

LUIZ CARLOS DE MELO BARBOZA JUNIOR

Análise histológica e funcional de xenotransplante de células-tronco da orelha interna de camundongos em cócleas de cobaias com perda auditiva induzida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento

São Paulo  
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barboza Junior, Luiz Carlos de Melo

Análise histológica e funcional de xenotransplante de células-tronco da orelha interna de camundongos em cócleas de cobaias com perda auditiva induzida / Luiz Carlos de Melo Barboza Junior. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Ricardo Ferreira Bento.

Descritores: 1.Perda auditiva 2.Regeneração 3.Células-tronco 4.Terapia celular 5.Transplante de células 6.Xenotransplante 7.Cóclea 8.Camundongos 9.Cobaias

USP/FM/DBD-165/12

*'São fúteis e cheias de erros  
as ciências que não nasceram da experimentação,  
mãe de todo conhecimento.'*

Leonardo da Vinci

(1452-1519)

*Dedico*

*Aos meus pais, **Luiz Carlos** e **Maria de Fátima**, e minha irmã, **Lillian**, pelo carinho, dedicação e apoio em todas as etapas da minha vida, imprescindíveis na minha trajetória pessoal e profissional.*

*À minha esposa que amo, **Gaby**, minha companheira de todas as horas e que sempre me deu forças.*

*Aos meus filhos, **Artur** e **Sara**, que recentemente proporcionaram o momento mais feliz da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP e meu orientador, ao seu incansável empreendedorismo frente ao nosso Departamento, por ter acreditado em todos os nossos projetos e apoiado esta ideia desde o início.

À **Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad**, Professora Doutora no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo, pelo apoio incondicional em todas as etapas do projeto desde o seu início em 2005.

À **Profa. Dra Regina Célia Mingroni Netto**, Professora Doutora no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo, pelas suas ideias sempre objetivas e pela disponibilidade em todos os momentos para discutir o projeto e apoiá-lo.

À **Dra. Jeanne Oiticica**, Médica Assistente do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Chefe do Laboratório de Investigação Médica (LIM 32), pela sua determinação e dinamismo na direção do LIM-32, sempre em busca de novas idéias e recursos para viabilização das nossas pesquisas e pelo apoio constante durante todo o projeto.

À **Dra. Karina Lezirovitz-Mandelbaum**, Pesquisadora Científica do LIM32, pela ajuda nos experimentos de pesquisa do potencial auditivo, indução de surdez e imunohistoquímica e pelas sugestões preciosas na redação da tese.

À **Dra. Ana Carla Batissoco**, Pesquisadora Colaboradora do Instituto de Biociências da USP e do LIM32, pela ajuda nos experimentos de disseções e cultura e por suas dicas valiosas nos estudos de imunocitoquímica.

À **Dra. Milene Massucci Bissoli**, Pós-graduanda da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, pela amizade e ajuda nos experimentos de pesquisa do potencial auditivo e indução de surdez.

Ao **Prof. Dr. Bryan Eric Strauss**, Diretor do Laboratório de Vetores Virais do Instituto do Coração, FMUSP, por suas contribuições essenciais na metodologia do estudo e pela oportunidade de realizar os experimentos de transdução viral no seu laboratório.

À **Dra. Daniela Bertolini Zanatta**, Doutoranda do Laboratório de Vetores Virais do Instituto do Coração, FMUSP, pela amizade e por sempre estar disponível para nos ajudar em nossos experimentos de transdução viral.

Ao **Dr. Waldir Caldeira**, Biólogo do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da USP, pela amizade e pelo auxílio nas técnicas de histoquímica e captura de imagens no microscópio confocal.

Ao **Prof. Dr. Rubens Vuono de Brito Neto**, Professor Associado da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, pelas suas sugestões durante a minha qualificação e pela oportunidade de dissecação no Laboratório de Habilidades Cirúrgicas da Otorrinolaringologia da FMUSP.

Ao **Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro**, responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da USP, pela disponibilidade do seu laboratório para o estudo histológico das cócleas.

À **Profa. Dra. Angela Maria Vianna Morgante**, Docente no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade do seu laboratório na captura de imagens de imunofluorescência.

Ao **Prof. Dr. Stefan Heller**, Professor do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade de Stanford, EUA, e seus pós-graduandos, por terem me acolhido no seu

laboratório e proporcionado meu aprimoramento nas técnicas de dissecação e cultura essenciais para o sucesso deste trabalho.

À **Dra. Ana Lucia Garippo**, Especialista em Microscopia Confocal, InCor, FMUSP, pelas suas dicas preciosas para os experimentos de imunofluorescência e pela captura das imagens.

Ao **Dr Raimar Weber**, pela amizade e inestimável ajuda nos cálculos estatísticos da tese.

À **Melissa da Silva Bastos**, Bióloga e Técnica de LIM32, pela amizade e pelo constante apoio técnico nos experimentos realizados no laboratório.

Ao **Dr. Raimar Weber**, pela amizade e inestimável ajuda nos cálculos estatísticos da tese.

Aos amigos **Dr. Carlos Diógenes Pinheiro Neto** e **Dr. Felipe Sartor Guimarães Fortes**, pelas dicas e incentivos durante a pesquisa e pelos projetos bem sucedidos que realizamos no Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aos **Pós-graduandos** e **Funcionários** do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo, pela amizade, sugestões e discussões científicas que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos **Assistentes** do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela amizade, apoio e ensinamentos cruciais na minha formação acadêmica.

Às secretárias **Maria Marilede Alves**, **Maria Márcia Alves** e **Lucivânia Lima da Silva** pela amizade e por toda atenção dispensada durante toda a minha formação no Departamento de Otorrinolaringologia, FMUSP.

Aos **Funcionários** do Centro de Bioterismo da FMUSP pelo suporte e atenção.

Às instituições de fomento de pesquisa **FAPESP** e **CNPq**.



## SUMÁRIO

Lista de Siglas

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
3.1 Conceito de células-tronco.....	15
3.2 Uso de diferentes tipos de células-tronco na orelha interna .....	16
3.2.1 Células-tronco embrionárias .....	16
3.2.2 Células-tronco adultas ou órgão-específicas .....	19
3.3 Fatores determinantes no sucesso da terapia celular para surdez	19
3.3.1 Seleção das células-tronco para a terapia da surdez .....	20
3.3.2 Acessos para o transplante de células-tronco na orelha interna	21
3.3.3 Condição da cóclea para o transplante .....	24
3.4 Peculiaridades das células-tronco da orelha interna de camundongos neonatais.....	25
3.5 Razão para a escolha do xenotransplante.....	26
<b>4 MÉTODOS</b> .....	29
4.1 Animais.....	30
4.2 Linhas gerais do estudo .....	32

4.3 Obtenção das células-tronco do órgão de Corti de camundongos neonatos .....	34
4.4 Caracterização fenotípica das otosferas e diferenciação .....	38
4.4.1 Caracterização fenotípica das otosferas .....	38
4.4.2 Diferenciação .....	42
4.4.3 Microscopia e processamento de imagens .....	42
4.5 Transdução do vetor viral contendo o gene <i>LacZ</i> nas otosferas....	43
4.6 Pesquisa do potencial evocado auditivo .....	48
4.7 Indução de surdez nas cobaias adultas pré-transplante .....	51
4.8 Microcirurgia para injeção das células-tronco na cóclea .....	51
4.9 Estudo histológico das cócleas transplantadas .....	54
4.10 Contagem das células transplantadas nos cortes histológicos das cócleas no grupo estudo .....	56
4.11 Análises estatísticas .....	57
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
5.1 Células provenientes da orelha interna de camundongos neonatos se comportam como células-tronco .....	59
5.2 Eficiência da transdução viral <i>in vitro</i> .....	62
5.3 Eficiência da neomicina como indutor de perda .....	63
5.4 Grupos estudo e controle exibem similares limiares auditivos antes e após o transplante .....	65
5.5 Células-tronco da orelha interna transplantadas sobrevivem, migram e integram-se na cóclea hospedeira .....	66
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>78</b>
<b>APÊNDICE – Carta de Aprovação do Comitê de Ética</b>	

## LISTA DE SIGLAS

FMUSP/HC	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo / Hospital das Clínicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CEPID	Centro de Estudos do Genoma Humano
IB-USP	Instituto de Biociências
LIM-FMUSP	Laboratório de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CEDEME- UNIFESP	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo
InCor-HC- FMUSP	Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	anticorpo
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
$\beta$ -gal	<i>beta-galactosidase</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
CSCCL	canal semicircular lateral
CT	células-tronco
DIV	dias <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
GNDF	<i>glial derived neurotrophic factor</i> - fator neurotrófico
Ig	imunoglobulina
IGF1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
Lv-LacZ	vetor viral derivado de lentivírus contendo o gene LacZ
NPS	nível de pressão sonora
OC	órgão de Corti
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (solução salina tamponada de fosato)
PFA	paraformaldeído
rpm	rotações por minuto
TA	temperatura ambiente

## LISTA DE SÍMBOLOS

dB	decibel
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono, gás carbônico
°C	grau Celsius
Hz	hertz
kHz	quilohertz
kΩ	quiloohm
μg	micrograma
μL	microlitro
min	minuto
mm	milímetros
mL	mililitro
ng	nanograma
NPS	nível de pressão sonora
p	valor de p
Ω	ohm

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ilustração dos dois modos diferentes de regeneração das células ciliadas do órgão auditivo das aves. Após a morte das células ciliadas, as células de suporte primeiramente sofrem uma conversão fenotípica para célula ciliada (inferior à esquerda) e, num segundo tempo, reentram no ciclo celular e sofrem uma divisão assimétrica, originando células ciliadas e novas células de suporte. ....	4
<b>Figura 2</b>	Painel superior: Morfologia celular do órgão auditivo das aves, evidenciando células de suporte (setas) semelhantes sob as células ciliadas. Painel inferior: Órgão de Corti (OC) do mamífero apresenta células de suporte altamente especializadas com fenótipos diferentes que formam o túnel de Corti, uma estrutura única dentro do epitélio sensitivo, que se acredita ser determinante para a audição de sons de frequência alta ..	6
<b>Figura 3</b>	Imunofluorescência indireta de otoesferas no segundo dia <i>in vitro</i> (DIV2): (A) anticorpo anti-nestina (vermelho); (B) anticorpo antirreceptor de fator de crescimento de fibroblastos 2 - FGFR2 (verde); (C) sobreposição das imagens de A e B .....	8
<b>Figura 4</b>	Célula-tronco de orelha interna possui a capacidade de autorrenovação e de originar os precursores dos diversos tipos celulares: células ciliadas, células de suporte, neurônios e células da glia .....	10
<b>Figura 5</b>	Linhas gerais do estudo .....	34

<b>Figura 6</b>	Ilustração do giro basal do órgão de Corti (OC) parcialmente isolado das estruturas adjacentes. Percebe-se o conjunto ligamento espiral/estria vascular/membrana de Reissner (seta azul) quase todo separado do OC (na borda externa do OC) e parte do modíolo (asteriscos), que contém o gânglio espiral, encontra-se na borda interna do OC. (Microscópio invertido Axiovert 40C - Zeiss, Alemanha - aumento 10x) .....	36
<b>Figura 7</b>	Células do órgão de Corti em meio de cultura após dissociação enzimática e mecânica (Microscópio invertido Axiovert 40C - Zeiss, Alemanha - aumento 10x)	38
<b>Figura 8</b>	Reação da enzima beta-galactosidase clivando X-Gal em galactose e 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole, que dimeriza espontaneamente e é oxidado, gerando o 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo (produto insolúvel de cor azul) .....	44
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática do vetor lentiviral com o gene <i>LacZ</i> inserido .....	44
<b>Figura 10</b>	Obtenção dos potenciais evocados auditivos em cobaia anestesiada e com os eletrodos e sonda posicionados adequadamente .....	49
<b>Figura 11</b>	Curvas eletrofisiológicas de diferentes intensidades decrescentes, evidenciando onda V até 35dB .....	50
<b>Figura 12</b>	Mesa cirúrgica composta (no sentido horário): microscópio cirúrgico OPMI Pico (Zeiss, Alemanha), bisturi elétrico com placa (HF 120 WEM), borrifador com álcool 70%, instrumentos cirúrgicos (caneta de bisturi para lâmina bisturi n <sup>o</sup> 15, tesoura de íris curva, estilete, pinça, retrator, porta-agulha, rugina, perfurador de platina 0,3mm), microbroca, motor e caneta (Vmax, NSK)	52

<b>Figura 13</b>	Microcirurgia do osso temporal de cobaia para transplante das CT: (A) - janela redonda (seta azul); (B) - cocleostomia 1mm da janela redonda no giro basal da cóclea, dando acesso à escala timpânica; (C) - cocleostomia fechada com pedaço de músculo temporal, após a infusão das CT. (microscópio cirúrgico Zeiss OPMI Pico – aumento 15X) .....	53
<b>Figura 14</b>	Esferas sólidas visualizadas no segundo dia <i>in vitro</i> (DIV2) da cultura em suspensão de OC dissociado de camundongo neonato. (Microscópio invertido Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha - aumento 20x) .....	60
<b>Figura 15</b>	Esferas expressando nestina (figura a em vermelho) e Sox2 (figura b em verde), marcadores de células-tronco, após 2 dias de cultura. Após 7 dias de diferenciação, há expressão de Miosina VIIa (figura c em verde), p27kip1 (figura d em vermelho) e beta-III-tubulina (figura e em vermelho), marcadores para células ciliadas, células de suporte e neurônios, respectivamente. Marcação nuclear com DAPI (figuras a, b, c, e figura e em azul). Escala de barra: 20µm .....	61
<b>Figura 16</b>	Células da esfera transduzidas pelo LV-LacZ e coradas em azul após a reação X-gal .....	62
<b>Figura 17</b>	Cortes longitudinais corados com Hematoxilina e Eosina das cócleas esquerda (Figura A, normal) e direita (Figura B, exposta à neomicina) de uma cobaia do grupo controle. As membranas basilares da cóclea esquerda com o Organ de Corti íntegro (seta azul) e a cóclea dir. com o epitélio achatado (duas setas vermelhas). Após 7 dias, a exposição à neomicina aumentou significativamente os limiares auditivos na orelha direita do grupo controle (B') comparados com a orelha esquerda não exposta (A'), para frequência específica 16kHz .....	64



**Figura 18** Algumas CT transplantadas foram detectadas nas cócleas direitas do grupo estudo por meio de imunofluorescência indireta. A maioria das CT transplantadas no espaço perilinfático e endolinfático foi encontrada em forma de aglomerados celulares, como esferas (asteriscos em A). Um pequeno número das CT transplantadas se integraram na membrana basilar (detalhes nas imagens A' e B''). Anticorpo anti- $\beta$ -galactosidase (em vermelho) que detecta a proteína expressa pelo gene repórter *LacZ*. O marcador de célula ciliada, Miosina VIIa (em verde), é detectado pelo anticorpo específico. Marcação nuclear com DAPI (em azul). (ST = escala timpânica; SM = escala media; LBE = limbus espiral). Escala de barra: B 100 $\mu$ m; A-B' 50 $\mu$ m; A'-B'' 20 $\mu$ m..... 67

**Figura 19** Imagem A: disposição das células ciliadas internas (cabeça de seta) e externas (três asteriscos) no OC íntegro do giro basal de uma cóclea esquerda. Imagem B: membrana basilar sem a estrutura do OC do giro basal e com células integradas, expressando  $\beta$ -Gal (em vermelho), de uma cóclea direita submetida à ação ototóxica da neomicina e ao transplante de CT de orelha interna de camundongos neonatos. Miosina VIIa, marcador de célula ciliada (em verde);  $\beta$ -Gal, marcador da enzima beta-galactosidase, expressa pelo gene *LacZ* (em vermelho); DAPI, marcador nuclear (em azul). Escala de barra: 50 $\mu$ m..... 68

**Figura 20** Quantidade média de CT transplantadas expressando  $\beta$ -Gal e o número médio que co-expressa  $\beta$ -Gal e Miosina VIIa nas diferentes regiões da escala média: endolinfa (EL), parede lateral (PL), membrana basilar (MB), limbus espiral (LBE) ..... 69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Estudos com diferentes tipos de CT na orelha interna ..	17
<b>Tabela 2</b>	Relação dos anticorpos usados e as respectivas funções dos marcadores fenotípicos .....	41
<b>Tabela 3</b>	Anticorpos primários e secundários utilizados na imuno-histoquímica .....	55
<b>Tabela 4</b>	Limiares auditivos médios (dB SPL) da pesquisa do potencial evocado auditivo das orelhas das oito cobaias analisadas antes e após a indução de surdez.	63
<b>Tabela 5</b>	Limiares auditivos médios (dB NPS) da pesquisa do potencial evocado auditivo da orelha direita das oito cobaias analisadas antes e após transplante no grupo estudo (células tronco + meio de cultura) ou grupo controle (somente meio de cultura) .....	65

## RESUMO

Barboza Jr LCM. Análise histológica e funcional de xenotransplante de células-tronco da orelha interna de camundongos em cócleas de cobaias com perda auditiva induzida [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 107p.

**Introdução:** Em mamíferos, a morte das células sensoriais (células ciliadas) da orelha interna acarreta perda auditiva neurosensorial permanente. Neste estudo, investigou-se se, após o transplante, as células-tronco (CT) da orelha interna de camundongos neonatos podem sobreviver e integrar nos giros basais das cócleas de cobaias submetidas à surdez induzida por neomicina. O potencial efeito do transplante celular na função auditiva também foi avaliada.

**Métodos:** Oito cobaias foram submetidas à injeção de neomicina transtimpânica para indução de surdez. Após 7 dias, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos. No grupo estudo (n=4), as CT da orelha interna de camundongos neonatos (meio de cultura com  $10^5$  CT *LacZ+*) foram transplantadas através de uma cocleostomia no giro basal de cobaias surdas. O grupo controle (n=4) recebeu somente meio de cultura. Após 14 dias do transplante, o efeito funcional foi avaliado por meio de pesquisa dos potenciais evocados auditivos e os animais foram sacrificados. A presença e a distribuição das CT transplantadas foram avaliadas por imunofluorescência dos cortes longitudinais das cócleas do grupo estudo. Testes não paramétricos foram usados para a análise estatística.

**Resultados:** A ação da neomicina na cavidade timpânica proporcionou dano às células ciliadas e aumento significativo dos limiares auditivos antes do transplante celular. Não houve diferenças significantes dos limiares auditivos antes e após o transplante celular nas cobaias individualmente. Algumas CT transplantadas foram observadas em todas as escalas dos giros basais das cócleas lesadas, e parte destas células expressaram Miosina VIIA, um marcador de célula ciliada. Algumas CT transplantadas se integraram na membrana basilar da cóclea hospedeira. Nenhuma evidência de infiltração inflamatória nas cobaias transplantadas foi observada, apesar do uso de xenotransplante.

**Conclusões:** Embora, após o transplante, os limiares auditivos não tenham sido alterados, os experimentos mostraram sobrevivência, migração, expressão de marcadores de células ciliadas e integração das CT transplantadas.

