaudiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais
2. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais
3. Departamento de Medicina, campus Dom Bosco, Universidade Federal de São João Del Rey
4. Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais
5. Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais
6. Laboratório de Biofísica Neurosensorial da Faculdade de Medicina e de Farmácia da Université d' Auvergne
7. Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Minas Gerais

Abreviações: EOAPD, Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção; PEATE, Potencial Evocado Auditivo de Tronco-Encefálico; *T. gondii*, *Toxoplasma gondii*;

*Autor correspondente

Endereços de email: bibi.eugenio@hotmail.com, ricardovitor@icb.ufmg.br,
salves.carvalho@gmail.com, jacqueline_tiburcio@ufsj.edu.br, dvitorvs@gmail.com,
lmacedo.luciana@gmail.com

Resumo

A toxoplasmose adquirida é um possível fator de risco para perda auditiva, entretanto pouco explorada na literatura especializada. O objetivo do presente estudo foi verificar e caracterizar os efeitos auditivos periféricos e centrais causados pela toxoplasmose adquirida em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com a cepa brasileira TgCTBr5. Foram realizados os exames auditivos Emissões Otoacústicas Evocadas por Produto de Distorção nas frequências de 8, 12, 16, 24 e 32 kHz e Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico nas frequências de 10, 16, 24 e 32 kHz. As cócleas foram analisadas por meio de microscopia óptica e eletrônica. Os cérebros e os tronco-encefálicos foram analisados pela microscopia óptica. Anticorpos IgG anti *Toxoplasma gondii* foram pesquisados por meio do teste ELISA, que confirmou o sucesso da infecção pela cepa TgCTBr5 nos camundongos dos grupos experimentais. Os resultados dos exames auditivos, assim como os resultados microscópicos e histopatológicos, evidenciaram ausência de alterações cocleares e centrais significativas nos camundongos infectados. Esses dados sugerem que o sistema auditivo periférico e central dos camundongos BALB/c não foi prejudicado pela infecção com a cepa TgCTBr5 de *Toxoplasma gondii*.

Palavras-chave: Toxoplasmose, Audição, Emissões Otoacústicas Espontâneas, Potenciais Evocados Auditivos, Camundongos, Cóclea

Key-words: Toxoplasmosis; Hearing; Otoacoustic Emissions, Spontaneous; Evoked Potentials, Auditory, Mice, Cochlea

1 Introdução

A toxoplasmose adquirida é uma zoonose causada pelo protozoário parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Apesar de existir apenas uma espécie desse protozoário, há diversas linhagens clonais ou cepas que se diferem em relação à virulência e formação de cistos (Filha and Oliveira, 2009). Na Europa e América do Norte há três linhagens clonais divididas nos tipos I, II e III (Howe and

Sibley, 1995). Na América do Sul, as cepas são atípicas (Pinheiro, 2014) e apresentam uma ampla diversidade genética em relação às que são encontradas nos países do hemisfério norte (Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carne B and ML., 2004; de Melo Ferreira et al., 2006; Ferreira et al., 2011). No Brasil há outros quatro tipos de genótipos: BrI, BrII, BrIII e BrIV (Pena et al., 2008) e nesse país a toxoplasmose é considerada mais grave que nos países onde há o predomínio das cepas clonais I, II e III (Gilbert, 2009).

O *T. gondii* pode ser adquirido por meio da ingestão de cistos do parasita presentes em carne crua ou mal cozida de animais infectados, ou pelo consumo de águas, frutas, ou vegetais crus, que estejam contaminados pelos oocistos do protozoário, sendo este o modo mais comum de infecção (Filha and Oliveira, 2009; Jones et al., 2001).

Aproximadamente um terço da população mundial é afetado pela toxoplasmose adquirida (Tenter et al., 2000), e sua prevalência varia de região para região, de acordo com o clima, grupo étnico e hábitos da população (Montoya and Liesenfeld, 2004). Uma das soroprevalências mais elevadas é observada no Brasil, no qual cerca de 70 a 95% dos habitantes apresentam anticorpos para o *T. gondii* (Ministério da Saúde, 2010).

A gravidade ou não da toxoplasmose adquirida depende da imunidade dos indivíduos. Em portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), transplantados, indivíduos em quimioterapia ou em uso de drogas imunossupressoras, que têm a imunidade comprometida, os sinais e sintomas clínicos geralmente são mais graves, pois órgãos vitais como o cérebro, o coração e o pulmão podem ser comprometidos (Filha and Oliveira, 2009). Em pessoas imunocompetentes a toxoplasmose é geralmente assintomática, ou apresenta sintomas de gripe comum, linfadenopatia ocular ou cervical, sendo na maioria das vezes, identificada apenas por meio de exame sorológico (Carvalho and Farhat, 1999; Filha and Oliveira, 2009). Outra possível, embora rara consequência clínica da toxoplasmose adquirida é a perda auditiva (Rösch et al., 1998; Schlottmann et al., 1996).

Alterações auditivas podem ser evidenciadas na toxoplasmose adquirida independentemente do sistema imune dos indivíduos. Ocorre que, mesmo que eles não estejam debilitados, essa infecção parasitária pode ainda manifestar-se na forma neurológica. Nesses casos, a perda auditiva neurosensorial é uma das possíveis manifestações clínicas. E, mesmo após a realização do tratamento com sulfadiazina e

pirimetamina, a perda auditiva pode permanecer como sequela do quadro agudo. (Rösch et al., 1998).

Entretanto, mesmo que não se trate de toxoplasmose adquirida cerebral, problemas auditivos podem ocorrer (Schlottmann et al., 1996). Em alguns casos, após a realização do tratamento preconizado para a toxoplasmose, observou-se melhora discreta nos limiares de audibilidade das frequências baixas, (Katholm et al., 1991), e em outro caso, a perda auditiva neurossensorial permaneceu (Schlottmann et al., 1996).

Há também registro de perda de audição em pessoa imunodeprimida com toxoplasmose adquirida. Indivíduo do sexo masculino, portador da AIDS, apresentou toxoplasmose adquirida manifesta sob a forma de abscesso cerebral no ângulo ponto-cerebelar, ocasionando surdez súbita e síndrome cerebelar. Segundo os autores, quando a toxoplasmose adquirida atinge o sistema nervoso central de indivíduos com AIDS, uma das consequências é a perda auditiva neurossensorial (Bohadana et al., 1998).

A escassez de estudos que avaliam a perda auditiva na toxoplasmose adquirida aponta para a necessidade de se estudar os mecanismos cocleares e do sistema nervoso auditivo central nessa patologia. Ainda não há na literatura a descrição das consequências auditivas ocasionadas pela toxoplasmose adquirida no modelo animal, embora modelos animais, tais como os camundongos da linhagem BALB/c, sejam muito utilizados em pesquisas auditivas (Baba et al., 2006; Kou et al., 2011; Li et al., 2014; Willott et al., 1998) e de infecção experimental pelo *T. gondii* (Brandão et al., 2009; Carneiro et al., 2013; Fux et al., 2003; Veloso et al., 2015). Diante do exposto, este estudo objetivou esclarecer os possíveis efeitos da toxoplasmose adquirida sobre o sistema auditivo periférico e central de camundongos BALB/c infectados pela cepa brasileira TgCTBr5 de *T. gondii*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado em conformidade com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Brasil. O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil (Protocolo CEUA 261/2014). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. O método de eutanásia realizada no final deste estudo, para obter cistos cerebrais e taquizoítos, foi overdose de cetamina e xilazina, seguido por deslocamento cervical.

2.2 Animais

Quarenta fêmeas de camundongos BALB/c foram obtidas no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Foram alojados dez camundongos por gaiola, de acordo com a temperatura, umidade e padrões de iluminação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) – Brasil, com ração *ad libitum* (Nuvilab CR1, Nuvital, Brasil) e água clorada *ad libitum*. As gaiolas eram de polipropileno medindo, aproximadamente, 41x34x16cm, tampadas com grade zincada e com depressão central para deposição da ração e para a alocação da garrafa de água. As gaiolas foram trocadas semanalmente. No momento da infecção experimental os camundongos tinham entre quatro a seis semanas de vida.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, com dez animais em cada:

Quadro 1: Distribuição dos camundongos BALB/c em grupos:

Grupo controle 1	Controle não infectado para animais com toxoplasmose aguda
Grupo controle 2	Controle não infectado para animais com toxoplasmose crônica
Grupo experimental 1	Toxoplasmose aguda
Grupo experimental 2	Toxoplasmose crônica

2.3 Infecção experimental

Os camundongos BALB/c foram infectados com a cepa brasileira TgCTBr5, isolada de recém-nascido com toxoplasmose congênita, genotipada por Su *et al* (Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, 2010) e de baixa virulência para os camundongos. A inoculação foi realizada por 10 cistos cerebrais em tampão fosfato (PBS), com potencial de hidrogênio (pH) 7,2, obtidos de camundongo previamente infectado pela cepa TgCTBr5. Os camundongos dos grupos controle foram inoculados apenas com PBS. Todos os camundongos foram pesados a cada três dias, a partir do início deste estudo (dia 0), até o final do experimento.

2.4 Exame sorológico: ELISA

O sangue foi coletado em papel filtro pela técnica de sangramento submandibular (Golde et al., 2005). O teste Elisa foi realizado como previamente descrito na literatura (Brandão et al., 2009), quanto à presença de IgG anti *T. gondii* no eluato de sangue seco. Resumidamente, microplacas foram revestidas com antígeno

solúvel de taquizoíta da cepa RH (0.5 µg/well). Um picote de 0,5 mm de papel filtro com sangue seco foi eluído *overnight* em 0,5 ml de PBS, pH 7,2, a 4°C, resultando em uma diluição de aproximadamente 1:100 e incubado a 37 °C por 45 min. Um conjugado com peroxidase anti-IgG (1:10000) de camundongo (Sigma) foi adicionado. A reação foi visualizada com H₂O₂ e orto-fenilenodiamina e parada com 4 N H₂SO₄. Para realizar a leitura automatizada foi utilizado um leitor de microplacas da BIO RAD modelo 3550 e filtro de 490 nm. Amostras com valores em absorbância maiores que o *cut off* foram consideradas positivas. O *cut off* foi calculado pela média de absorbância de oito eluatos de sangue obtidos de camundongos normais mais três desvios-padrão. Cada amostra foi analisada em duplicata, considerando a média como resultado final. Os controles negativos e positivos foram incluídos em cada placa. O teste ELISA foi realizado em três momentos distintos do estudo: antes da infecção pela cepa TgCTBr5, 14 (dpi) (toxoplasmose aguda) e 42 dpi (toxoplasmose crônica).

2.5 Avaliações Auditivas

Neste estudo experimental foi analisada a resposta das vias auditivas periféricas e centrais dos camundongos com e sem infecção pelo *T. gondii*. Para esta análise foi feito o estudo das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção (EOAPD) e dos Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE) em sala acusticamente controlada. Foi utilizado o equipamento *OtoPhyLab* específico para registro de respostas auditivas em animais, fabricado pela empresa francesa *RT Conception*.

No primeiro momento, antes da infecção pela cepa TgCTBr5, todos os 40 camundongos foram avaliados auditivamente. Na fase de infecção aguda, 14 dpi, os exames foram realizados apenas no grupo experimental 1 - toxoplasmose aguda e no grupo controle 1 - não infectado. Na infecção crônica recente, 42 dpi, os exames foram realizados no grupo experimental 2 - toxoplasmose crônica e no grupo controle 2 - não infectado.

Todos os camundongos foram anestesiados com Cetamina (60mg/kg) e Xilazina (10mg/kg), por via intraperitoneal. Essa medicação não interferiu em nenhum dos exames auditivos.

2.5.1 EOAPD

O microfone do analisador de emissões otoacústicas foi acoplado no meato acústico externo da orelha direita do camundongo com o auxílio de uma oliva de silicone.

Foi aplicado o protocolo "*dp-gram*", quatro pontos por oitava, nas frequências 8, 12, 16, 24, 32 kHz, proporção de $f_2/f_1 = 1,22$. A relação de intensidade foi de $L_1=L_2$, com intensidade inicial de 40 dBNPS, seguida por 45, 50, 55, 60, 65 e 70 dBNPS, obtendo-se 5 "*dp-grams*" por camundongo avaliado.

A resposta foi considerada presente quando a relação sinal/ruído foi maior ou igual a 04 dB.

Os resultados de amplitude e relação sinal/ruído obtidos em $2f_1-f_2$, por frequência, foram registrados em cada intensidade de testagem.

2.5.2 PEATE

Foi registrado por meio de eletrodos subdermais, em forma de agulha posicionados no animal da seguinte forma: eletrodo ativo em Fz, eletrodos referência na região retroauricular direita e eletrodo terra na parte inferior das costas.

O estímulo acústico foi do tipo *tone burst*, a polaridade alternada, apresentado de forma monoaural (orelha direita) por meio do fone de inserção. A velocidade de apresentação foi 17 estímulos por segundo.

As frequências testadas foram: 10, 16, 24 e 32 kHz. A integridade da via auditiva foi pesquisada a 80 dBNPs e posteriormente, a intensidade foi diminuída em passos de 10 dB, até observar-se o desaparecimento completo das ondas. Para verificar o limiar eletrofisiológico foi considerada a menor intensidade de estímulo em que se evidenciava a onda II. Foram medidas as latências absolutas (ms) das ondas I, II, III, IV, V e os valores de intervalos interpicos (I-II, II-III, II-IV, II-V e I-III, III-V, I-V).

2.6 Análise Histopatológica

Foi realizada análise histopatológica em cinco cócleas de cada grupo, que foram selecionadas aleatoriamente (total de 20 cócleas). Todos os cérebros e tronco-encefálicos foram analisados histopatologicamente.