**Descritores:** 1.Perda auditiva 2.Regeneração 3.Células-tronco 4.Terapia celular 5.Transplante de células 6.Xenotransplante 7.Cóclea 8. Camundongos 9.Cobaias

## ABSTRACT

Barboza Jr LCM. Histological and functional analysis of inner ear stem cell xenotransplantation in the cochlea of guinea pigs with induced hearing loss. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 107pp.

**Background:** In mammals, damage to sensory receptor cells (hair cells) of the inner ear results in permanent sensorineural hearing loss. Here we investigate whether, after transplantation, neonatal mouse inner ear stem cells (mIESCs) can survive and integrate into basal turns of neomycin-injured guinea pig cochleas. We also studied the potential effects of the cell transplantation on the auditory function.

**Methods:** Eight adult guinea pigs were deafened by intratympanic neomycin delivery. After 7 days, the animals were randomly divided in two groups. Study group (n=4) received transplantation to the scala tympani of  $1 \times 10^5$  LacZ-positive mIESCs in culture medium. Control group (n=4) received culture medium only. Fourteen days after the transplantation, functional analyses were performed by auditory brainstem responses (ABR) and the animals were sacrificed. The presence and distribution of mIESCs were evaluated by immunohistochemistry of longitudinal sections of the cochlea from the study group. Non-parametric tests were used for statistical analysis.

**Results:** The intratympanic neomycin delivery damaged hair cells and increased auditory thresholds prior to cell transplantation. There were no significant differences between auditory brainstem thresholds before and after transplantation in individual guinea pigs. Some mIESCs have been observed in all scalae of basal turns of the injured cochleas, and a proportion of those cells expressed the hair cell marker myosin VIIa. Some transplanted mIESCs integrated in the cochlear basilar membrane. There was no evidence of inflammatory infiltration in any of the guinea pigs.

**Conclusions:** Although implanted mIESCs showed no obvious effect on auditory thresholds, our experiments showed survival, migration, expression of hair cell marker and integration of transplanted cells.

**Descriptors:** 1. Hearing Loss 2.Regeneration 3.Stem Cells 4.Cell Therapy  
5.Cell Transplantation 6.Xenotransplantation 7.Cochlea 8.Mice  
9.Guinea Pigs

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a surdez congênita apresenta incidência alta (1:1000 entre os nascidos e 1:1000 os que desenvolvem surdez no decorrer da infância) (OMS, 2012). Com o crescimento da expectativa de vida da população, a prevalência da surdez adquirida tem aumentado, principalmente na população acima de 60 anos (Baraky, 2011). Estima-se que um terço dos adultos com mais de 65 anos de idade apresente hipoacusia incapacitante (OMS, 2012). Constitui-se um dos transtornos crônicos mais frequentes, com mais de 500 milhões de indivíduos afetados em todo o mundo, e projeta-se que, em 2050, este número cresça para 900 milhões. Estes dados configuram a perda auditiva como o distúrbio sensorial mais comum do ser humano, proporcionando, portanto, impacto importante na qualidade de vida das pessoas, e implicações econômicas e sociais. (De Felipe et al., 2011)

Na maioria dos casos, a perda auditiva adquirida ou congênita é causada por perda de células ciliadas cocleares e/ou seus neurônios associados (Li et al., 2004). Diversas etiologias estão relacionadas, como: exposição excessiva ao ruído, infecções virais e bacterianas, drogas ototóxicas, trauma acústico e doenças genéticas. Além destas, considera-se a presbiacusia, perda auditiva decorrente do envelhecimento, um fator de risco adicional (Bento et al., 1998).

Os tratamentos atuais da perda auditiva dependem das células

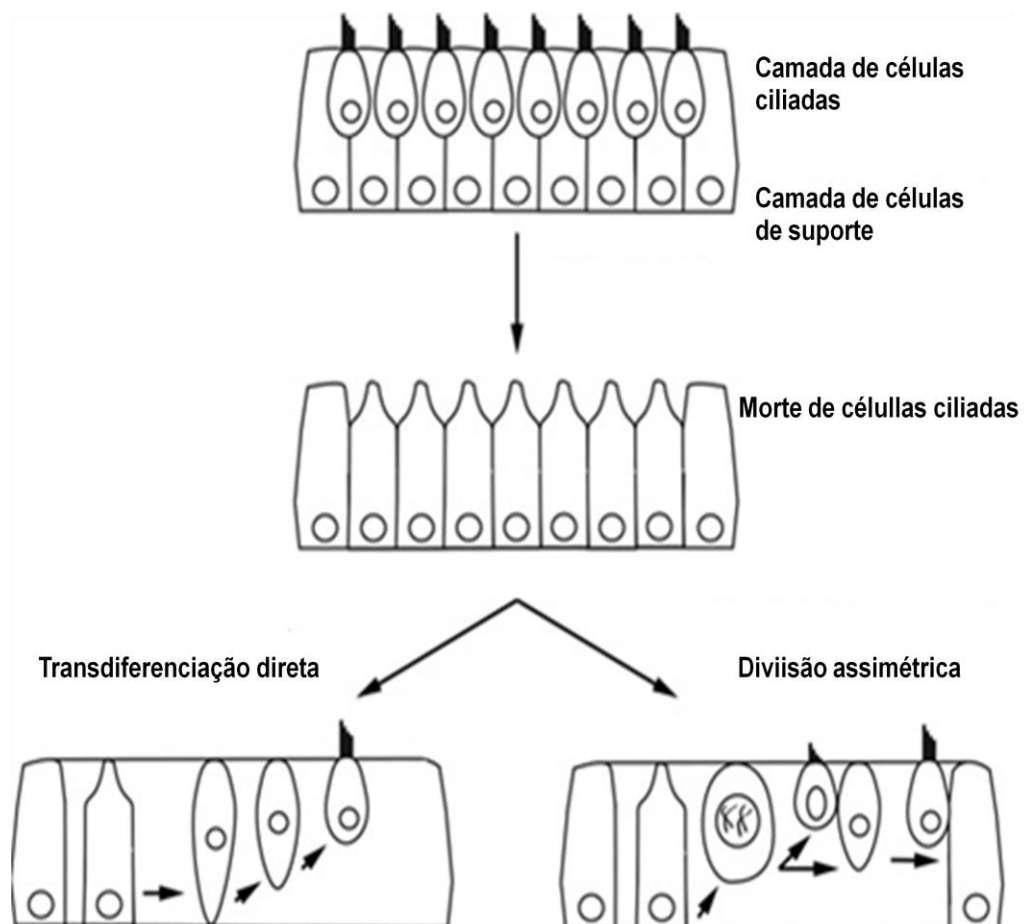
ciliadas e neurônios que restam após o insulto coclear. Para perdas leves a severas, os aparelhos auditivos amplificam o som, compensando o aumento de limiares provocados por perda de amplificação sonora, geralmente resultante da perda de células ciliadas externas. Portanto, o sucesso da intervenção com aparelhos auditivos depende, em parte, da integridade das células ciliadas internas. (Li et al., 2004)

Uma alternativa terapêutica para perda profunda é o implante coclear, um dispositivo que estimula os neurônios diretamente por meio de eletrodos dispostos na escala timpânica. Desta maneira, o implante coclear transpassa a função das células ciliadas internas, porém depende de neurônios íntegros para recepção dos estímulos. Em caso de disfunção do nervo auditivo, pode-se optar pelo implante de tronco cerebral, uma ferramenta similar ao implante coclear, mas que estimula diretamente o núcleo auditivo. Apesar de transpor a função da cóclea, seu desempenho ainda é pobre comparado ao implante coclear. (Jongkamonwiwat et al., 2010)

Há duas décadas, tomou-se conhecimento da regeneração funcional e estrutural do epitélio auditivo em aves, peixes e répteis, após agressão com ototóxico ou trauma acústico. Em contraposição, as células da orelha interna dos mamíferos são terminalmente diferenciadas já no período embrionário, ou seja, não reentram no ciclo celular, tornando dessa maneira a perda auditiva neurosensorial irreversível (Corwin, Cotanche, 1988).

Ao contrário do que ocorre nos mamíferos, após insulto ototóxico em aves, peixes e répteis, as células de suporte, células não sensoriais

adjacentes às células ciliadas, se convertem fenotipicamente em células ciliadas. Este mecanismo, chamado de transdiferenciação direta, é uma maneira rápida de restabelecer a quantidade de células ciliadas perdidas. Em um segundo momento, as células de suporte reentram no ciclo celular e se dividem assimetricamente, gerando novas células ciliadas e de suporte. Portanto, a população de células de suporte perdidas por meio da conversão fenotípica é restabelecida por divisão assimétrica (Figura 1) (Warchol, 2011).

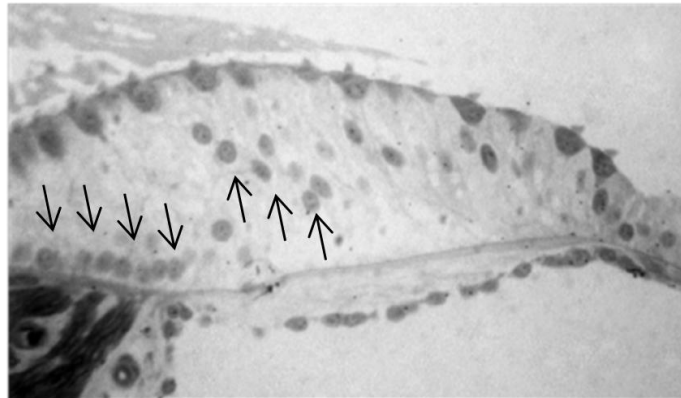
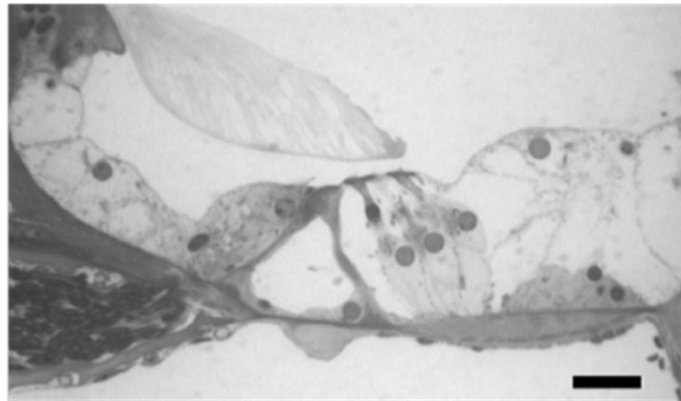


**Figura 1** - Ilustração dos dois modos diferentes de regeneração das células ciliadas do órgão auditivo das aves. Após a morte das células ciliadas, as células de suporte primeiramente sofrem uma conversão fenotípica para célula ciliada (inferior à esquerda) e, num segundo tempo, reentram no ciclo celular e sofrem uma divisão assimétrica, originando células ciliadas e novas células de suporte. (Fonte: adaptado de Groves et al., 2010)



A capacidade das células de suporte de gerar novas células ciliadas e cópias idênticas das mesmas é uma característica de células-tronco (CT) multipotentes ou órgão-específicas. Outros sistemas sensoriais em mamíferos, como o epitélio olfatório, possuem precursores que restabelecem a população celular, durante o *turnover* natural, e também abrigam CT adultas quiescentes para regeneração após eventual lesão epitelial (Brigande, Heller, 2009).

Algumas teorias tentam explicar a incapacidade regenerativa do epitélio auditivo do mamífero adulto. De acordo com Warchol (2011), durante os processos evolutivos, as células de suporte da cóclea do mamífero perderam a plasticidade fenotípica, mas, em compensação, houve ganhos na audição para sons de frequência alta. Esta capacidade exigiu o fornecimento de mais energia das células de suporte para as células ciliadas. Logo, as células de suporte se tornaram mais especializadas e diferenciadas com uma variedade de fenótipos distintos. Já a papila basilar, órgão auditivo das aves, possui uma citoarquitetura mais simples, um limite auditivo para frequências até 12kHz e células de suporte semelhantes entre si (Figura 2).

**Papila Basilar****Órgão de Corti**

**Figura 2 – Painel superior:** Morfologia celular do órgão auditivo das aves, evidenciando células de suporte (setas) semelhantes sob as células ciliadas. **Painel inferior:** Órgão de Corti (OC) do mamífero apresenta células de suporte altamente especializadas com fenótipos diferentes que formam o túnel de Corti, uma estrutura única dentro do epitélio sensitivo, que se acredita ser determinante para a audição de sons de frequência alta. (Fonte: adaptado de Warchol, 2011)

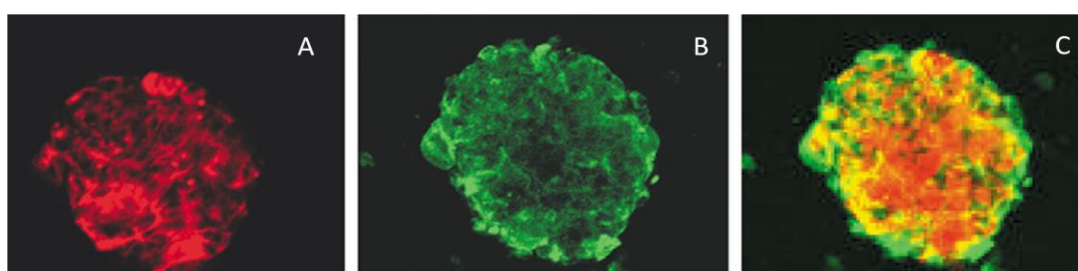
A ausência de certos receptores mitogênicos e a expressão de inibidores de ciclo celular, como os inibidores de quinases dependentes de ciclina (por exemplo, p27kip1), são aspectos da expressão gênica das células de suporte dos mamíferos que formam uma base molecular para

esclarecer a irreversibilidade da perda auditiva em mamíferos (White et al., 2006).

A partir da melhor compreensão sobre a incapacidade regenerativa da cóclea dos mamíferos e sobre a reepitelização do epitélio auditivo dos vertebrados, não mamíferos, após lesão, novas abordagens vêm sendo estudadas para o tratamento da surdez. Duas possibilidades terapêuticas são atualmente consideradas: estimulação de células endógenas por injeção de agentes exógenos (por exemplo, fatores de crescimento ou vetores virais geneticamente manipulados) ou injeção de células progenitoras ou CT para reposição do tecido perdido (Brownstein, Avraham, 2006).

As CT possuem propriedades de autorrenovação e diferenciação em uma variedade de tipos celulares. Esta potencialidade tem sido explorada para buscar a regeneração das células ciliadas de mamíferos. Um avanço importante nas perspectivas para a utilização das CT para substituir as células sensoriais da orelha interna foi a possibilidade de geração *in vitro* de células ciliadas a partir de CT embrionárias (Li et al., 2003a), CT de medula óssea (Naito et al., 2004), CT neurais (Tateya et al., 2003) e CT pluripotentes induzidas (Oshima et al., 2010). Além disso, células pré-diferenciadas derivadas de CT embrionárias de camundongos se integraram estrutural e funcionalmente à orelha interna do embrião de galinha, quando colocadas em fases iniciais do período embrionário (Li et al., 2003b). Portanto, pode-se pensar na possibilidade de aplicações clínicas dessas CT em orelhas surdas ou com surdez induzida.

Em 2002, Malgrange et al. observaram pela primeira vez a formação de colônias de células (esferas) nas culturas em suspensão de epitélio auditivo dissociado de camundongos neonatos (Figura 3). Estas esferas possuíam propriedades de autorrenovação, proliferação, expressão de marcadores genéticos característicos do desenvolvimento embrionário da orelha interna e do sistema nervoso, e diferenciação em diferentes tipos celulares, incluindo células ciliadas, de suporte e neurônios. Em estudos de imunofluorescência indireta, as células dessas esferas mostraram-se positivas para marcação com anticorpo anti-nestina, um filamento intermediário identificado primeiramente em CT neuroepiteliais e que, durante a embriogênese, é expresso em células proliferativas e, em tecidos adultos, mantém-se restrito às áreas de regeneração (Lopez et al., 2004; Malgrange et al., 2002).

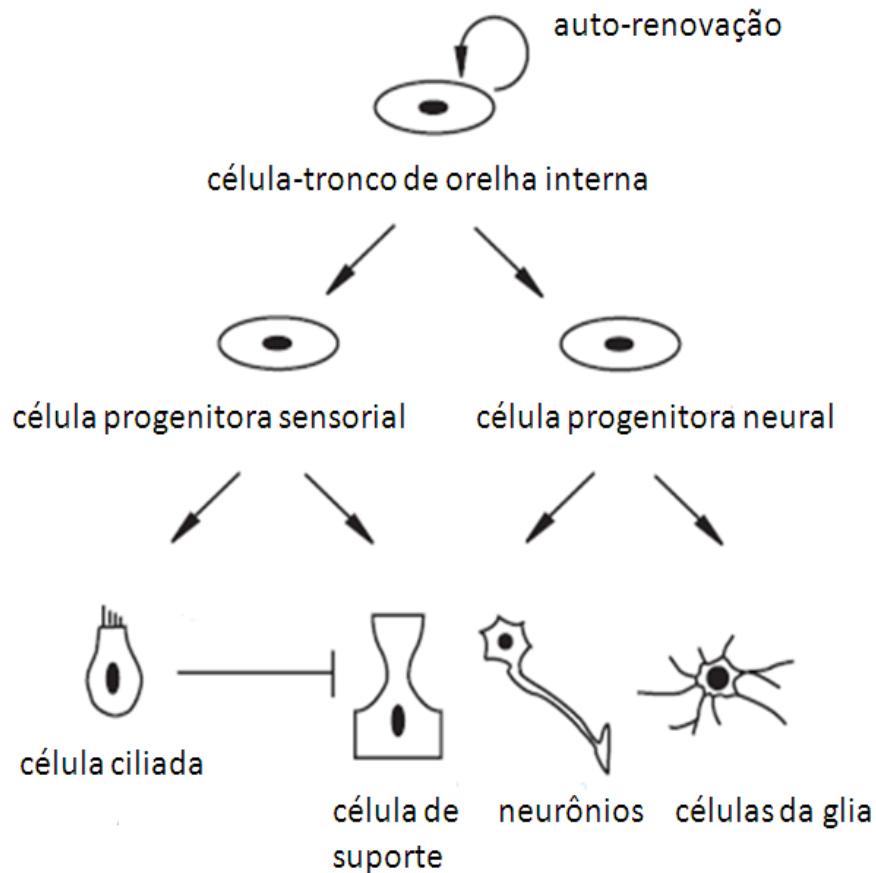


**Figura 3** - Imunofluorescência indireta de otoesferas no segundo dia *in vitro* (DIV2): (A) anticorpo anti-nestina (vermelho); (B) anticorpo antirreceptor de fator de crescimento de fibroblastos 2 - FGFR2 (verde); (C) sobreposição das imagens de A e B. (Fonte: adaptado de Malgrange et al., 2002)

Em cultura de cóclea de camundongo neonato também foi identificada a expressão de Sox2, um marcador universal de células-tronco, presente em

CT neurais em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário do sistema nervoso central. Em humanos, mutações no gene *Sox2* causam perda auditiva neurosensorial e, em estudo de perda de função deste gene em camundongos, mostrou-se a exigência da expressão do *Sox2* para a formação do epitélio coclear (Dabdoub, et al., 2008).

De acordo com a definição clássica, CT são células que possuem a capacidade de autorrenovação prolongada ou ilimitada e que podem produzir fenótipos celulares diferenciados de um determinado tecido (Watt, Hogan, 2000). Dessa forma, conclui-se que células da orelha interna de camundongos neonatos, sob certas condições em cultura, caracterizam-se como CT órgão-específicas, pois, além de autorrenovação prolongada, podem se diferenciar em células ciliadas, células de suporte e neurônios (Figura 4) (Lou et al., 2007).



**Figura 4** - Célula-tronco de orelha interna possui a capacidade de autorrenovação e de originar os precursores dos diversos tipos celulares: células ciliadas, células de suporte, neurônios e células da glia. (Fonte: adaptado de Ozeki et al., 2007)

As CT de orelha interna podem ser um excelente material para os estudos de terapia celular em modelos animais com dano do epitélio auditivo, por causa dessas propriedades. Além disso, de acordo com a teoria do microambiente, as células-tronco órgão-específicas, quando transplantadas para um determinado tecido lesado, podem reconhecer sinais intrínsecos deste novo ambiente e, conseqüentemente, diferenciar-se em células do tecido hospedeiro. (Cotanche, 2008)

No presente estudo e com ênfase no potencial de regeneração estrutural, foram investigadas:

- (i) em estudo histológico: a sobrevivência, a localização e a expressão de marcadores de células ciliadas de CT da própria orelha interna de camundongos neonatos, transplantadas em cócleas de cobaias adultas submetidas à surdez induzida por ototóxico; e,
- (ii) mediante pesquisa do potencial evocado auditivo: a função auditiva, antes e após o transplante celular.

**2 OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

Objetivo primário:

- Por meio de estudo histológico, analisar a sobrevivência, localização e expressão de marcadores de células ciliadas de células-tronco provenientes de camundongos neonatos, transplantadas em cóclea de cobaias adultas com surdez induzida por ototóxico

Objetivos secundários:

- Obter culturas em suspensão de células-tronco provenientes de Órgão de Corti (OC) dissociado de camundongos neonatos.
- Caracterizar os fenótipos dessas células-tronco (nestina e Sox2) e estudar sua diferenciação por meio de imunofluorescência indireta.
- Transduzir as células-tronco com vetor viral contendo o gene repórter *LacZ* para seu rastreamento após transplante na cóclea de cobaias adultas com surdez induzida por ototóxico.
- Induzir surdez em cobaias adultas por meio da injeção transtimpânica de ototóxico.
- Analisar o possível ganho funcional de audição por meio da realização de pesquisa do potencial evocado auditivo, antes e após o transplante celular.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Conceito de células-tronco**

Por definição, uma célula-tronco é caracterizada pela capacidade de autorrenovação e de diferenciação assimétrica para formar outros tipos celulares além dela mesma. As principais diferenças das diversas categorias de CT consistem dos tipos de células geradas (Fuchs, Segre, 2000).

As CT embrionárias são captadas da massa interna do blastocisto numa fase precoce do desenvolvimento embrionário. Estas CT são chamadas de pluripotentes, pois apresentam a capacidade de diferenciar nos três folhetos germinativos: mesoderma (origina ossos, sangue e músculos), endoderma (intestino) e ectoderma (pele, nervo e células ciliadas) (Odorico et al., 2001).

Há uma subpopulação de células existentes em órgãos que retém a capacidade de autorrenovação e produção de diferentes células irmãs do próprio tecido, ou seja, restrita a uma linhagem germinativa. Estas células, denominadas CT órgão-específicas ou adultas, são encontradas em diversos órgãos, como: medula óssea, pele, cérebro, fígado, intestino e retina (Fuchs, Segre, 2000).

Com relação às CT embrionárias, as CT órgão-específicas são relativamente limitadas nos tipos de células que são capazes de gerar.

Portanto elas são definidas como células-tronco multipotentes (Parker, Cotanche, 2004).

A partir destas definições, conclui-se que as células-tronco em estudo, provenientes da cóclea de camundongos neonatais, se enquadram nas CT órgão-específicas com características multipotentes.

### **3.2 Uso de diferentes tipos de células-tronco na orelha interna**

#### **3.2.1 Células-tronco embrionárias**

Em diversos estudos têm sido empregadas na cóclea as CT embrionárias indiferenciadas (Tabela 1). Estas células apresentam uma plasticidade grande, que se caracteriza pelo poder de diferenciação nas três linhagens germinativas e, também, de se adaptar aos diferentes microambientes possibilitando, assim, uma provável regeneração de diversos fenótipos celulares a partir de um mesmo transplante (Shi et al., 2007). Além disso, as CT embrionárias apresentam imunogenicidade baixa.

Ulfendahl et al. (2007) implantaram CT embrionárias na escala timpânica. As células sobreviventes foram identificadas na região do gânglio espiral e ao longo de fibras nervosas que se projetavam para o OC. Entretanto, a taxa de sobrevivência mostrou ser baixa (1,1 a 1,5%).

**Tabela 1** – Estudos com diferentes tipos de CT na orelha interna

Autor	Tipo celular (Animal doador)	Animal hospedeiro	Casos / Controles	TS	Acesso	Rastreador das CT na cóclea implantada
Sullivan et al., 2010	CT epitelial de língua (camundongo)	camundongo	7 / 4	4	Giro basal	Dil
Pandit et al., 2011	CT olfatória (homem)	camundongo	8 / 13	2	Giro basal	Dil
Hu et al., 2004	Gânglio da raiz dorsal de embrião (camundongo)	cobaia	5 grupos de 7 ou 8 / 7	4	Giro basal	Ac anti-NF
Parker et al., 2007	CT neural (camundongo)	camundongo	Estudo histológico 2 semanas	4	Janela redonda	lacZ
			3 / 1			
			Estudo histológico 4 semanas			
			3 / 1			
	CT neural (camundongo)	cobaia	4 / 4	4	ST via giro basal	FISH-Y
Fu, Y. et al., 2009	CT neural de feto (rato)	ratos	15 / 15	4	Janela redonda	Ad-GFP
Han et al., 2010	CT neural de embrião (rato)	cobaia	12 / -	2	2º giro coclear	Ad-GFP
Hu et al., 2005b	CT neurais camundongo adulto	cobaia	51 (grupos com 9,9,9,9, 12 e 12) / 9	4	ST giro basal	LacZ e GFP
Ito et al., 2001	CT neurais (rato adulto)	rato	não cita	4	Janela redonda ou oval	β-Gal
Hildebrand et al., 2005	CT embrionárias (camundongo)	cobaia	15 (6 grupos de 1 a 4) / 4	4	Janela redonda	GFP
Shimizu et al., 2004	CT medula óssea (chinchila)	chinchila	5 / -	3	Janela redonda e modíolo	Dil
Lang et al., 2008	CT embrionárias (camundongo)	gerbil	23 (precoce) e 15 (tardio) / 3		Canal de Rosenthal	GFP
Nishimura et al., 2009	CT pluripotentes induzidas (iPS) (camundongo)	camundongo neonato (P3)	10 / -	1	Janela redonda	Ds-Red
Cho et al., 2011	CT mesenquimais diferenciadas linhagem neural (homem)	cobaia	8 / 8	6	ST Giro basal	Ac humano específico
Iguchi et al., 2003	CT embrionárias (camundongo)	camundongo	5 / -	4	CSC lateral e posterior	GFP
Tateya et al., 2003	CT embrionárias (camundongo)	camundongo	15 / -		2º Giro coclear	GFP
Matsuoka et al., 2007	CT mesenquimais (camundongo)	gerbil	8,8,8 / 8	1	ST e modíolo	GFP
Ogita et al., 2010		cobaia	4 / 4	4	Modíolo	Beta III tubulina
	CT medula óssea diferenciadas em neuroesferas (cobaia)					
Coleman et al., 2006	CT embrionárias (camundongo)	cobaia	5,5,5 (1,2 e 4 semanas) / 5	4	ST	GFP

TS = tempo de sobrevivência das CT implantadas em semanas; FISH-Y = Fluorescência do cromossomo Y; Ac anti-NF = Anticorpo anti-neurofilamento; GFP = *green fluorescent protein*; ST = escala timpânica; CSC = canal semicircular lateral; P3 = terceiro dia de vida

Para aumentar a taxa de sobrevivência celular e a diferenciação neuronal na escala timpânica, alguns autores introduziram, além das CT embrionárias, tecido ganglionar da raiz dorsal de embrião de camundongo (Hu et al., 2005a) e fator neurotrófico (GNDF – *glial derived neurotrophic factor*) (Altschuler et al., 2008). Ambos conseguiram um incremento na sobrevivência e diferenciação neuronal, mas em nenhum dos casos houve diferenciação para células ciliadas e avaliação funcional com o intuito de verificar ganho auditivo com a intervenção.

As CT embrionárias podem ser pré-diferenciadas *in vitro* antes da implantação, para melhorar a diferenciação para o fenótipo desejado. Além disso, as CT embrionárias pré-diferenciadas apresentam menor chance de formação tumoral *in vivo* em relação às CT embrionárias indiferenciadas, embora nos trabalhos supracitados não tenha sido constatada ocorrência de tumor. Outra vantagem da pré-diferenciação em um progenitor neuroectodérmico é a evidência de que tanto as células ciliadas quanto os neurônios do gânglio espiral são derivados de um precursor comum (Coleman et al., 2006).

Corrales et al. (2006) relataram diferenciação neuronal de progenitores neurais derivados de CT embrionárias de camundongo após injeção em nervo auditivo de outra espécie de roedores, gerbil, observando formação de processos neurais abundantes que atravessaram o canal de Rosenthal e cresceram em direção às células ciliadas no OC. Neste estudo, não foi efetuada a avaliação funcional.

### 3.2.2 Células-tronco adultas ou órgão-específicas

Apesar de possuírem repertório mais restrito para diferenciação em linhagens celulares em relação às CT embrionárias, as CT adultas ou órgão-específicas dispõem de algumas vantagens, como: a possibilidade de transplante autólogo, evitando reação enxerto-hospedeiro; e, o fato de serem isoladas de um indivíduo adulto, sem implicar em questões éticas geradas pelo uso de CT embrionárias (de Felipe et al., 2011). Até o momento, diferentes tipos de CT órgão-específicas (Tabela 1) foram usados na cóclea na tentativa de regeneração auditiva: CT neurais, CT mesenquimais, CT epiteliais, CT olfatórias e CT pluripotentes induzidas. Outros tipos de CT adultas, largamente estudadas *in vitro* são as CT (Diensthuber et al., 2009; Oshima e al., 2009 e 2007; Lou et al., 2007; Senn et al., 2007; Malgrange et al., 2002), porém ainda não testadas *in vivo*.

### 3.3 Fatores determinantes no sucesso da terapia celular para surdez

Para o sucesso das estratégias de transplante de CT para surdez, além da escolha entre os diferentes tipos de CT disponíveis, diversas variáveis devem ser consideradas, como: a condição histológica da cóclea hospedeira no momento do transplante celular e os acessos à orelha interna para a infusão das CT. Estas questões são consideradas cruciais e podem afetar a eficiência deste tipo de terapia (Jongkamonwiwat et al., 2010).

### 3.3.1 Seleção das células-tronco candidatas para a terapia da surdez

Na escolha do tipo de CT mais adequado para a restauração celular na orelha interna, teoricamente as CT embrionárias poderiam ser as melhores candidatas, pois possuem a capacidade de gerar células dos três folhetos germinativos e já foram empregadas com relativo êxito em terapia experimental em modelos para outras doenças, como: Diabetes Melitus, Doença de Parkinson e lesões de medula espinhal (Daley et al., 2003). Entretanto, existe o risco potencial de que algumas linhagens de CT embrionárias sejam capazes de sofrer transformação maligna, originando tecidos indesejáveis após o transplante celular (Pauley et al., 2008). Além disso, a destruição de embriões para a captação destas CT é questionada sob o ponto de vista ético.

As CT neurais são captadas geralmente da parede lateral do ventrículo lateral e do giro denteado do cérebro de animais, logo o seu uso seria eticamente mais aceitável que as CT embrionárias. Por manter íntima relação anatômica e embriológica, entre a orelha interna e o cérebro, as CT neurais poderiam ser utilizadas para a restauração das células ciliadas da cóclea. Outra aplicação dessas células seria no tratamento de alguns tipos de neuropatia auditiva (Parker, Cotanche, 2004).

O acesso limitado às CT neurais poderá, entretanto, comprometer o seu uso clínico, pois são encontradas em regiões profundas do cérebro. Já as CT mesenquimais de medula óssea são de mais fácil obtenção e, no seu processo de diferenciação, também geram neurônios. Estes produziram



neurotrofinas, proporcionando aumento da quantidade de neurônios e suporte ao gânglio espiral, com possível melhora na eficácia do implante coclear (Naito et al., 2004).

A comparação *in vitro* do potencial de diferenciação em células ciliadas das CT neurais e com o das CT evidenciou duas diferenças. A primeira delas foi que dez por cento das CT diferenciaram-se em células ciliadas contra 0,1% das CT neurais, ou seja, cem vezes mais (10% contra 0,1%). Em segundo lugar, as CT diferenciaram-se de modo mais completo em células ciliadas que as CT neurais (Li et al., 2003a).

Diante destas evidências, considera-se apropriado o uso de CT como instrumento de reparo biológico.

### 3.3.2 Acessos para o transplante de células-tronco na orelha interna

Diversas técnicas de acesso já foram usadas para transplante das CT em diferentes regiões da cóclea e nervo auditivo: injeção na janela redonda (Coleman et al., 2006), na parede lateral da cóclea (Iguchi et al., 2004), no canal semicircular lateral (Iguchi et al., 2004), no canal auditivo interno (Sekiya et al., 2006) e no modíolo (Tamura et al., 2004). Partindo da premissa de que as CT tendem a migrar para os sítios lesionados, a escolha de determinado acesso depende do objetivo da terapia celular. Outro fator importante é que o acesso não cause dano adicional ao tecido decorrente do trauma cirúrgico.

No intuito de regenerar o epitélio auditivo, na maioria dos estudos com

implantação de CT opta-se pelo acesso à escala timpânica através de um furo na janela redonda ou uma cocleostomia no giro basal da cóclea. Este acesso resulta em uma distribuição maior das células implantadas dentro da cóclea, pois a escala timpânica é um dos maiores compartimentos da cóclea e o fluxo perilinfático espalha as células exógenas por toda a cóclea. Além disso, acredita-se que este acesso cirúrgico é o que causa menos dano à citoarquitetura coclear (De Felipe et al., 2011; Jongkamonwiwat et al., 2010).

Em contraposição, Hu et al. (2005b) observaram que a taxa de sobrevivência das CT introduzidas diretamente na escala timpânica foi baixa. Uma das hipóteses é a falta de alguns fatores tróficos essenciais nesta região. Estes mesmos autores usaram pedaços de gânglio da raiz dorsal de embrião, como fonte de fatores tróficos, junto com CT embrionárias, e relataram um aumento significativo da sobrevivência das células transplantadas (Hu et al., 2005a).

Outra razão para o número baixo de CT sobreviventes na escala timpânica é o fluxo peilinfático. Este, como já citado, pode ajudar a distribuir as células exógenas por toda a cóclea, mas pode também dispersar estas células inadvertidamente para o líquido cefalorraquidiano por meio de um aqueduto coclear pérvio. Esta é uma hipótese que necessita estudos adicionais para ser confirmada (Coleman et al., 2006).

Um acesso alternativo à escala timpânica tem sido possível através do canal semicircular lateral (CSCL). Iguchi et al. (2004) introduziram neuroesferas derivadas de CT embrionárias em cócleas de camundongos

adultos. As células se localizaram predominantemente no espaço perilinfático (62% na escala vestibular e 37,6% na escala timpânica) e uma ínfima porcentagem na escala média (0,04%), porém não foi avaliada a sobrevivência celular. Neste mesmo estudo, os autores compararam a técnica usando o CSCL com acesso à escala média, diretamente por meio de uma cocleostomia no segundo giro coclear. A localização da escala média é feita identificando-se a pigmentação da estria vascular na parede lateral da cóclea, decorrente do acúmulo de melanócitos nesta região. Neste acesso, as células permaneceram, em sua maioria, na escala média (62,1%) e, em menores proporções, nas escalas: vestibular (20,8%) e timpânica (17,1%). Apesar de proporcionar uma quantidade maior de células na escala média, este acesso causou uma alteração considerável dos limiares auditivos (aumento do nível de pressão sonora de 40,0dB a 52,5dB). Enquanto o acesso via CSCL ocasionou elevações mínimas de limiares (8,0dB a 16,6dB NPS) em alta frequência de 40kHz. (Iguchi et al., 2004)

A abordagem via escala média seria interessante, pois as células exógenas estariam no compartimento do tecido alvo a ser regenerado, o OC. Porém várias barreiras biológicas precisam ser ultrapassadas para o sucesso desta técnica. Uma das razões disto é a concentração alta de potássio encontrada na endolinfa, que pode ser tóxica às células transplantadas e comprometer a sobrevivência das CT. A abordagem da escala média via parede lateral da cóclea possui outra barreira, o dano à estria vascular, que mantém a homeostasia do potencial endococlear (Jongkamonwiwat, 2010).

Parker et al. (2007), ao injetar CT neurais na escala timpânica de camundongos e cobaias com surdez induzida por exposição sonora, conseguiram uma distribuição das células em todos os compartimentos da cóclea, inclusive no OC. Também observaram diferenciação das CT neurais em células ciliadas (Miosina VIIa, oncomodulina e calbindina), células de suporte (GFAP) e células neurais ( $\beta$ III-tubulina). Diante desta evidência, destaca-se a influência do microambiente coclear na diferenciação das CT implantadas, pois estas expressaram marcadores típicos das células da região onde foram encontradas.

De acordo com os relatos, o acesso mais favorável para o transplante de CT na cóclea ainda é na escala timpânica, pois, além da maior sobrevivência e diferenciação das células transplantadas, o dano à citoarquitetura coclear é mínima, logo não compromete os limiares auditivos. Considera-se também a via cirurgicamente mais factível em uma possível implantação das CT em humanos, pois é semelhante ao acesso usado para o implante coclear (Coleman et al., 2006).

### 3.3.3 Condição da cóclea para o transplante

O estado do tecido hospedeiro é um fator crítico para o sucesso da terapia celular. Matsuoka et al. (2007) observaram maior taxa de sobrevivência e diferenciação das CT mesenquimais de camundongos transplantadas em cócleas de gerbil com surdez induzida, quando comparadas às cócleas não lesadas. Hu et al. (2005b), transplantando CT neurais adultas de camundongos, constataram sobrevivência celular maior

em cobaias submetidas a dano ototóxico com neomicina transtimpânica quando comparadas a cócleas sem dano.

A influência da mudança do microambiente coclear, mediante dano ototóxico, na taxa de sobrevivência e diferenciação das CT transplantadas, provavelmente é causado por liberação de fatores de crescimento, quimiotáticos e angiogênicos (De Felipe et al., 2011; Lang et al., 2008).

### **3.4 Peculiaridades das células-tronco da orelha interna de camundongos neonatais**

Em cultura em suspensão sob determinadas condições, as células dissociadas de OC de camundongos neonatais possuem a capacidade de formar colônias flutuantes, chamadas esferas (Diensthuber et al., 2009; Lou et al., 2007; Oshima et al., 2007; Malgrange et al., 2002).