2.6.1 Cóclea

Os ossos temporais foram removidos e os tecidos ósseos circundantes às cócleas foram dissecados. As cócleas foram colocadas durante uma hora em paraformaldeído

4% e depois foram lavadas três vezes a cada 10 minutos com PBS. Em seguida, elas foram transferidas para um tubo de 05 ml contendo EDTA 5%, na temperatura de 4°C, durante 4 dias (o EDTA foi trocado a cada 24 horas neste período). Após esta etapa, as cócleas foram novamente lavadas três vezes a cada 10 minutos com PBS e, em seguida, desidratadas nas seguintes concentrações: álcool 25%, duas vezes de 15 minutos; álcool 50%, duas vezes de 15 minutos, álcool 70% durante uma hora; álcool 95% durante uma hora; álcool 100% durante uma hora e trinta minutos; álcool 100% durante 45 minutos; álcool 100% durante uma hora; 30 minutos no xilol; uma hora no xilol; e por fim uma hora e meia no xilol.

Ao término da desidratação, as cócleas foram incluídas na parafina. Os espécimes foram então seccionados, montados e corados com hematoxilina-eosina (H&E) para microscopia óptica.

2.6.2 Tronco encefálico e cérebro

O tronco-encefálico e o cérebro foram removidos e posteriormente colocados em formol 10%. Em seguida, os espécimes foram em seguida seccionados, montados e corados com hematoxilina-eosina (H&E).

2.7 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em vinte cócleas (cinco cócleas foram selecionadas aleatoriamente de cada grupo). O osso temporal foi retirado do crânio, e posteriormente imerso em tampão fosfato diluído em glutaraldeído 2%, dentro do qual as cócleas foram removidas do osso temporal e lavadas.

As cócleas ficaram fixadas no glutaraldeído 2% por uma noite, na temperatura de 04 C°.

Após este período de fixação, as cócleas foram dissecadas (a cápsula óssea foi removida) e, em seguida lavadas 3 vezes a cada 10 minutos no tampão fosfato.

Depois desta etapa foi iniciado o processo de desidratação na concentração de álcool a 25%, sendo duas vezes de quinze minutos; álcool a 50% sendo duas vezes de 15 minutos, álcool 70%, três vezes de 30 minutos (esta etapa durou três dias, sendo as cócleas mantidas na temperatura de 4 °C); álcool 95%, três vezes de 30 minutos. Durante uma noite as cócleas foram mantidas na temperatura de 4 °C, sendo a desidratação na concentração de 100% de álcool. A desidratação finalizou na concentração de 100% de álcool, sendo duas vezes de trinta minutos.

Com o término da desidratação as cócleas foram secadas em ponto crítico, no equipamento Bal-tec/Leica e, posteriormente metalizadas no equipamento Bal-Tec, modelo MD20, no período de um minuto.

Cada imagem foi observada qualitativamente no microscópio eletrônico JEOL JSM – 6360 LV, no Centro de Microscopia da UFMG.

2.8 Análise Estatística

Para a construção do banco de dados e análises foi utilizado o *software* SPSS, versão 19.

Foi feita a comparação das respostas intra-sujeitos em relação à etapa de infecção (pré-infecção e infecção aguda, e pré-infecção e infecção crônica). Também foi realizada a comparação inter-sujeitos com os grupos experimentais e os grupos controles correspondentes.

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Para análises dependentes foi utilizado o Teste T de Student pareado para a média e para as análises independentes foi utilizado o teste T de Student para a média. Em todos os casos foi adotado como nível de significância o valor de 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

3.1 Condições gerais de saúde

O teste ELISA confirmou o sucesso da infecção pela cepa TgCTBr5 nos camundongos infectados experimentalmente que apresentaram peso discretamente inferior aos camundongos do grupo controle, não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre eles (Tabela 1).

Todos os camundongos do grupo experimental 1, correspondente à fase aguda da infecção, apresentaram pelo arrepiado, apatia e diminuição da atividade motora. Os animais avaliados na fase crônica recente – grupo experimental 2 - não apresentaram mais esses sinais clínicos. Todos os camundongos infectados sobreviveram à infecção pela cepa TgCTBr5 de *T. gondii*. O arqueamento postural não foi observado nos animais infectados.

Tabela 1: Peso dos camundongos após inoculação com *Toxoplasma gondii*.

Grupos	N	Média	Desvio Padrão	P*
Controle 1 - não infectado ^a	10	19,9	0,825	0,417
Experimental 1 - toxoplasmose aguda ^a	10	19,5	1,3	
Controle 2 - não infectado ^b	10	20,7	0,804	0,13
Experimental 2 - toxoplasmose crônica ^b	10	20,2	0,812	

^a Peso corporal avaliado 14 dias após infecção; ^b Peso corporal avaliado 42 dias após infecção; N: número de camundongos avaliados; * teste T de Student.

3.2 EOAPD

Análise de EOAPD entregrupos

EOAPD entre grupos

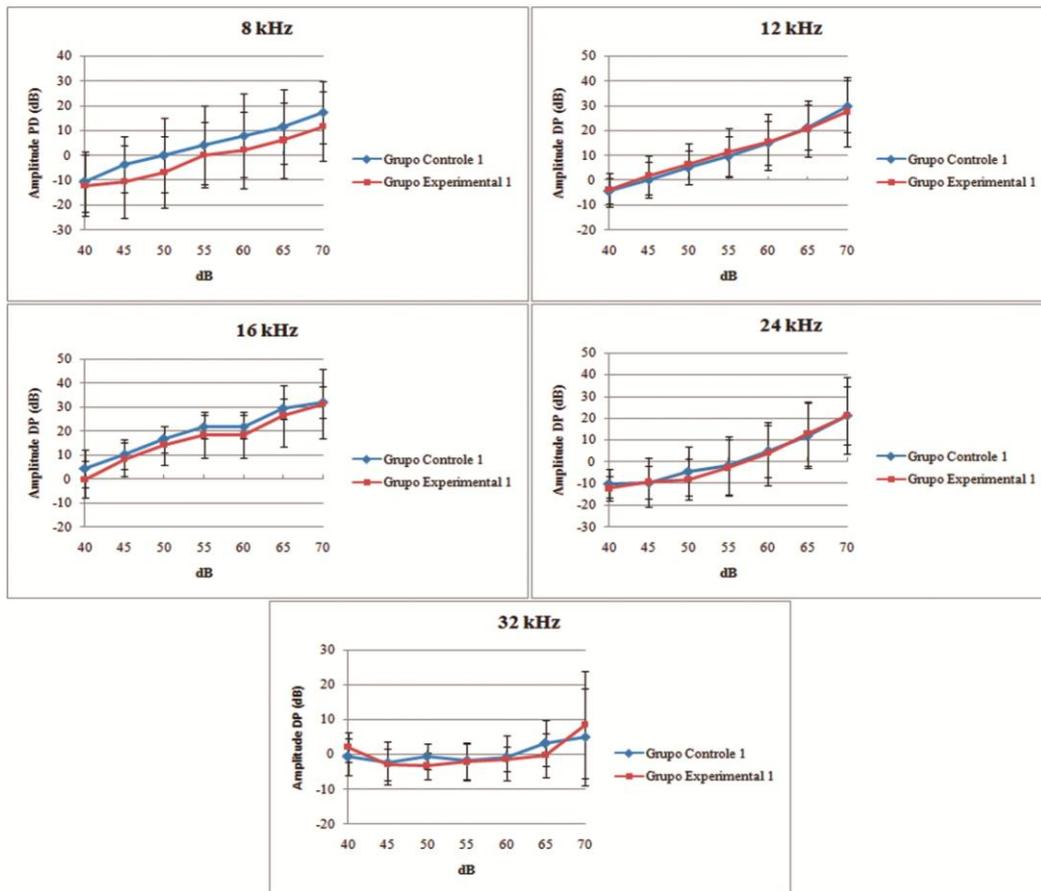


Figura 1: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção apresentadas pelos grupos controle 1 e experimental 1 ($p > 0,05$). Teste T de Student.

EOAPD entregrupos

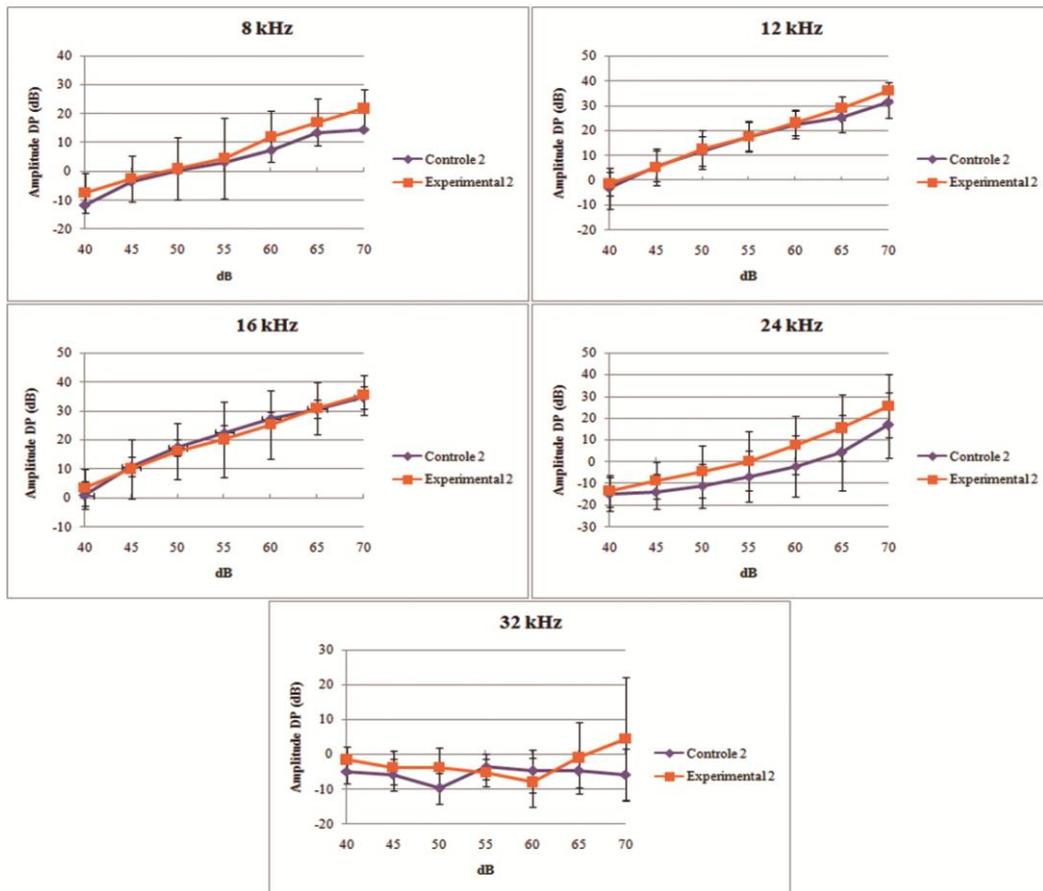


Figura 2: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção apresentadas pelos grupos controle 2 e experimental 2 ($p > 0,05$). Teste T de Student.

A figura 1 mostra os resultados das amplitudes do produto de distorção das EOAPD apresentados pelos grupos controle 1 e experimental 1 (fase aguda). Não ocorreu diferença com significância estatística para as amplitudes do produto de distorção em relação à intensidade de estimulação para as frequências pesquisadas, assim como não foi observada diferença estatística significativa para a relação S/R apresentados pelo grupo experimental da fase aguda e seu respectivo grupo controle, em nenhuma das frequências pesquisadas ($p > 0,05$).

A figura 2 mostra resultados das amplitudes do produto de distorção das EOAPD apresentados pelos grupos controle 2 e experimental 2 (fase crônica recente). Nesta comparação, tanto para as análises das amplitudes do produto de distorção, como para a relação S/R das EOAPD apresentados pelo grupo experimental da fase crônica

recente e seu respectivo grupo controle, não foram observadas diferenças estatísticas significantes para as frequências pesquisadas ($p>0,05$).