Essas esferas apresentam três morfologias distintas: sólidas, mistas e ocas. As esferas sólidas possuem a capacidade de se autorrenovar, proliferar e se diferenciar em células ciliadas. Estas propriedades são atribuídas à expressão de marcadores de CT no interior das esferas sólidas, como: *pax2*, *Islet1* e *nestina* (Oiticica et al., 2010; Diensthuber et al., 2009; Malgrange et al., 2002).

A população de esferas sólidas é predominante nos dois primeiros dias. Com a transformação das esferas sólidas em mistas e, posteriormente, em ocas, a população de esferas sólidas diminui gradativamente. Esta

mudança de morfologia é acompanhada por diferenciação epitelial das células que constituem a esfera, logo as esferas mistas e ocas não apresentam as propriedades de CT das esferas sólidas (Diensthuber et al., 2009).

A cultura de OC de camundongos neonatos nos dois primeiros dias apresenta, portanto, quantidade maior de esferas sólidas, e possui melhores condições para ser aplicada em experimentos de transplante celular com o objetivo de regeneração de células ciliadas.

### **3.5 Razão para a escolha do xenotransplante**

Inicialmente o projeto consistia de um possível transplante autólogo de células-tronco em cobaias, pois estes animais são modelos em cirurgia otológica para acesso à orelha interna (Wysocki, 2005; Wells, 1986) e possuem sensibilidade alta à indução de surdez por ototóxicos (Poirrier, 2010). Portanto, as CT seriam obtidas da orelha interna de cobaias neonatas e transplantadas em cócleas de cobaias adultas após surdez induzida, pois se acreditava que o OC de cobaia neonata, dissociado e submetido às mesmas condições dos experimentos com camundongos neonatos, forneceria células com propriedades de autorrenovação, proliferação e diferenciação.

Em trabalho realizado pelo grupo de pesquisa do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP (Oiticica et al., 2010), constatou-se que as

células cocleares de cobaias neonatas formaram poucas esferas que, apesar de expressarem marcadores de células-tronco, como a nestina e Sox2, não apresentaram diferenciação em células ciliadas e células de suporte.

A incapacidade das células de cobaias de se comportarem como células-tronco, provavelmente é resultante do amadurecimento precoce da via auditiva destes animais, pois, ao contrário dos camundongos, que só apresentam potenciais evocados auditivos a partir do 12<sup>o</sup> dia de vida, as cobaias têm a sua maturação auditiva 12 a 15 dias antes do nascimento (Pujol, 1985). Oshima et al. (2007) constataram a formação de poucas esferas com propriedades de células-tronco em camundongos com 21 dias de vida, ou seja, 9 dias após o aparecimento dos potenciais evocados auditivos.

Outra possibilidade para a realização de um transplante autólogo seria a introdução de células-tronco de camundongos neonatos em camundongos adultos. Isto se mostrou inviável, porque não existe padronização na literatura de um protocolo de surdez induzida em camundongos. Uma das razões é um elevado *clearance* renal dos camundongos e nível de superóxido dismutase alto, proporcionando, respectivamente, uma meia-vida curta dos ototóxicos e estresse oxidativo menor na cóclea (Poirrier, 2010). Por causa da impossibilidade de obter um modelo de lesão coclear confiável ao utilizar camundongos adultos, optou-se usar a cobaia como animal receptor.

Vários outros fatores contribuíram para a escolha de cobaias, como animais modelos para a cirurgia experimental:

- Anatomia e técnica cirúrgica do osso temporal bem documentada (Wysocki, 2005; Wells, 1986);
- Acesso amplo à cavidade timpânica e orelha interna, por causa do tamanho considerável da bula timpânica (Wysocki, 2005); e,
- Porque o modelo de toxicidade coclear é mais confiável, ou seja, a cobaia é o melhor animal para indução de surdez neurosensorial de forma reprodutível (Poirrier, 2010).

A consideração principal em relação ao xenotransplante é a rejeição imunológica, pois consiste em respostas adquiridas e inatas (anticorpos e células *natural killer*, NK) que reconhecem e matam as células estranhas (Li et al., 2004). Em contrapartida, a cóclea é considerada um sítio imunologicamente privilegiado, pois apresenta uma imunoproteção natural, a barreira hematolabiríntica (Hildebrand et al., 2005). Por este motivo, não houve qualquer reação inflamatória tecidual compatível com reação enxerto-hospedeiro nos trabalhos em que foram usados xenotransplantes (Cho et al., 2011; Pandit et al., 2011; Ogita et al., 2010; Hu et al., 2009; Lang et al., 2008; Matsuoka et al., 2007; Coleman et al., 2006; Hildebrand et al., 2005).



## 4 MÉTODOS

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Animais

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sob os protocolos 1221/06 e 0466/08. Todos os procedimentos foram executados em concordância com o manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório (*National Research Council, 2003*).

A pesquisa foi financiada pelas instituições de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo N° 2009/09473-3, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo N° 573.920/2008-7. Também foi parcialmente apoiada pela infra-estrutura do CEPID–FAPESP Centro de Estudos do Genoma Humano (FAPESP), processo N° 98/14254-2.

Os experimentos foram realizados em centros de pesquisa do complexo da Universidade de São Paulo seguintes:

- Laboratório Genoma Funcional, chefiado pela Profa Luciana Haddad, localizado no Instituto de Biociências (IB-USP).
- Setor de Vetores Virais, chefiado pelo Prof. Bryan Strauss, sediado no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC-FMUSP).

- Laboratório de Investigação Médica (LIM 32), chefiado pela Dra Jeanne Oiticica, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).
- Laboratório de Habilidades Cirúrgicas em Otorrinolaringologia, chefiado pelo Prof. Dr. Rubens Vuono de Brito Neto, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

### **Camundongos (*Mus musculus*)**

Foram utilizados camundongos neonatos da raça BALB/c com 2 a 3 dias de vida de ambos os gêneros. Estes animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP. No estudo, foi utilizado um total de 256 animais e em cada experimento foram empregados de quatro a oito animais.

### **Cobaias (*Cavea Porcellus*)**

Foram usadas cobaias adultas de ambos os gêneros, com massa corpórea entre 250g e 350g, pêlo curto, apresentando reflexo de Preyer positivo e otoscopia normal. Foram excluídos os animais com sinais de infecção de orelha externa e média, gestantes, portadores de malformações e limiars auditivos acima de 40dB na frequência de 16kHz em testes de pesquisa do potencial evocado auditivo.

Os animais foram fornecidos inicialmente pelo CEDEME-UNIFESP (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil), e posteriormente pelo biotério privado Granja RG que foi responsável pelo transporte, manutenção e manejo. As cobaias eram mantidas em caixas plásticas forradas com maravalha, trocada diariamente, recebendo ração peletizada e água à vontade com suplemento de ácido ascórbico.

Durante todo o projeto foram utilizadas 90 cobaias, oito a dez animais em cada experimento.

No experimento final, oito animais foram divididos em dois grupos:

Estudo: composto por quatro animais, nos quais foram introduzidas CT com meio de cultura na orelha interna direita, após surdez induzida.

Controle: composto por quatro animais, nos quais foi introduzido somente meio de cultura na orelha interna direita, após surdez induzida.

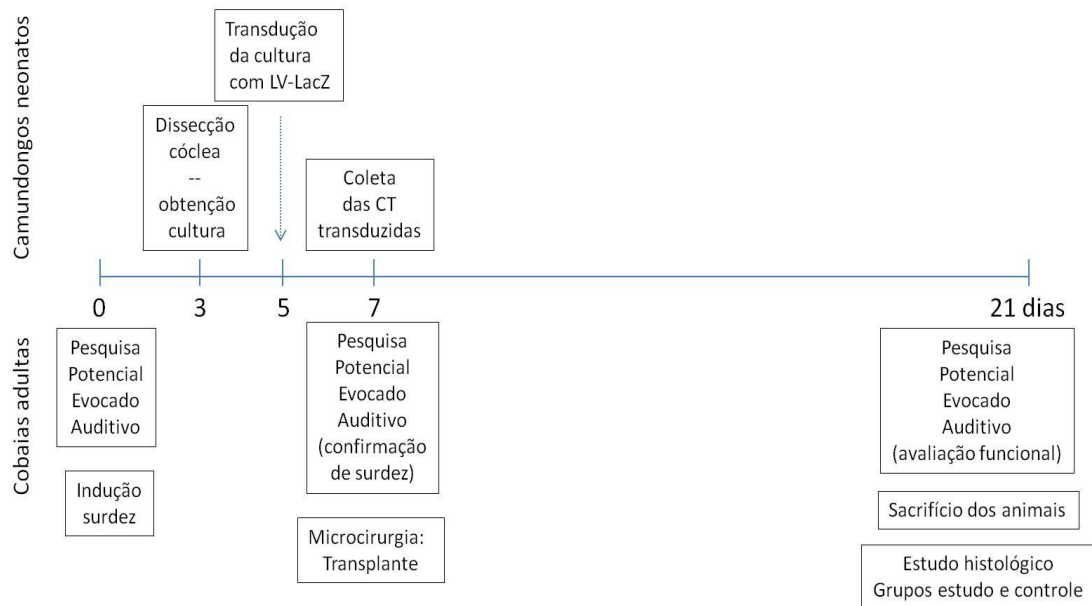
## **4.2 Linhas gerais do estudo**

Após pesquisa do potencial evocado auditivo para certificar audição normal, as cobaias foram submetidas à injeção de ototóxico na orelha direita

para indução de surdez que também foi comprovada com o mesmo teste supracitado.

No sétimo dia após a indução de surdez, foi realizada microcirurgia para transplante das CT, obtidas por meio de culturas do OC dissociado de camundongos neonatos. Estas CT transplantadas foram previamente transduzidas com um vetor viral contendo gene-repórter *Lac-Z*, que tem a função de auxiliar seu rastreamento na cóclea do animal hospedeiro.

Passados 14 dias do transplante, nova pesquisa do potencial evocado auditivo foi executada, para investigação de possível ganho auditivo. Em seguida, os animais foram sacrificados para a remoção das cócleas. Foram realizados cortes histológicos das cócleas excisadas para o estudo da sobrevivência, localização e expressão de marcador de células ciliadas das CT transplantadas (Figura 5).



**Figura 5** - Linhas gerais do estudo.

### 4.3 Obtenção das células-tronco do órgão de Corti de camundongos neonatos

Para obtenção da cultura primária, em cada experimento foram dissecados os OC de oito camundongos neonatos com 2 dias de vida. Após decapitação realizada com tesoura cirúrgica na base do forame magno, as cabeças foram borrifadas com álcool a 70%. O crânio foi dividido na linha sagital em duas partes e o tecido cerebral foi removido para visualização dos ossos temporais. Estes foram dissecados do resto do crânio e colocados em uma placa de Petri de 35mm de diâmetro contendo 3 $\mu$ L de HBSS (*Hank's balanced salt solution*) gelada (Parker et al., 2010; Oshima et al., 2009).

O procedimento de dissecção ocorreu sob visualização de uma lupa

microcirúrgica de dissecção (Tecnival, SQF-F), dentro de uma cabine de segurança biológica de fluxo laminar (Thermo), previamente submetida à antissepsia com álcool a 70% e, em seguida, exposta à luz Ultravioleta (UV) por 30 minutos. Com o auxílio de pinças (Dumont #5 e #55), isolou-se a cápsula ótica, após remoção da bula ótica e tecidos adjacentes do osso temporal. Destacou-se a cápsula ótica do labirinto membranoso da cóclea e o ducto coclear foi desprendido do modíolo, partindo do giro basal até o ápice. (Parker et al., 2010)

O ducto coclear isolado contém, além do OC, estria vascular, ligamento espiral e membrana de Reissner. O OC e o conjunto formado pela estria vascular, ligamento espiral e membrana de Reissner se dispõem no ducto coclear como duas fitas paralelas de fácil identificação e separação. Em seguida, com auxílio de duas pinças destacou-se o OC (Figura 6). Após este passo, ainda podem permanecer restos de modíolo que contêm gânglio espiral, e que foram removidos cuidadosamente com as pinças. (Oshima et al., 2009)



**Figura 6** - Ilustração do giro basal do órgão de Corti (OC) parcialmente isolado das estruturas adjacentes. Percebe-se o conjunto ligamento espiral/estria vascular/membrana de Reissner (seta azul) quase todo separado do OC (na borda externa do OC) e parte do modíolo (asteriscos), que contém o gânglio espiral, encontra-se na borda interna do OC. (Microscópio invertido Axiovert 40C - Zeiss, Alemanha - aumento 10x)

Dezesseis OC foram transferidos para uma placa de seis poços, apropriada para cultura em suspensão (Greiner Bio-One, Monroe, NC, USA), contendo 50µL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Adicionou-se 50µL de tripsina/EDTA a 0,25% e, em seguida, a placa foi colocada na incubadora por 5 minutos a 37°C e 5% de concentração de CO<sub>2</sub>. A tripsina possui a função de desagregar as células



entre si mediante sua propriedade proteolítica sobre proteínas intercelulares (Diensthuber et al., 2009, Oshima et al., 2009).

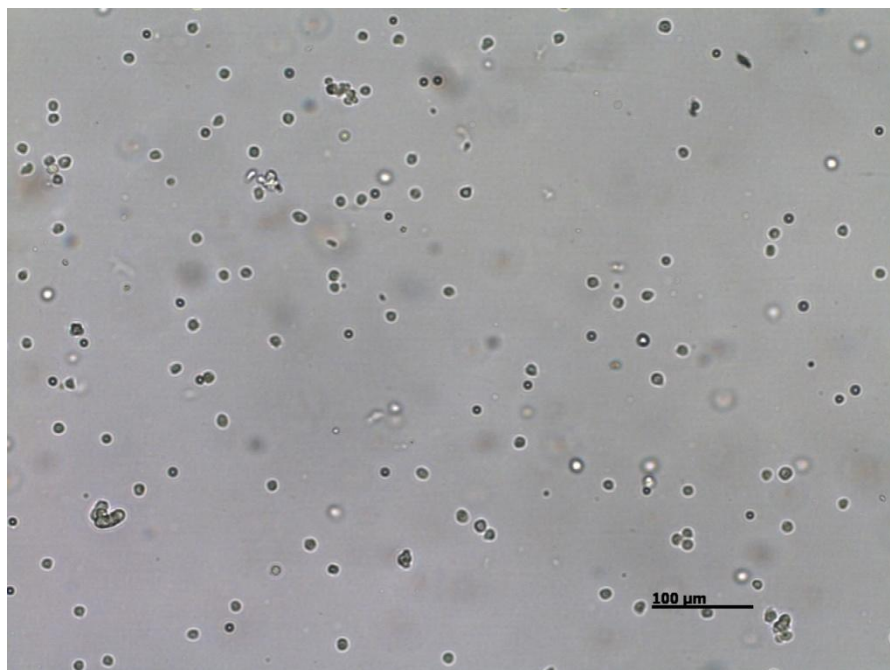
Esta ação enzimática foi bloqueada por meio da adição de 50 $\mu$ L de inibidor de tripsina com DNaseI. Para completar 200 $\mu$ L de solução, foram adicionados mais 50 $\mu$ L de meio de cultura com a composição seguinte: DMEM:F12 (Invitrogen) com os suplementos N2 (Invitrogen) e B27 (Invitrogen); os fatores de crescimento: *Epidermal Growth Factor* (EGF) a 20ng/mL, *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) a 10ng/mL, *Insulin Growth Factor* (IGF1) a 50ng/mL e sulfato de heparana a 50ng/mL; e ampicilina a 50 $\mu$ g/mL (Sigma - Aldrich, USA) (Oshima et al., 2009). Não se utilizou o antibiótico estreptomicina, como de rotina em cultivo celular, dada sua conhecida ototoxicidade.

Além da dissociação enzimática com tripsina/EDTA, foi realizada uma dissociação mecânica que consiste em pipetar o conteúdo contra o fundo da placa por 30 vezes (ponteiras plástica com filtro, epTIPS 20–300 $\mu$ L; Eppendorf, Alemanha). Após esta etapa, as células foram visualizadas no microscópio invertido Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha) para verificar se houve boa dissociação (Oshima et al., 2009).

Em outro poço da mesma placa, posicionou-se um filtro celular de nylon (BD Falcon<sup>TM</sup>) com 70 $\mu$ m de abertura de malha. O conteúdo foi transferido, filtrado e adicionados mais 1.800 $\mu$ L de meio de cultura, totalizando 2mL. Dez microlitros desta solução foram retirados e adicionados a 10 $\mu$ L de azul de tripano para contagem do total de células viáveis no

hemocítômetro (Câmara de Neubauer modificada) com auxílio de um microscópio invertido Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha). (Oshima et al., 2009)

A placa de seis poços foi colocada na incubadora por dois dias a 37°C e 5% de concentração de CO<sub>2</sub> (Figura 7).



**Figura 7** - Células do órgão de Corti em meio de cultura após dissociação enzimática e mecânica (Microscópio invertido Axiovert 40C - Zeiss, Alemanha - aumento 10x)

#### **4.4 Caracterização fenotípica das otosferas e diferenciação**

##### **4.4.1 Caracterização fenotípica das otosferas**

Para saber se as esferas sólidas expressavam alguns marcadores característicos de células-tronco, realizou-se o experimento seguinte:

- No DIV2, há predominância de esferas sólidas em relação às esferas mistas e ocas (Diensthuber et al., 2009). Nesta etapa da cultura, sob visualização com o microscópio invertido (ZEISS, Alemanha), foram pipetadas, individualmente, 80 a 100 esferas sólidas (pipetador Eppendorf 20 $\mu$ L) na placa de seis poços. Estas esferas foram distribuídas uniformemente em uma câmara de oito poços (Lab-Tek II) previamente revestida com 5 $\mu$ L de fibronectina (Sigma-Aldrich, USA), que propicia a aderência e a diferenciação celular.
- Nas condições da incubadora a 37<sup>0</sup>C e 5% de CO<sub>2</sub>, a câmara de oito poços com as esferas selecionadas permaneceu por 12 horas em meio de cultura com fatores de crescimento. Foi utilizado este breve período de cultura para que as esferas aderissem ao fundo da placa, mas que não houvesse diferenciação.
- Após esse período, as esferas foram fixadas em paraformaldeído a 4% em solução salina tamponada de fosfato (PBS). Decorridos 20 minutos em paraformaldeído (PFA) a 4% e em temperatura ambiente (TA), as esferas foram lavadas com PBS e permeabilizadas em surfactante não iônico Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) a 0,3% por 10 minutos em TA. Após a lavagem com PBS, foram tratadas em TA com glicina 0,1M em PBS por 20 minutos. Bloqueados os sítios de ligação não específicos com PBS que continham albumina sérica bovina (BSA) a 1% e IgG a 5% não imune, correspondente ao anticorpo secundário a ser usado (Cabra

IgG Abcam; Coelho IgG Abcam) por 1 hora em TA (Pranchevicius et al., 2008).

- Após lavagem com PBS, as esferas foram incubadas durante 16 horas a 4<sup>0</sup>C com os anticorpos primários (Tabela 2) diluídos em PBS e BSA1%.
- Após nova lavagem com PBS, as esferas foram incubadas com anticorpos secundários diluídos contendo BSA1% e mantidas por uma hora em TA, e protegidas da luz ambiente.
- Foram realizadas mais duas lavagens com PBS e adicionada uma gota de meio de montagem Prolong Gold contendo DAPI (Invitrogen) corante de DNA para a marcação nuclear. Em seguida, os poços que continham as células fixadas e tratadas para imunofluorescência foram selados com lamínula e esmalte. (Oiticica et al., 2010; Diensthuber et al., 2009; Oshima et al., 2009)

Em todas as imunofluorescências indiretas, foram separados poços para o controle negativo dos anticorpos primários e secundários.

**Tabela 2** - Relação dos anticorpos usados e as respectivas funções dos marcadores fenotípicos.

Marcadores	Anticorpos primários	Anticorpos secundários	Características destes marcadores fenotípicos
de células-tronco	Camundongo monoclonal anti- <b>Nestina</b> 1:100 (Chemicon)	Anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen)	Filamento intermediário identificado primeiramente em células-tronco neuroepiteliais; durante embriogênese, é expresso em células proliferativas e, em tecidos adultos, é restrito a áreas de regeneração (Lopez, 2004)
	Cabra policlonal anti- <b>Sox2</b> 1:50 (Santa Cruz)	Anti-cabra conjugado com Alexa Fluor 546 (1:500, Invitrogen)	Responsável pelo desenvolvimento da epitélio sensitivo da orelha interna e é expresso em células de suporte e CT da orelha interna. Mantém as funções de mitose e transdiferenciação das células de suporte (Oesterle, 2008; Kiernan, 2005)
de células diferenciadas	Coelho policlonal anti- <b>Miosina VIIa</b> 1:100 (ABR)	Anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen)	Marcador de células ciliadas, a partir de E15 (15 dias de vida embrionária). (Cotanche, 2010)
	Coelho monoclonal anti- <b>p27kip1</b> 1:50 (Abcam)	Anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 546 (1:400, Invitrogen)	Marcadores de células de suporte (Diensthuber, Heller, 2010)
	Camundongo monoclonal anti- <b>beta III tubulin</b> 1:250 antibody (Millipore)	Anti-camundongo Cy3 (1:1000, Invitrogen)	Marcador neuronal (Martinez-Monedero et al., 2008)

#### 4.4.2 Diferenciação

Para obtenção da diferenciação das células das esferas em células com o fenótipo de células-ciliadas, células de suporte e neurônios, foi utilizado um protocolo semelhante ao da caracterização fenotípica das esferas sem diferenciação, e a principal diferença é o meio de cultura com omissão dos fatores de crescimento e em meio de cultura aderente.

Após o revestimento com poli-L-ornitina (0,1mg/mL) e fibronectina (5µg/mL), as esferas pipetadas individualmente da placa de cultura em suspensão foram distribuídas na câmara de oito poços (Lab-Tek II). Ao invés de completar cada poço com meio de cultura que continha fatores de crescimento, foi adicionado o mesmo meio de cultura desprovido daqueles fatores e 80% do meio foi trocado a cada dois dias. Após sete dias em incubadora a 37<sup>0</sup>C e atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>, foram realizados os passos de fixação (PFA 4%), permeabilização (Triton X-100 0.3%), bloqueio dos sítios de ligação não específicos (1% BSA e IgG 5% não imune), adição dos anticorpos primários específicos para o fenótipo de células diferenciadas, adição de anticorpos secundários e montagem da lâmina com Prolong Gold com DAPI (Invitrogen), como descrito previamente (Oiticica et al., 2010).

Em todas as imunofluorescências indiretas, foram separados poços para o controle negativo dos anticorpos primários e secundários.

#### 4.4.3 Microscopia e processamento de imagens

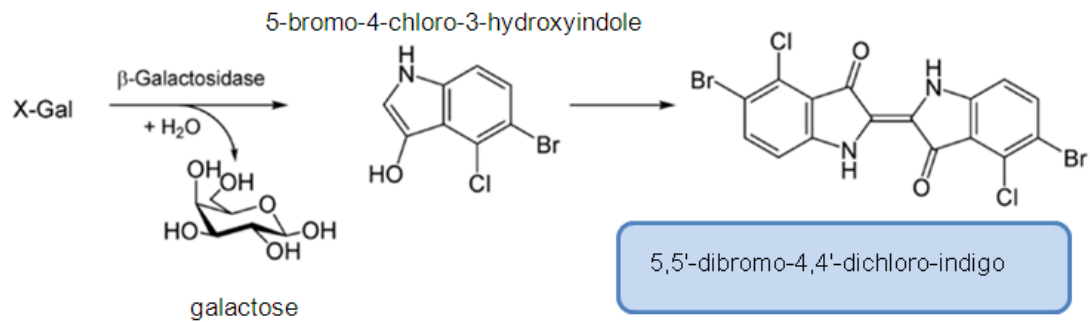
O OC, inteiro e dissociado, e as esferas em cultura foram visualizados

por intermédio de um microscópio invertido Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha), fotografados com uma câmera digital AxioCam (Zeiss, Alemanha) e as imagens adquiridas com auxílio de um *software* em um computador pessoal (Fujitsu-Siemens) com Windows XP.

As esferas marcadas com anticorpos foram visualizadas por meio de um microscópio de fluorescência (Axioplan, Carl Zeiss, Alemanha) e *software* para captura digital das imagens (*Isis Fish Imaging Meta System*). E, por meio da Rede Multiusuários Sistema FMUSP/HC, utilizou-se o microscópio confocal LSM510 (Zeiss, Alemanha) do InCor-HCFMUSP.

#### **4.5 Transdução do vetor viral contendo o gene *LacZ* nas otosferas**

Para identificar as células transplantadas na cóclea das cobaias, foi utilizado o gene *LacZ*, que codifica uma enzima chamada beta-galactosidase. Esta enzima cliva o substrato incolor X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-galactopyranoside), um análogo da lactose, em galactose e 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole. Este dimeriza espontaneamente e é oxidado em um produto insolúvel de cor azul (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo), tornando a célula produtora da enzima facilmente identificável (Figura 8) (Pfeifer et al., 2001).



**Figura 8** - Reação da enzima beta-galactosidase clivando X-Gal em galactose e 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole, que dimeriza espontaneamente e é oxidado, gerando o 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo (produto insolúvel de cor azul)

Outra maneira de identificar a enzima é por meio de imunofluorescência indireta com o uso de anticorpo anti-beta-galactosidase.

O gene *LacZ* não está presente na maioria dos genomas e é um gene característico de bactérias. Essa propriedade é interessante para aplicação como gene-repórter. Para sua adequada transdução nas células-alvo, o gene *LacZ* foi inserido, por meio de enzimas de restrição, em um vetor lentiviral (LV-*LacZ*) (Figura 9) (Pfeifer et al., 2001).



**Figura 9** - Representação esquemática do vetor lentiviral com o gene *LacZ* inserido (Fonte: Pfeifer et al., 2001)



O vetor lentiviral, derivado do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV1), é o único entre os retrovírus com a capacidade de transfectar células em divisão e células mitoticamente inativas, portanto, por causa destas características, são considerados como ferramentas inovadoras para a transdução de determinados genes em células-alvo. O lentivírus se integra ao genoma da célula hospedeira e garante a expressão dos seus genes em longo prazo (Hildebrand et al., 2008, Totsugawa et al., 2003).

Seguindo os padrões de segurança adequados para a manipulação de partículas virais, os experimentos de transdução do LV-*LacZ* (Plasmid 12108 Mammalian Expression, Lentiviral) nas CT foram executados no Setor de Vetores Virais no InCor-HCFMUSP. Estes vetores lentivirais, portadores do gene *LacZ*, foram adquiridos da empresa Addgene (Cambridge, MA, EUA).

Antes de submeter as CT de orelha interna de camundongos neonatais à transdução com LV-*LacZ*, como é descrito a seguir, testou-se a eficiência de transdução do LV-*LacZ* em uma linhagem de células imortalizadas derivadas de fibroblastos de embrião de camundongos, as células NIH 3T3.

De acordo com Diensthuber et al. (2009), a cultura *in vitro* no segundo dia apresenta quantidade maior de esferas sólidas. Estas possuem maior capacidade proliferativa e quantidade maior de células com marcadores de células progenitoras. Logo, foi definido que no segundo dia do

estabelecimento da cultura, as células seriam transportadas na própria placa de seis poços para o Setor de Vetores Virais do InCor, para a transdução.

Inicialmente, foi realizada a contagem das células da cultura na placa de Neubauer, para determinar quantas partículas virais seriam colocadas no meio de cultura. O ideal é obter a relação de cinco partículas virais para cada célula (*multiplicity of infection*, MOI igual a 5). O conteúdo da cultura em suspensão foi centrifugado (1000rpm durante 5min) e o *pellet* ressuspendido em 100µL de meio de cultura. Em seguida, foram adicionadas as partículas virais LV-LacZ na concentração desejada e polibreno (4µg/mL). As células ficaram expostas a esta concentração viral por 3 horas na incubadora a 37<sup>0</sup>C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Passadas 3 horas, colocou-se o conteúdo de células transduzidas na placa de seis poços com 2mL de meio de cultura, que permaneceu na incubadora por 48 horas. Após este período, centrifugou-se o conteúdo da placa (1000rpm durante 5min) e, após descartar o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 1mL de tripsina a 0,1%, e deixou-se na incubadora durante 5 minutos. Nesta etapa ocorre a dissociação química das esferas. Após o período de 5 minutos, o conteúdo foi pipetado 30 vezes contra o fundo do microtubo, realizando-se a dissociação mecânica das esferas. Centrifugado o conteúdo de células com tripsina e, após descartar o sobrenadante, o *pellet* de células foi ressuspendido em meio de cultura.

Após realizar uma nova contagem das células na placa de Neubauer e a população de células foi concentrada em quatro microtubos de 10µL

cada com uma concentração de 10.000 células/ $\mu$ L, totalizando 100.000 células por tubo.

Quatro microtubos foram identificados e transportados em caixas de isopor com gelo para o Laboratório de Habilidades Cirúrgicas em Otorrinolaringologia, onde o seu conteúdo foi injetado na cóclea de cobaias com surdez induzida. Outros quatro microtubos contendo somente meio de cultura foram utilizados para os animais com surdez induzida do grupo controle.

O restante das células, que não foi encaminhado para o transplante, foi submetido a um método histoquímico com X-gal para a confirmação da transdução destas células com LV-*LacZ*. Este método consiste na detecção da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase produzida pelo gene *LacZ*. As células foram distribuídas na câmara de oito poços (Lab-Tek II) previamente revestida com fibronectina, isto é, em condições aderentes. A câmara de oito poços foi submetida à centrifugação (1500rpm durante 5min). Após lavagem com PBS, os poços foram incubados em glutaraldeído a 0,25% por 5min a 4<sup>o</sup>C. Em seguida o glutaraldeído a 0,25% foi removido e nova lavagem com PBS foi realizada. As células foram incubadas a 37<sup>o</sup>C por 8 horas com uma solução que continha 100 $\mu$ g/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil beta-d-galactopiranoside, Sigma-Aldrich, MO, USA), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 20mM de ferrocianeto de potássio [K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, Sigma-Aldrich, USA], 20mM de ferricianeto de potássio [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, Sigma-Aldrich, USA], 100mM NaPO<sub>4</sub>, e PBS pH 7,3. Após 16 horas desta etapa, com auxílio de microscópio invertido (Axiovert40, Zeiss, Alemanha), as células transduzidas com LV-

*LacZ* foram visualizadas em azul, de acordo com a reação X-gal descrita no primeiro parágrafo desta seção.

#### **4.6 Pesquisa do potencial evocado auditivo**

Os testes de audição foram realizados por meio da pesquisa do potencial evocado auditivo das cobaias em três tempos diferentes do experimento:

- antes da indução da surdez para confirmação de audição normal do animal;
- após a indução da surdez para comprovação do aumento dos limiares auditivos; e,
- 14 dias após o transplante das CT na orelha interna das cobaias para avaliação funcional pós-operatória.

Para obtenção dos limiares dos potenciais evocados auditivos, usou-se o aparelho *Intelligent Hearing System* e o *software Smart-EP (Intelligent Hearing System, Miami, USA)* acoplado a um *laptop HP mini 110* (Figura 10). Este *software* foi adaptado para geração de estímulos acústicos específicos, por transdutores de frequência alta. Após anestesia profunda dos animais com ketamina (intramuscular 40mg/kg Ketalar<sup>®</sup>) e xilazina (intramuscular 10mg/kg Rompun<sup>®</sup>), foram inseridos eletrodos de agulha no tecido subcutâneo do vértex (ativo) e das regiões ventrolaterais de orelha D

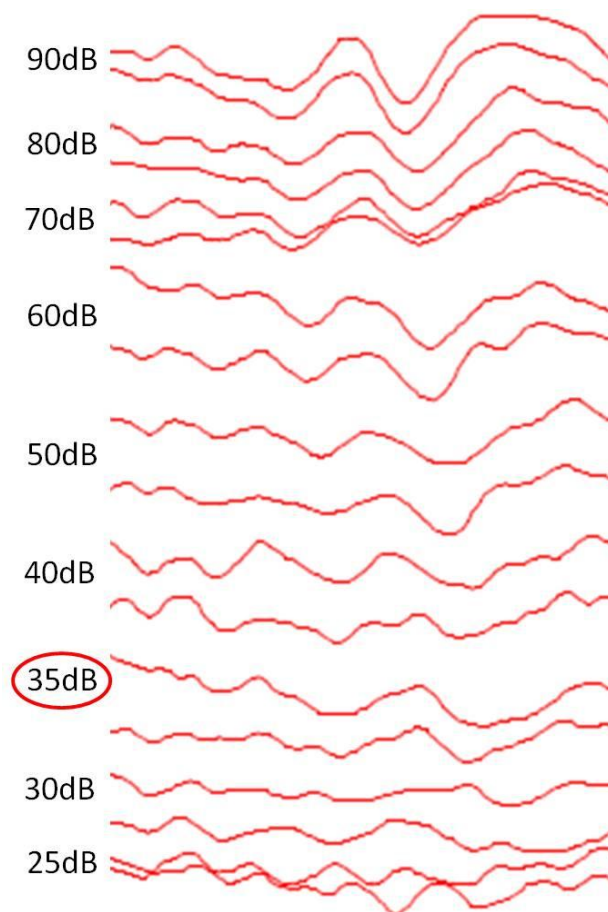
(referência) e esquerda (terra). Uma sonda foi introduzida gentilmente no conduto auditivo externo direito. Após checar a impedância ( $<3k\Omega$ ), os estímulos na frequência específica (16kHz) foram emitidos para a orelha direita por intermédio de fones transdutores de frequência alta, previamente calibrados. Esta frequência específica foi escolhida, por ser a que melhor pode ser detectada em cobaias após insultos ototóxicos (Poirrier et al., 2010).



**Figura 10** - Obtenção dos potenciais evocados auditivos em cobaia anestesiada e com os eletrodos e sonda posicionados adequadamente.

Os estímulos foram emitidos com uma taxa de repetição de 19,1 vezes por segundo, em um total de 1024 repetições para cada intensidade. O ganho utilizado foi de 100.000. A primeira intensidade de estímulo testada

foi de 90dB NPS com decréscimos de 10dB NPS, inicialmente, e 5dB NPS, ao redor do limiar auditivo, que foi determinado pela última intensidade com todas as ondas presentes (Figura 11). Todas as intensidades foram verificadas duas vezes para verificação da reprodutibilidade da resposta e os limiares foram analisados por dois pesquisadores diferentes (Cho et al., 2011; Grimm et al., 2009).



**Figura 11** – Curvas eletrofisiológicas de diferentes intensidades decrescentes, evidenciando a onda V até 35dB.

#### **4.7 Indução de surdez nas cobaias adultas pré-transplante**

Para obtenção do dano às células ciliadas externas e internas do epitélio sensitivo da orelha interna com conseqüente aumento dos limares auditivos, todas as cobaias, após anestesia profunda com ketamina (intramuscular 40mg/kg Rompun<sup>®</sup>) e xilazina (intramuscular 10mg/kg Ketalar<sup>®</sup>), receberam injeção transtimpânica de neomicina 10% (preparada pela Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) (Hu et al, 2005b).

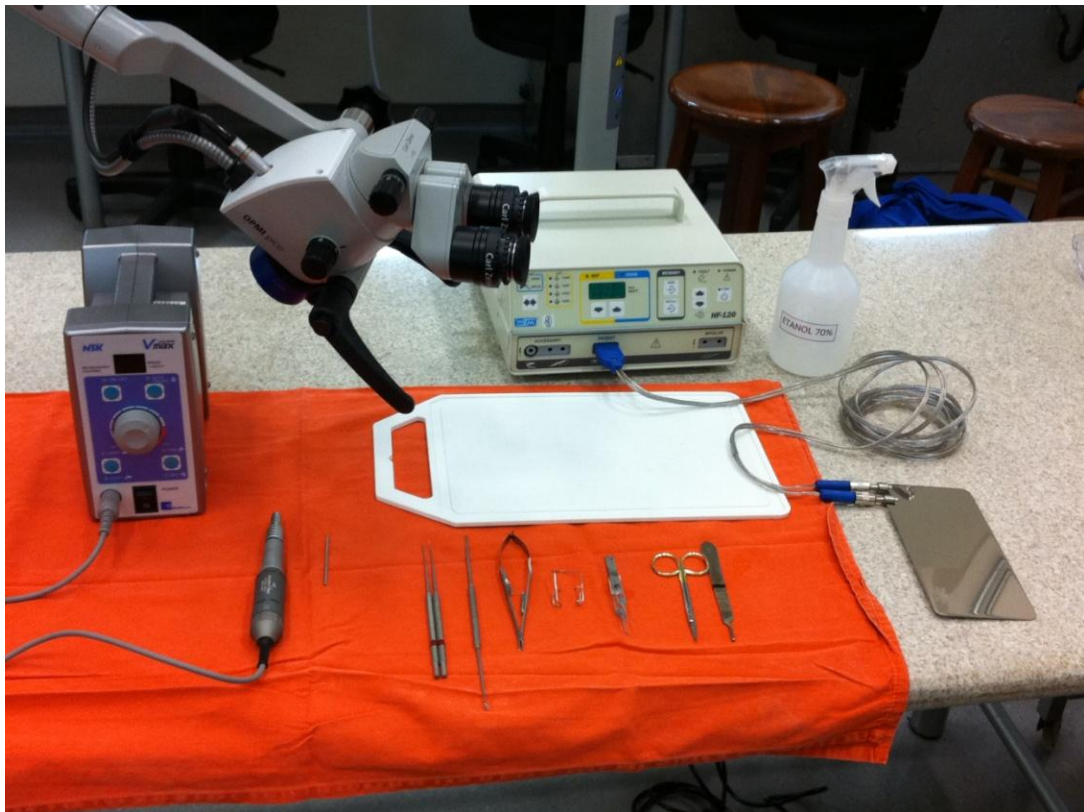
Sob visualização em microscópio OPMI Pico (Zeiss, Alemanha), por leve retração da orelha externa, a membrana timpânica foi exposta com nitidez. Em uma seringa com 1mL de capacidade, acoplada em um jelco 24, a orelha média foi preenchida com 0,1mL de neomicina a 10%. Durante todo procedimento e após 15min da infusão do aminoglicosídeo, a orelha direita esteve posicionada para cima para facilitar a difusão da droga pela janela redonda. (Hu et al., 2005b)

Após quatro dias da indução da surdez, as cobaias que apresentaram limiar auditivo abaixo de 70dB NPS foram excluídas do estudo (Izumikawa et al., 2005). Em seguida, as cobaias com surdez induzida foram submetidas à microcirurgia para transplante das CT na cóclea.