Tabela 2: Média, desvio padrão e p valor para a relação sinal/ruído apresentada pelos grupos controles e experimentais nas Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção

Intensidade (dB)	Grupos	8 kHz			12 kHz			16 kHz			24 kHz			32 kHz		
		S/R	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p
40	Controle 1	2,90	14,866	,808	,20	3,584	,462	4,30	7,288	,498	-3,00	5,312	0,631	-4,50	4,143	0,19
	Experimental 1	1,40	12,276		1,90	6,154		2,00	7,572		-4,70	3,773		-2,20	5,412	
	Controle 2	1,90	12,069	,873	2,30	11,672	,457	4,40	5,854	0,579	-6,10	7,279	,539	-5,20	3,190	0,56
	Experimental 2	2,70	9,821		5,30	4,423		5,10	8,279		-4,20	6,233		-2,40	2,633	
45	Controle 1	11,10	13,609	,221	3,00	8,615	,289	12,50	5,740	,323	-,80	11,282	0,739	-6,70	6,378	0,393
	Experimental 1	3,10	14,602		7,00	7,746		9,20	8,522		-3,00	6,600		-7,20	4,962	
	Controle 2	9,30	10,001	,870	10,50	6,187	,765	14,40	5,125	0,684	-3,40	7,849	,301	-6,60	4,789	,422
	Experimental 2	10,10	11,474		11,40	7,058		13,30	9,638		,20	7,254		-4,80	5,007	
50	Controle 1	14,30	16,255	,330	8,30	6,395	,320	17,60	7,560	,586	3,40	11,266	0,393	-4,60	4,351	0,143
	Experimental 1	7,20	15,426		11,70	8,341		15,70	7,747		-,40	9,131		-7,50	3,028	
	Controle 2	13,80	10,337	,935	16,50	7,292	,838	20,90	3,573	0,971	-1,10	10,311	,201	-10,60	4,402	0,55
	Experimental 2	13,30	16,097		17,20	7,772		18,10	10,908		5,40	11,539		-5,50	3,689	
55	Controle 1	17,40	18,001	,660	14,30	8,354	,645	20,30	7,243	,795	5,50	13,616	0,912	-5,80	5,453	0,631
	Experimental 1	14,10	14,798		16,20	9,739		19,40	7,989		4,30	13,132		-6,80	2,936	
	Controle 2	16,90	13,988	,766	25,10	6,540	,592	24,90	4,725	0,579	3,60	11,806	,304	-4,10	3,725	,166
	Experimental 2	18,90	15,595		23,50	6,570		21,40	14,577		9,60	13,501		-6,60	4,006	
60	Controle 1	7,90	16,789	,398	20,00	7,288	,961	20,30	7,243	,792	10,80	11,193	1	-5,30	4,620	,911
	Experimental 1	2,10	15,438		19,80	10,454		19,40	7,989		11,70	14,583		-5,50	3,100	
	Controle 2	21,40	16,147	,444	28,30	4,945	,820	31,20	3,011	,210	8,30	14,773	,224	-5,80	5,940	,275
	Experimental 2	26,30	11,461		27,70	6,567		26,40	11,286		16,00	12,472		-9,00	6,749	
65	Controle 1	11,60	14,946	,624	25,70	8,287	,779	29,60	6,802	,892	19,30	16,118	,829	-,90	4,909	,125
	Experimental 1	6,00	15,011		26,90	10,408		29,00	12,037		20,80	14,351		-4,50	5,104	
	Controle 2	26,70	11,634	,423	30,90	7,385	0,529	35,30	3,974	,524	13,30	17,192	,136	-5,90	4,483	,342
	Experimental 2	30,60	9,559		33,60	5,125		33,20	9,426		24,40	14,531		-2,30	10,605	
70	Controle 1	17,30	12,338	,508	33,20	10,942	,681	30,00	7,394	,892	27,50	13,914	0,796	,40	12,616	,459
	Experimental 1	11,60	13,898		33,20	12,603		34,00	13,776		29,30	17,563		5,00	14,484	
	Controle 2	26,00	15,129	,116	36,80	10,020	,299	38,70	4,572	,573	27,10	15,103	,339	-6,80	6,529	,154
	Experimental 2	34,00	8,179		40,60	4,789		37,00	8,179		33,80	15,411		2,50	18,094	

Legenda: S/R – relação sinal-ruído. DP – desvio padrão. P – p valor teste T de Student.

Análise de EOAPD intragrupos

EOAPD intragrupos

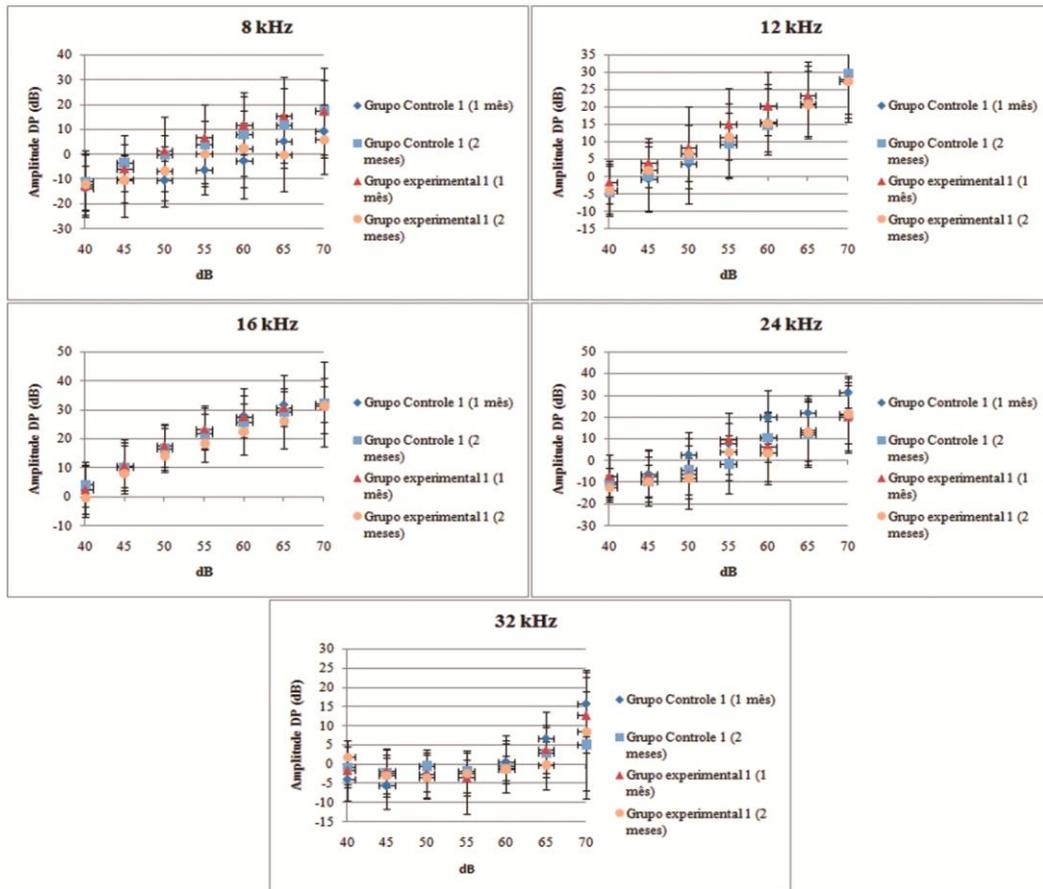


Figura 3: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção apresentadas intragrupos controle 1 e experimental 1. Comparação intragrupos no dia 0 (camundongos com 1 mês de vida – grupos controle 1 e experimental 1) e 14 dpi (camundongos com 2 meses de vida - grupos controle 1 e experimental 1). $p > 0,05$ Teste T de Student pareado.

EOAPD intragrupos

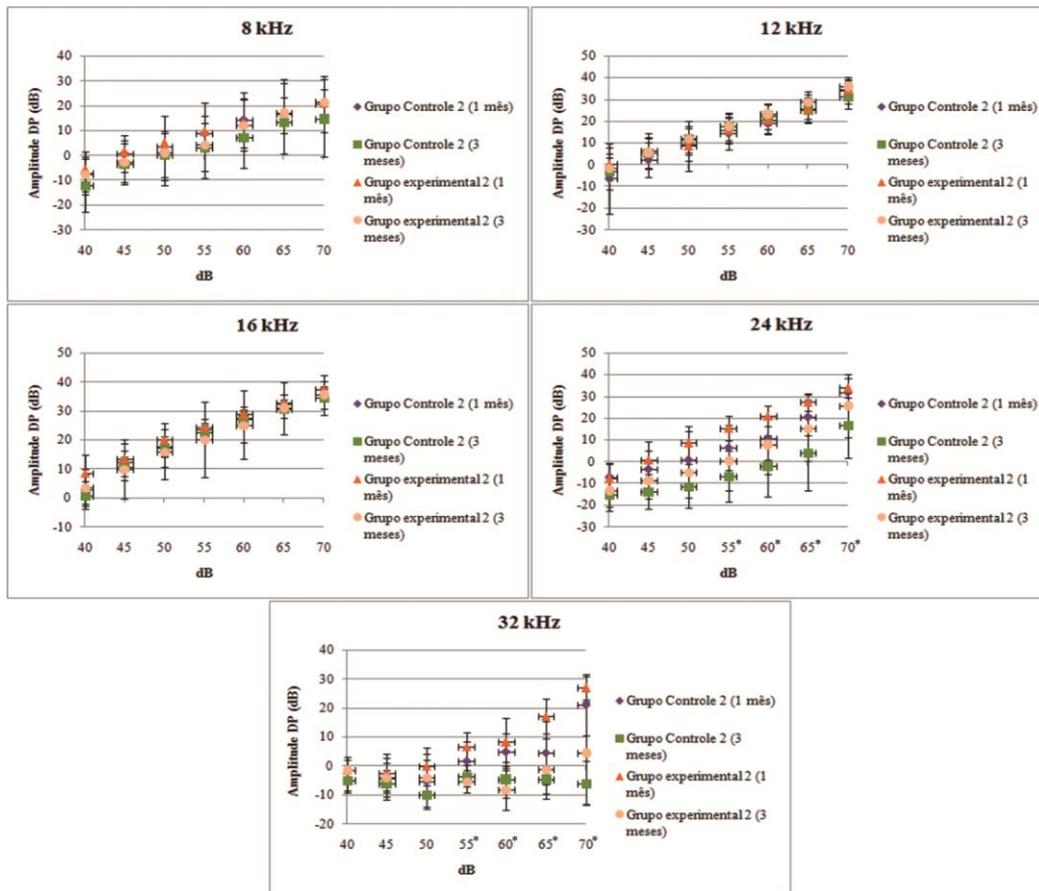


Figura 4: Amplitudes médias e desvio padrão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção apresentadas intragrupos controle 2 e experimental 2. Comparação intragrupos no dia 0 (camundongos com 1 mês de vida – grupos controle 2 e experimental 2) e 42 dpi (camundongos com 3 meses de vida - grupos controle 2 e experimental 2). * $p \leq 0,05$ Teste T de Student pareado.

As figuras 3 e 4 mostram os resultados das análises intragrupos das amplitudes do produto de distorção em relação à intensidade de estimulação para as frequências pesquisadas. Ao comparar as respostas intrasujeitos das EOAPD realizadas no início do estudo, quando a idade dos camundongos era 1 mês de vida, com as que foram realizadas 14 dias após, camundongos com 2 meses de vida, não houve diferenças estatísticas significantes para as amplitudes do produto de distorção, nem para a relação S/R em nenhuma das frequências pesquisadas, tanto para o grupo controle 1, quanto para o grupo experimental 1 ($p > 0,05$).

Na comparação intrasujeitos, as respostas das EOAPD apresentadas pelos camundongos no início do estudo, quando a idade destes era 1 mês de vida, e 42 dias

após (camundongos com 3 meses de vida), foram semelhantes para os grupos controle 2 e experimental 2. Em ambos os casos não houve diferença estatística significativa para as frequências de 8, 12, e 16 kHz ($p > 0,05$), tanto para a amplitude do produto de distorção, quanto para a relação S/R. A partir da intensidade de 55 dB, nas frequências de 24 e 32 kHz, foi observada diminuição da amplitude do produto de distorção e da relação S/R. Estes dados estão descritos nas tabelas 3 e 4 e os valores de “p” encontram-se destacados nos casos em que a diminuição da amplitude do produto de distorção e a relação S/R foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Tabela 3: Amplitudes médias das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção, apresentadas por frequência testada intragrupos

Intensidade	Grupos	24 kHz			32 kHz		
		Amplitude PD	DP	p	Amplitude PD	DP	p
55 dB	Grupo Controle 2 (1 mês)	6,40	10,298	0,018	1,70	6,783	0,028
	Grupo Controle 2 (3 meses)	-6,70	11,567		-3,50	3,749	
	Grupo experimental 2 (1 mês)	15,40	5,680	0,003	6,60	5,103	0,001
	Grupo experimental 2 (3 meses)	,20	13,669		-5,30	4,001	
60 dB	Grupo Controle 2 (1 mês)	10,50	9,835	0,019	5,00	6,360	0,023
	Grupo Controle 2 (3 meses)	-2,10	14,154		-4,80	6,125	
	Grupo experimental 2 (1 mês)	21,10	4,701	0,009	8,30	8,314	0,001
	Grupo experimental 2 (3 meses)	7,70	13,433		-8,00	7,071	
65 dB	Grupo Controle 2 (1 mês)	20,30	8,000	0,017	4,50	11,008	0,054
	Grupo Controle 2 (3 meses)	4,20	17,261		-4,80	4,662	
	Grupo experimental 2 (1 mês)	27,40	4,088	0,043	17,30	5,982	0,001
	Grupo experimental 2 (3 meses)	15,50	15,233		-1,00	10,285	
70 dB	Grupo Controle 2 (1 mês)	31,70	6,717	0,036	21,10	10,429	0,001
	Grupo Controle 2 (3 meses)	16,90	14,940		-5,90	7,430	
	Grupo experimental 2 (1 mês)	33,90	4,483	0,116	26,90	4,149	0,002
	Grupo experimental 2 (3 meses)	25,50	14,577		4,40	17,589	

Legenda: PD – Produto de Distorção. DP – Desvio Padrão. P – p valor teste T de Student pareado.

Tabela 4: Médias da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção, apresentadas por frequência testada intragrupos.

			24 kHz			32 kHz	
Intensidade	Grupos	S/R	DP	p	S/R	DP	p
55	Grupo Controle 2 (1 mês)	10,70	10,894	0,114	-1,40	5,190	0,068
	Grupo Controle 2 (3 meses)	3,60	11,806		-4,10	3,725	
	Grupo experimental 2 (1 mês)	21,00	6,650	0,008	1,70	5,034	0,006
	Grupo experimental 2 (3 meses)	9,60	13,501		-6,60	4,006	
60	Grupo Controle 2 (1 mês)	14,20	9,211	0,176	,50	4,972	0,059
	Grupo Controle 2 (3 meses)	8,30	14,773		-5,80	5,940	
	Grupo experimental 2 (1 mês)	26,10	5,587	0,047	3,50	8,127	0,001
	Grupo experimental 2 (3 meses)	16,00	12,472		-9,00	6,749	
65	Grupo Controle 2 (1 mês)	23,60	9,348	0,082	,10	9,550	0,154
	Grupo Controle 2 (3 meses)	13,30	17,192		-5,90	4,483	
	Grupo experimental 2 (1 mês)	32,30	5,078	0,178	12,20	6,861	0,004
	Grupo experimental 2 (3 meses)	24,40	14,531		-2,30	10,605	
70	Grupo Controle 2 (1 mês)	35,90	6,173	0,155	17,40	10,916	0,001
	Grupo Controle 2 (3 meses)	27,10	15,103		-6,80	6,529	
	Grupo experimental 2 (1 mês)	40,40	4,526	0,228	22,00	4,137	0,007
	Grupo experimental 2 (3 meses)	33,80	15,411		2,50	18,094	

Legenda: S/R – Sinal-ruído. DP – Desvio Padrão. P – p valor Teste T de Student pareado.