#### **4.8 Microcirurgia para transplante das células-tronco na cóclea**

Sob anestesia profunda, previamente descrita, e antibioticoterapia

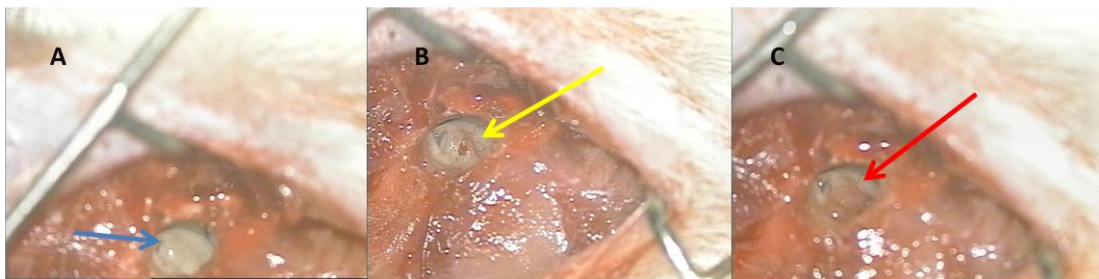
profilática benzilpenicilina potássica (intramuscular 100.000UI/kg), as cobaias foram colocadas sobre mesa cirúrgica em condições assépticas (Figura 12) e submetidas à antissepsia com álcool 70% da região temporal direita. Em seguida, no plano subcutâneo, foi infiltrada xilocaína a 1% sem vasoconstritor (4,5mg/kg) no local da incisão e feita a tricotomia da região retroauricular (Han et al., 2010).



**Figura 12** - Mesa cirúrgica composta (no sentido horário): microscópio cirúrgico OPMI Pico (Zeiss, Alemanha), bisturi elétrico com placa (HF 120 WEM), borrifador com álcool a 70%, instrumentos cirúrgicos (caneta de bisturi para lâmina bisturi nº 15, tesoura de íris curva, pinça, retrator, porta-agulha, rugina, perfurador de platina (0,3mm), estilete, microbroca, caneta e motor (Vmax, NSK)



Com abordagem dorsal (Wells et al., 1986), uma incisão pré-auricular de 2,5cm e divulsão do músculo temporal, foi exposto o plano subperiosteal da bula. Em visualização microscópica (microscópio cirúrgico Zeiss OPMI Pico), identificou-se a crista arqueada, parâmetro anatômico importante, pois define o limite entre a bula e a cavidade craniana. Dois milímetros abaixo da crista arqueada, a bula foi amplamente aberta com microbroca para posterior exposição do nicho da janela oval e do nervo facial. Usando um perfurador de 0,3mm, foi realizada uma cocleostomia no giro basal junto à janela redonda (Figura 13), logo dando acesso à escala timpânica. (Cho et al., 2011)



**Figura 13** - Microcirurgia do osso temporal de cobaia para transplante das CT: (A) - janela redonda (seta azul); (B) - cocleostomia 1mm da janela redonda no giro basal da cóclea, dando acesso à escala timpânica; (C) - cocleostomia fechada com pedaço de músculo temporal, após a infusão das CT. (microscópio cirúrgico Zeiss OPMI Pico – aumento 15X)

Com auxílio da microsseringa de Hamilton 26G, um volume de 10 $\mu$ L foi infundido na escala timpânica em uma velocidade aproximada de 5 $\mu$ L/min. No grupo de estudo, o volume de 10 $\mu$ L continha meio de cultura

com 10.000 células/ $\mu$ L, e, no grupo controle, somente o meio de cultura. Após a infusão dos referidos conteúdos, a cocleostomia foi ocluída com um pedaço de músculo temporal (Hu et al., 2005b).

É importante salientar que no ato da microcirurgia, os tubos com meio de cultura contendo células-tronco e os tubos somente com o meio de cultura foram previamente identificados de forma que o cirurgião desconhecesse o conteúdo implantado nas cócleas. Logo, as identificações dos tubos foram pareadas com as dos animais para que, posteriormente à análise dos cortes histológicos, fossem reveladas.

Realizou-se revisão de hemostasia e, em seguida, suturou-se a incisão em dois planos: muscular (Poliglactina 910 - Vicryl<sup>®</sup> - 6-0) e pele (polipropileno - Prolene<sup>®</sup> - 6-0).

#### **4.9 Estudo histológico das cócleas transplantadas**

Após overdose de xilazina e ketamina, e colocação em câmara de dióxido de carbono por 5 minutos, os animais foram decapitados e, com deslocamento da mandíbula, acessou-se os ossos temporal que foram devidamente removidos. As cócleas tiveram seus ápices perfurados para serem perfundidas a 4<sup>o</sup>C com um fixador de tecido – paraformaldeído a 4% e pH 7,4 (Parker et al., 2007). Após a fixação, as cócleas foram lavadas em PBS e descalcificadas em ácido fórmico a 10% por 24 horas à temperatura ambiente.

O material foi colocado no meio de inclusão *Tissue Freezing Medium* (JUNG). Cortes longitudinais da cóclea, paralelos ao modíolo, com espessura de 16µm foram realizados no criostato a -20<sup>0</sup>C (Leica CM 1850) (Han et al., 2010).

Os cortes histológicos foram lavados duas vezes com PBS e, em seguida, permeabilizados uma vez com 5% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, USA), 3% soro normal (específico para a espécie que originou o anticorpo secundário), 0,3% Triton X-100 em PBS. As amostras foram incubadas por 24 horas com os anticorpos primários diluídos na solução permeabilizadora acima em ambiente úmido a 4<sup>0</sup>C, Tabela 3. Após esta etapa, foram lavadas três vezes com PBS e incubadas de 40 a 60 minutos com os anticorpos secundários (Tabela 3), diluídos 200 vezes (1:200) na solução permeabilizante, a 4<sup>0</sup>C. Por fim, as amostras foram novamente lavadas três vezes com PBS e adicionadas ao meio de montagem Prolong Gold com DAPI (marcador nuclear) para detecção da fluorescência (Parker et al., 2007).

**Tabela 3** - Anticorpos primários e secundários utilizados na imunohistoquímica

<b>Anticorpos primários</b>	<b>Anticorpos secundários</b>
Camundongo Anti- <b>β-galactosidase</b> 1:1000 (Sigma-Aldrich, USA)	Anti-camundongo conjugado com Cy3 (1:1000, Invitrogen)
Coelho policlonal anti- <b>Miosina VIIa</b> 1:100 (ABR, Golden, CO, EUA)	Anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (1:400, Invitrogen)

#### **4.10 Contagem das células transplantadas nos cortes histológicos das cócleas do grupo estudo**

Por causa da integridade estrutural dos giros basais em todas as cócleas seccionadas do grupo estudo, foram visualizadas as células transplantadas nas escalas timpânica, média e vestibular daqueles giros. A contagem das células transplantadas foi restrita à escala média.

A escala média, onde se localiza originalmente o epitélio sensorial, foi dividida em quatro sub-regiões anatômicas: parede lateral, membrana basilar, limbo espiral e endolinfa. Foi comparada a distribuição das células transplantadas entre cada compartimento.

A marcação positiva para  $\beta$ -gal+ significa expressão do gene *LacZ* até o dia da remoção das cócleas, evidenciando, portanto, a sobrevivência das células transplantadas. As células  $\beta$ -gal+ que também foram positivas para Miosina VIIa corresponderam às células transplantadas que expressaram o fenótipo de célula ciliada (Parker et al., 2007)

Quatro cortes médio-modiolar longitudinais com 16 $\mu$ m de espessura cada, foram analisados em cada animal. Para evitar a contagem das mesmas células por mais de uma vez, somente cortes não adjacentes foram considerados. Os cortes cocleares foram visualizados com auxílio de um microscópio invertido com fluorescência (Axioplan, Zeiss, Alemanha) ou um microscópio confocal (LSM 510, Zeiss, Alemanha).

#### 4.11 Análises Estatísticas

De acordo com Armitage (1987), o cálculo do tamanho da amostra foi considerado utilizando-se os parâmetros seguintes: uma diferença clinicamente significativa de 15dB a ser detectada por meio de pesquisa, nível de significância de 5% bicaudal, considerando o desvio padrão dos limiares auditivos de 6dB e poder do teste de 90%. A partir destes parâmetros, o tamanho calculado de amostra para cada grupo foi de, no mínimo, três cobaias.

As variáveis quantitativas deste estudo incluíram: os limiares auditivos antes e após surdez induzida por ototóxicos e após o transplante com CT; a média de células  $\beta$ -gal+ encontradas nas sub-regiões da escala média; e, a proporção da expressão de miosina VIIa no total de células  $\beta$ -gal+. Essas variáveis foram descritas por meio de suas médias e desvios-padrão.

A comparação entre os momentos e a medida da variância foi realizada por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon. Nas comparações entre o número de células  $\beta$ -gal+ e o percentual de células  $\beta$ -gal+ que também expressam Miosina VIIa entre as diferentes sub-regiões da escala média, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

O programa IBM SPSS Statistics 20 foi usado para as análises estatísticas.

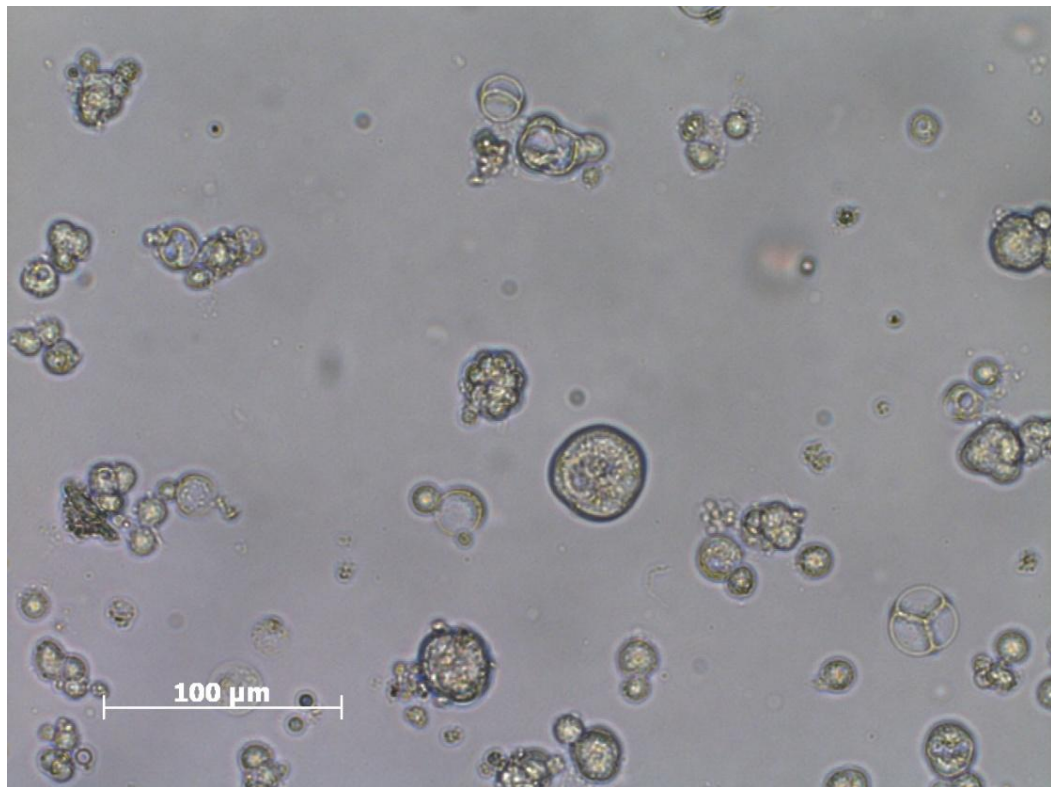
## 5 RESULTADOS

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Células provenientes da orelha interna de camundongos neonatos se comportam como células-tronco**

No presente estudo, assim como previamente demonstrado pelo grupo de pesquisa do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP (Oiticica et al., 2010), após 2 dias (DIV2), a cultura em suspensão do OC de camundongo neonatal dissociado originou aglomerados celulares (esferas). Estas esferas foram capazes de se propagar em esferas adicionais por meio de passagens. Obteve-se no máximo duas passagens.

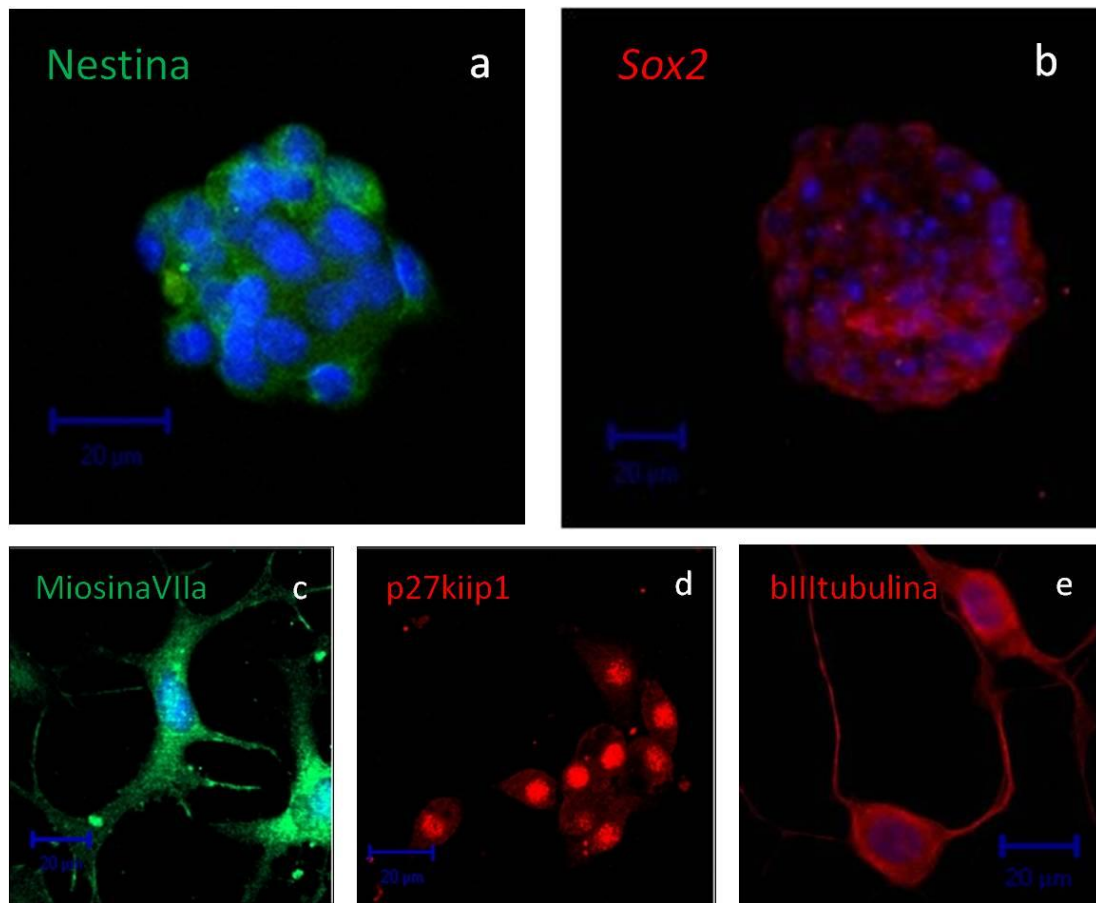
Além da propriedade de autorrenovação, as esferas predominantes neste período (DIV2) se apresentaram com formato arredondado e com pequenas células compactadas em seu interior, sendo assim chamadas de esferas sólidas. (Figura 14)



**Figura 14** – Esferas sólidas visualizadas no segundo dia *in vitro* (DIV2) da cultura em suspensão de OC dissociado de camundongo neonato. (Microscópio invertido Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha - aumento 20x)

De acordo com estudos prévios, marcadores específicos de CT foram expressos nas esferas sólidas (Diensthuber et al., 2009; Wang et al., 2006; Malgrange et al., 2002). Por meio de imunofluorescência indireta, foram demonstrados marcadores de CT nas esferas sólidas: Sox2 (Figura 15a) e Nestina (Figura 15b).





**Figura 15** - Esferas expressando nestina (figura a em vermelho) e Sox2 (figura b em verde), marcadores de células-tronco, após 2 dias de cultura. Após 7 dias de diferenciação, há expressão de Miosina VIIa (figura c em verde), p27kip1 (figura d em vermelho) e beta-III-tubulina (figura e em vermelho), marcadores para células ciliadas, células de suporte e neurônios, respectivamente. Marcação nuclear com DAPI (figuras a, b, c, e figura e em azul). Escala de barra: 20µm

Para determinar se as células das esferas podem diferenciar em células ciliadas, células de suporte e neurônios, as esferas sólidas foram mantidas em cultura aderente por 7 dias. Após fixação e imunofluorescência das células aderidas, foram constatadas expressão de Miosina VIIa (Figura 15c) - marcador de célula ciliada, p27kip1 - marcador de célula de suporte e beta-III-tubulina – marcador de neurônios (Figura 15d).

## 5.2 Eficiência da transdução viral *in vitro*

Vetores lentivirais podem mediar integração e expressão eficientes de genes, em longo prazo, em células hospedeiras *in vitro* e *in vivo* (Totsugawa et al., 2003). Nos experimentos do presente estudo, após a transfecção do lentivirus contendo o gene *LacZ*, as células expressaram a enzima  $\beta$ -galactosidase, capaz de clivar o substrato incolor X-gal e gerar um produto insolúvel de cor azul, que torna as células facilmente identificáveis (Figura 16).



**Figura 16** - Células da esfera transduzidas pelo LV-LacZ e coradas em azul após a reação X-gal.

### 5.3 Eficiência da neomicina como indutor de perda

Inicialmente, os limiares auditivos de todas as cobaias do estudo foram normais (40dB SPL frequência específica 16kHz).

Após sete dias da injeção de neomicina em todas as orelhas direitas das cobaias dos grupos estudo e controle, os limiares auditivos foram testados para avaliar a perda auditiva e observou-se um aumento médio de  $35,6 \pm 4,2$  dB NPS nos limiares auditivos em relação ao limiar de triagem 40dB NPS ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4).

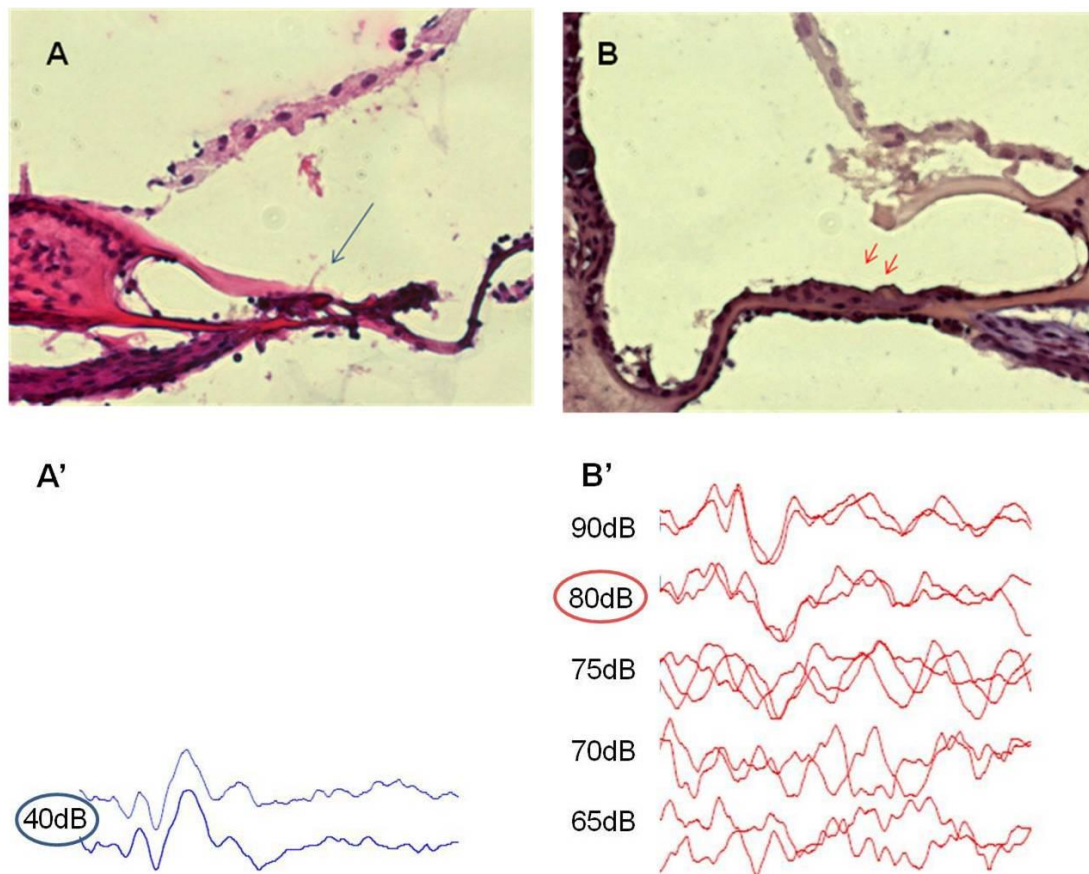
**Tabela 4** - Limiares auditivos médios (dB SPL) da pesquisa do potencial evocado auditivo das orelhas das oito cobaias analisadas antes e após a indução de surdez.

relha	Momentos		Variação média (dB)	p <sup>†</sup>
	Antes indução da surdez (dB)	Sete dias após indução da surdez (dB)		
Direita (aplicada neomicina)	40 ± 0	75,6 ± 4,2	35,6 ± 4,2	0,01
Esquerda (controle)	40 ± 0	40 ± 0	0 ± 0	1,0

†: *Wilcoxon signed ranks test* entre os momentos

Histologicamente, o OC e as outras estruturas especializadas do ducto coclear são totalmente destruídos após o tratamento com neomicina (Poirrier et al., 2010; Morais et al., 1998). No presente estudo, a

citoarquitetura do OC e o arranjo habitual de suas células ciliadas e de suporte não foram identificados após a ação da neomicina transtimpânica. O epitélio na membrana basilar tornou-se simples com células cuboidais ou achatadas. Outra mudança anatômica é o descolamento da membrana tectorial, usualmente em contato com os cílios das células ciliadas externas (Figura 17).



**Figura 17** - Cortes longitudinais corados com Hematoxilina e Eosina das cócleas esquerda (Figura A, normal) e direita (Figura B, exposta à neomicina) de uma cobaia do grupo controle. As membranas basilares da cóclea esquerda com o Organ de Corti íntegro (seta azul) e a cóclea direita com o epitélio achatado (duas setas vermelhas). Após 7 dias, a exposição à neomicina aumentou significativamente os limiares auditivos na orelha direita do grupo controle (B') comparados com a orelha esquerda não exposta (A'), para frequência específica 16kHz.

#### 5.4 Grupos estudo e controle exibem limiares auditivos similares antes e após o transplante

Não houve diferença estatística significativa na comparação dos limiares auditivos entre os momentos, antes e 14 dias após o transplante das CT, nos grupos estudo e controle ( $p > 0,05$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Limiares auditivos médios (dB NPS) da pesquisa do potencial evocado auditivo da orelha direita das oito cobaias analisadas antes e após transplante no grupo estudo (células tronco + meio de cultura) ou grupo controle (somente meio de cultura).

Grupos	Momentos		Variação média (dB)	p <sup>†</sup>
	Pré transplante (dB)	14 dias após transplante (dB)		
Estudo (n = 4)	73,8 ± 4,8	78,8 ± 2,5	- 5,0 ± 4,1	0,1
Controle (n = 4)	77,5 ± 2,9	80,0 ± 4,1	- 2,5 ± 2,9	0,16

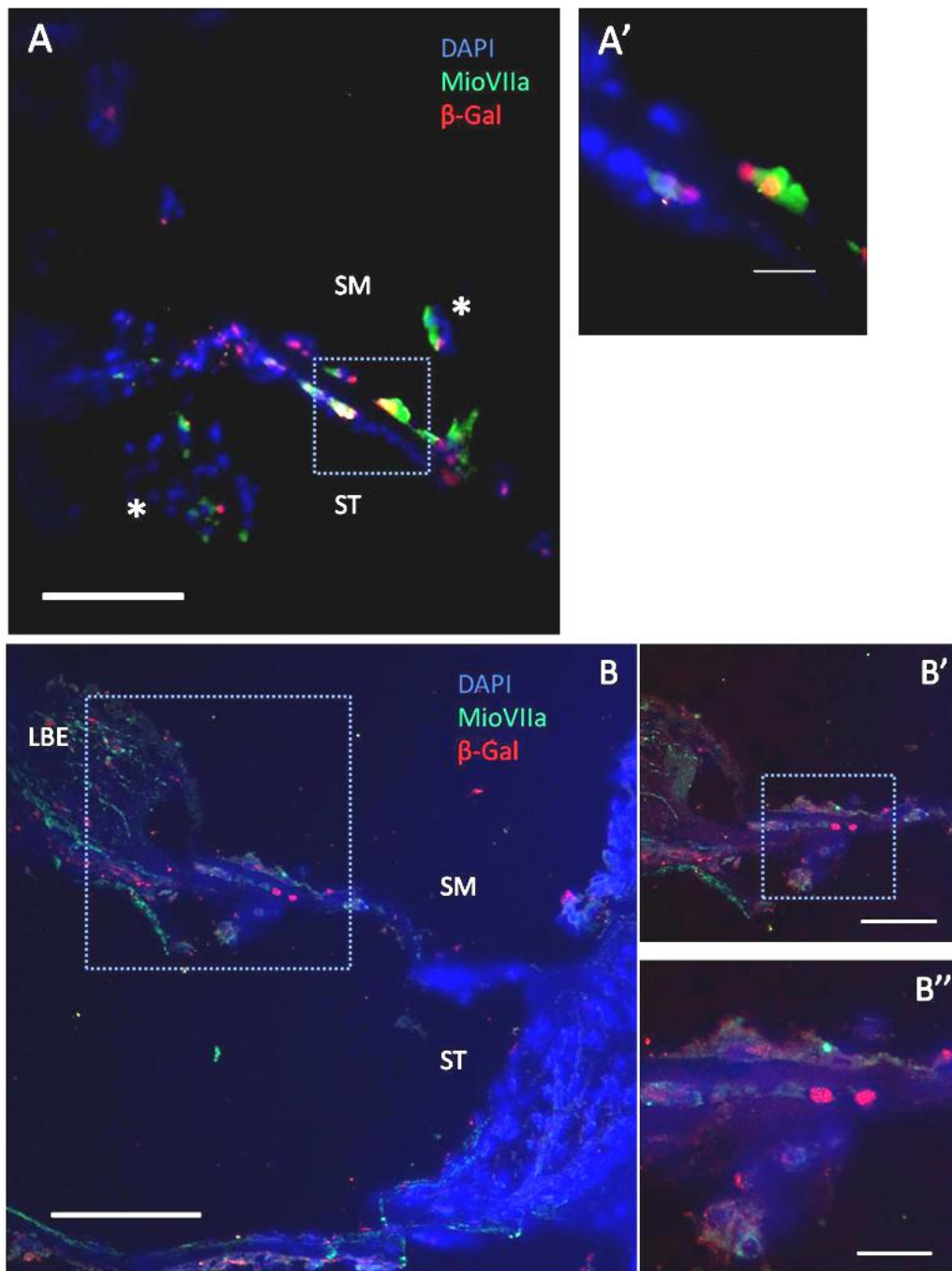
†: *Wilcoxon signed ranks test* entre os momentos

### **5.5 Células-tronco da orelha interna transplantadas sobrevivem, migram e integram-se na cóclea hospedeira**

No grupo estudo, as CT foram transplantadas nas orelhas direitas de quatro cobaias 7 dias após a indução de surdez por neomicina. Os animais foram submetidos à pesquisa do potencial evocado auditivo após 14 dias do transplante e, imediatamente após, foram sacrificados para o estudo histológico das cócleas. Uma das cócleas do grupo estudo apresentava secreção purulenta na orelha média e o labirinto ósseo estava friável e quebradiço, inviabilizando o tecido para a análise histológica.

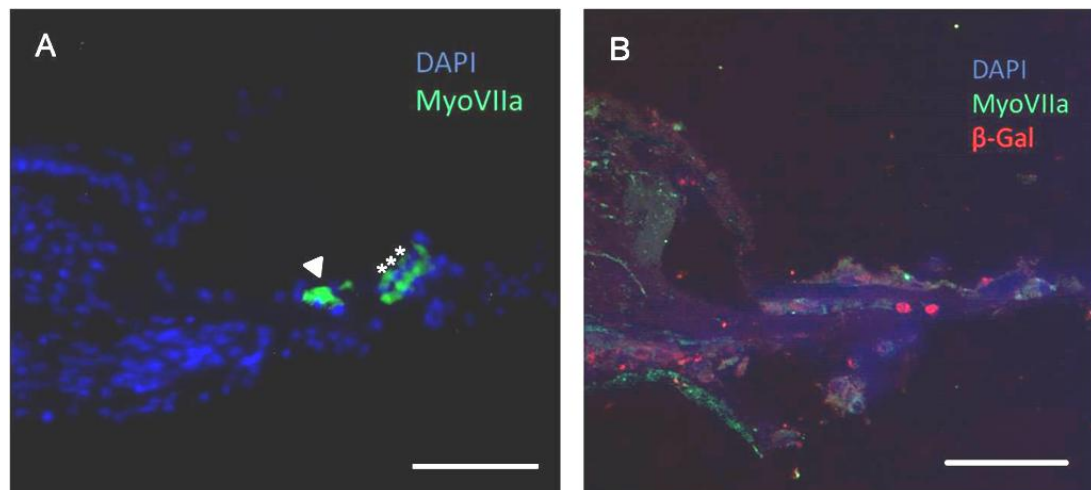
Nos cortes histológicos, embora não tenha sido um dos objetivos do estudo, nenhuma infiltração de células inflamatórias foi observada nas cócleas transplantadas.

Aglomerados celulares, semelhantes às esferas, foram encontrados em todas as escalas dos giros basais: escalas timpânica, vestibular e timpânica. Na escala média, o tecido alvo, as CT transplantadas foram identificadas na parede lateral, membrana basilar, limbo espiral e espaço endolinfático (Figura 18).



**Figura 18** - Algumas CT transplantadas foram detectadas nas cócleas direitas do grupo estudo por meio de imunofluorescência indireta. A maioria das CT transplantadas no espaço perilinfático e endolinfático foi encontrada em forma de aglomerados celulares, como esferas (asteriscos em A). Um pequeno número das CT transplantadas se integraram na membrana basilar (detalhes nas imagens A' e B''). Anticorpo anti- $\beta$ -galactosidase (em vermelho) que detecta a proteína expressa pelo gene repórter *LacZ*. O marcador de célula ciliada, MiosinaVIIa (em verde), é detectado pelo anticorpo específico. Marcação nuclear com DAPI (em azul). (ST =escala timpânica; SM = escala media; LBE = limbus espiral). Escala de barra: B 100 $\mu$ m; A-B' 50 $\mu$ m; A'-B'' 20 $\mu$ m.

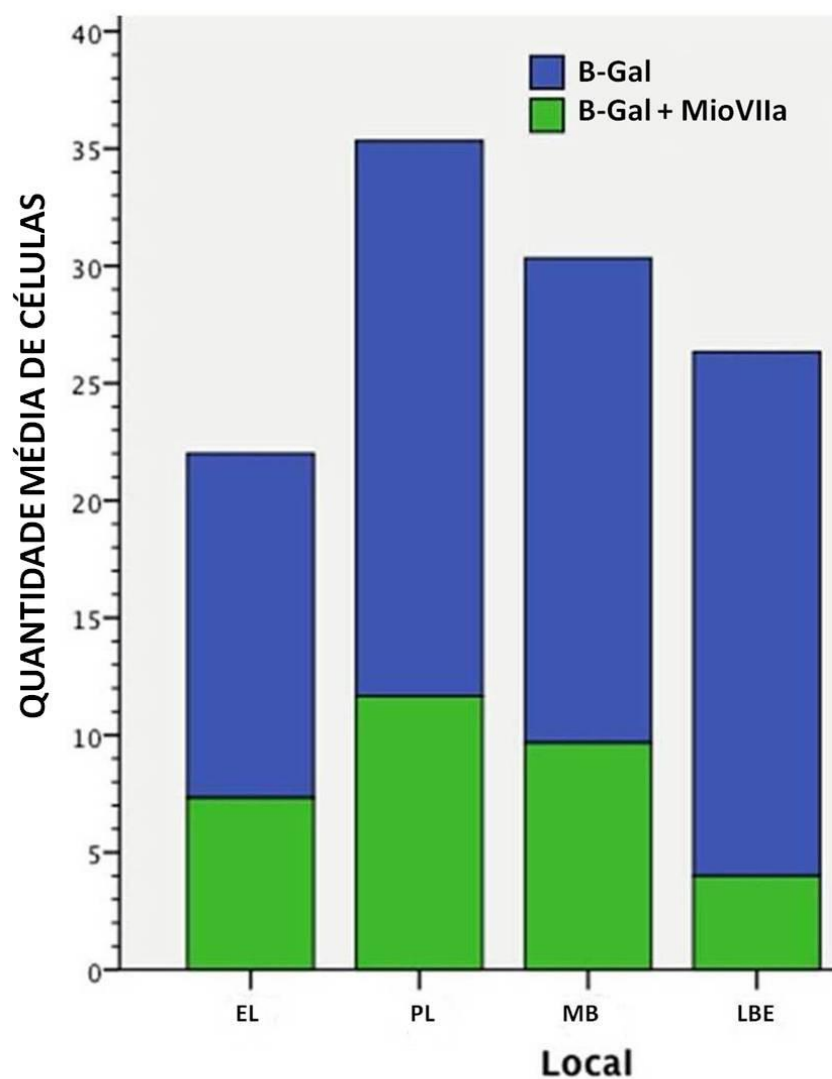
Na escala média, algumas células transplantadas se integraram ao epitélio da membrana basilar danificado pela neomicina. Algumas destas células expressaram marcador de célula ciliada, porém sem substituir a complexa arquitetura do OC, com uma fileira de células ciliadas internas e três fileiras de células ciliadas externas (Figura 19A). As células transplantadas se arranjaram sem um padrão definido entre as células do epitélio da membrana basilar (Figura 19B).



**Figura 19** - Imagem A: disposição das células ciliadas internas (cabeça de seta) e externas (três asteriscos) no OC íntegro do giro basal de uma cóclea esquerda. Imagem B: membrana basilar sem a estrutura do OC do giro basal e com células integradas, expressando  $\beta$ -Gal (em vermelho), de uma cóclea direita submetida à ação ototóxica da neomicina e ao transplante de CT de orelha interna de camundongos neonatos. Miosina VIIa, marcador de célula ciliada (em verde);  $\beta$ -Gal, marcador da enzima beta-galactosidase, expressa pelo gene *LacZ* (em vermelho); DAPI, marcador nuclear (em azul). Escala de barra: 50 $\mu$ m.



Não houve diferenças estatisticamente significativas na análise quantitativa das CT transplantadas entre as regiões da escala média ( $p=0,79$ ), Figura 20. Nenhuma CT foi detectada no giro basal das cócleas esquerdas do grupo estudo e nas cócleas do grupo controle.



**Figura 20** - Quantidade média de CT transplantadas expressando  $\beta$ -Gal e o número médio que co-expressa  $\beta$ -Gal e Miosina VIIa nas diferentes regiões da escala média: endolinfa (EL), parede lateral (PL), membrana basilar (MB), limbus espiral (LBE).

Entre as CT transplantadas visualizadas na escala média,  $42,6 \pm 5,7\%$  foram positivas para o marcador de célula ciliada, Miosina VIIa. Não existiram diferenças significativas na taxa de expressão de Miosina VIIa nas CT transplantadas entre as diferentes regiões da escala média ( $p=0,86$ ), Figura 20.

## 5 DISCUSSÃO

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente o transplante de CT para o tratamento da surdez é considerado um tratamento promissor. Nos últimos anos, as CT mais utilizadas experimentalmente para este fim são as de medula óssea (Ogita et al., 2010), neurais (Parker et al., 2007) e embrionárias (Corrales et al., 2006). Estes estudos tiveram como objetivos principais a regeneração das células ciliadas e neurônios do gânglio espiral, pois estas células são as mais atingidas na maioria dos casos de surdez neurossensorial. A maior expectativa nesta terapia é a diferenciação das CT nos fenótipos desejados, integração ao tecido hospedeiro e estabelecimento de conexões funcionais adequadas (De Felipe et al., 2011).

A escolha da CT a ser transplantada é de fundamental importância para o sucesso da terapia. No presente estudo, assim como em outros trabalhos (Oiticica et al., 2010; Diensthuber et al., 2009; Wang et al., 2006; Malgrange et al., 2002), as células provenientes do OC de camundongos neonatos foram capazes de formar colônias celulares flutuantes (esferas), com propriedades de proliferação e autorrenovação, e expressar marcadores de células-tronco e de células diferenciadas, como células ciliadas, células de suporte e neurônios, sob determinadas condições.

Além disso, por causa de sua origem coclear, as CT da orelha interna de camundongos neonatos são o tipo celular que mais se aproxima do processo de diferenciação normal que acontece *in vivo* no desenvolvimento

embrionário. Em razão dessas características, as CT da orelha interna de camundongos neonatos podem ser consideradas candidatas para transplante em orelha interna de modelos animais com surdez induzida.