58

3.3 PEATE

Nas figuras 5 e 6 podem ser observados o padrão de respostas auditivas eletrofisiológicas para as frequências de 10 e 32 kHz em camundongos BALB/c. Na frequência de 10 kHz observam-se respostas eletrofisiológicas até a intensidade de 15 dB. A 32 kHz as respostas eletrofisiológicas estão presentes até a intensidade de 40 e 45 dB.

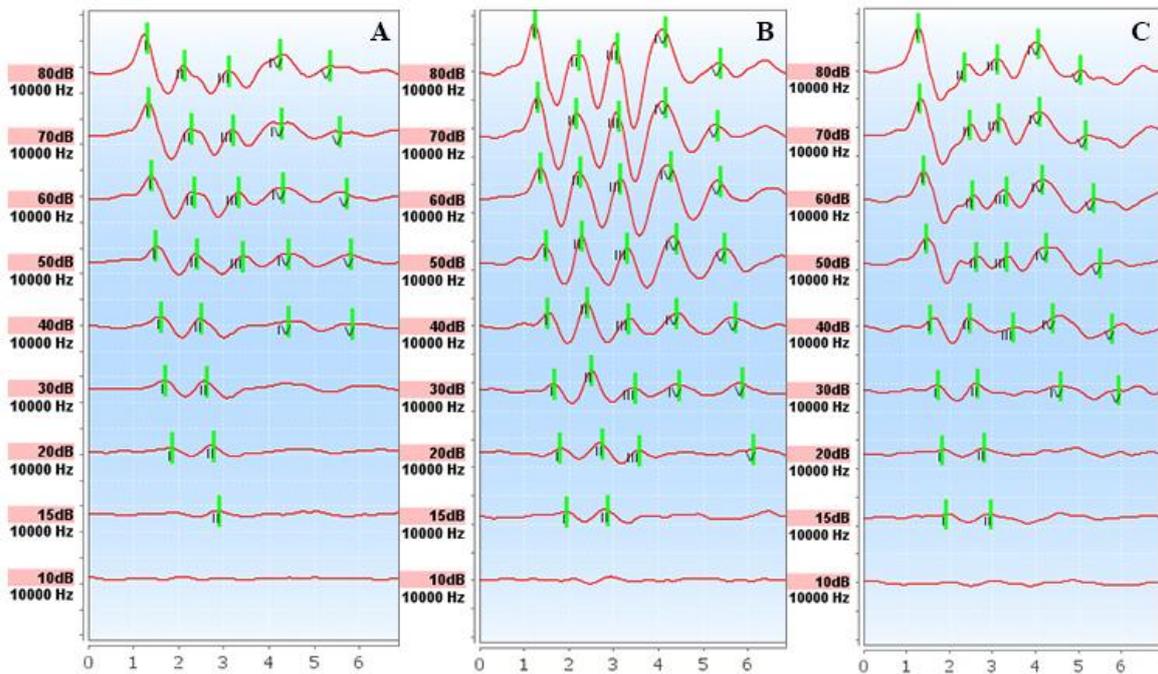


Figura 5: Traçado do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico para a frequência de 10 kHz. **A:** Respostas no PEATE para camundongos sem infecção. **B:** Respostas no PEATE para camundongos com infecção aguda. **C:** Respostas no PEATE para camundongos com infecção crônica.

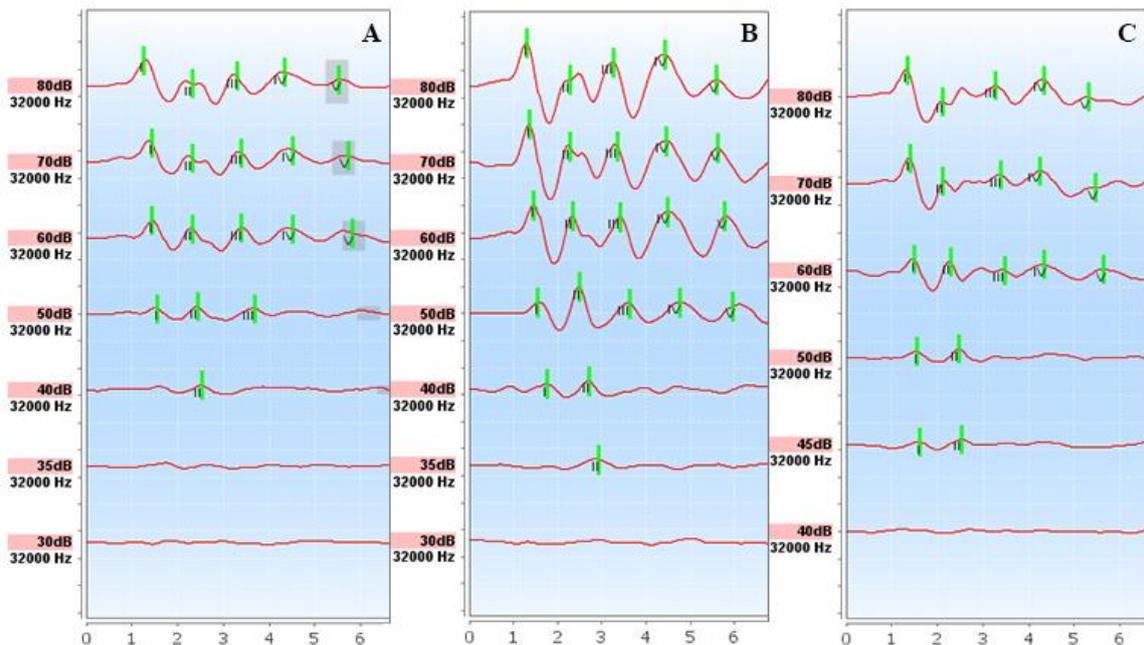


Figura 6: Traçado do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico para a frequência de 32 kHz. **A:** Respostas no PEATE para camundongos sem infecção. **B:**

Respostas no PEATE para camundongos com infecção aguda. C: Respostas no PEATE para camundongos com infecção crônica.

Análise PEATE intragrupos

Na análise intragrupos, para os grupos controle 1 e experimental 1, realizadas no dia 0 (camundongos com um mês) e 14 dpi (camundongos com dois meses), assim como para as comparações realizadas intragrupos para os grupos controle 2 e experimental 2, realizadas no dia 0 (camundongos com um mês de vida) e 42 dpi (camundongos com 3 meses de vida) não se evidenciaram diferenças estatísticas para as latências absolutas das ondas I, II, III, IV e V (tabela 5) e nem para os intervalos interpicos I-II, II-III, II-IV, II-V, I-III, III-V e I-V (tabela 6) obtidos na intensidade de 80 dB ($p > 0,05$).

Tabela 5:

Tabela 5: Médias das latências absolutas, desvio padrão e p valor das ondas I, II, III, IV e V a 80 dB no Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico intragrupos

Grupos	Frequência kHz	Onda I			Onda II			Onda III			Onda IV			Onda V		
		Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p
Controle 1 (1 mês)	10	1,00	0,00	0,34	2,00	0,00	1,00	3,00	0,00	0,34	4,00	0,00	0,34	5,00	0,00	0,34
Controle 1 (2 meses)		1,10	0,32		2,20	0,16		3,10	0,32		4,10	0,32		5,10	0,32	
Controle 1 (1 mês)	16	1,00	0,00	0,34	2,00	0,00	1,00	3,00	0,00	0,34	4,00	0,00	0,34	5,00	0,00	0,34
Controle 1 (2 meses)		1,10	0,32		2,10	0,32		3,10	0,32		4,10	0,32		5,10	0,35	
Controle 1 (1 mês)	24	1,00	0,00	0,89	2,40	0,00	0,55	3,20	0,00	0,56	4,20	0,00	0,89	5,20	0,42	0,56
Controle 1 (2 meses)		1,20	0,32		2,90	0,32		3,80	0,42		4,50	0,53		5,50	0,50	
Controle 1 (1 mês)	32	1,00	0,00	0,90	2,50	0,00	0,54	3,30	0,00	0,59	4,00	0,00	0,76	5,40	0,42	0,90
Controle 1 (2 meses)		1,10	0,32		2,80	0,32		3,90	0,11		4,30	0,30		5,70	0,42	
Experimental 1 (1 mês)	10	1,00	0,00	0,34	2,00	0,00	0,90	3,00	0,00	0,34	4,10	0,32	1,00	5,20	0,42	0,17
Experimental 1 (2 meses)		1,10	0,32		2,10	0,32		3,10	0,32		4,10	0,32		5,00	0,25	
Experimental 1 (1 mês)	16	1,00	0,00	0,34	2,00	0,00	0,34	3,00	0,00	0,34	4,10	0,32	1,00	5,30	0,52	0,68
Experimental 1 (2 meses)		1,10	0,32		2,20	0,25		3,00	0,30		4,00	0,30		5,00	0,23	
Experimental 1 (1 mês)	24	1,00	0,00	0,57	2,30	0,00	0,87	3,40	0,32	0,79	4,10	0,32	1,00	5,40	0,52	1,00
Experimental 1 (2 meses)		1,15	1,03		2,80	1,03		3,70	0,82		4,40	0,72		5,40	0,80	
Experimental 1 (1 mês)	32	1,00	0,00	0,78	2,20	0,00	0,55	3,30	0,00	0,59	4,10	0,32	1,00	5,30	0,48	0,59
Experimental 1 (2 meses)		1,20	0,53		2,60	0,53		3,50	0,46		4,10	0,35		5,40	0,52	
Controle 2 (1 mês)	10	1,00	0,00	1,00	2,00	0,00	1,00	3,00	0,00	1,00	4,00	0,00	1,00	5,00	0,00	0,17
Controle 2 (3 meses)		1,00	0,00		2,10	0,32		3,20	0,35		4,10	0,32		5,20	0,42	
Controle 2 (1 mês)	16	1,00	0,00	1,00	2,00	0,00	1,00	3,00	0,00	1,00	4,00	0,00	1,00	5,10	0,00	0,17
Controle 2 (3 meses)		1,00	0,00		2,10	0,32		3,10	0,32		4,20	0,17		5,40	0,52	
Controle 2 (1 mês)	24	1,00	0,00	1,00	2,00	0,00	1,00	3,00	0,00	0,34	4,00	0,00	0,17	5,10	0,32	0,81
Controle 2 (3 meses)		1,00	0,00		2,15	0,08		3,10	0,32		4,20	0,42		5,40	0,52	
Controle 2 (1 mês)	32	1,20	0,05	0,98	2,00	0,08	1,00	3,00	0,14	0,34	4,00	0,15	1,00	5,10	0,29	1,00
Controle 2 (3 meses)		1,00	0,00		2,15	0,06		3,10	0,32		4,20	0,42		5,80	0,42	
Experimental 2 (1 mês)	10	1,00	0,00	1,00	2,00	0,00	1,00	3,00	0,00	1,00	4,10	0,32	1,00	5,10	0,32	1,00
Experimental 2 (3 meses)		1,00	0,00		2,10	0,32		3,10	0,32		4,00	0,30		5,00	0,30	
Experimental 2 (1 mês)	16	1,00	0,00	1,00	2,00	0,00	1,00	3,00	0,00	1,00	4,10	0,32	1,00	5,30	0,48	1,00
Experimental 2 (3 meses)		1,00	0,00		2,10	0,32		3,00	0,30		4,00	0,20		5,10	0,32	
Experimental 2 (1 mês)	24	1,00	0,00	0,99	2,00	0,00	1,00	3,00	0,00	1,00	4,10	0,32	1,00	5,30	0,48	0,89
Experimental 2 (3 meses)		1,10	0,32		2,15	0,11		3,10	0,32		4,10	0,32		5,10	0,32	
Experimental 2 (1 mês)	32	1,20	0,05	0,87	2,00	0,10	0,87	3,15	0,15	1,00	4,20	0,21	1,00	5,40	0,30	0,96
Experimental 2 (3 meses)		1,00	0,00		2,15	0,14		3,15	0,17		4,10	0,32		5,30	0,48	

Legenda: DP – desvio padrão. P – p valor T Student pareado

Tabela 6: Médias dos intervalos-interpicos em milissegundos, desvio padrão e p valor na intensidade de 80 dB no Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico intragrupos

Grupos	Frequência (kHz)	I-II			II-III			II-IV			II-V			I-III			III-V			I-V		
		Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p
Controle 1 (1 mês)	10	0,85	0,07	0,25	0,94	0,12	0,84	1,95	0,18	0,45	3,03	0,21	0,51	2,00	0,00	1,00	3,90	0,32	0,59	2,00	0,00	0,34
Controle 1 (2 meses)		0,79	0,13		0,93	0,20		1,89	0,29		2,95	0,37		2,00	0,00		4,00	0,47		2,10	0,32	
Controle 1 (1 mês)	16	0,85	0,09	0,90	0,94	0,11	0,60	1,94	0,17	0,98	3,02	0,20	0,71	2,00	0,00	1,00	4,00	0,00	0,34	2,00	0,00	1,00
Controle 1 (2 meses)		0,78	0,11		0,97	0,18		1,94	0,31		2,98	0,31		2,00	0,00		3,90	0,32		2,00	0,00	
Controle 1 (1 mês)	24	0,84	0,08	0,89	0,92	0,06	0,61	1,85	0,12	0,76	2,82	0,13	0,67	2,00	0,00	0,17	4,00	0,00	0,34	2,00	0,00	0,17
Controle 1 (2 meses)		0,85	0,09		0,83	0,20		1,72	0,23		2,78	0,35		1,80	0,42		3,80	0,63		2,20	0,42	
Controle 1 (1 mês)	32	0,84	0,11	0,67	1,04	0,05	0,19	2,08	0,13	0,14	3,20	0,17	0,18	2,00	0,00	1,00	4,00	0,00	0,17	2,00	0,00	2,00
Controle 1 (2 meses)		0,93	0,08		0,96	0,18		1,90	0,32		2,98	0,46		2,00	0,00		3,80	0,42		2,00	0,47	
Experimental 1 (1 mês)	10	0,86	0,17	0,29	1,03	0,17	0,10	1,85	0,17	0,56	2,86	0,31	0,20	2,00	0,00	0,34	4,10	0,32	0,10	2,00	0,00	0,34
Experimental 1 (2 meses)		0,81	0,11		0,90	0,20		1,82	0,19		2,81	0,16		1,90	0,32		3,70	0,67		1,90	0,32	
Experimental 1 (1 mês)	16	0,86	0,14	0,55	0,92	0,15	0,23	1,83	0,20	0,54	2,90	0,32	0,54	2,00	0,00	1,00	4,10	0,32	0,17	2,00	0,00	0,17
Experimental 1 (2 meses)		0,89	0,15		0,88	0,13		1,77	0,15		2,88	0,27		2,00	0,00		4,00	0,00		1,90	0,32	
Experimental 1 (1 mês)	24	0,79	0,09	0,20	1,09	0,11	0,20	1,94	0,13	0,50	2,97	0,23	0,58	2,00	0,00	1,00	4,10	0,32	0,17	2,00	0,00	0,34
Experimental 1 (2 meses)		0,87	0,10		0,92	0,37		1,85	0,29		2,93	0,28		2,00	0,47		3,90	0,32		1,90	0,32	
Experimental 1 (1 mês)	32	0,84	0,07	0,27	0,88	0,08	0,50	1,69	0,15	0,76	2,67	0,21	0,98	2,00	0,00	0,34	3,80	0,32	0,2	2,10	0,32	0,81
Experimental 1 (2 meses)		0,91	0,14		0,82	0,24		1,64	0,47		2,64	0,52		1,90	0,32		3,50	0,53		1,80	0,42	
Controle 2 (1 mês)	10	0,83	0,11	0,91	0,91	0,09	0,90	1,86	0,13	0,89	2,95	0,18	0,78	2,00	0,00	1,00	3,80	0,42	0,17	2,00	0,00	1,00
Controle 2 (3 meses)		0,83	0,10		0,90	0,08		1,90	0,09		3,10	0,18		2,00	0,00		4,00	0,00		2,00	0,00	
Controle 2 (1 mês)	16	0,80	0,13	0,31	0,96	0,16	0,24	1,94	0,17	0,96	2,98	0,25	0,95	2,00	0,00	1,00	3,90	0,32	1,00	2,00	0,00	1,00
Controle 2 (3 meses)		0,84	0,10		1,03	0,09		1,97	0,09		3,30	0,26		2,00	0,00		4,20	0,42		2,30	0,48	
Controle 2 (1 mês)	24	0,80	0,05	0,48	1,03	0,10	0,17	1,94	0,11	0,87	3,11	0,23	0,98	2,00	0,00	1,00	4,00	0,00	1,00	2,00	0,00	1,00
Controle 2 (3 meses)		0,82	0,04		0,80	0,08		1,87	0,14		3,09	0,17		2,00	0,00		4,00	0,00		2,00	0,00	
Controle 2 (1 mês)	32	0,82	0,07	1,00	1,00	0,11	1,00	1,94	0,12	0,76	3,00	0,24	1,00	1,82	0,09	0,89	3,90	0,24	1,00	2,10	0,17	1,00
Controle 2 (3 meses)		0,83	0,05		0,83	0,08		1,88	0,11		2,90	0,20		2,00	0,00		4,20	0,42		2,10	0,32	
Experimental 2 (1 mês)	10	0,88	0,07	0,27	0,93	0,13	0,56	1,97	0,16	0,14	3,14	0,27	0,23	2,00	0,00	1,00	4,10	0,32	0,34	2,10	0,32	1,00
Experimental 2 (3 meses)		0,84	0,08		0,88	0,07		1,80	0,10		2,97	0,24		2,00	0,00		4,00	0,00		2,10	0,32	
Experimental 2 (1 mês)	16	0,88	0,08	0,62	1,00	0,15	0,39	2,03	0,17	0,23	3,17	0,24	0,53	2,00	0,00	1,00	4,00	0,00	1,00	2,00	0,00	0,34
Experimental 2 (3 meses)		0,83	0,06		0,94	0,12		1,86	0,17		3,08	0,28		2,00	0,00		4,00	0,00		2,10	0,32	
Experimental 2 (1 mês)	24	0,86	0,06	0,58	1,05	0,12	0,12	2,06	0,14	0,16	3,29	0,27	0,14	2,00	0,00	1,00	4,10	0,32	1,00	2,10	0,32	0,34
Experimental 2 (3 meses)		0,84	0,08		0,97	0,10		1,95	0,15		3,13	0,20		2,00	0,00		4,10	0,32		2,00	0,00	
Experimental 2 (1 mês)	32	0,83	0,05	1,00	1,00	0,09	0,98	2,10	0,14	0,97	3,30	0,22	0,80	1,89	0,11	0,86	4,13	0,25	0,89	2,25	0,15	0,97
Experimental 2 (3 meses)		0,84	0,09		0,86	0,14		1,93	0,13		3,10	0,23		2,00	0,00		4,20	0,42		2,20	0,42	

Legenda: DP – desvio padrão. P – p valor T Student pareado.

Análise PEATE entregrupos

Ao comparar as respostas do PEATE do grupo controle 1 com o grupo experimental 1, e grupo controle 2 com o grupo experimental 2, na intensidade de 80 dB não foram observadas diferenças estatísticas para as latências absolutas das ondas I, II, III, IV, e V, e nem para os intervalos interpicos: I-II, II-III, II-V, II-V e I-III, III-V, I-V, em todas as frequências pesquisadas ($p > 0,05$) (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Médias das latências absolutas, desvio padrão e p valor das ondas I, II, III, IV e V a 80 dB no Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico apresentadas pelos grupos controles e experimentais

Frequência	Grupos	Onda I			Onda II			Onda III			Onda IV			Onda V		
		Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p
10 kHz	Controle 1	1,10	0,32	1,00	2,20	0,16	1,00	3,10	0,32	1,00	4,10	0,32	1,00	5,10	0,32	1,00
	Experimental 1	1,10	0,32		2,10	0,32		3,10	0,32		4,10	0,32		5,00	0,25	
	Controle 2	1,00	0,00	1,00	2,10	0,32	1,00	3,20	0,35	1,00	4,10	0,32	1,00	5,20	0,42	1,00
	Experimental 2	1,00	0,00		2,10	0,32		3,10	0,32		4,00	0,30		5,00	0,30	
16 kHz	Controle 1	1,10	0,32	1,00	2,10	0,32	1,00	3,10	0,32	1,00	4,10	0,32	1,00	5,10	0,35	1,00
	Experimental 1	1,10	0,32		2,20	0,25		3,00	0,30		4,00	0,30		5,00	0,23	
	Controle 2	1,00	0,00	1,00	2,10	0,32	1,00	3,10	0,32	1,00	4,20	0,17	1,00	5,40	0,52	1,00
	Experimental 2	1,00	0,00		2,10	0,32		3,00	0,30		4,00	0,20		5,10	0,32	
24 kHz	Controle 1	1,20	0,32	0,80	2,90	0,32	0,35	3,80	0,42	0,14	4,50	0,53	0,35	5,50	0,50	0,45
	Experimental 1	1,15	1,03		2,80	1,03		3,70	0,82		4,40	0,72		5,40	0,80	
	Controle 2	1,00	0,00	0,34	2,15	0,08	1,00	3,10	0,32	1,00	4,20	0,42	1,00	5,40	0,52	1,00
	Experimental 2	1,10	0,32		2,15	0,11		3,10	0,32		4,10	0,32		5,10	0,32	
32 kHz	Controle 1	1,10	0,32	0,85	2,80	0,32	0,35	3,90	0,11	0,63	4,30	0,30	0,64	5,70	0,42	0,10
	Experimental 1	1,20	0,53		2,60	0,53		3,50	0,46		4,10	0,35		5,40	0,52	
	Controle 2	1,00	0,00	1,00	2,15	0,06	1,00	3,10	0,32	1,00	4,20	0,42	1,00	5,80	0,42	1,00
	Experimental 2	1,00	0,00		2,15	0,14		3,15	0,17		4,10	0,32		5,30	0,48	

Legenda: DP – desvio padrão. P – p valor T Student

Tabela 8: Médias dos intervalos-interpicos em milissegundos, desvio padrão e p valor a 80 dB no Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico apresentadas pelos grupos controles e experimentais

Frequência	Grupos	I-II			II-III			II-IV			II-V			I-III			III-V			I-V		
		Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p	Média	DP	p
10 kHz	Controle 1	0,79	0,13	0,80	0,93	0,20	0,78	1,89	0,29	0,56	2,95	0,37	0,29	2,00	0,00	0,34	4,00	0,47	0,26	2,10	0,32	0,17
	Experimental 1	0,81	0,11		0,90	0,20		1,82	0,19		2,81	0,16		1,90	0,32		3,70	0,67		1,90	0,32	
	Controle 2	0,83	0,10	0,69	0,90	0,08	0,55	1,90	0,09	0,60	3,10	0,18	0,19	2,00	0,00	1,00	4,00	0,00	1,00	2,00	0,00	1,00
	Experimental 2	0,84	0,08		0,88	0,07		1,80	0,10		2,97	0,24		2,00	0,00		4,00	0,00		2,10	0,32	
16 kHz	Controle 1	0,78	0,11	0,74	0,97	0,18	0,19	1,94	0,31	0,15	2,98	0,31	0,54	2,00	0,00	1,00	3,90	0,32	0,34	2,00	0,00	0,34
	Experimental 1	0,89	0,15		0,88	0,13		1,77	0,15		2,88	0,27		2,00	0,00		4,00	0,00		1,90	0,32	
	Controle 2	0,84	0,10	0,77	1,03	0,09	0,69	1,97	0,09	0,57	3,30	0,26	0,81	2,00	0,00	1,00	4,20	0,42	0,17	2,30	0,48	0,29
	Experimental 2	0,83	0,06		0,94	0,12		1,86	0,17		3,08	0,28		2,00	0,00		4,00	0,00		2,10	0,32	
24 kHz	Controle 1	0,85	0,09	0,55	0,83	0,20	0,56	1,72	0,23	0,29	2,78	0,35	0,31	1,80	0,42	0,33	3,80	0,63	0,66	2,20	0,42	0,89
	Experimental 1	0,87	0,10		0,92	0,37		1,85	0,29		2,93	0,28		2,00	0,47		3,90	0,32		1,90	0,32	
	Controle 2	0,82	0,04	0,51	0,80	0,08	0,79	1,87	0,14	0,83	3,09	0,17	0,76	2,00	0,00	1,00	4,00	0,00	0,33	2,00	0,00	1,00
	Experimental 2	0,84	0,08		0,97	0,10		1,95	0,15		3,13	0,20		2,00	0,00		4,10	0,32		2,00	0,00	
32 kHz	Controle 1	0,93	0,08	0,70	0,96	0,18	0,17	1,90	0,32	0,17	2,98	0,46	0,14	2,00	0,00	0,34	3,80	0,42	0,18	2,00	0,47	
	Experimental 1	0,91	0,14		0,82	0,24		1,64	0,47		2,64	0,52		1,90	0,32		3,50	0,53		1,80	0,42	0,33
	Controle 2	0,83	0,05	0,88	0,83	0,08	0,25	1,88	0,11	0,34	2,90	0,20	0,10	2,00	0,00	1,00	4,20	0,42	1,00	2,10	0,32	0,56
	Experimental 2	0,84	0,09		0,86	0,14		1,93	0,13		3,10	0,23		2,00	0,00		4,20	0,42		2,20	0,42	

Legenda: DP – desvio padrão. P – p valor T Student.

Limiar eletrofisiológico entregrupos

Na comparação entre os grupos controles 1 e experimental 1, e grupo controle 2 e experimental 2, não foram observadas diferenças estatísticas significantes em nenhuma das frequências pesquisadas ($p>0,05$).

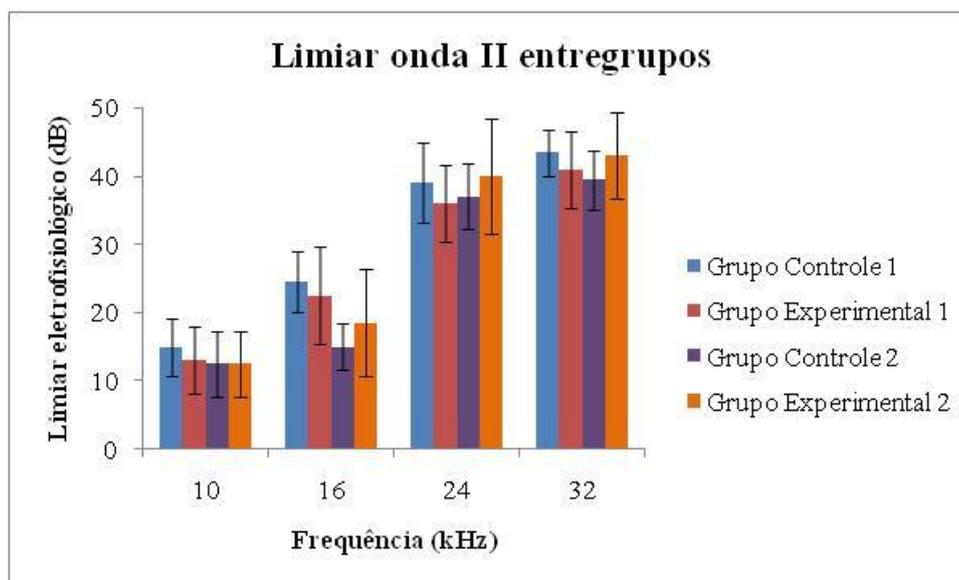


Figura 7: Limiar eletrofisiológico apresentados pelos grupos controles e experimentais, para as fases aguda e crônica recente de toxoplasmose adquirida ($p>0,05$).

Limiar eletrofisiológico intragrupos

Os grupos controle 1 e experimental 1, que foram avaliados auditivamente no dia 0 da infecção (camundongos com 1 mês de vida), e 14 dpi (camundongos com 2 meses de vida), não apresentaram diferenças estatísticas para as frequências de 10 e 16 kHz. Para as frequências de 24 e 32 kHz foi observado um aumento significativo desse limiar em relação aos respectivos grupos controle 1 e experimental 1 no dia zero de infecção.

Para os grupos controle 2 e experimental 2, avaliados auditivamente no dia 0 da infecção (camundongos com 1 mês de vida), e 42 dpi (camundongos com 3 meses de vida), as frequências de 10 e 16 kHz não mostraram diferenças estatísticas. Também para estes grupos, foi observado um aumento significativo do limiar para as frequências de 24 e 32 kHz em relação aos limiares observados no dia zero de infecção.

Limiar intragrupos onda II

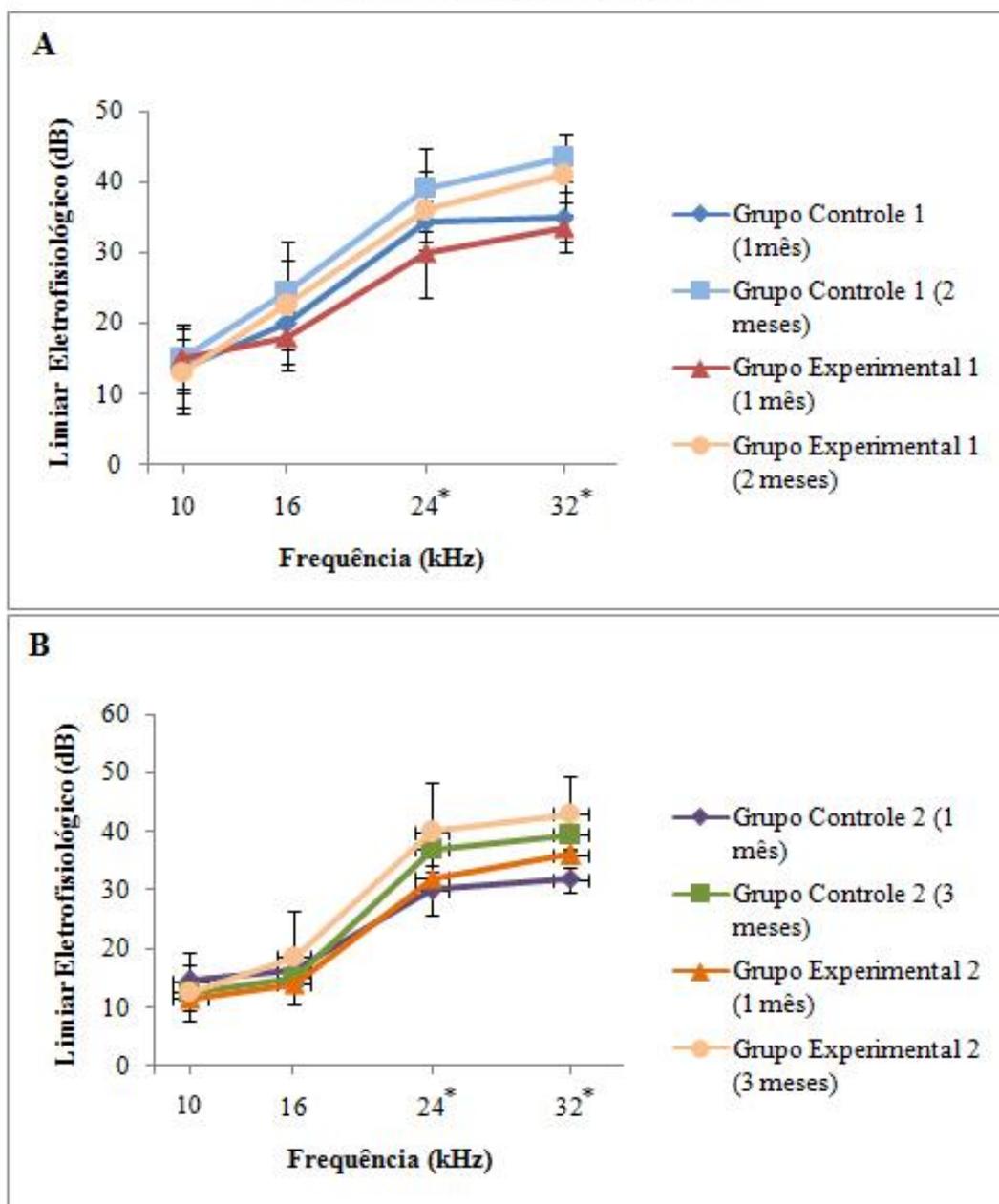


Figura 8: Limiar eletrofisiológico da onda II na comparação intragrupos. **A:** Limiares da onda II intragrupos apresentadas pelos grupos controle 1 e experimental 1. **B:** Limiares da onda II intragrupos apresentadas pelos grupos controle 2 e experimental 2. * $p \leq 0,05$.

Microscopia eletrônica das cócleas dos camundongos infectados pela cepa TgCTBr5

Como exemplificado na figura 9, não foram observadas alterações morfológicas ou perdas de células ciliadas externas e internas, tanto para os animais infectados, quanto para os animais do grupo controle.

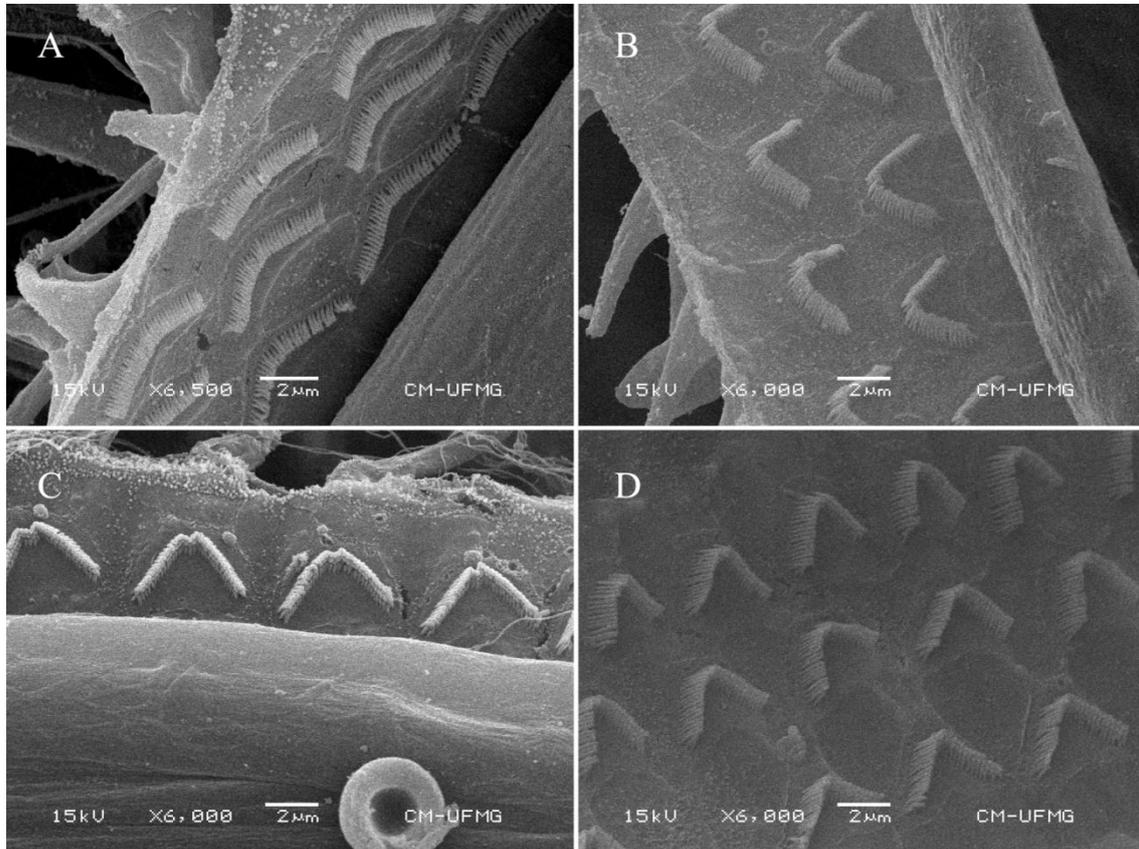


Figura 9: microscopia eletrônica de varredura das cócleas de camundongos dos grupos controles e experimentais. **A:** cóclea de um camundongo do grupo controle 1. **B:** cóclea de um camundongo do grupo experimental 1. **C:** cóclea de um camundongo do grupo controle 2. **D:** cóclea de um camundongo do grupo experimental 2.

Análise histopatológica das cócleas dos camundongos infectados pela cepa TgCTBr5

Nos grupos experimentais investigados não foi observada a presença do parasita *T. gondii* (Figura 10).

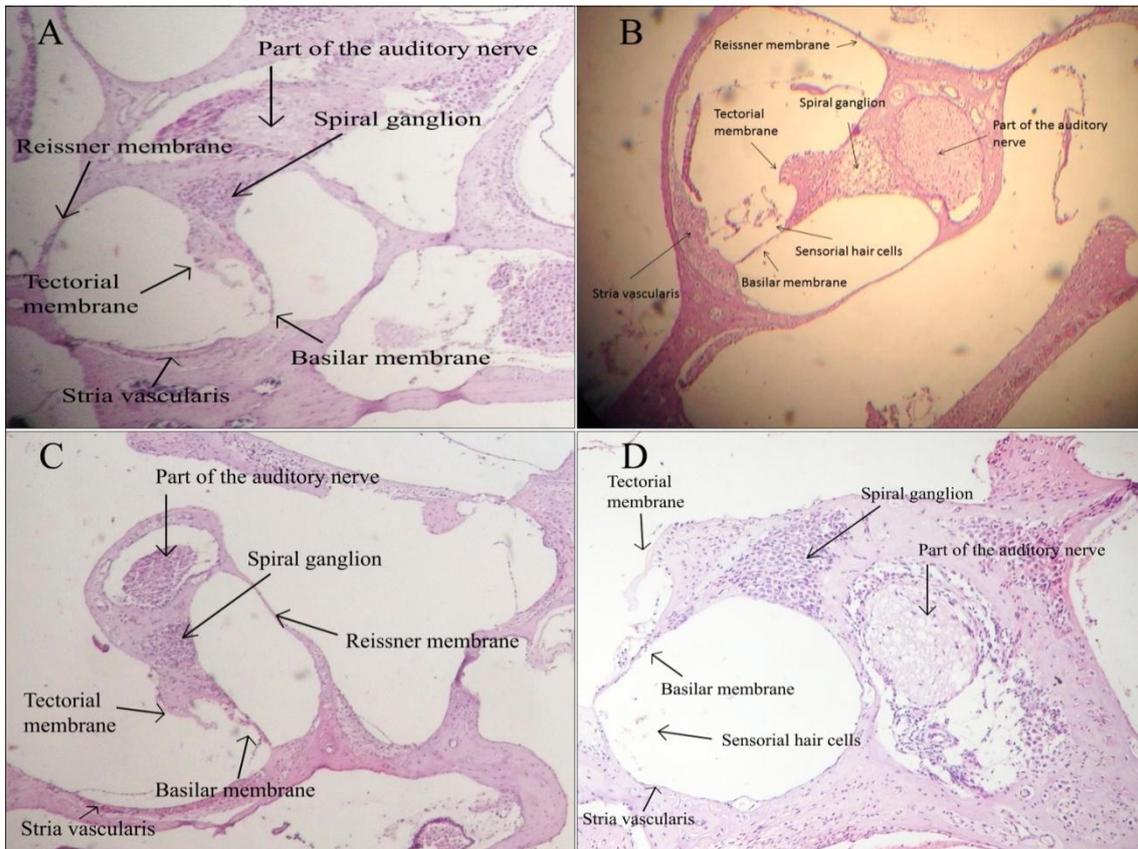


Figura 10: análise histopatológica das cócleas de camundongos dos grupos controles e experimentais. **A:** cóclea de um camundongo do grupo controle 1. **B:** cóclea de um camundongo do grupo experimental 1. **C:** cóclea de um camundongo do grupo controle 2. **D:** cóclea de um camundongo do grupo experimental 2.

Análise histopatológica cérebro e tronco-encefálico

Os grupos controles 1 e 2 não apresentaram quaisquer alterações no cérebro e tronco-encefálico, tendo estas estruturas permanecido com aspecto normal. O *T. gondii* não foi observado nos cérebros e tronco-encefálicos dos grupos experimentais. Entretanto, no grupo experimental 1 seis camundongos apresentaram meninge ligeiramente espessada, em outros três, foi identificado sangue na meninge, e em um único camundongo o aspecto de cérebro e tronco-encefálico estava normal. Em relação ao grupo experimental 2, dois camundongos apresentaram meninge ligeiramente espessada e nos demais observou-se presença de linfonodo no sistema nervoso central (figura 10).

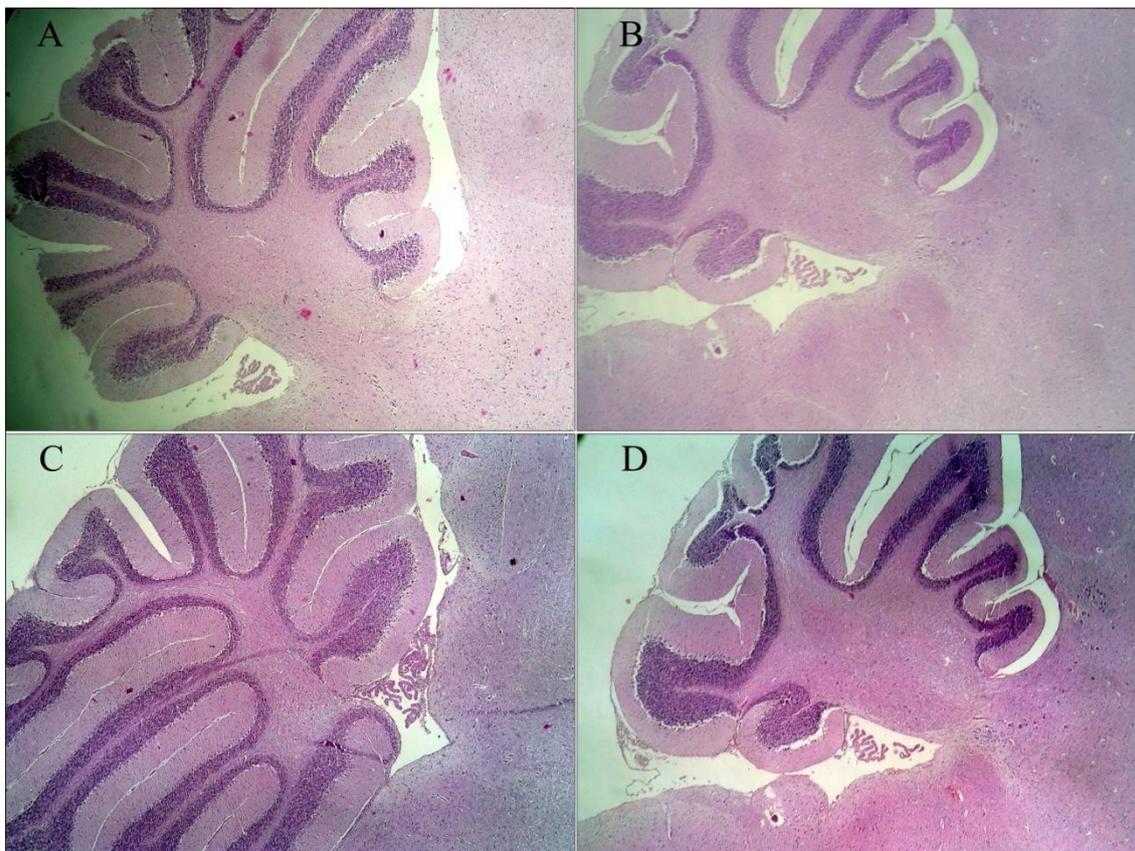


Figura 11: análise histopatológica dos cérebros e tronco-encefálicos dos grupos controles e experimentais. **A:** sistema nervoso central de um camundongo do grupo controle 1. **B:** sistema nervoso central de um camundongo do grupo experimental 1. **C:** sistema nervoso central de um camundongo do grupo controle 2. **D:** sistema nervoso central de um camundongo do grupo experimental 2.

Discussão

A toxoplasmose adquirida é uma doença cosmopolita, que afeta grande parte da população mundial e, devido à sua alta prevalência possui grande importância para a saúde pública (Ministério da Saúde, 2010). O quadro clínico dessa patologia é variável, sendo sugerida em alguns poucos relatos de casos a possibilidade de perda auditiva (Bohadana et al., 1998; Katholm et al., 1991; Rösch et al., 1998; Schlottmann et al., 1996).

Nos poucos estudos encontrados na literatura sobre o tema, foi observado que os indivíduos com toxoplasmose adquirida que apresentaram perda de audição, mesmo após tratamento adequado, a perda auditiva permaneceu como uma seqüela (Rösch et al., 1998), ou melhorou apenas parcialmente (Katholm et al., 1991). Em um caso, a perda auditiva manifestou-se de modo súbito (Schlottmann et al., 1996), sendo sugerido

pelos autores do estudo a necessidade da toxoplasmose adquirida ser considerada no processo de diagnóstico de perdas auditivas súbitas (Schlottmann et al., 1996).

Os mecanismos patofisiológicos da toxoplasmose adquirida na audição ainda são desconhecidos, sendo necessário o desenvolvimento de modelos experimentais que proporcionem melhor compreensão dos mecanismos auditivos nessa infecção. Não há na literatura estudos que tenham caracterizado o sistema auditivo periférico e central de camundongos BALB/c infectados pelo *T. gondii*, muito embora este animal seja um modelo experimental recorrente em diversos estudos auditivos (Baba et al., 2006; Kou et al., 2011; Li et al., 2014; Willott et al., 1998) e em pesquisas de toxoplasmose adquirida experimental (Brandão et al., 2009; Carneiro et al., 2013; Veloso et al., 2015).

Acredita-se que exista associação entre a virulência da cepa de *T. gondii* no camundongo com a gravidade da doença nos humanos (Ajzenberg et al., 2002; Boothroyd and Grigg, 2002; Darde et al., 1998). Além disso, diferentes cepas, de diferentes graus de virulência podem proporcionar alterações e manifestações clínicas distintas. A cepa TgCTBr5 utilizada neste estudo, foi isolada de um recém-nascido com toxoplasmose congênita, que não apresentou sinais clínicos desta doença no nascimento. Essa cepa é de baixa virulência para os camundongos BALB/c (Carneiro et al., 2013) e, talvez por este motivo os grupos experimentais tenham apresentado peso corporal e respostas auditivas cocleares e centrais semelhantes às dos grupos controles, tanto para a fase aguda, quanto para a fase crônica recente de toxoplasmose.

Neste trabalho foram realizadas duas comparações distintas, sendo uma entre grupos controles e experimentais, na qual os camundongos tinham exatamente a mesma idade, e só se diferiam em relação à presença do *T. gondii*, e a outra intragrupos, em que os camundongos dos grupos controles se diferiam apenas no fator idade, e os camundongos dos grupos experimentais se diferenciavam em relação a idade e a presença do parasita. Na análise das EOAPD entre camundongos infectados e não infectados, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas, indicando que a cepa brasileira utilizada não afetou as células ciliadas externas correspondentes às frequências que foram pesquisadas. Todos os quatro grupos apresentaram um mesmo padrão nas respostas cocleares, as amplitudes do produto de distorção e relação S/R foram menores nas frequências f2 24 e 32 kHz, fato este também evidenciado por outros autores (Jimenez et al., 1999).

Na análise das latências e intervalos interpicos apresentados pelos grupos controles e experimentais, na intensidade de 80 dB no PEATE, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controles e experimentais, tanto para a fase aguda, quanto para a fase crônica recente de toxoplasmose adquirida. Além disso, a morfologia das ondas foi semelhante para os quatro grupos. Esses dados sugerem que para ambas as fases desta infecção, a via auditiva central constituída pelas estruturas: nervo auditivo (onda I), núcleos cocleares (onda II), complexo olivar superior (onda III), lemnisco lateral e colículo inferior (onda IV), corpo geniculado medial e radiações talamocorticais (onda V) (Henry, 1979); não foi prejudicada pela cepa TgCTBr5.

Além das latências e intervalos interpicos, realizou-se também a pesquisa do limiar eletrofisiológico. A escolha da onda II como limiar eletrofisiológico ocorreu por ter sido a última onda a desaparecer, concordante com estudos prévios (Amsallem and Andrieu-Guitrancourt, 1985; Freitas et al., 2009; Kamimura et al., 1999). Mais uma vez a análise comparativa entre os grupos experimentais e seus respectivos grupos controles não apresentou diferença estatística significativa. Estes resultados novamente sugerem que a cepa TgCTBr5 não prejudicou o sistema auditivo central, mais especificamente o núcleo coclear, estrutura geradora da onda II no camundongo BALB/c (Henry, 1979).

Em relação às comparações realizadas intrasujeitos observou-se influência do fator idade, tanto nas EOAPD quanto no PEATE. Os grupos controle 2 e experimental 2, 32 dpi, apresentaram uma redução da amplitude do produto de distorção e na relação S/R nas frequências de 24 e 32 kHz a partir da intensidade de 55 dB. À medida que a idade dos camundongos BALB/c aumenta, observa-se significativa redução na amplitude e relação S/R das EOAPD, sendo as altas frequências as primeiras a serem afetadas (Jimenez et al., 1999). Segundo autor (Willott et al., 1998), a partir de aproximadamente dois meses de vida há uma perda de células ciliadas externas na região basal da cóclea dos camundongos BALB/c, e aos 32 dpi os camundongos deste estudo já estavam com três meses de vida.

Na análise intragrupos, o limiar eletrofisiológico do PEATE também foi influenciado pelo aumento da idade, uma vez que observou-se aumento do limiar da onda II, nas frequências de 24 e 32 kHz, como era esperado, uma vez que essas são as primeiras frequências afetadas pela presbiacusia (Idrizbegovic et al., 2006; Johnson et al., 2000; Willott et al., 1998). Mesmo com apenas 50 dias de vida, os camundongos BALB/c já apresentam respostas ruins no PEATE nas frequências altas. Por este

motivo, alguns autores optam por não realizar o PEATE na frequência de 32 kHz nesta linhagem de camundongos (Johnson et al., 2000; Willott et al., 1998). De acordo com a literatura, o limiar eletrofisiológico desta linhagem de camundongos, para as frequências de 10 e 16 kHz começa a piorar a partir dos 4 meses de vida (Willott et al., 1998), corroborando com os achados dos limiares eletrofisiológicos para estas frequências no presente estudo. Embora tenha sido observado aumento significativo do limiar para a onda II nas frequências de 24 e 32 kHz, os valores absolutos das latências e intervalos interpicos em todas as frequências pesquisadas, não foram influenciados de modo significativamente estatístico pelo envelhecimento dos camundongos.

Em relação à microscopia eletrônica da cóclea, cuja análise foi descritiva, o parasita *T. gondii* não foi identificado nos grupos experimentais, assim como não foram evidenciadas diferenças entre as células ciliadas externas dos camundongos infectados e não infectados, que mantiveram-se presentes, com arquitetura organizada e íntegra. Estes dados corroboram com a ausência de diferenças significativas nas EOAPD entre os grupos controles e experimentais referentes ao presente estudo. A avaliação histopatológica da cóclea também foi descritiva, e o parasita não foi identificado nos grupos experimentais tanto para a fase aguda quanto para a fase crônica recente de toxoplasmose adquirida. São relatadas na literatura a presença do *T. gondii* na orelha interna e lesões permanentes no ligamento espiral e na cóclea por meio da análise histopatológica, com a identificação de depósitos de cálcio em casos de toxoplasmose congênita (Kelemen G, 1958; Salviz et al., 2014). Entretanto não há relatos sobre achados cocleares histopatológicos em casos de toxoplasmose adquirida.

Todos os cérebros e tronco-encefálicos foram analisados apenas por meio da histopatologia. Os grupos controles 1 e 2 não apresentaram quaisquer alterações nestas estruturas, que mantiveram-se preservadas e sem presença de lesões. Taquizoítos e cistos de *T. gondii* não foram visualizados no cérebro e tronco-encefálico dos camundongos dos grupos experimentais. No entanto no grupo experimental 1 para a fase aguda da toxoplasmose adquirida, seis camundongos apresentaram meninge levemente espessada, e três apresentaram sangue na meninge. Esse sangue pode ser justificado pelo procedimento de retirada dos órgãos após a eutanásia dos animais.

Em outro estudo experimental com a cepa TgCTBr5 não foram observadas lesões no sistema nervoso central durante a fase aguda da toxoplasmose (Veloso et al., 2015). A ausência de alterações cerebrais na fase aguda da doença, após infecção do *T. gondii* por via oral é relatada por outros autores (Djurković-Djaković et al., 2006;

Dubey et al., 2012; Liesenfeld et al., 1996; Mordue et al., 1999; Smiley ST, Lanthier PA, Couper KN, Szaba FM, Boyson JE, Chen W, 2005).

No grupo experimental 2, fase crônica recente da toxoplasmose, dois camundongos apresentaram meninge ligeiramente espessada e nos demais observou-se presença de alguns linfócitos no sistema nervoso central. Após 30 dias de infecção já foi relatada a presença de cistos teciduais no cérebro de camundongos infectados pela cepa TgCTBr5 (Pinheiro, 2014). Nessa etapa da doença é comum que o sistema nervoso central dos camundongos apresente lesões, tais como infiltrado inflamatório perivascular, nódulos microgliais e destruição de neurônios (Luft BJ, Conley F, Remington JS, Laverdiere M, Wagner KF, Levine JF, Craven PC, Strandberg DA, File TM, Rice N, 1983; Pinheiro, 2014). O cérebro é o último órgão a ser atingido pelo *T. gondii*, uma vez que a barreira hematoencefálica atrasa o influxo de células infectadas, mediadores de inflamação e anticorpos ao cérebro, que passa a ter maior importância patológica na fase crônica da infecção (Dubey et al., 2012; Frenkel JK, 1988).

Conclusão

Este estudo sugere que a cepa TgCTBr5 não prejudica a audição periférica e central dos camundongos BALB/c, tanto na fase aguda, quanto na fase crônica recente da toxoplasmose adquirida. É necessário a realização de mais estudos na área, utilizando cepas de *T. gondii* com diferentes graus de patogenicidade para os camundongos.

Referências

- Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., Dardé, M.-L., 2002. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 186, 684–689.
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, D., ML., 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34, 1185–1196.
- Amsallem, P., Andrieu-Guitrancourt, J., 1985. [Experimental study of the ototoxicity of cisplatinum]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 102, 365–372.
- Baba, S., Iwai, H., Inaba, M., Kawamoto, K., Omae, M., Yamashita, T., Ikehara, S., 2006. Transfer of accelerated presbycusis by transplantation of bone marrow cells

- from senescence-accelerated mice. *Brain Res.* 1120, 93–99.
- Bohadana, S.C., Lima, S. de, Maia, L.M.S. V., Gonzalez, F., Silveira, Em.G.C., Júnior, O.M., Rausís, M.B.G., Silveira, J.A.M. da, 1998. Surdez Súbita como Primeira Manifestação da Síndrome da imunodeficiência Adquirida. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 64, 151–156.
- Boothroyd, J.C., Grigg, M.E., 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: Do different strains cause different disease? *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 438–442.
- Brandão, G.P., Melo, M.N., Gazzinelli, R.T., Caetano, B.C., Ferreira, A.M., Silva, L.A., Vitor, R.W.A., 2009. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: Involvement of IFN- γ and IL-10. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 241–245.
- Carneiro, A.C.A.V., Andrade, G.M., Costa, J.G.L., Pinheiro, B.V., Vasconcelos-Santos, D.V., Ferreira, A.M., Su, C., José Nélio Januário, Vitor, R.W.A., 2013. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 51, 901–907.
- Carvalho, C.M.C.N., Farhat, C.K., 1999. Toxoplasmose adquirida. *J. Pediatr. (Rio. J.)* 75, S63.
- Darde, M.L., Villena, I., Pinon, J.M., Beguinot, I., 1998. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana [1]. *J. Clin. Microbiol.* 36, 324.
- de Melo Ferreira, A., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., Melo, M.N., 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.* 6, 22–31.
- Djurković-Djaković, O., Klun, I., Khan, A., Nikolić, A., Knežević-Ušaj, S., Bobić, B., Sibley, L.D., 2006. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes Infect.* 8, 2206–2212. doi:10.1016/j.micinf.2006.04.016
- Dornelas, S.A., 2013. Avaliação da audição periférica e central em pré-escolares com toxoplasmose congênita diagnosticada e tratada no primeiro ano de vida.
- Dubey, J.P., Ferreira, L.R., Martins, J., McLEOD, R., 2012. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on

- pathogenesis and mortality. *Parasitology* 139, 1–13.
doi:10.1017/S0031182011001673
- Ferreira, I.M.R., Vidal, J.E., de Mattos, C. de C.B., de Mattos, L.C., Qu, D., Su, C., Pereira-Chiocola, V.L., 2011. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp. Parasitol.* 129, 190–195.
- Filha, E.S., Oliveira, S.M., 2009. TOXOPLASMOSE 13–15.
- Freitas, M.R. De, Anne, G., Brito, D.C., Junior, D.C., Gomes, R.M., Ribeiro, R.D.A., 2009. Avaliação da sensibilidade das emissões otoacústicas produtos de distorção e dos potenciais auditivos evocados de tronco encefálico na ototoxicidade por cisplatina em ratos. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 75, 476–484.
- Frenkel JK, 1988. . Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today* 4., : 273-8.
- Fux, B., Rodrigues, C. V., Portela, R.W., Silva, N.M., Su, C., Sibley, D., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., 2003. Role of Cytokines and Major Histocompatibility Complex Restriction in Mouse Resistance to Infection with a Natural Recombinant Strain (Type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 71, 6392–6401.
doi:10.1128/IAI.71.11.6392-6401.2003
- G, K., 1958. Toxoplasmosis and Congenital Deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg. Neck Surg* 68, 547–61.
- Gilbert, R., 2009. Treatment for congenital toxoplasmosis: Finding out what works. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 305–311. doi:10.1590/S0074-02762009000200026
- Golde, W.T., Gollobin, P., Rodriguez, L.L., 2005. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim. (NY)*. 34, 39–43.
- Henry, K.R., 1979. Auditory brainstem volume-conducted responses: origins in the laboratory mouse. *J. Am. Aud. Soc.* 4, 173–178.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* Comprises of Parasite Three Clonal Lineages : Correlation with Human Disease Genotype. *Oxford Univ. Press behalf Infect. Dis. Soc. Am.* 172, 1561–1566.
- Idrizbegovic, E., Salman, H., Niu, X., Canlon, B., 2006. Presbycusis and calcium-binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus of BALB/c mice. *Hear. Res.* 216–217, 198–206. doi:10.1016/j.heares.2006.01.009
- Jimenez, a M., Stagner, B.B., Martin, G.K., Lonsbury-Martin, B.L., 1999. Age-related loss of distortion product otoacoustic emissions in four mouse strains. *Hear. Res.* 138, 91–105.

- Joint Committee on Infant Hearing. Year 2007 position statement: principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. *Pediatrics*. 2007;120(4):898-921.
- Johnson, K.R., Zheng, Q.Y., Erway, L.C., 2000. A major gene affecting age-related hearing loss is common to at least ten inbred strains of mice. *Genomics* 70, 171–180. doi:10.1006/geno.2000.6377
- Jones, J.L., Kruszon-moran, D., Wilson, M., McQuillan, G., Navin, T., McAuley, J.B., 2001. *Toxoplasma gondii* Infection in the United States : Seroprevalence and Risk Factors. *Am. Journal Epidemiol.* 154, 357–365.
- Kamimura, T., Whitworth, C.A., Rybak, L.P., 1999. Effect of 4-methylthiobenzoic acid on cisplatin-induced ototoxicity in the rat. *Hear. Res.* 131, 117–127.
- Katholm, M., Johnsen, N.J., Siim, C., Willumsen, L., 1991. Bilateral sudden deafness and acute acquired toxoplasmosis. *J. Laryngol. Otol.* 105, 115–118.
- Kou, Z.Z., Zhang, Y., Zhang, T., Li, H., Li, Y.Q., 2011. Age-related increase in PKC gamma expression in the cochlear nucleus of hearing impaired C57BL/6J and BALB/c mice. *J. Chem. Neuroanat.* 41, 20–24.
- Li, X., Shi, X., Qiao, Y., Xu, K., Zeng, L., Wang, C., Xu, Z., Niu, H., 2014. Observation of permeability of blood-labyrinth barrier during cytomegalovirus-induced hearing loss. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 78, 995–999.
- Liesenfeld, O., Kosek, J., Remington, J.S., Suzuki, Y., 1996. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 184, 597–607. doi:10.1084/jem.184.2.597
- Luft BJ, Conley F, Remington JS, Laverdiere M, Wagner KF, Levine JF, Craven PC, Strandberg DA, File TM, Rice N, M.-C.F., 1983. Outbreak of central-nervous system toxoplasmosis in western Europe and North America. *Lancet* 1, : 781-4.
- Ministério da Saúde, 2010. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. *Cad. Saude Publica* 22, 2498–2498.
- Montoya, J., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet Semin.* 363, 1965–1976.
- Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M., Sibley, L.D., 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* 190, 1783–92. doi:10.1084/jem.190.12.1783
- Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-

- virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 561–569.
- Pinheiro, B.V., 2014. Toxoplasmose congênita humana: Caracterização de cepas de *Toxoplasma gondii* em linhagens isogênicas de camundongos.
- Rösch, D., Handrick, W., Lietz, R., Blatz, R., König, E., 1998. Erworbene Toxoplasmose mit zerebraler Beteiligung und nachfolgender Hörstörung. *Klin. Pädiatrie*.
- Salviz, M., Montoya, J.G., Nadol, J.B., Santos, F., 2014. Otopathology in Congenital Toxoplasmosis. *Otol. Neurotol.* 34, 1165–1169. doi:10.1097/MAO.0b013e31828297b6.Otopathology
- Schlottmann, A., Kleemann, D., Kranz, K., Schmal, G., 1996. Hörsturz und erhöhter IgM-Titer für Toxoplasmose*. *Laryngo-Rhino-Otologie* 75, 687–690.
- Smiley ST, Lanthier PA, Couper KN, Szaba FM, Boyson JE, Chen W, J.L., 2005. Exacerbated susceptibility to infection-stimulated immunopathology in CD1d-deficient mice. *J Immunol* 174, 7904–11.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Themat. issue Emerg. Parasit. zoonoses* 30, 1217–1258.
- Veloso, B., Lourdes, M. De, Noviello, M., Maciel, M., Thomaz, A., Carolina, A., Vasconcelos, A., Maria, R., Arantes, E., Wagner, R., Vitor, A., 2015. Experimental Parasitology Pathological changes in acute experimental toxoplasmosis with *Toxoplasma gondii* strains obtained from human cases of congenital disease 156, 87–94.
- Willott, J.F., Turner, J.G., Carlson, S., Ding, D., Seegers Bross, L., Falls, W.A., 1998. The BALB/c mouse as an animal model for progressive sensorineural hearing loss. *Hear. Res.* 115, 162–174.

Agradecimentos

À Sra. Rosalida Estevam Nazar Lopes. Ao CNPq, pelo financiamento (processo 445026/2014-6) do edital MCTI/CNPq, número 14/2014. Agradecimento ao *Laboratoire de Biophysique Neurosensorielle INSERM1107 Université d'Auvergne* pelo empréstimo do equipamento utilizado nas avaliações audiológicas. Os autores agradecem ainda o NUPAD/UFMG e PRPq/UFMG pelo apoio institucional à pesquisa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A perda auditiva tem sido sugerida como uma possível manifestação clínica da toxoplasmose adquirida. A compreensão dos mecanismos auditivos periféricos e centrais nessa doença faz-se necessária, uma vez que alterações auditivas em indivíduos com toxoplasmose adquirida podem permanecer como seqüela do quadro agudo. A presente dissertação teve como objetivo avaliar os efeitos auditivos causados por duas diferentes cepas de *T. gondii* – a ME-49, muito comum em países do hemisfério norte, e a TgCTBr5 encontrada no Brasil. Embora estas cepas apresentem genótipos distintos, ambas são de baixa virulência para os camundongos BALB/c.

O primeiro artigo original desta pesquisa demonstrou que a cepa ME-49 não prejudica o funcionamento das células ciliadas externas referentes às frequências de 8 e 10 kHz. Entretanto não podemos afirmar que esta cepa não prejudique as demais frequências, uma vez que frequências mais altas não foram pesquisadas devido à limitação do equipamento que encontrava-se disponível no início deste estudo.

Em relação ao segundo artigo original desta pesquisa, observou-se que a cepa TgCTBr5 não afetou o sistema auditivo periférico e central de camundongos BALB/c. A diminuição da amplitude do produto distorção e relação sinal ruído verificado nas EOAPD, assim como o aumento do limiar eletrofisiológico para frequências altas evidenciado no PEATE estão provavelmente relacionados ao aumento da idade desses camundongos, que mesmo com poucos dias de vida, são afetados pela presbiacusia.

Futuros estudos auditivos em modelos experimentais de toxoplasmose adquirida, com demais cepas de *T. gondii* são necessários para esclarecimento do comportamento do parasita nas vias auditivas periféricas e centrais. Acredita-se que os achados do presente estudo possam contribuir para as evidências científicas referentes à associação entre toxoplasmose adquirida e a perda auditiva.

ANEXOS

Anexo I

Termo de aprovação do projeto de pesquisa no CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 261/2014, relativo ao projeto intitulado “Toxoplasmose: efeitos da infecção e do tratamento precoce sobre o sistema auditivo”, que tem como responsável Luciana Macedo de Resende está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 16/12/2014. Este certificado espira-se em 16/12/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 261 / 2014, related to the Project entitled “Toxoplasmosis: Infection and early treatment outcomes in the auditory system”, under the supervision of Luciana Macedo de Resende, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 16/12/2014. This certificate expires in 16/12/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende

Coordenador (a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 16/12/2014.

Atenciosamente,

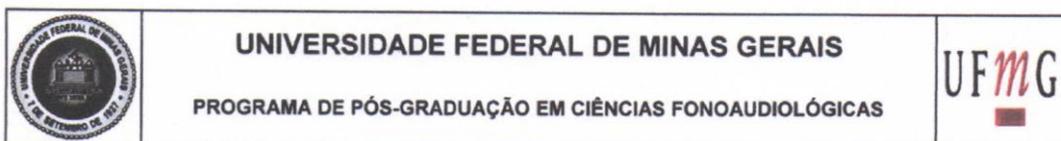
Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

Anexo II

Folha de aprovação



FOLHA DE APROVAÇÃO

**EFEITOS AUDITIVOS DA TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS BALB/C**

BIANCA CRISTINA EUGÊNIO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FONOAUDIOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FONOAUDIOLÓGICAS, área de concentração FUNCIONALIDADE E SAÚDE DA COMUNICAÇÃO HUMANA.

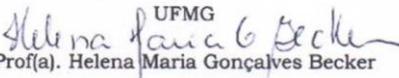
Aprovada em 14 de dezembro de 2016, pela banca constituída pelos


Prof(a). Luciana Macedo de Resende - Orientador

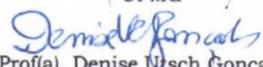
UFMG


Prof(a). Sirley Alves da Silva Carvalho

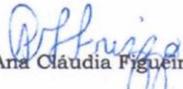
UFMG


Prof(a). Helena Maria Gonçalves Becker

UFMG


Prof(a). Denise Utsch Gonçalves

UFMG


Prof(a). Ana Cláudia Figueiredo Frizzo

UNESP

Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2016.