Para indução de surdez, existem diversas medicações que destroem todas as células ciliadas com conseqüente aumento dos limiares auditivos. A aplicação transtimpânica de solução de neomicina, ao preencher a cavidade timpânica e atingir, por difusão, a orelha interna através da janela redonda, provoca a morte de células ciliadas, portanto é um método excelente para gerar perda auditiva (Hu et al., 2005a). Neste estudo, 7 dias após a aplicação transtimpânica da neomicina, houve destruição das células ciliadas e da citoarquitetura do OC normal (Figura 15B), e um aumento significativo dos limiares auditivos ( $p < 0,05$ ) (Figura 15B'). Existem hipóteses que o dano celular gerado pelo ototóxico poderia liberar fatores intrínsecos na tentativa de reparo tecidual. Estes fatores proporcionariam também um aumento na sobrevivência, diferenciação e integração das células transplantadas (Matsuoka et al., 2007; Ulfendahl et al., 2007; Hildebrand et al., 2005; Tateya et al., 2003).

Um fator relevante a ser considerado no transplante entre espécies diferentes é o potencial de rejeição imunológica, pois pode comprometer a sobrevivência e integração das células transplantadas. No presente estudo, o procedimento de xenotransplante foi realizado sem que os animais recebessem drogas imunossupressoras, que atenuariam uma possível rejeição. Na análise histológica das cócleas do grupo estudo, não foi observada qualquer infiltração de células inflamatórias. Alguns autores

realizaram xenotransplantes de células-tronco mesenquimais em orelha interna (Cho et al., 2011, Hildebrand et al., 2005) e também não relataram qualquer reação imune adversa. Este privilégio imunológico da cóclea pode ser atribuído à barreira hematolabiríntica (Ferguson et al., 2002).

Em relação à visualização das CT transplantadas nas cócleas do grupo estudo, elas foram encontradas, além da escala timpânica, nas escalas média e vestibular. Esta migração da escala timpânica, local onde inicialmente as células se alojaram no procedimento do transplante para a escala vestibular, pode ser atribuída ao fluxo perilinfático, que pode mover as CT transplantadas até o helicotrema, no qual há comunicação entre as escalas timpânica e vestibular (Hildebrand et al., 2005, Tateya et al., 2003). Para atingir a escala média, as CT transplantadas podem migrar através de danos transitórios causados pelo ototóxico nas membranas basilar (Jongkamonwiwat et al, 2010) e vestibular (Fu et al., 2009) (Figura 18).

Na escala média, apesar da maior concentração de potássio em comparação com as escalas timpânica e vestibular, algumas CT transplantadas foram encontradas no espaço endolinfático em forma de aglomerados celulares e integradas a algumas regiões, como: parede lateral, limbo espiral e membrana basilar. Em todas estas regiões, algumas das CT transplantadas expressaram Miosina VIIa, um marcador de célula ciliada.

A expressão de Miosina VIIA em regiões que habitualmente não expressam este marcador, como na parede lateral e limbo espiral, também foi relatada em transplante de CT neurais injetadas na escala timpânica

(Parker et al., 2007). Este achado pode ser atribuído a sinais locais da cóclea transplantada e/ou a uma diferenciação parcial das CT antes do transplante, provavelmente durante o processo de transdução viral *in vitro*.

Na escala média, algumas células transplantadas se integraram ao epitélio da membrana basilar danificado pela neomicina sem um padrão definido, portanto, sem substituir a citoarquitetura do OC, com uma fileira de células ciliadas internas e três fileiras de células ciliadas externas (Figura 19). Este achado está de acordo com uma hipótese previamente relatada sobre terapia com CT para surdez, que consistia de uma implantação de células, com o fenótipo de célula ciliada, dispostas sem o padrão observado no OC, mas sim com uma disposição similar ao epitélio da papila basilar, órgão auditivo sensorial de aves (Figura 2). Esta teoria infere que as células ciliadas “novas” poderiam fornecer fatores tróficos para neurônios do gânglio espiral e, conseqüentemente, aumentar o desempenho dos atuais implantes cocleares (Li et al., 2004; Brigande, Heller, 2009).

Apesar da integração celular e a expressão de marcador de célula ciliada na membrana basilar, a avaliação funcional das cobaias submetidas a transplante das CT da orelha interna de camundongos neonatos não revelou melhora significativa nos limiares auditivos. Este achado pode ser atribuído ao curto período de observação de 14 dias após o transplante. Espera-se que em estudos posteriores, com maior tempo de seguimento dos animais transplantados, as células implantadas na membrana basilar com fenótipo de célula cilada estabeleçam conexões sinápticas funcionais com os neurônios do gânglio espiral.

## 6 CONCLUSÃO



## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi constatado que as CT transplantadas sobreviveram nas cócleas hospedeiras por, no mínimo, duas semanas, migraram da escala timpânica para as escalas média e vestibular, integraram-se em algumas regiões da escala média e expressaram marcador de células ciliadas. Obteve-se culturas em suspensão de CT provenientes de OC dissociado de camundongos neonatos, caracterização dos fenótipos dessas CT (*nestina* e *Sox2*) e diferenciação em células ciliadas, células de suporte e neurônios.

A aplicação transtimpânica de neomicina mostrou-se um excelente método para indução de surdez em cobaias adultas. Também foi demonstrado que o gene *LacZ*, acoplado ao vetor lentiviral (Lentivirus *LacZ*), é um gene repórter útil para rastreamento das CT transplantadas.

Algumas das CT transplantadas, embora tenham sobrevivido e integrado na membrana basilar, a avaliação após transplante não evidenciou melhora significativa da função auditiva das cobaias hospedeiras.

## REFERÊNCIAS

---

**REFERÊNCIAS<sup>1</sup>**

- Altschuler R, O'Shea K, Miller J. Stem cell transplantation for auditory nerve replacement. *Hear Res.* 2008;242(1-2):110-6.
- Armitage P, Berry G. The planning of statistical investigations. In: *Statistical methods in medical research.* 2.ed. Oxford, Blackwell, 1987. p.179-85.
- Baraky, L. Prevalência de surdez incapacitante no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. 2011. Teseok (Doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Bento R, Miniti A, Marone S. *Tratado de Otologia.* São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo. Fundação Otorrinolaringologia. FAPESP, 1998.
- Brigande J, Heller S. Quo vadis, hair cell regeneration? *Nat Neurosci.* 2009;12(6):679-85.
- Brownstein Z, Avraham K. Future trends and potential for treatment of sensorineural hearing loss. *Seminars in Hearing.* 2006;27(3):193-204.
- Cho Y, Cho H, Jang S, Jeong H, Park J. Transplantation of neural differentiated human mesenchymal stem cells into the cochlea of an auditory-neuropathy guinea pig model. *J Korean Med Sci.* 2011;26:492-8.
- Coleman B, Hardman J, Coco A, Epp S, De Silva M, Crook J, Shepherd R. Fate of embryonic stem cells transplanted into the deafened mammalian cochlea. *Cell Transplant.* 2006;15(5):369-80.
- Corwin J, Cotanche D. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science.* 1988;240:1772-4.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

- Corrales C, Pan L, LI H, Liberman M, Heller S, Edge A. Engraftment and Differentiation of Embryonic Stem Cell–Derived Neural Progenitor Cells in the Cochlear Nerve Trunk: Growth of Processes into the Organ of Corti. *J Neurobiol.* 2006;66(13):1489-500.
- Cotanche D. Genetic and pharmacological intervention for treatment/prevention of hearing loss. *J Commun Disord.* 2008;41(5):421-43.
- Cotanche D, Kaiser C. Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration. *Hear Res.* 2010;266(1-2):18-25.
- Dabdoub A, Puligilla C, Jones J, Fritzsich B, Cheah K, Pevny L, Kelley M. Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *PNAS.* 2008;105(47):18396-401.
- Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:398-418.
- De Felipe M, Feijoo Redondo A, García-Sancho J, Schimmang T, Alonso M. Cell- and gene-therapy approaches to inner ear repair. *Histol Histopathol.* 2011;26(7):923-40.
- Diensthuber M, Heller S. Characterization of stem cells derived from the neonatal auditory sensory epithelium. *HNO.* 2010;58(11):1056, 1058, 1060-6.
- Diensthuber M, Oshima K, Heller S. Stem/Progenitor cells derived from the cochlear sensory epithelium give rise to spheres with distinct morphologies and features. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2009;10(2):173-90.
- Ferguson T, Green D, Griffit T. Cell death and immune privilege. *Int Rev Immunol.* 2002; 21(2-3):153-72.
- Fuchs E, Segre J. Stem cells: a new lease on life. *Cell.* 2000;100:143-5.
- Fu Y, Wang S, Liu Y, Wang J, Wang G, Chen Q, Gong S. Study on neural stem cell transplantation into natural rat cochlea via round window. *Am J Otolaryngol.* 2009;30(1):8-16.
- Grimm C, Jörs S, Heller S. Life and death of sensory hair cells expressing constitutively active TRPML3. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13823-31.
- Groves AK. The challenge of hair cell regeneration. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010;235(4):434-46.

- Han Z, Yang J, Chi F, Cong N, Huang Y, Gao H, Li W. Survival and fate of transplanted embryonic neural stem cells by Atoh1 gene transfer in guinea pigs cochlea. *Neuroreport*. 2010;21(7):490–496.
- Hildebrand M, Dahl H, Hardman J, Coleman B, Shepherd R, de Silva M. Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2005;6(4):341-54.
- Hildebrand M, Newton SS, Gubbels SP, Sheffield AM, Kochhar A, de Silva M, Dahl H, Rose SD, Behlke MA, Smith RJ. Advances in molecular and cellular therapies for hearing loss. *Mol Ther*. 2008;16(2):224-36.
- Hu Z, Andang M, Ni D, Ulfendahl M. Neural cograft stimulates the survival and differentiation of embryonic stem cells in the adult mammalian auditory system. *Brain Res*. 2005a;1051(1-2):137-44.
- Hu Z, Ulfendahl M, Olivius P. Survival of neuronal tissue following xenograft implantation into the adult rat inner ear. *Exp Neurol*. 2004;185:7-14.
- Hu Z, Ulfendahl M, Prieskorn D, Olivius P, Miller J. Functional evaluation of a cell replacement therapy in the inner ear. *Otol Neurotol*. 2009;30:551-558.
- Hu Z, Wei D, Johansson C, Holmstrom N, Duan M, Frisen J, Ulfendahl M. Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp Cell Res*. 2005b;302:40-7.
- Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Endo T, Kim T, Dong Y, Kita T, Kojima K, Naito Y, Omori K, Ito J. Surgical techniques for cell transplantation into the mouse cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2004;551:43-7.
- Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Kim T, Endo T, Taniguchi Z, Naito Y, Ito J. Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation. *Neuroreport*. 2003;14(1):77-80.
- Ito J, Kojima K, Kawaguchi S. Survival of Neural Stem Cells in the Cochlea. *Acta Otolaryngol*. 2001;121:140-2.
- Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkim K, Swidersk D, Dolan D, Brough D, Raphael Y. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med*. 2005;11(3):271-6.

- Jongkamonwiwat N, Zine A, Rivolta M. Stem cell based therapy in the inner ear: appropriate donor cell types and routes for transplantation. *Curr Drug Targets*. 2010;11(7):888-97.
- Kiernan A, Pelling A, Leung K, Tang A, Bell D, Tease C, Lovell-Badge R, Steel K, Cheah K. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature*. 2005;434:1031-5.
- Lang H, Schulte B, Goddard J, Hedrick M, Schulte J, Wei L, Schmidt R. Transplantation of mouse embryonic stem cells into the cochlea of an auditory-neuropathy animal model: effects of timing after injury. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2008;9(2):225-40.
- Li H, Corrales C, Edge A, Heller S. Stem cells as therapy for hearing loss. *Trends Mol Med*. 2004;10(7):309-15.
- Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med*. 2003a;9(10):1293-9.
- Li H, Roblin G, Liu H, Heller S. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003b;100:13495-500.
- Lopez I, Zhao P, Yamaguchi M, De Vellis J, Espinosa-Jeffrey A. Stem/progenitor cells in the postnatal inner ear of the GFP-nestin transgenic mouse. *Int J Dev Neurosci*. 2004;22:205-13.
- Lou X, Zhang Y, Yuan C. Multipotent stem cells from the young rat inner ear. *Neurosci Lett*. 2007;416(1):28-33.
- Malgrange B, Belachew S, Thiry M, Nquyen L, Rogister B, Alvarez M, Rigo JM, Van De Water TR, Moonen G, Lefebvre PP. Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech Dev*. 2002;112(1-2):79-88.
- Martinez-Monedero R, Yi E, Oshima K, Glowatzki E, Edge A. Differentiation of inner ear stem cells to functional sensory neurons. *Dev Neurobiol*. 2008;68(5):669-84.
- Matsuoka J, Kondo T, Miyamoto R, Hashino E. Enhanced survival of bone-marrow-derived pluripotent stem cells in an animal model of auditory neuropathy. *Laryngoscope*. 2007;117(9):1629-35.

- Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Fujino K, Kim T, Hiratsuka Y, Tamura T, Kanemaru S, Shimizu Y, Ito J. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport*. 2004;15(1):1-4.
- Nishimura K, Nakagawa T, Ono K, Ogita H, Sakamoto T, Yamamoto N, Okita K, Yamanaka S, Ito J. Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. *Neuroreport*. 2009;20:1250-4.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19(3):193-204.
- Oesterle E, Campbell S, Taylor R, Forge A, Hume C. Sox2 and JAGGED1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2008;9: 65-89.
- Ogita H, Nakagawa T, Sakamoto T, Inaoka T, Ito J. Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea. *Laryngoscope*. 2010 120(3):576-81.
- Oiticica J, Barboza-Junior L, Batissoco A, Lezirovitz K, Mingroni-Netto R, Haddad L, Bento R. Retention of progenitor cell phenotype in otospheres from guinea pig and mouse cochlea. *J Trans Med*. 2010;8:119.
- Organização Mundial da Saúde, *World Health Organization* [Internet]. World Health Assembly 2012: Hearing loss. Disponível em: <http://www.who.int/pbd/deafness/en/>
- Oshima K, Grimm C, Corrales C, Senn P, Monedero R, Géléoc GS, Edge A, Holt J, Heller S. Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2007;8:18-31.
- Oshima K, Senn P, Heller S. Isolation of sphere-forming stem cells from the mouse inner ear. *Methods Mol Biol*. 2009;493:141-62.
- Oshima K, Shin K, Diensthuber M, Peng A, Ricci A, Heller S. Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010;141:704-16.
- Ozeki H, Oshima K, Senn P, Kurihara H, Kaga K. Development and regeneration of hair cells. *Acta Oto-Laryngol*. 2007;127:38-44.

- Pandit S, Sullivan J, Egger V, Borecki A, Oleskevich S. Functional effects of adult human olfactory stem cells on early-onset sensorineural hearing loss. *Stem Cells*. 2011;29:670–7.
- Parker M, Brugeaud A, Edge A. Primary culture and plasmid electroporation of the murine organ of corti. *J Vis Exp*. 2010;36:1685.
- Parker M, Cotanche D. The potential use of stem cells for cochlear repair. *Audiol Neurootol*. 2004; 9:72-80.
- Parker M, Corliss D, Gray B, Anderson J, Bobbin R, Snyder R, Cotanche D. Neural stem cells injected into the sound-damaged cochlea migrate throughout the cochlea and express markers of hair cells, supporting cells, and spiral ganglion cells. *Hear Res*. 2007;232(1-2):29–43.
- Pauley S, Kopecky B, Beisel K, Soukup G, Fritsch B. Stem cells and molecular strategies to restore hearing. *Panminerva Med*. 2008;50(1):41-53.
- Pfeifer A, Brandon E, Kootstra N, Gage F, Verma I. Delivery of the cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: Efficient gene targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11450-5.
- Poirrier A, Ackerveken P, Vandebosch T, Nguyen L, Lefebvre P, Malgrange B. Ototoxic drugs: Difference in sensitivity between mice and guinea pigs. *Toxicol Lett*. 2010;193(1):41-9.
- Pranchevicius M, Baqui M, Ishikawa-Ankerhold H, Lourenço E, Leão R, Banzi S, Santos C, Barreira M, Espreafico E, Larson R. Myosin Va phosphorylated on Ser1650 is found in nuclear speckles and redistributes to nucleoli upon inhibition of transcription. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2008;65:441–56.
- Pujol R. Morphology, synaptology and electrophysiology of the developing cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1985;421:5-9.
- Sekiya T, Kojima K, Matsumoto M, Kim T, Tamura T, Ito J. Cell transplantation to the auditory nerve and cochlear duct. *Exp Neurol*. 2006;198(1):12-24.
- Senn P, Oshima K, Teo T, Grimm C, Heller S. Robust Postmortem Survival of Murine Vestibular and Cochlear Stem Cells. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2007;8:194-204.



- Shi F, Corrales C, Liberman M, Edge A. BMP4 induction of sensory neurons from human embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium. *Eur J Neurosci.* 2007;26:3016-23.
- Sullivan M, Pandit S, Sahota R, Borecki A, Oleskevich S. Effect of epithelial stem cell transplantation on noise-induced hearing loss in 2 adult mice. *Neurobiol Dis.* 2011;41(2):552-9.
- Tamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Tateya I, Endo T, Kim T, Dong Y, Kita Y, Kojima K, Naito Y, Omori K Ito J. Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2004;551:65-8.
- Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, Kim T, Endo T, Yamada S, Kageyama R, Naito Y, Ito J. Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport.* 2003;14:1677-81.
- Totsugawa T, Kobayashi N, Maruyama M, Kosaka Y, Okitsu T, Arata T, Sakaguchi M, Ueda T, Kurabayash Y, Tanaka N. Lentiviral vector: a useful tool for transduction of human liver endothelial cells. *ASAIO J.* 2003;49(6):635-40.
- Ulfendahl M, Hu Z, Olivius P, Duan M, Wei D. A cell therapy approach to substitute neural elements in the inner ear. *Physiol Behav.* 2007;92:75-9.
- Wang Z, Jiang H, Yan Y, Wang Y, Shen Y, Li W, Li H. Characterization of proliferating cells from newborn mouse cochleae. *Neuroreport.* 2006;17(8):767-71.
- Watt F, Hogan B. Out of eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000;287:1427-30.
- Warchol M. Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: differences at the levels of cells and species. *Hear Res.* 2011;273(1-2):72-9.
- Wells J, Gernon W, Wart G, Davis K. Otosurgical model in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1986;95:450-57.
- White P, Doetzlhofer A, Lee Y, Groves A, Segil N. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature.* 2006; 441:22.
- Wysocki J. Topographical anatomy of the guinea pig temporal bone. *Hear Res.* 2005;199:103-10.

## APÊNDICE

**CARTA DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE  
DE PROJETOS DE PESQUISA**



**APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.12.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1221/06**, intitulado: **"Implantação de Células de Órgãos de Corti e Fatores de Crescimento em Orelha Interna de Guinea Pig Após Cofose Induzida por Aminoglicosídeos"** apresentado pelo Departamento de **OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**.


Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196 de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "C").

**Pesquisador(a) Responsável: Ricardo Ferreira Bento e Luciana**

**Luciana Haddad**

**Luiz Carlos de Melo Barboza Junior**

CAPPesq, 20 de dezembro de 2006.

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa