

MILENE MASSUCCI BISSOLI

**Evidências de células-tronco na cóclea humana
adulta: formação de esferas e presença do
marcador de células-tronco ABCG2**

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

Coorientadora: Dra. Karina
Lezirovitz Mandelbaum

São Paulo

2016

Versão Corrigida

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

♥reprodução autorizada pelo autor

Massucci-Bissoli, Milene

Evidências de células-tronco na cóclea humana adulta : formação de esferas e presença do marcador de células-tronco ABCG2 / Milene Massucci-Bissoli. -- São Paulo, 2016.

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

Orientador: Ricardo Ferreira Bento.

Coorientadora: Karina Lezirovitz Mandelbaum.

Descritores: 1.Órgao espiral 2.Cóclea 3.Orelha interna 4.Células-tronco
5.Humanos 6.Perda auditiva

USP/FM/DBD-324/16

DEDICATÓRIA

Dedico

A Julio, Melissa e Dudu.

Com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP e meu orientador, pela postura empreendedora e inovadora frente ao departamento, e pela oportunidade de o ter como mentor deste trabalho.

À Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum, Pesquisadora Científica do Laboratório de Investigação Médica (LIM-32) e minha co-orientadora, pelo apoio, pelas discussões científicas, pelas ideias, pelas correções e pelo carinho de sempre.

À Faculdade de Medicina da USP, querida Casa de Arnaldo, que abrigou meus anos de formação médica, residência e pós-graduação, por todo o conhecimento que aqui recebi e pelas pessoas maravilhosas que passaram a fazer parte da minha vida desde que entrei por suas portas em 2001.

À Dra. Jeanne Oiticica, Médica Assistente do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP e Chefe do LIM-32, pelo apoio desde o início deste projeto.

Ao Dr. Luiz Carlos de Melo Barboza Junior, Médico Assistente do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP, por tudo que me ensinou e ajudou desde que ingressei no departamento como preceptor e pela ajuda inestimável na identificação das primeiras otosferas.

Ao Dr. Tharcísio Citrângulo Tortelli Junior, Monitor de Pesquisa Pleno no CTO BioCel - ICESP, pela disponibilidade e ajuda nos experimentos com o citômetro de fluxo em seu laboratório.

Aos doutores Fábio de Alencar Rodrigues Junior, Francisco das Chagas Cabral Junior, Paula Tardim Lopes e Ricardo Dourado Alves pela disposição e habilidade na captação das cócleas dos doadores de órgãos.

Aos Assistentes do Departamento de Otorrinolaringologia, pela amizade, apoio e ensinamentos durante toda minha formação profissional.

Aos amigos de residência, fellows e preceptores de toda a jornada no departamento, pelos plantões, cirurgias, broncas e risadas que tornavam a vida mais colorida.

Ao Prof. Marcelo Rivolta, Chefe do Departamento de Biologia Sensorial no Centre for Stem Cell Biology, na Universidade de Sheffield, que me proporcionou um ano de aprendizado e discussões científicas sem par, pelo carinho com que fui recebida e pela confiança em delegar experimentos importantes para o desenvolvimento de sua linha de pesquisa.

Às amigas de colégio, Ana Paula, Heloiza, Bianca, Daniela, Sandra e Juliana. Às amigas de faculdade Karen, Thatyana e Marina. Obrigada por estarem sempre perto, mesmo longe.

Às secretárias Maria Marilede Alves, Maria Márcia Alves e Lucivânia Lima da Silva pela amizade e por toda atenção e ajuda nesses anos de residência e pós-graduação.

Ao CNPq e ao Programa Ciência Sem Fronteiras pela oportunidade de trazer conhecimentos novos para o nosso país.

Um agradecimento especial à minha família materna, principalmente à minha mãe, Cleide, e à minha irmã, Amanda. Por tudo, sempre.

“A parte que ignoramos é muito maior que tudo quanto sabemos”.

Platão

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos 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*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	32
2. OBJETIVOS	37
3. REVISÃO DA LITERATURA	39
3.1. Identificação de CTs em tecidos adultos.....	40
3.1.1. Otosferas.....	44
3.1.2. ABCG2 em camundongos – side-population.....	46
3.1.3. Progenitores óticos humanos.....	47
3.2. Obtenção de cócleas humanas para estudos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. Material.....	52
4.2. Métodos	52
4.2.1. Seleção dos casos	53
4.2.2. Procedimento cirúrgico	56
4.2.2.1 Procedimento cirúrgico nos doadores de órgãos em morte encefálica	57
4.2.2.2 Procedimento cirúrgico nos portadores de schwannoma vestibular: via translabiríntica ampliada	59
4.2.3. Cultura organotípica para estudo de viabilidade	60
4.2.4. Dissociação do tecido membranoso coclear	61
4.2.5. Cultura de otosferas.....	62
4.2.6. Citometria de fluxo.....	62
4.2.7. Coleta do material para extração de RNA e realização de qRT-PCR.....	63
5. RESULTADOS	66
5.1. Cultura organotípica para estudo de viabilidade.....	68
5.2. Cultura de otosferas	68
5.2.1 Cultura do material da amostra E.....	68
5.2.2 Otosferas obtidas após cultura da amostra G	69
5.2.3 Cultura do material da amostra H.....	70
5.2.4 Otosferas obtidas após cultura da amostra A.....	71
5.3. Citometria de fluxo	73
5.3.1 Citometria de fluxo realizada com material da amostra B73	
5.3.2 Citometria de fluxo realizada com material da amostra C76	
5.3.3 Citometria de fluxo realizada com material da amostra D78	
5.4. Extração de RNA para qRT-PCR.....	80
6. DISCUSSÃO	82
6.1 Seleção dos casos e procedimento cirúrgico.....	83
6.2. Cultura organotípica.....	85

6.3. Evidências de CTs na cóclea humana adulta	85
6.3.1 Cultura de otosferas	86
6.3.2 ABCG2/SP	89
7. CONCLUSÃO	91
8. ANEXO: ESTÁGIO NO EXTERIOR	93
1) Uso de marcadores de superfície celular para separação de progenitores óticos por citometria de fluxo	98
2) Perfil na citometria de fluxo dos progenitores óticos epiteliais (OEPs) e experimentos subsequentes	100
3) Correlação entre densidade final e porcentagem de OPs positivos para CD44	101
4) Perfil citométrico e separação celular utilizando a linhagem NOP-SOX2	103
5) Inibição de TGF beta após indução com FGF	105
Resultados	108
6) Solução de problemas relacionados ao uso do Microkit Qiagen para extração de RNA	109
9. REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE	119
Parecer CAPPesq	120
Termo de consentimento – doadores de órgãos	121
Termo de consentimento – pacientes	127

LISTA DE SIGLAS

CAPPesq: Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

HCFMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

USP: Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS

CCs: células ciliadas

CCIs: células ciliadas internas

CCEs: células ciliadas externas

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CO₂: gás carbônico

CSs: células de suporte

CT: célula-tronco CTs: células-tronco

DNA: ácido desoxirribonucleico

DIV: dia(s) *in vitro*

EGF: *epidermal growth factor* (fator de crescimento epidérmico)

EMEM: Eagle's minimal essential medium

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution* (solução salina balanceada de Hank)

HEPES: ácido hidroxietílico piperazinoetanossulfônico

MEM: *minimum essential medium*

OC: órgão de Corti

PBS: *phosphate-buffered saline* (solução salina tamponada de fosfato)

PFA: paraformaldeído

qRT-PCR: técnica da realização da reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real

RNA: ácido ribonucleico

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

SV: schwannoma vestibular

TCLE: termo(s) de consentimento livre e esclarecido

LISTA DE SÍMBOLOS

©: do inglês *copyright* (direito autoral)

°C: graus Celsius

cm: centímetros

dB: decibel

g: gravidade

Hz: Hertz

mL: mililitros

μL: microlitros

®: marca registrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma dos métodos utilizados após captação do material coclear.....	53
Figura 2A e 2B – Aspecto pós-operatório da região retroauricular do doador de órgãos após a captação da cóclea.....	59
Figura 3 – Fragmentos de tecido coclear imediatamente após remoção cirúrgica.....	67
Figura 4 – Otosfera no 5º. DIV	70
Figura 5 – Otosferas no 3º. DIV	71
Figura 6 – Aglomerados celulares com características morfológicas semelhantes a precursores neuronais no 3º. DIV.....	72
Figura 7 – Otosfera no 5º. DIV	72
Figura 8 – Aglomerados celulares com características morfológicas semelhantes a precursores neuronais no 5º. DIV.....	73
Figura 9 – Linhagem celular BEWO para controle biológico do anticorpo ABCG2 na amostra B.....	74
Figura 10 – Perfil citométrico do anticorpo ABCG2 nas células dissociadas da cóclea na amostra B	75
Figura 11 – Perfil citométrico do anticorpo ABCG2 nas células dissociadas da cóclea na amostra C	77
Figura 12 – Perfil citométrico do anticorpo ABCG2 nas células dissociadas da cóclea na amostra D.....	79
Figura 13 – porcentagem das células CD44+ obtidas nas diferentes densidades ao final do protocolo de diferenciação.....	101
Figura 14 – porcentagem das células CD44/CD51+ obtidas nas diferentes densidades ao final do protocolo de diferenciação	102
Figura 15 – Experimentos dias 12 a 14	104
Figura 16 – Experimentos dias 6 a 7	104
Figura 17 – Representação das taxas de proliferação de cada uma das condições estudadas em dois experimentos	108
Figura 18 – Representação das quantidades totais de RNA obtidas (eixo y) em experimentos com diferentes contagens celulares (eixo x)	109
Figura 19 – Representação das quantidades totais de RNA obtidas (eixo y) em diferentes experimentos com a mesma contagem celular (eixo x).....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados dos doadores de órgãos dos quais foi coletado material coclear.....	55
Tabela 2 – Dados dos pacientes submetidos à cirurgia de ressecção de SV dos quais foi coletado material coclear.....	56
Tabela 3 – Vias de acesso utilizadas para coleta de material coclear nos doadores de órgãos em morte encefálica.....	59
Tabela 4 – Quantidade de RNA obtida por experimento em ng/ μ L	80
Tabela 5 – Resumo dos resultados obtidos com cada amostra coletada	81
Tabela 6 – Aumento da expressão dos marcadores de superfície celular em diferentes condições após a primeira fase do protocolo de diferenciação, após análise no microarray.....	97
Tabela 7 – Experimentos realizados com diferentes densidades celulares em dois tipos de placas.....	106
Tabela 8 – Quantidade de RNA obtida por cada condição do experimento em triplicata	107

RESUMO

MASSUCCI-BISSOLI, M. Evidências de células-tronco na cóclea humana adulta: formação de esferas e presença do marcador de células-tronco ABCG2. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2016. A cóclea humana adulta é reconhecidamente incapaz de se regenerar de modo significativo na prática clínica após uma lesão. Tal fato se explica pela perda da capacidade de proliferação de suas células sensoriais após o período neonatal. Em diferentes espécies de mamíferos neonatos, foi demonstrada a capacidade de proliferação das células sensoriais cocleares através de ensaios de formação de esferas e da presença de marcadores para células-tronco, como o ABCG2. Neste estudo, foram utilizadas cócleas humanas adultas para ensaio de formação de esferas e para a pesquisa do marcador de células-tronco ABCG2 através de citometria de fluxo. As cócleas foram obtidas de pacientes portadores de schwannomas vestibulares submetidos a procedimento cirúrgico para ressecção do tumor via translabiríntica e doadores de órgãos em morte encefálica. Foi possível observar formação de esferas *in vitro* e identificar o marcador ABCG2 através de citometria de fluxo nas células dissociadas do tecido coclear.

Descritores: órgão espiral; cóclea; orelha interna; células-tronco; humanos; perda auditiva.

SUMMARY

MASSUCCI-BISSOLI, M. Evidences of stem cells in the human adult cochlea: sphere formation and identification of ABCG2. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2016. The human cochlea is, allegedly, unable to regenerate after trauma due to the loss of the proliferation capacity after the neonatal period. It has been demonstrated in different neonatal mammal species that sensorial cochlear cells retain their proliferation capacity in the neonatal period using sphere-formation assays and stem cell markers such as ABCG2. In the present work, human adult cochleas have been used for sphere-formation assay and flow cytometric identification of ABCG2. Human adult cochleas have been removed either from patients undergoing vestibular schwannoma resection via translabyrinthine approach or brain-dead organ donors. There have been identified sphere formation *in vitro* and the stem cell marker ABCG2 in flow cytometry analysis after cochlear dissociation.

Descriptors: Organ of Corti; cochlea; ear, inner; stem cells; humans; hearing loss.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A audição depende de um sistema complexo e altamente desenvolvido, viabiliza nossa interação com o meio ambiente, e é responsável por uma das características mais importantes e únicas da espécie humana: a comunicação verbal. Esse sistema funciona a partir de estruturas sensoriais altamente especializadas, as células ciliadas (CCs), capazes de converter a onda sonora mecânica em estímulo elétrico, e os neurônios auditivos, capazes de transmitir o estímulo elétrico gerado aos circuitos neurais centrais, onde serão interpretados do ponto de vista cognitivo como estímulo auditivo específico.

O órgão de Corti (OC) é o epitélio sensorial dentro da cóclea onde CCs, mais de dez tipos de células de suporte (CSs) e fibras nervosas interagem entre si. Existem dois tipos de CCs, as internas (CCIs) e as externas (CCEs), cada CCI se conecta a vários neurônios do tipo I enquanto cada neurônio do tipo II se conecta a várias CCEs (Water, 2012; Bento, 2013). A faixa sensorial do OC é formada por uma fileira de CCIs e três fileiras de CCEs. As CCs estão separadas umas das outras pelos corpos celulares das CSs, que se interpõem entre a base das CCs e a membrana basilar. Há diversos tipos de CSs colunares na faixa sensorial do OC, formando um mosaico ao redor das CCs. A manutenção desse mosaico é fundamental para o funcionamento coclear (Taylor et al., 2012). Trata-se de uma estrutura delicada, na qual a proliferação celular termina antes mesmo da diferenciação celular estar completa em seu

desenvolvimento (Kwan et al, 2009). Não havendo proliferação celular, lesões ao OC se tornam permanentes e se traduzem, clinicamente, em perdas auditivas irreversíveis.

As perdas auditivas podem ocorrer em qualquer idade, ser parciais ou totais, de origem genética (heranças autossômicas dominante e recessiva, ligada ao cromossomo X e mitocondrial) ou causadas por infecções intra-uterinas, complicações no parto, determinadas doenças infecciosas como meningite, uso de drogas ototóxicas, tumores, exposição excessiva a ruído e envelhecimento (Bento, 2013). A disfunção coclear decorrente de lesão de CCs figura entre as principais causas de surdez neurossensorial (Wong e Ryan, 2015).

A perda auditiva é um problema que afeta cerca de 5% da população brasileira, o que corresponde a quase 10 milhões de pessoas segundo resultados do censo do IBGE de 2010 (informações autorreferidas). Uma pesquisa realizada no município mineiro de Juiz de Fora estimou sua prevalência em 5,2% (Baraky, 2011).

Os tratamentos disponíveis para surdez neurossensorial são baseados no uso de próteses que vão desde a amplificação sonora individual (prótese auditiva convencional ou próteses implantáveis de orelha média) com aproveitamento funcional das células ciliadas ainda íntegras ou, na falha da prótese, o implante coclear que estimula diretamente o nervo auditivo como alternativa à fisiologia coclear.

A despeito do seu amplo uso e de sua comprovada melhora na qualidade de vida desses pacientes, os tratamentos atuais não são perfeitos, com

resultados variáveis particularmente no que diz respeito à discriminação fina das frequências e à performance em ambientes ruidosos (Oshima et al., 2010). Nenhum dos tratamentos disponíveis atualmente é capaz de restabelecer plenamente a fisiologia auditiva, o que poderia ser alcançado, em teoria, com o uso de estratégias de regeneração das células da cóclea e dos neurônios auditivos.

A presença de células-tronco (CTs) é uma condição que viabiliza a regeneração espontânea dos tecidos, como acontece na pele, túbulos seminíferos, medula óssea, entre outros (Morrison e Spradling, 2008). Além de estarem presentes em tecidos com regeneração espontânea, há CTs também em tecidos sem regeneração clínica evidente, como o sistema nervoso central (van Wijngaarden e Franklin, 2013) e o miocárdio (Santini, 2016).

São consideradas evidências de CTs nesses tecidos a capacidade de formação de esferas após dissociação celular, a presença de determinados marcadores celulares, ou a identificação de uma subpopulação de células conhecida por *side-population* (SP). Esferas são colônias flutuantes com características de autorrenovação, proliferação e diferenciação em outros tipos celulares (Pastrana et al., 2011). As células SP são identificadas pela elevada capacidade de efluxo do corante Hoechst 33342 e também podem ser caracterizadas pela presença do marcador ABCG2 (Zhou et al, 2001).

São escassos os estudos com cócleas humanas adultas, o que pode ser explicado pela dificuldade de acesso a esse material. Sua localização

profunda no osso temporal, na base do crânio (Taylor et al., 2015), sua composição delicada e heterogênea (Liu et al., 2014) e perda funcional associada à uma hipotética manipulação em voluntários sadios são fatores determinantes para a baixa disponibilidade desse tipo de material para estudo. Dessa forma, os autores optam por selecionar pacientes que já seriam submetidos a procedimentos que sacrificariam a audição *per se*, como nas cirurgias para schwannomas vestibulares via translabiríntica ou via transcoclear (Oghalai et al., 2000).

Uma outra fonte possível de material coclear para estudo, até o momento não descrita por nenhum autor, é realizar a coleta de doadores de órgãos em morte encefálica. Segundo o último boletim disponível no site da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), entre janeiro e junho de 2015 foram 1.356 doadores em todo o território brasileiro, 409 deles no estado de São Paulo. A disponibilização desses casos para captação de material coclear pode trazer grande impacto no meio científico.

A combinação de casos complexos com necessidade de cirurgia com sacrifício da audição e o serviço de procura de órgãos para doação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo proporcionaram um número de casos suficiente para pesquisar evidências de células-tronco com cócleas humanas adultas. Tais evidências não são provas definitivas da presença de uma capacidade regenerativa da cóclea, ainda que não relevante clinicamente, porém abrem espaço para maiores e mais complexas investigações no futuro.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Pesquisar evidências de células-tronco em cócleas humanas adultas obtidas durante cirurgia para ressecção de schwannomas vestibulares e de doadores de órgãos em morte encefálica, a saber:

- Formação de esferas após dissociação em cultura;
- Caracterização das esferas;
- Presença do marcador de *side-population* ABCG2.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Identificação de CTs em tecidos adultos

As CTs adultas formam uma subpopulação existente em diversos tecidos do corpo e são capazes de originar diferentes células do tecido ao qual pertencem (células multipotentes), com potencial regenerativo e/ou de reposição celular. São exemplos de CTs adultas em mamíferos: CTs germinativas na camada basal dos túbulos seminíferos, CTs epiteliais no folículo piloso, CTs neurais na zona subventricular dos ventrículos laterais do SNC, CTs musculares entre as células satélites da lâmina basal das miofibras e CTs hematopoiéticas na medula óssea (Morrison e Spradling, 2008).

As CTs adultas foram inicialmente descritas em tecidos com regeneração e renovação fisiológicas, como a medula óssea (Becker et al., 1963); o que não impediu a busca de evidências da presença de CTs adultas em tecidos sem regeneração clinicamente significativa. Os principais exemplos de CTs adultas nessas condições são as CTs no sistema nervoso central, descritas na década de 1990 (Reynold e Weiss, 1992; Lois e Alvarez-Buylla, 1993; Kirschenbaum et al., 1994), e as CTs no miocárdio (Beltrami et al., 2003).

A identificação de CTs adultas nos diferentes tecidos pode ser feita de maneira direta, isto é, utilizando-se algum marcador específico para a

CT adulta daquele tecido em particular, ou de forma retrospectiva baseada nas propriedades de autorrenovação e diferenciação das CTs. Uma forma amplamente difundida de identificação retrospectiva de CTs adultas em tecidos é através de ensaios de formação de esferas (revisado extensamente por Pastrana et al., 2011).

O ensaio para formação de esferas pode ser feito diretamente no tecido a ser estudado ou pode ser realizado a partir de marcadores celulares para isolamento ou exclusão de linhagens celulares determinadas (Pastrana et al., 2011). Um estudo pioneiro, publicado em 1992 por Reynold e Weiss, identificou a presença de esferas após dissociação de tecido removido do corpo estriado e área periventricular de camundongos adultos e cultura não aderente em meio livre de soro e suplementado com EGF (fator de crescimento epidérmico, do inglês *epidermal growth factor*). A maioria das células apresentava expressão de nestina, um marcador presente nas CTs neuroepiteliais do cérebro embrionário. As esferas mostraram-se capaz de autorrenovação após dissociação e novo plaqueamento sob as mesmas condições. Quando colocadas em cultura aderente e sem o fator de crescimento, as esferas se diferenciaram em neurônios e células da glia, o que consistiu na primeira evidência de células multipotentes no cérebro adulto de mamíferos. Foi identificada a capacidade de formação de esferas diretamente após a dissecação de outros tecidos adultos além do nervoso, entre eles: retina (Tropepe et al., 2000), derme (Toma et al., 2001), tecido mamário (Dontu et al., 2003) e córnea (Yokoo et al., 2005).

A identificação de alguns marcadores protéicos com técnicas de imunofluorescência (direta no tecido inteiro ou através de citometria de fluxo após dissociação) possibilita uma avaliação inicial da capacidade de formação de esferas em tecidos nos quais tal capacidade ainda não foi descrita (Pastrana et al., 2011). Em 1996, Goodell descreveu pela primeira vez que uma família de transportadores transmembrana tinha capacidade de efluxo rápido de um corante lipofílico fluorescente (Hoechst 33342), em determinadas células da medula óssea de camundongos. Após separação celular por citometria, foi verificado que essa população celular se mostrou rica em CTs hematopoiéticas funcionais. Essa família de transportadores transmembrana é chamada de ABC (do inglês ATP-binding cassette), e pertence à superfamília de proteínas transmembrana que catalizam o transporte de vários componentes endógenos e xenobióticos. A subpopulação com a característica de efluxo rápido de Hoechst 33342 ficou conhecida por *side-population* (SP). Depois dos estudos de Goodell, outros tecidos foram investigados para a presença de SP e sua correlação com características de CTs adultas nesses tecidos. Foi observada a formação de esferas nas SPs obtidas após separação celular por citometria em diversos tecidos, entre eles: músculo esquelético (Asakura et al., 2002), fígado (Shimano et al., 2003), rim (Iwatani et al., 2004), glândula pituitária (Chen et al., 2005) e coração (Tomita et al., 2005).

Apesar de estarem amplamente difundidos, os ensaios para identificação de SP podem apresentar grande variabilidade e baixa reprodutibilidade

entre os diversos laboratórios (Golebiewska et al., 2011). Diversos estudos investigaram marcadores específicos para as proteínas transmembrana responsáveis pelo fenótipo SP e a possibilidade de sua utilização como marcadores de CTs. Um fator comum aos estudos com SP Hoechst positivos, em conjunto com a baixa expressão de CD34 em células hematopoiéticas, foi a expressão direta dos transportadores ABC (Bunting K, 2002). O papel do transportador ABCG2 foi verificada por Zhou e colaboradores em 2001 através da expressão de seu RNA mensageiro por qRT-PCR (técnica da reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real, em que são comparadas quantitativamente as expressões de diferentes genes nas amostras estudadas). Foi demonstrada expressão elevada de ABCG2 em CTs hematopoiéticas de camundongos e importante diminuição de seus níveis nas células adultas da medula óssea. Além disso, a expressão forçada de seu cDNA conferiu fenótipo SP às células adultas da medula óssea e levou a redução de sua maturidade tanto em testes *in vitro* como *in vivo*. A partir desses resultados, os autores concluíram que o ABCG2 é determinante no fenótipo SP e pode servir como marcador de CTs. A utilização do marcador ABCG2, isoladamente ou em conjunto com outros marcadores, como identificador de SP ou CTs também foi realizada com sucesso na córnea (Watanabe et al., 2004) e em tecido cardíaco (Pfister et al., 2008), além de ser extensamente estudado como marcador de CTs cancerígenas e como de resistência a quimioterápicos (Ding et al., 2010).

Especificamente na orelha interna de mamíferos, foram identificadas esferas e foi identificada a presença de SP. Além disso, foram identificados progenitores óticos em nervo auditivo e em cócleas fetais. Esses estudos são detalhados abaixo.

3.1.1. Otoféricas

Em 2002, Malgrange e colaboradores publicaram a primeira evidência de esferas em culturas em suspensão de epitélio auditivo dissociado de ratos neonatos. Essas esferas apresentaram as propriedades características das CTs como autorrenovação, proliferação e diferenciação em outros tipos celulares, incluindo CCs, CSs e neurônios. As esferas obtidas do epitélio da orelha interna ficaram conhecidas por otosferas.

Utrículos de camundongos adultos dissociados também apresentaram a capacidade de formação de otosferas em culturas em suspensão (Li et al., 2003). Nesse trabalho, foram utilizados como controles culturas dos gânglios espiral e vestibular, sem formação de esferas.

A capacidade de formação de otosferas nos diferentes órgãos sensoriais da orelha interna foi descrita por Oshima e seus colaboradores em 2007: foram estudados camundongos de idades entre um e 42 dias de vida e dissecados separadamente o órgão de Corti, gânglio espiral, estria vascular e as máculas do sáculo, utrículo e crista ampular. Foram

observadas esferas em todos os tecidos neonatos e a maior facilidade de obtenção de esferas foi encontrada nas máculas do vestibulo. No OC não foram encontradas esferas nos camundongos com 21 dias de vida e, no gânglio espiral, não foram encontradas esferas nos camundongos com 42 dias de vida.

Oshima e colaboradores publicaram em 2009, um protocolo detalhado para obtenção de otosferas, utilizado por diversos autores posteriormente. Resumidamente, o método consiste em dissecação dos tecidos sob visão microscópica, dissociação com tripsina, inibição com inibidor de tripsina e DNaseI, dissociação mecânica com pipeta e passagem das células por filtro de 70 micrômetros seguida da cultura em suspensão em placa não aderente.

A formação de otosferas em cobaias neonatais foi descrita por Oiticica e colaboradores 2010, mostrando que tal capacidade não se restringe a ratos e camundongos.

Lou e colaboradores, em 2014, publicaram estudo em que se mostrou possível a obtenção de esferas de camundongos adultos (60 dias de vida). Essas esferas eram, comparativamente com as otosferas de camundongos neonatos (um dia de vida), em menor número, apresentaram menor expressão de marcadores genéticos de desenvolvimento e não se mostraram capazes de diferenciação *in vitro*.

3.1.2. ABCG2 em camundongos – side-population

Foi demonstrada a presença de SP em cócleas de camundongos neonatos por citometria de fluxo com o corante Hoechst (Savary et al., 2007). Nas células dissociadas de camundongos de três dias de vida, foi encontrada uma porcentagem de 0,53% de SP. A confirmação do perfil de SP foi feita por meio de qRT-PCR comparativo da expressão de ABCG2 nas células SP em relação às demais (houve aumento da expressão na SP conforme esperado) e da presença de ABCG2 confirmada por imunocitoquímica em que se observou marcação para ABCG2 ao redor da membrana plasmática das células SP. Quando foi realizada cultura das células SP purificadas por citometria, foram obtidas esferas com capacidade comprovada de proliferação e capacidade de autorrenovação limitada a duas passagens *in vitro*. Essas esferas resultantes foram dissociadas e submetidas a ensaio de diferenciação e originaram células com marcadores de células ciliadas (miosina VIIa e fimbrina) e outras com marcadores de células de suporte (p27kip1).

A partir dessa descoberta, outros estudos foram realizados (Chen et al., 2011; Chao et al., 2013, Chen et al., 2015). Cultivando células do modíolo purificadas por citometria de fluxo de acordo com o efluxo de Hoechst, os grupos acima obtiveram esferas e células capazes de proliferação, autorrenovação e diferenciação *in vitro*. Os autores utilizaram a expressão de ABCG2 como marcador do fenótipo SP nos estudos citados.

3.1.3. Progenitores óticos humanos

Em 2005, Rask-Andersen e colaboradores isolaram células progenitoras neurais no nervo auditivo adulto de doze pacientes submetidos a cirurgia para ressecção de meningioma petroclival. Durante o procedimento cirúrgico, ao invés de realizar o broqueamento através da cóclea, ela foi removida e levada ao laboratório para microdissecção do gânglio espiral. O material foi cultivado e foram obtidas neuroesferas que se mostraram capazes de proliferação, autorrenovação e diferenciação *in vitro* em neurônios.

Em 2007, Chen e colaboradores isolaram CTs auditivas a partir de fetos humanos entre 9-12 semanas de gestação. O material coletado após a interrupção da gestação foi incubado a 37°C, durante uma noite antes do início dos procedimentos, como medida para aumentar a viabilidade e diminuir o stress celular antes da dissociação dos tecidos. Foi realizada cultura em monocamada aderente e observada expressão de marcadores de desenvolvimento e diferenciação celular após indução. O mesmo grupo demonstrou, em 2009, a capacidade dessas células de expansão, a longo prazo, e diferenciação em células com perfil de ciliadas e neurônios auditivos funcionais *in vitro*.

3.2. Obtenção de cócleas humanas para estudos

São poucos os estudos com cócleas humanas adultas. As principais razões apontadas pelos autores são o pequeno tamanho do órgão, sua composição delicada e heterogênea (Liu et al., 2014) e sua localização profunda no osso temporal, conhecido por ser o osso mais duro do corpo humano, na base do crânio (Liu et al., 2014, Taylor et al., 2015).

Estudos *post-mortem* apresentam a dificuldade da manutenção da viabilidade tecidual, uma vez que o tempo para a captação dos tecidos pode variar de várias horas até dias após o óbito (Liu et al., 2014).

Dessa forma, os autores optam por selecionar pacientes com doenças específicas, de baixa incidência populacional, que já seriam submetidos a procedimentos que sacrificariam a audição *per se*. Oghalai et al., em 2000, selecionou pacientes que seriam submetidos a ressecção de tumores da base lateral do crânio cujo procedimento implicaria na destruição da orelha interna desses pacientes. Num período de 10 meses, 25 pacientes foram submetidos a esse procedimento, entretanto apenas 4 deles tinham indicação de cirurgia que incluísse o broqueamento coclear associado (tumores com diâmetro maior que 3 cm). Todos os pacientes foram selecionados com base no tamanho do tumor ou na ausência de audição funcional. Para a captação do tecido coclear, foi realizada mastoidectomia total com exposição de orelha média, remoção da membrana timpânica, martelo e bigorna, preservação do nervo facial, labirintectomia. Após a identificação do promontório coclear, foram realizadas duas cocleostomias com broca diamantada e curetagem da

camada óssea entre elas. Foram utilizadas pinças para liberação do ligamento espiral e dissecação romba no modíolo e giros cocleares.

Liu e seus colaboradores publicaram, em 2014, um estudo morfológico com ênfase no detalhamento da imunofluorescência de cócleas inteiras, obtidas de pacientes submetidos a cirurgia para remoção de tumores do ângulo ponto cerebelar. Os 14 pacientes selecionados apresentavam tumores extensos, em sua maioria meningiomas, com indicação de cirurgia transcoclear, além de audição normal para a idade. Foi realizada mastoidectomia total com remoção da parede posterior do meato auditivo externo e reposicionamento postero-inferior do nervo facial. A cóclea foi removida intacta exceto por sua porção antero-inferior e os tecidos foram fixados e descalcificados para estudo de imunofluorescência.

Um estudo mais recente removeu material apenas do vestíbulo de pacientes submetidos a ressecção de schwannomas vestibulares (Taylor et al., 2015). Os autores não descrevem em detalhes o procedimento utilizado para remoção dos tecidos. O objetivo principal dos autores foi estabelecer um modelo para estudo *in vitro* de mácula utricular de pacientes submetidos a cirurgia translabiríntica. O material foi dissecado e mantido em meio de cultura MEM glutamax com 1% de HEPES e 10% SFB a 37°C até sua chegada ao laboratório e definição do destino da amostra. O tempo de chegada variou de 20 minutos até 2 dias. Foi testada viabilidade celular de amostras randomicamente determinadas através de exposição a FM1-43, e em todas as amostras

foi observada viabilidade adequada (o tempo máximo nessas condições antes do teste de viabilidade foi de 4 dias). Nas demais amostras foram realizados estudos morfológicos.

Até o momento, não há nenhum estudo publicado onde tenha sido investigada alguma evidência de CTs na cóclea humana adulta.

Uma possibilidade até o momento não utilizada pelos estudos publicados é a coleta de material da orelha interna de doadores de órgãos em morte encefálica. Trata-se de uma população-alvo considerável pois, segundo o último boletim disponível no site da ABTO, entre janeiro e junho de 2015 foram identificados 4.715 possíveis doadores em todo o território nacional, 1.306 deles no estado de São Paulo. Entretanto, a sociedade ainda apresenta resistência na doação de órgãos, sendo que 44% das não efetivações de doação são devido à recusa familiar, segundo dados da mesma ABTO. No mesmo período, foram efetivamente doados os órgãos de 1.356 pacientes no território nacional inteiro e 409 no estado de São Paulo. Ainda assim, é de se esperar que a disponibilização desses casos para captação de material coclear seja relevante no meio científico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O material de interesse do estudo é a porção membranosa da cóclea humana onde se encontram o órgão de Corti, a estria vascular e as terminações nervosas do nervo coclear.

4.2. Métodos

Foram selecionadas cócleas de doadores de órgãos e pacientes que foram submetidos a cirurgias de ressecção de schwannomas vestibulares. O projeto de pesquisa, juntamente com termos de consentimento livre e esclarecidos (TCLE), foram registrados na Plataforma Brasil com número 8896 e foram aprovados pela CAPPesq e pelo CEP em outubro de 2012, número do parecer 128.418. O parecer consubstanciado do CEP e os TCLE se encontram em anexo ao final do texto. O material coletado foi submetido a um dos procedimentos seguintes: cultura organotípica para teste de viabilidade celular, dissociação para cultura de otosferas, dissociação para citometria de fluxo e extração de RNA para realização de qRT-PCR. Foi definido qual o destino do material coletado com base na disponibilidade de reagentes e do citômetro de fluxo utilizado na pesquisa.

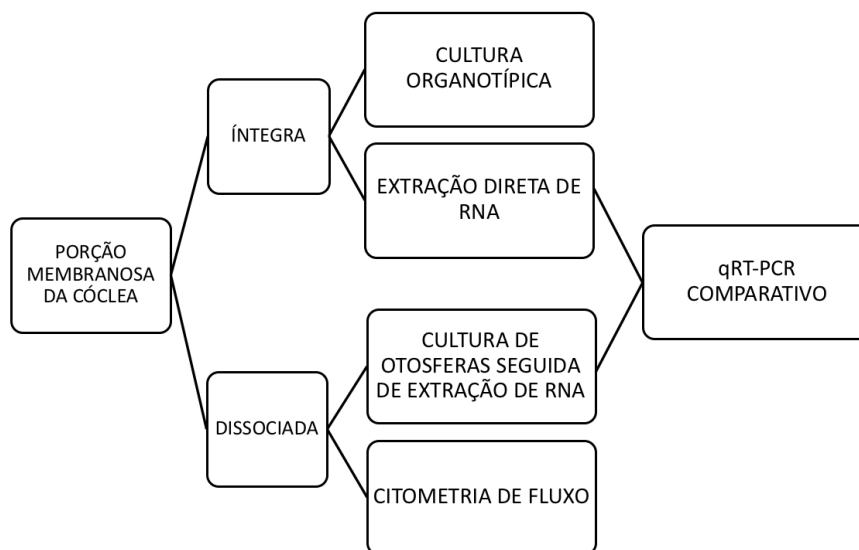


Figura 1 – Fluxograma dos métodos utilizados após captação do material coclear. A porção membranosa da cóclea foi mantida íntegra para cultura organotípica e extração direta de RNA, enquanto que para citometria de fluxo e cultura de otosferas o tecido foi dissociado

4.2.1. Seleção dos casos

Para ter acesso ao material de interesse do estudo, dois grupos de pacientes foram selecionados: doadores de órgãos e pacientes portadores de schwannomas vestibulares com indicação de cirurgia via translabiríntica. Foram selecionados esses grupos de pacientes pois, para acessar e obter a porção membranosa da cóclea, obrigatoriamente haveria perda total da audição do indivíduo no lado operado. Por essa razão, o procedimento só poderia ser realizado em pessoas cuja audição estivesse comprometida previamente ou que seria comprometida independentemente da realização da pesquisa, seja pela via de acesso ao tumor ou pelo quadro de morte encefálica. Foi selecionada amostra de

conveniência no período do estudo, isto é, todos os casos elegíveis no período do estudo foram convidados a participar. Por se tratar de um estudo observacional inédito, não foi determinado um número mínimo ou máximo de pacientes a serem incluídos.

No HCFMUSP, a Organização de Procura de Órgãos (OPO) é responsável por contatar familiares e/ou responsáveis pelos pacientes em morte encefálica, passíveis de doação de órgãos para transplantes e pesquisas. Durante o período da pesquisa, os familiares e responsáveis pelos doadores de órgãos foram informados sobre a pesquisa e elegibilidade para o estudo e, uma vez concordando com o procedimento, foram apresentados ao TCLE de acordo com as normas da Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP. Todos os familiares e/ou responsáveis que concordaram com a doação do material para a pesquisa assinaram o termo de consentimento antes da realização do procedimento. Foram excluídos os pacientes com registro de traumatismo de osso temporal por tomografia ou exame físico (excluída a lateralidade a depender do caso). No período de novembro de 2015 a março de 2016 quatro familiares/responsáveis por doadores de órgãos no HCFMUSP aceitaram participar da pesquisa. Dos oito lados possíveis, foi removido material para estudo de seis lados. Os demais lados foram excluídos por traumatismo local (um paciente) e por indisponibilidade de material cirúrgico no horário do procedimento. As amostras coletadas de um mesmo doador foram tratadas como uma amostra única. A tabela abaixo resume os dados dos doadores de órgãos (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados dos doadores de órgãos dos quais foi coletado material coclear

Data do procedimento	Idade	Sexo	Lateralidade	Identificação da amostra
02/12/2015	17 anos	masculino	bilateral	A
16/12/2015	38 anos	masculino	direita	B
21/12/2015	55 anos	feminino	bilateral	C
01/03/2016	33 anos	feminino	direita	D

Pacientes portadores de schwannoma vestibular com indicação de cirurgia translabiríntica também foram selecionados para participação no estudo. Como rotina pré-operatória, esses pacientes são submetidos a avaliação audiológica. Foram excluídos do estudo os pacientes com perda neurossensorial profunda ou anacusia do lado a ser operado, uma vez que para obtenção de células viáveis para a pesquisa seria importante ter a cóclea funcional, ao menos parcialmente, para obtenção de células viáveis. Os critérios utilizados para a definição da via cirúrgica foram o tamanho e a localização do tumor no meato auditivo interno de acordo com o descrito detalhadamente por Bento (2013). Os pacientes elegíveis para o estudo foram informados sobre o projeto de pesquisa e então apresentados ao TCLE de acordo com as normas da Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP. Os pacientes que concordaram em participar da pesquisa foram então incluídos no estudo. No período de junho de 2014 a março de 2015 e, entre agosto e dezembro de 2015, quatro pacientes consentiram na participação no estudo. A tabela 2 resume os dados dos pacientes que participaram do estudo:

Tabela 2 – Dados dos pacientes submetidos à cirurgia de ressecção de SV dos quais foi coletado material coclear

Data da cirurgia	Idade	Sexo	Identificação da amostra
08/07/2014	52	feminino	E
12/08/2014	20	feminino	F
01/10/2014	61	feminino	G
22/09/2015	63	feminino	H

4.2.2. Procedimento cirúrgico

O acesso cirúrgico à cóclea foi realizado por via endaural ou retroauricular nos doadores de órgãos e pela via translabiríntica ampliada nos pacientes portadores de schwannoma vestibular. Após a exposição coclear, foi realizada uma cocleostomia ampla e cuidadosa, isto é, uma perfuração da camada óssea e abertura da cóclea, com remoção da camada óssea por broqueamento com broca diamantada e posterior curetagem. Foi removido o máximo possível de tecido com cureta, realizando um descolamento da porção membranosa do osso coclear.

Após cada procedimento, os tecidos foram inspecionados no laboratório e, no caso de haver fragmentos ósseos, os mesmos foram removidos. Não foi possível a remoção integral do OC em nenhum dos casos, todos os casos chegaram fragmentados à inspeção. Independentemente da quantidade de material obtida, o tecido foi utilizado para a pesquisa conforme descrito nos tópicos seguintes.

4.2.2.1 Procedimento cirúrgico nos doadores de órgãos em morte encefálica

Foram removidas porções membranosas de seis cócleas de quatro pacientes. Para acesso à cóclea, foram utilizadas, experimentalmente, duas vias: endaural e retroauricular. O tempo total dos procedimentos variou entre 45 e 70 minutos para cada lado. Os procedimentos foram realizados por três cirurgiões diferentes.

4.2.2.1.1 Acesso via endaural

Sob visão microscópica, foi realizada otoscopia e incisão em porção óssea do meato auditivo externo para dissecção de pele e confecção de retalho timpano-meatal. Para melhor visualização do promontório coclear, optou-se por remover a membrana timpânica e realizar broqueamento de parede posterior do meato auditivo externo. Seguiu-se o broqueamento da cóclea com remoção do tecido de interesse.

4.2.2.1.2 Acesso via retroauricular

Foi realizada incisão retroauricular na linha de implantação do cabelo, seguida de confecção de retalho da musculatura temporal para exposição da cortical óssea. Realizado broqueamento da mastoide, com identificação do seio sigmoide e canal semicircular lateral. Em quatro lados (três pacientes), foi realizada timpanotomia posterior ampla para identificação do promontório e janela redonda. Em um dos lados (um paciente), optou-se pelo broqueamento total da parede posterior do meato auditivo externo para exposição da cóclea. Nos cinco lados em que foi realizada esta técnica, após a exposição da cóclea, o estribo foi removido e foi realizada cocleostomia ampla com comunicação das janelas redonda e oval. Foi removido o tecido membranoso coclear e, para a sutura do retalho, foi utilizado ponto contínuo de fio de nylon 4.0. Como a incisão e a sutura foram realizadas na linha de implantação do cabelo, não houve prejuízo estético. Um resumo das técnicas utilizadas é mostrado na tabela 3.



Figura 2A e 2B – Aspecto pós-operatório da região retroauricular do doador de órgãos após a captação da cóclea

Tabela 3 – Vias de acesso utilizadas para coleta de material coclear nos doadores de órgãos em morte encefálica

Amostra	Lateralidade	Técnica utilizada
A	direita	endaural
A	esquerda	retroauricular com timpanotomia posterior
B	direita	retroauricular com timpanotomia posterior
C	bilateral	retroauricular com timpanotomia posterior
D	direita	retroauricular com broqueamento da parede posterior do meato auditivo externo

4.2.2.2 Procedimento cirúrgico nos portadores de schwannoma vestibular: via translabiríntica ampliada

Para a remoção do tecido de interesse, a cirurgia via translabiríntica foi ampliada para acesso coclear, conforme descrito por Bento (1989). Uma vez identificada a cóclea, foi realizada uma cocleostomia ampla com a

remoção do tecido membranoso. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo cirurgião. Durante o procedimento os pacientes tiveram sua função do nervo facial monitorada através do equipamento NIM Nerve Monitoring Systems 2.0 (Medtronic®, Dublin, Irlanda).

4.2.3. Cultura organotípica para estudo de viabilidade

A cultura organotípica, ou seja, cultura do órgão inteiro após sua coleta, foi utilizada para estudo de viabilidade do órgão de Corti em laboratório. O material coletado de um dos doadores de órgãos em morte encefálica foi transportado ao laboratório em EMEM Vitrocell Embriolife® (Campinas, SP, Brasil) em 10% SFB, seguindo protocolo sugerido por Taylor e colaboradores (2015). Permaneceu a 4°C por 36 horas e então foi transferido para placa de Petri com 2,5 mL de meio aquecido a 37°C, colocado em incubadora de CO₂ a 5% e lá mantido por 96 horas. Foi feita reposição de 500 µL de meio em dias alternados. Ao término das 96 horas, o tecido foi submetido a dissociação seguindo procedimento descrito no item 4 e exposto a azul de tripan para contabilização de células viáveis em câmara de Neubauer. O teste de viabilidade de azul de tripan baseia-se no princípio de que células vivas apresentam em sua membrana celular a capacidade de eliminar determinados corantes, como o azul de tripan. No protocolo sugerido por Strober (2015), as células vivas são capazes de excluir o corante, mantendo seu citoplasma

claro, enquanto as células mortas absorvem o corante e se apresentam com citoplasma azul.

4.2.4. Dissociação do tecido membranoso coclear

O material coletado no centro cirúrgico foi transportado até o LIM-32 em aproximadamente 10 mL de meio de cultura (ver itens 5 e 6 para maiores detalhes) em tubo de 30 mL em caixa de isopor com gelo. Previamente à dissociação do tecido, o material foi transferido para placa de Petri com HBSS para visualização em microscópio de dissecação, documentação e remoção de eventual tecido ósseo. Então fez-se a transferência do tecido para microtubo de 1,5 mL com 100 µL de PBS para lavagem, aspirado em seguida. Foram adicionados 450 µL de tripsina e posterior incubação em banho-maria a 37°C por 45 minutos até amolecimento do tecido. Seguiu-se dissociação mecânica com pipeta de 200 µL e ponteira com filtro até obtenção de suspensão celular homogênea sem tecido visível. Para inativação da tripsina, foram adicionados 450 µL de inibidor de tripsina associado a DNase I em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Para remoção da tripsina e seu inibidor, o material foi centrifugado por 5 minutos a 8000 x g a temperatura ambiente e ressuspendido no meio de cultura de interesse (ver itens 5 e 6).

4.2.5. Cultura de otosferas

O tecido coclear, que foi submetido a cultura de otosferas, foi coletado diretamente em meio de cultura específico descrito por Oshima (2009): DMEM-F12, 2X B27, 1X N2, glutamina a 2 mM, ITS a 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$, glicose a 6g/L, ampicilina sódica a 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$, EGF a 20 ng/mL, bFGF a 10 ng/mL e IGF a 50 ng/mL. O meio de cultura para otosferas também foi utilizado para a ressuspensão após a dissociação celular. A suspensão celular obtida após a dissociação foi submetida a filtração em filtro celular de 70 micrômetros e plaqueada em placa para cultura em suspensão de 6 poços CellStar® (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA). Foi mantida em incubadora de CO₂ a 5% com temperatura estável de 37°C e feita reposição de 500 μL de meio em dias alternados até a identificação de otosferas que foram então coletadas para extração de RNA. A coleta de otosferas foi realizada sob visão microscópica com pipeta de 1000 μL .

4.2.6. Citometria de fluxo

As células dissociadas em suspensão foram ressuspensas em 1000 μL de PBS em 10% SFB e então divididas em 3 microtubos de 1,5ml diferentes: 200 μL para controle negativo sem anticorpo, 400 μL para controle negativo com isotipo controle e 400 μL para incubação com anti-

ABCG2 conjugado. Foram utilizados 40 μ L do anticorpo e 20 μ L do isotipo para incubação, realizada em temperatura ambiente por 45 minutos, em ambiente protegido da luz. Após esse período, os tubos foram colocados em centrífuga por 5 minutos a 8000 x g a temperatura ambiente, aspirados os sobrenadantes e os pellets ressuspensos em 500 μ L de PBS em 10% FBS. Os tubos foram submetidos a outra centrifugação idêntica à anterior e então novamente os pellets foram ressuspensos em 500 μ L de PBS em 10% FBS para leitura no citômetro Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). A análise foi feita no software do próprio equipamento.

4.2.7. Coleta do material para extração de RNA e realização de qRT-PCR

O tecido coclear removido da cirurgia diretamente para extração de RNA foi coletado em solução de RNAlater e transportado no gelo até o laboratório de investigação médica (LIM 32 – FMUSP). No laboratório o tecido foi cuidadosamente filtrado e então transferido para microtubo de 1,5 mL contendo 350 μ L de tampão de lise RLT (Qiagen®, Hilden, Alemanha) com beta mercaptoetanol a 1:100. Para ruptura do tecido, utilizou-se homogeneizador do tipo rotor e estator por 40 segundos seguido de centrifugação por 3 minutos e transferência do sobrenadante

para novo microtubo de 1,5 mL. Seguiu-se a extração de RNA seguindo o protocolo do RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha), eluindo em 30 microlitros de água RNase-free. O RNA obtido diretamente da cóclea humana foi utilizado para comparação com RNA obtido de cultura de otosferas de cóclea humana utilizando PCR em tempo real após transcrição reversa. A extração de RNA das otosferas foi feita seguindo igualmente as orientações do RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha). Ao término do protocolo de extração, o RNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 (Nanodrop Technologies®, Wilmington, DE). Para análise por qRT-PCR, a transcrição do RNA em cDNA foi feita com o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) e o protocolo sugerido pelo fabricante. As reações de qRT-PCR foram feitas no Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), com as condições de amplificação padrão. Os primers utilizados nas amostras foram desenhados com o software Primer3 (Untergasser et al, 2012; Koressaar e Remm, 2007) para os seguintes genes: genes de referência GUSB e HPRT1; células ciliadas MYO7A; células de suporte SOX2, MAP3K7; células progenitoras de orelha interna SOX2. Foram realizadas curvas de dissociação e curvas padrão seriadas para cada um dos primers desenhados a fim de verificar se a amplificação estava específica ao gene alvo e proporcional a quantidade de material utilizada. A qRT-PCR foi realizada utilizando-se SYBR Green e cada amostra foi corrida em triplicata. O método proposto para cálculo das

alterações na expressão dos genes alvo foi o $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

A figura 3 ilustra um dos fragmentos de tecido obtidos antes de qualquer manipulação. Podem ser observados o órgão de Corti, ducto coclear, estria vascular e um fragmento do gânglio espiral.

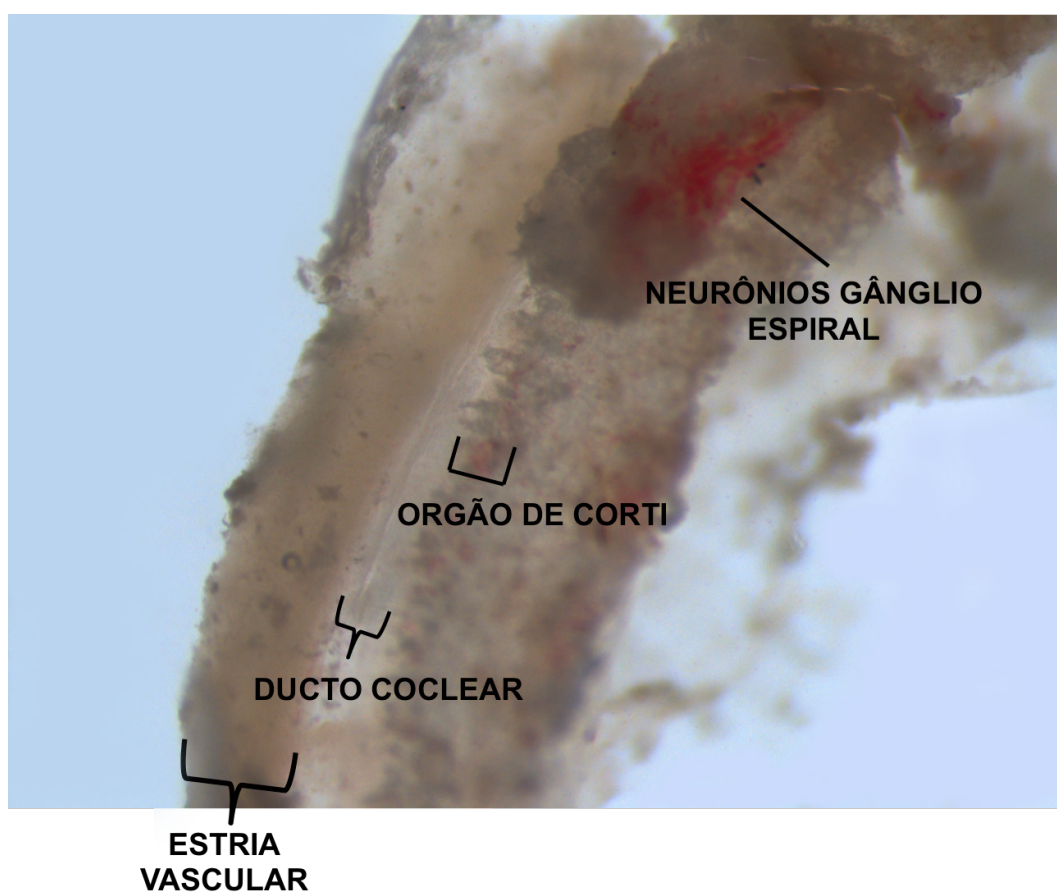


Figura 3 – Fragmentos de tecido coclear imediatamente após remoção cirúrgica

5.1. Cultura organotípica para estudo de viabilidade

Para o estudo de viabilidade da cultura organotípica após remoção cirúrgica foi utilizado material removido cirurgicamente de dois lados de um mesmo doador de órgãos (amostra A). O doador de órgãos era masculino e tinha 17 anos. Os tecidos foram removidos e mantidos a 4°C por 36 horas e então transferidos para incubadora de CO₂ a 5% onde permaneceram por 96 horas. Após dissociação e contagem em câmara de Neubauer, a totalidade das células estava viável após o experimento com azul de tripan.

5.2. Cultura de otosferas

Para cultura de otosferas foi utilizado material de três pacientes submetidos a cirurgia para ressecção de SV e de dois lados de um mesmo doador de órgãos, em três experimentos independentes.

5.2.1 Cultura do material da amostra E

Foi removido material de paciente feminino de 52 anos após procedimento cirúrgico para ressecção de SV sem intercorrências. O tecido foi dissociado no laboratório logo após sua remoção com dificuldade técnica importante (formação de bolhas e dissociação celular

ineficiente), o que resultou em poucas células ao final do procedimento e todas as células obtidas foram plaqueadas diretamente sem contagem celular. No 2º DIV foi observada contaminação bacteriana e a placa foi desprezada.

5.2.2 Otosferas obtidas após cultura da amostra G

Foi removido material de paciente feminino de 61 anos após procedimento cirúrgico para ressecção de SV sem intercorrências. O tecido foi dissociado no laboratório logo após sua remoção. Foram obtidas $1,25 \times 10^6$ células e todas foram plaqueadas no mesmo poço. No 1º e 2º DIV foram observados poucos aglomerados celulares. No 4º DIV foi observado um aumento nos aglomerados celulares e uma maior densidade celular. No 5º DIV foi observado um número maior de células mortas e foi optado por coletar as esferas para extração de RNA.

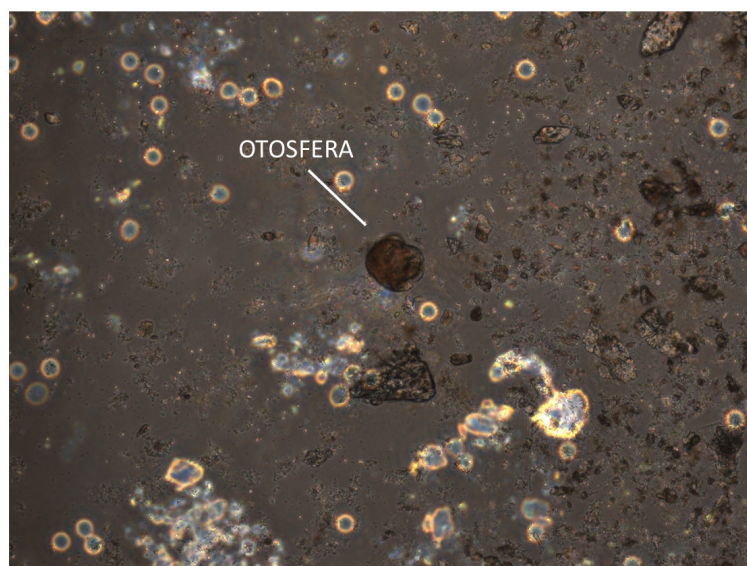


Figura 4 – Otoferra no 5º. DIV

5.2.3 Cultura do material da amostra H

Foi removido material de paciente feminino de 63 anos após procedimento cirúrgico para ressecção de SV sem intercorrências. Houve uma maior dificuldade técnica na remoção dos tecidos neste caso, o que resultou em menor quantidade de material removido. O tecido foi dissociado no laboratório logo após sua remoção. Foram obtidas 4×10^4 células e todas foram plaqueadas no mesmo poço. Não houve qualquer crescimento celular até o 5º. DIV, quando o experimento foi desprezado.

5.2.4 Otofensas obtidas após cultura da amostra A

Para este experimento foi utilizado o material resultante da dissociação da cultura organotípica descrita no item 5.1 (doador de órgãos de 17 anos). Após a dissociação, as células foram plaqueadas em um único poço. No 2º DIV foram observadas esferas e aglomerados celulares com características morfológicas de precursores neuronais. No 5º DIV foi observado aumento dessas populações celulares distintas e as mesmas foram coletadas separadamente para extração de RNA.

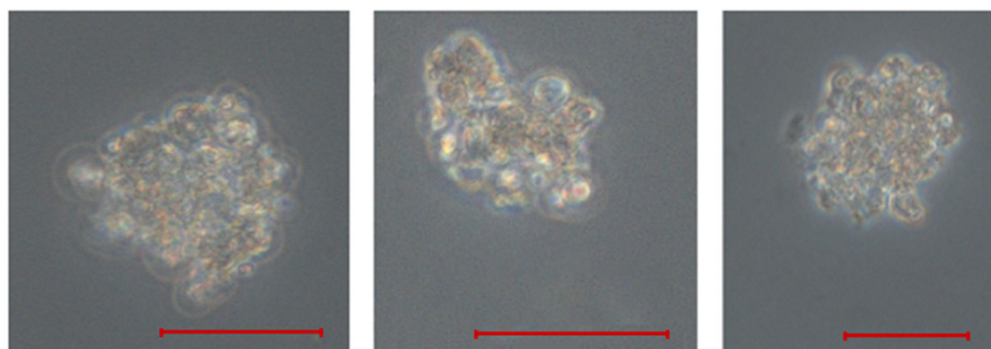


Figura 5 – Otofensas no 3º. DIV. Escalas representam 50 μm

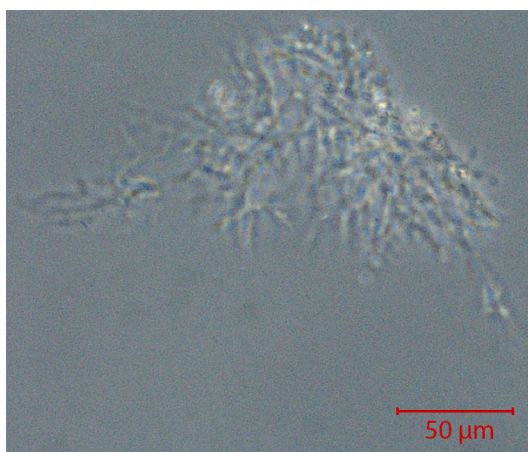


Figura 6 – Aglomerados celulares com características morfológicas semelhantes a precursores neuronais no 3°. DIV

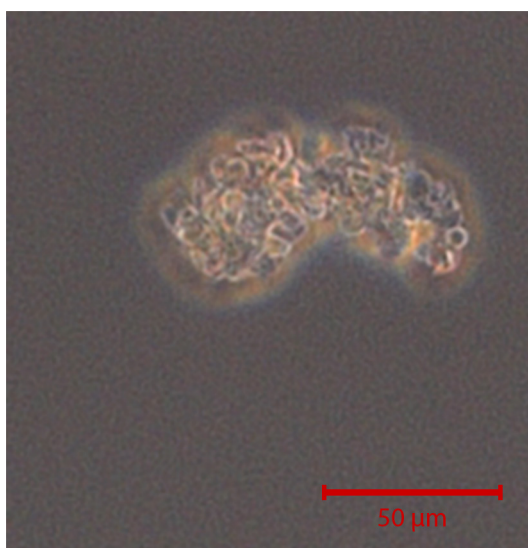


Figura 7 – Otosfera no 5°. DIV

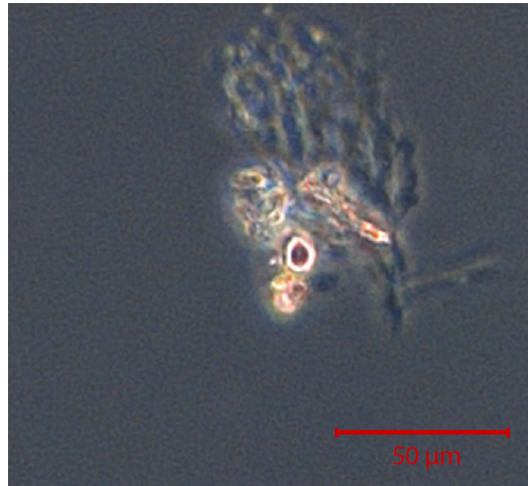


Figura 8 – Aglomerados celulares com características morfológicas semelhantes a precursores neuronais no 5^o. DIV

5.3. Citometria de fluxo

Para citometria de fluxo foi utilizado material coletado de quatro lados de três doadores de órgãos, em três experimentos independentes.

5.3.1 Citometria de fluxo realizada com material da amostra B

O material coletado no procedimento foi armazenado no meio de cultura a 4°C por 36 horas. Tratava-se de paciente masculino de 38 anos e foi removido material apenas do lado direito do paciente pois o lado esquerdo apresentava perda de massa encefálica em ferimento retroauricular, evidenciando lesão extensa de osso temporal. Neste primeiro experimento foi utilizado como controle biológico do anticorpo ABCG2 a linhagem celular BEWO (sugerida no website Human Protein Atlas), não estava disponível o isotipo para controle negativo. Dados

apresentados nos gráficos abaixo mostram que o controle biológico se mostrou adequado para o anticorpo estudado. O material removido da cóclea se mostrou insuficiente para o estudo.

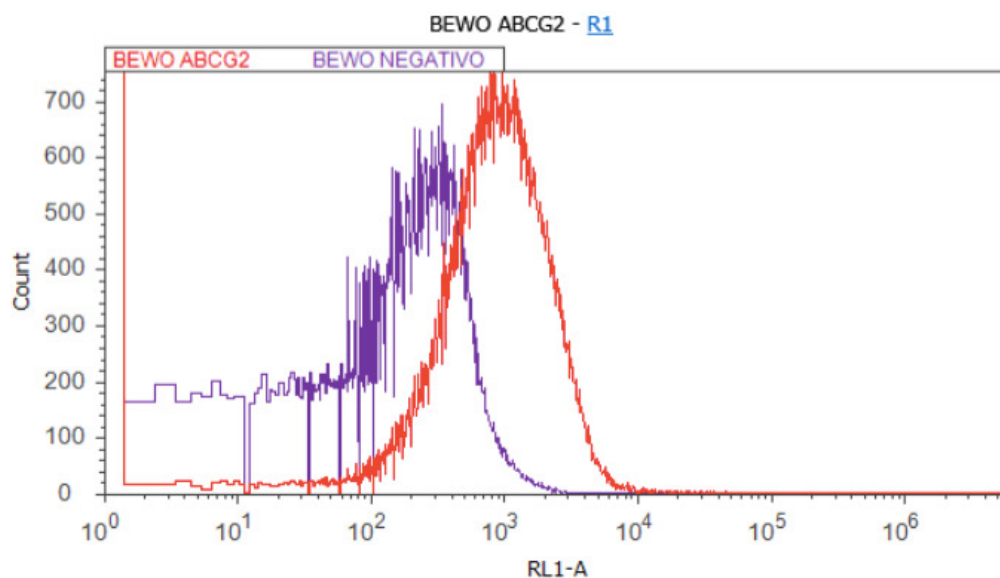


Figura 9 – Linhagem celular BEWO para controle biológico do anticorpo ABCG2 na amostra B. O gráfico representa, no eixo Y, a quantidade de células e no eixo X a intensidade de fluorocromo captada pelo citômetro. A curva na cor roxa representa o controle negativo, no caso a linhagem celular BEWO dissociada sem qualquer tipo de anticorpo. Esta curva determina a fluorescência mínima a ser considerada positiva no teste com o anticorpo. A curva na cor vermelha representa a linhagem celular BEWO dissociada submetida ao tratamento com o anticorpo ABCG2. A curva vermelha está mais à direita do gráfico, mostrando que a maior parte das células testadas com o anticorpo ABCG2 apresentou fluorescência suficiente para ser detectada pelo citômetro como positiva

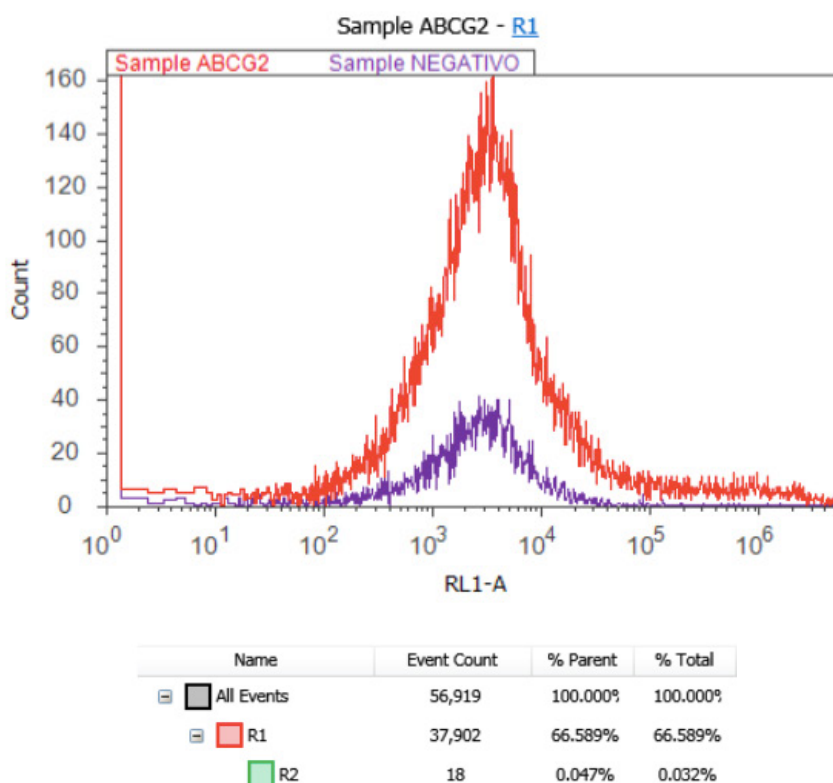


Figura 10 – Perfil citométrico do anticorpo ABCG2 nas células dissociadas da cóclea na amostra B. O gráfico representa, no eixo Y, a quantidade de células e no eixo X a intensidade de fluorocromo captada pelo citômetro. A curva na cor roxa representa o controle negativo, no caso o material coclear dissociado sem qualquer tipo de anticorpo. A curva na cor vermelha representa o material coclear dissociado submetido ao tratamento com o anticorpo ABCG2. A maior parte das curvas está sobreposta, porém há uma cauda mais à direita na curva vermelha, o que poderia significar uma pequena porcentagem de células positivas para ABCG2. Entretanto, o número de eventos captado foi pequeno e a ausência do isotipo para melhor delimitação da fluorescência mínima para a positividade tornaram o experimento inconclusivo

5.3.2 Citometria de fluxo realizada com material da amostra C

O material coletado no procedimento foi armazenado no meio de cultura a 4°C por 20 horas. Tratava-se de paciente feminino de 55 anos, foi removido material de ambas as cócleas sem maiores intercorrências. Neste experimento não estava disponível o isotipo para controle negativo. Dados apresentados nos gráficos abaixo mostram que 0,225% das células estudadas se apresentaram positivas para ABCG2.

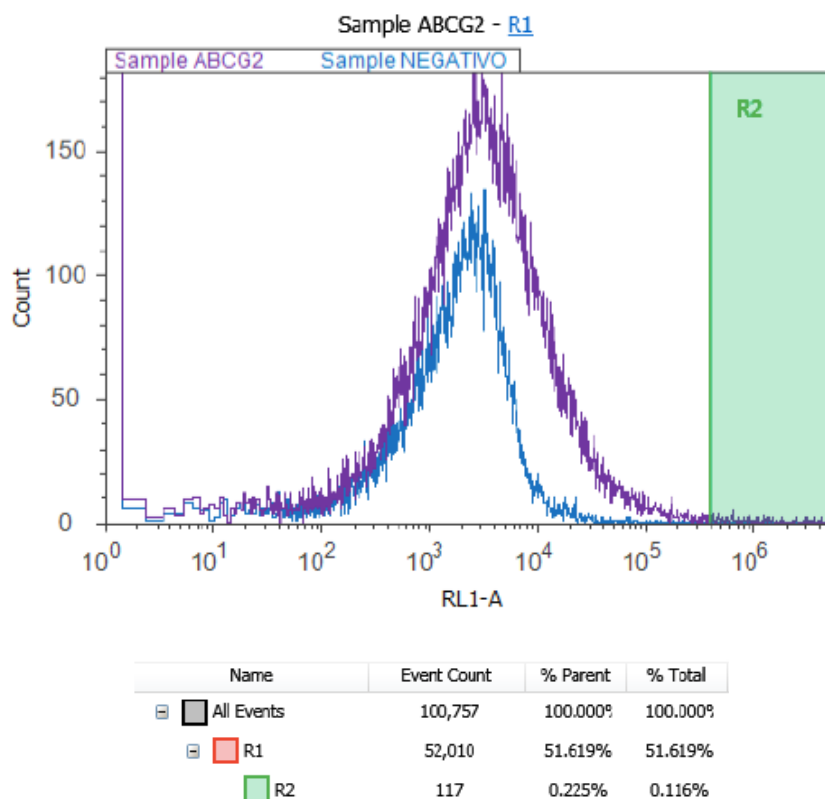


Figura 11 – Perfil citométrico do anticorpo ABCG2 nas células dissociadas da cóclea na amostra C. O gráfico representa, no eixo Y, a quantidade de células e no eixo X a intensidade de fluorocromo captada pelo citômetro. A curva na cor azul representa o controle negativo, no caso o material coclear dissociado sem qualquer tipo de anticorpo. A curva na cor roxa representa o material coclear dissociado submetido ao tratamento com o anticorpo ABCG2. A maior parte das curvas está sobreposta, porém novamente pode ser observada uma cauda mais à direita na curva roxa. Neste experimento, o número de eventos captado foi maior trazendo maior confiabilidade do resultado. Ainda assim, a falta do isotipo para determinação da fluorescência mínima para a positividade deve ser considerada na avaliação

5.3.3 Citometria de fluxo realizada com material da amostra D

O material coletado no procedimento foi armazenado no meio de cultura a 4°C por 20 horas. Tratava-se de paciente feminino de 33 anos, foi removido material apenas do lado direito devido a limitação de material cirúrgico. Foi utilizado isotipo para controle negativo conforme descrito nos métodos. Dados apresentados nos gráficos abaixo mostram que 2% das células analisadas foram positivas para o ABCG2.

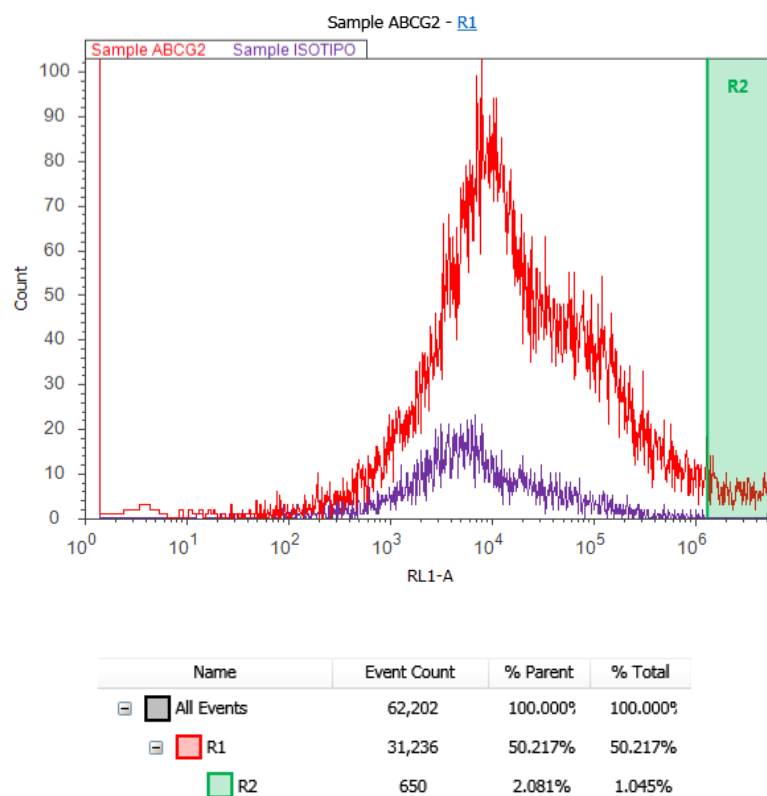


Figura 12 – Perfil citométrico do anticorpo ABCG2 nas células dissociadas da cóclea na amostra D. O gráfico representa, no eixo Y, a quantidade de células e no eixo X a intensidade de fluorocromo captada pelo citômetro. A curva na cor roxa representa o controle negativo, tratado com o isotipo fluorescente na mesma cor do anticorpo ABCG2. A curva na cor vermelha representa o material coclear dissociado submetido ao tratamento com o anticorpo ABCG2. Neste caso, fica evidente uma cauda mais à direita, representando as células positivas para o anticorpo. Com o uso do isotipo, o número mínimo de eventos analisados pode ser menor pelo aumento da confiabilidade do experimento

5.4. Extração de RNA para qRT-PCR

Para extração de RNA da cóclea íntegra foi utilizado material coletado da amostra F, ressecção de SV de paciente feminino de 20 anos, .

As características do RNA obtido da cóclea sem qualquer manipulação e do RNA obtido das otosferas e dos possíveis precursores neurais obtidos do doador estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Quantidade de RNA obtida por experimento em ng/μL. Aceitam-se relações 260/280 e 260/230 ao redor de 2,0 como mostra de pureza do RNA. Baixas relações 260/230 estão associadas a contaminantes com absorção em 230 nm

Experimento	ng/μL	260/280	260/230
Cóclea íntegra amostra F	8,4	1,94	0,04
Otosferas amostra G	1,39	1,6	0,55
Otosferas amostra A	2,7	1,84	0,42
Possíveis precursores neurais	2,87	1,59	0,43

As otosferas e os possíveis precursores neurais apresentaram quantidade total de RNA muito baixa e de má qualidade.

Foi realizada a transcrição em cDNA de todas as amostras utilizando sempre a totalidade do material, com a expectativa de realizar a compensação das diferentes quantidades através dos genes de referência, entretanto as amostras de otosferas e dos possíveis precursores neurais não apresentaram quantidade significativa de amplificação para os primers testados (incluindo os genes de referência), não sendo possível avaliá-las sob quaisquer aspectos.

A tabela 5 resume os resultados obtidos com cada amostra coletada.

Tabela 5 – Resumo dos resultados obtidos com cada amostra coletada

Amostr a	Experimento Realizado	Resultado
A	teste de viabilidade celular	células viáveis após 5 dias de sua remoção
A	cultura de otosferas	presença de otosferas
B	citometria de fluxo	inconclusivo
C	citometria de fluxo	inconclusivo
D	citometria de fluxo	presença do marcador ABCG2
E	cultura de otosferas	contaminação bacteriana
F	extração direta de RNA	sem material para comparação ¹
G	cultura de otosferas	presença de otosferas
H	cultura de otosferas	não houve proliferação celular

¹ O objetivo da extração direta de RNA do tecido coclear era realizar a comparação com o RNA obtido das otosferas.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Seleção dos casos e procedimento cirúrgico

Na literatura, são poucos os estudos realizados com material de orelhas internas humanas (Oghalai et al., 2000, Rask-Andersen, 2005, Liu et al., 2014, Taylor et al., 2015). Além de ser uma região de difícil acesso, procedimentos para remoção de mínimos fragmentos já implicariam em perda funcional em voluntários sadios. Por essas razões, foram propostos dois grupos distintos de pacientes para obtenção do material desejado: pacientes portadores de schwannomas vestibulares com indicação de cirurgia via translabiríntica e doadores de órgãos em morte encefálica. A utilização de material de orelha interna de pacientes que seriam submetidos a cirurgias para ressecção de tumores de ângulo ponto cerebelar foi descrita pelos autores supracitados como de baixo impacto cirúrgico e de grande importância científica. É importante ressaltar que são patologias raras e que é realizada somente uma cirurgia dessas a cada seis semanas, em média, no HCFMUSP.

Até o momento, não há nenhum estudo publicado que tenha utilizado cócleas de doadores de órgãos em morte encefálica. A partir deste trabalho, abre-se uma perspectiva interessante da utilização desses órgãos, uma vez que o impacto social é mínimo, relacionado apenas ao aumento do tempo de remoção dos órgãos antes dos procedimentos para

sepultamento (45 a 70 minutos por cóclea removida). A equipe não foi autorizada a realizar a captação das cócleas simultaneamente à captação dos órgãos para transplante para evitar contaminação do campo cirúrgico, conforme proposto inicialmente. O método para coleta do material coclear em que se obteve melhor exposição coclear foi o descrito como acesso retroauricular, broqueamento da mastoide e broqueamento total da parede posterior do meato auditivo externo.

Houve grande variabilidade da quantidade de tecido removida, tanto dos doadores de órgãos quanto dos pacientes cirúrgicos. O fator que aparentemente mais contribuiu para a quantidade de tecido obtida foi a realização de cocleostomia ampla cuidadosa, sem introdução da broca diamantada no óstio criado por ela. A remoção do tecido membranoso foi feita indiscriminadamente, em toda a extensão alcançável pela cocleostomia.

Oghalai e colaboradores (2000) também relataram dificuldades e pouca reprodutibilidade na remoção do tecido coclear. São os autores que melhor detalharam o procedimento para coleta do material. Foram realizadas duas cocleostomias seguidas por curetagem da camada óssea. Os autores tentaram preservar os giros separadamente e não conseguiram remover nenhum material do ápice coclear.

O outro trabalho que coletou material coclear para cultura foi o de Taylor e seus colaboradores (2015), porém não está descrito detalhadamente o procedimento utilizado. Os demais utilizaram a cóclea inteira ou

parcialmente íntegra, não sendo possível comparar diretamente os métodos (Rask-Andersen et al., 2005, Liu et al., 2014).

6.2. Cultura organotípica

Foi realizada cultura organotípica em material removido de doador de órgãos de 17 anos. A cultura organotípica foi realizada com o objetivo de testar a viabilidade celular do material em cultura após cinco DIV. Após dissociação, utilizando o método de azul de tripan, todas as células se apresentaram viáveis.

O dado de literatura que se compara ao resultado do experimento é de Taylor e colaboradores (2015) onde foi testada a viabilidade de células ciliadas com o método de exposição a FM1-43, num período máximo de quatro DIV, e foi encontrado resultado semelhante.

É importante salientar que o azul de tripan não diferencia a viabilidade dos diferentes tipos celulares como o FM1-43.

6.3. Evidências de CTs na cóclea humana adulta

A identificação acurada de CTs in vivo permanece o maior obstáculo ao progresso da compreensão da biologia das CTs (Morrison e Spradling, 2008). Isso porque, até o momento, não foi determinado um marcador único e universal em todas as CTs adultas, há grande variação na

localização e na morfologia das CTs nos diversos tecidos e há uma possível diminuição no número de CTs ao longo da vida (Bunting, 2002; Morrison e Spradling, 2008; Pfister, 2008; Pastrana et al., 2011).

Com o objetivo principal de identificar CTs na cóclea humana adulta, foram realizados testes para obtenção de otosferas e testes com um marcador sugerido de *side-population* (ABCG2).

6.3.1 Cultura de otosferas

Foi possível obter esferas em cultura em dois experimentos distintos, um resultante de remoção de tecido durante procedimento cirúrgico (paciente feminino de 61 anos) e outro resultante de doação de órgãos (paciente masculino de 17 anos). Esta é a primeira descrição da obtenção de esferas em tecidos cocleares humanos dissociados. Entretanto, as esferas não puderam ser caracterizadas adequadamente. Os trabalhos que caracterizaram otosferas em outras espécies animais utilizaram técnicas moleculares associadas a imunohistoquímica das esferas (Malgrange et al., 2002, Li et al., 2003, Oshima et al., 2007, Lou et al., 2014). Oshima e colaboradores (2007) utilizaram de três a quatro animais por experimento, totalizando seis a oito lados. Todos realizaram a cultura das células dissociadas logo após a dissecação.

Por experiência prévia dos pesquisadores do LIM-32, para a realização da imunohistoquímica das esferas há grande perda de material. Como o

número de esferas obtido foi muito reduzido, optou-se por extração de RNA para caracterização por qRT-PCR, técnica que, em tese, pode ser realizada com quantidades celulares mínimas (Heid et al., 1996).

As otosferas apresentaram quantidade total de RNA muito baixa e de má qualidade, conforme apresentado na tabela 4. Não houve amplificação dos primers testados o que inviabilizou a caracterização molecular das amostras.

O pequeno número de otosferas obtido era esperado, tendo em vista a amostra limitada a material de uma ou duas cócleas, enquanto que os trabalhos supracitados utilizaram diversos animais para a obtenção de esferas. A baixa qualidade do RNA extraído e a consequente não amplificação dos primers poderia ser explicada por algumas hipóteses:

- As esferas, apesar de presentes, não são metabolicamente ativas. A caracterização por qRT-PCR depende da transcrição ativa de RNA mensageiro pela célula, indicando atividade celular. Neste trabalho foram utilizados tecidos humanos adultos, enquanto que os trabalhos com animais utilizam, em sua maioria, neonatos. Os estudos com cócleas animais adultos ou não encontraram esferas (Oshima et al., 2007), ou encontraram poucas esferas com menos marcadores de desenvolvimento e sem potencial de diferenciação *in vitro* (Lou et al., 2014).

- Dissociação mais tardia dos tecidos quando comparada com a dissecação realizada nos animais. No primeiro caso, o tecido foi dissociado logo após a remoção cirúrgica, enquanto no segundo caso a dissociação ocorreu cinco dias após a coleta do material.
- Problemas técnicos relacionados ao kit de extração de RNA. Apesar de sua propagada excelência pelo fabricante, problemas com os kits de extração de RNA são frequentes nos laboratórios, ainda que sub-reportados. No apêndice, são apresentados dados de extração de RNA realizados com o mesmo kit utilizado neste trabalho no laboratório do Centro de Biologia de Células-Tronco da Universidade Sheffield.

A obtenção de esferas, sem a adequada caracterização, não pode ser considerada prova cabal da existência de CTs na cóclea humana adulta. Pastrana e colaboradores (2011) sublinham que os ensaios para obtenção de esferas avaliam o potencial das células dissociadas de se comportarem como uma CT quando removidas de seu microambiente original. Os estudos realizados em outras espécies de mamíferos, no entanto, conseguiram comprovar as características de CTs nas otosferas. Portanto, é perfeitamente possível que, com o aperfeiçoamento dos métodos utilizados neste trabalho, tais características consigam ser comprovadas nas esferas obtidas de cócleas humanas adultas.

6.3.2 ABCG2/SP

Pela primeira vez na literatura foi demonstrada a presença do marcador ABCG2 em cócleas humanas adultas dissociadas. Optou-se pela identificação direta do marcador por citometria de fluxo em detrimento do ensaio tradicional para *side-population* com Hoescht 33342 devido à instabilidade do corante, associada ao fato que o citômetro utilizado para os experimentos se encontra em laboratório externo ao LIM-32, com necessidade de transporte das células coradas em condições climáticas que poderiam influenciar no resultado, conforme sugerido por Golebiewska e colaboradores (2011). A utilização direta de ABCG2 como marcador de *side-population* foi descrita por Zhou e colaboradores (2001), Watanabe e colaboradores (2004), Pfister e colaboradores (2008), entre outros.

Este resultado é concordante com a identificação prévia de *side-population* e da presença imunohistoquímica de ABCG2 em cócleas de camundongos neonatos (Savary et al., 2007).

A presença isolada de ABCG2 também não configura prova definitiva da presença de CTs na cóclea humana adulta. Seria necessário realizar a separação celular por citometria das células positivas para o marcador e caracterizá-las adequadamente, tanto do ponto de vista molecular quanto em relação às suas propriedades *in vitro*. Para a realização de tais experimentos, todavia, seria necessário um número maior de células por experimento (duas ou mais cócleas) e disponibilidade precoce do

separador celular após a coleta do material. O número maior de células poderia ser alcançado com a utilização sistemática de doadores de órgãos associado ao aprimoramento da remoção delicada dos tecidos cocleares, dois fatores intrinsecamente ligados à experiência que pode ser acumulada com maior número de doações de cóclea para pesquisa. A partir dos resultados deste trabalho é esperada a divulgação dessa possibilidade para estudo, o que certamente é capaz de alavancar as pesquisas com cócleas humanas em diversas áreas - não apenas relacionadas a CTs mas também a terapia gênica, estudos de sequenciamento de RNA, toxicidade de medicamentos, entre outras possibilidades.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível identificar, pela primeira vez na literatura, evidências de CTs em cócleas humanas adultas, a saber:

Presença de esferas após dissociação dos tecidos.

Presença do marcador de *side-population* ABCG2.

Não foi possível realizar a caracterização adequada das esferas obtidas.

8. ANEXO: ESTÁGIO NO EXTERIOR

8. ANEXO: ESTÁGIO NO EXTERIOR - PROGRAMA DE DOUTORADO SANDUÍCHE - CIENCIA SEM FRONTEIRAS - UNIVERSIDADE DE SHEFFIELD - LABORATÓRIO DO PROFESSOR MARCELO RIVOLTA, CENTRO DE BIOLOGIA DE CÉLULAS TRONCO, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS.

No período do estágio, um dos principais focos da pesquisa do professor Marcelo Rivolta era o aperfeiçoamento do protocolo de diferenciação de progenitores óticos a partir de CTs embrionárias humanas. O protocolo desenvolvido em seu laboratório foi publicado detalhadamente por Chen em 2012 e em linhas gerais se baseia na diferenciação de CTs embrionárias humanas (hES da abreviação do inglês *human embryonic stem cells*) em progenitores óticos epiteliais (OEPs, *otic epithelial progenitors*) e progenitores óticos neurais (ONPs, *otic neural progenitors*). As hES são cultivadas em frascos com laminina e meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com Ham's F12 e N2/B27 acrescido dos fatores de crescimento fibroblástico (FGF) 3 e 10 por um período de 12 a 14 dias. Dentro desse período se observam células com morfologias muito diferentes e específicas. São identificados os dois tipos de progenitores óticos (OPs) a partir dessas morfologias e então a purificação é feita manualmente, através de raspagem das células indesejadas dos frascos. Apesar de efetivo, tal método é pesquisador-dependente e implica em risco de contaminação das culturas. Dessa

forma, o professor Marcelo Rivolta buscava um método mais objetivo para purificação dos OPs e foi nessa pesquisa que fui incluída majoritariamente. A hipótese a ser testada era utilizar marcadores de superfície celular para separação por citometria de fluxo. Os marcadores seriam selecionados a partir de uma tabela de genes que se mostravam com maior expressão nos OPs em relação às hES (*microarray*).

Paralelamente a esse projeto maior, participei de outros projetos e soluções de problemas no laboratório. O texto abaixo é uma tradução do relatório entregue ao professor Marcelo Rivolta ao final dos 12 meses de participação em suas pesquisas. Os últimos quatro meses de estágio foram financiados pelo programa Ciência Sem Fronteiras do governo brasileiro.

Projetos desenvolvidos e resultados:

- 1) Uso de marcadores de superfície celular para separação de progenitores óticos por citometria de fluxo
- 2) Perfil dos progenitores óticos epiteliais na citometria de fluxo
- 3) Correlação entre a densidade final dos progenitores óticos após diferenciação e a porcentagem de células expressando o marcador CD44
- 4) Análise e separação celular por citometria de fluxo da linhagem celular NOP-SOX2
- 5) Inibição de TGF beta após indução com FGF
- 6) Solução de problemas relacionados ao uso do Microkit Qiagen® para extração de RNA

Tabela 6 – Aumento da expressão dos marcadores de superfície celular em diferentes condições após a primeira fase do protocolo de diferenciação, após análise no microarray.

PUMA Fold OP up_v_FGF – medida relativa do aumento da expressão desses genes na comparação de OP com FGF

Genes candidatos	PUMA Fold OP up_v_FGF	hESC ¹	DFNB ²	FGF ³	OP ⁴	OEP ⁵	ONP ⁶
Fas	6.0	0.37	0.89	0.78	5.32	8.55	2.09
LHCGR	5.2	0.79	0.46	0.76	6.80	10.69	2.91
CD44	5.0	13.19	1.44	0.34	7.29	7.72	6.87
S1PR1	3.5	0.30	7.77	4.18	18.19	21.12	15.27
CD44	3.0	157.89	60.35	19.75	140.84	146.21	135.47
Sort1	2.8	1.57	2.96	1.98	7.45	7.95	6.95
Ncam1	2.7	0.81	1.13	1.05	4.71	3.33	6.08
S1PR1	2.4	1.19	1.33	0.92	3.76	3.86	3.66
LOC100133690	2.4	4.63	4.03	2.79	10.85	9.75	11.96
Thbs1	2.3	519.13	800.79	506.60	1251.29	1297.75	1204.83
CDH13	2.2	29.84	64.59	46.79	138.14	174.11	102.17
CD44	2.2	389.23	335.25	133.29	714.63	740.78	688.47
Adam9	2.1	512.79	732.44	521.49	1168.92	1255.80	1082.04
F3	2.1	159.89	127.66	53.06	193.96	178.21	209.70
Ncam1	2.1	48.36	211.59	203.76	422.93	384.39	461.46
TLR4	2.0	5.99	14.23	12.90	28.71	32.30	25.12
Itgav	2.0	10.56	27.04	28.55	70.70	78.24	63.17

¹hESC: células-tronco embrionárias humanas indiferenciadas.

²DFNB: meio controle do protocolo de diferenciação.

³FGF: protocolo de diferenciação padrão sem purificação manual.

⁴OP: protocolo de diferenciação com purificação manual de progenitores óticos.

⁵OEP: protocolo de diferenciação com purificação manual de progenitores óticos com características epiteliais.

⁶ONP: protocolo de diferenciação com purificação manual de progenitores óticos com características neurais.

1) *Uso de marcadores de superfície celular para separação de progenitores óticos por citometria de fluxo*

A partir de dados obtidos em experimentos prévios de *microarray* (tabela 5), foram selecionados quatro marcadores de superfície celular a serem testados após a primeira fase do protocolo de diferenciação de hES em OPs descrito por Chen et al., 2012. Os marcadores foram selecionados com base no aumento de sua expressão nos OP purificados manualmente pela sua morfologia quando comparados com a totalidade das células obtidas após a diferenciação sem qualquer tipo de purificação (condição que aparece na tabela como FGF). Além disso foram levados em conta a disponibilidade de anticorpos comerciais para citometria de fluxo e a presença de literatura corroborando tanto seu uso para citometria de fluxo quanto uma possível participação no desenvolvimento da orelha interna. Após a separação celular por citometria de fluxo a porcentagem de células positivas para o marcador ideal era esperada em torno de 20% e essas células deveriam apresentar um aumento da expressão dos marcadores óticos quando comparadas às células diferenciadas sem qualquer tipo de seleção. A técnica proposta para essa comparação foi o q-RT-PCR.

Os marcadores selecionados foram: CD44, NCAM, THBS1 e Itgav/CD51. A combinação CD51/CD61 também foi testada. Após a primeira fase do protocolo de diferenciação, as células foram submetidas a dissociação

com tripsina, incubação com anticorpo e análise em citômetro de fluxo Cyan™ ADP (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, EUA), com o software Summit 4.3.

O anticorpo THBS1 não funcionou.

O experimento foi repetido diversas vezes, em três linhagens celulares distintas, com diferentes anticorpos e diferentes combinações desses anticorpos em dois momentos distintos do protocolo de diferenciação.

A combinação escolhida para realizar a separação celular foi a combinação das células duplamente positivas para CD44 e CD51.

Após a separação por citometria de fluxo as células foram colocadas em microtubos com RLT e então foi extraído RNA usando o microkit da Qiagen. Todos os grupos tiveram a quantidade de cDNA normalizada dentro de cada experimento. As reações de qRT-PCR foram normalizadas utilizando o gene de referência RPLO e os marcadores pesquisados foram: DLX5, FOXG1, SOX2, PAX2 e PAX8. É importante ressaltar que as medidas espectrofotométricas da quantidade e qualidade do RNA obtido foram insatisfatórias após o processo de separação celular.

Os resultados comparativos do qRT-PCR foram inconsistentes nos experimentos, sem qualquer reprodutibilidade. Concluiu-se que os marcadores testados não são úteis para o objetivo proposto.

2) Perfil na citometria de fluxo dos progenitores óticos epiteliais (OEPs) e experimentos subsequentes

Foi proposta a análise da hipótese de que a dissociação e expansão dos OPs no meio de cultura definido como OSCFM alteraria o perfil na citometria de fluxo dos progenitores. Para tal, foram comparados OEPs recém diferenciados após 12 dias em FGF (condição 1), purificados manualmente (condição 2) e sem qualquer manipulação (condição 3) com OEPs submetidos a expansão em OSCFM por três semanas (controle). Nesse experimento virtualmente todos OEPs foram positivos para os marcadores testados e não foi observada diferença significativa entre os OEPs purificados manualmente ou sem qualquer manipulação.

3) Correlação entre densidade final e porcentagem de OPs positivos para CD44

Foi observado que, ao final do protocolo padrão de diferenciação, as colônias mais densas apresentavam menores porcentagens de células CD44+ na citometria de fluxo. Há uma correlação estatisticamente significativa entre a densidade final e a porcentagem de CD44+ ($p=0.0327$):

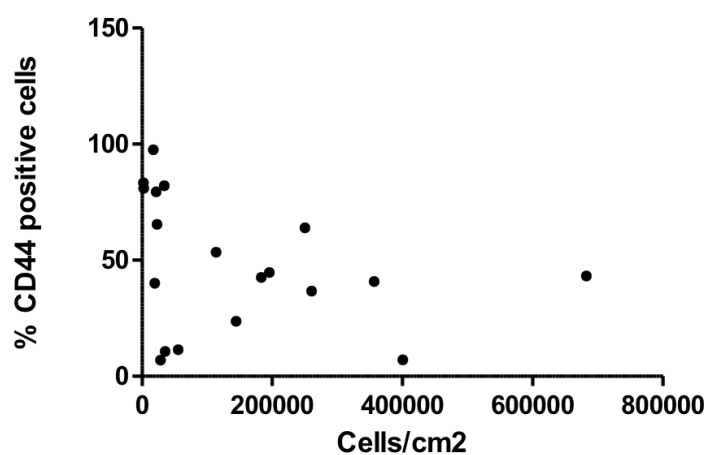


Figura 13 – porcentagem das células CD44+ obtidas nas diferentes densidades ao final do protocolo de diferenciação

Uma explicação possível para essa observação seria que ao obter culturas mais densas, mais células não teriam sofrido a indução desejada e permaneceriam no estado de hES ou se diferenciariam em outros tipos celulares.

Um teste sugerido para avaliar essa hipótese seria testar marcadores de células-tronco embrionárias/pluripotência nessas células. Ainda assim seria importante levar em conta que o próprio CD44 já foi caracterizado como um marcador de células-tronco em tecidos adultos diferenciados e em tumores.

Quanto à correlação entre a densidade final e a porcentagem de células duplamente positivas para os marcadores, há uma tendência, porém não estatisticamente significativa ($p= 0.2333$):

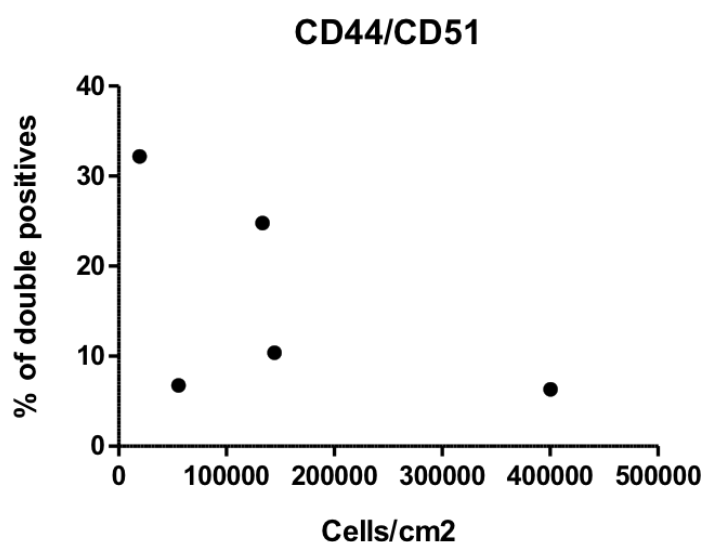


Figura 14 – porcentagem das células CD44/CD51+ obtidas nas diferentes densidades ao final do protocolo de diferenciação

4) Perfil citométrico e separação celular utilizando a linhagem NOP-SOX2

A linhagem NOP-SOX2 foi desenvolvida por outro pesquisador do laboratório, para expressão de GFP associada à expressão do gene SOX2, para ser utilizado como um marcador da diferenciação adequada em OPs.

Foram realizados quatro experimentos utilizando a linhagem NOP-SOX2 ao término de 12-14 dias da indução padrão com FGF e três após 6-7 dias de indução com FGF. Nenhum dos experimentos foi submetido a purificação manual dos OPs.

Foi observada a presença de uma correlação entre o brilho das células CD44+ e o brilho das células SOX2-GFP.

O primeiro conjunto de figuras representa essa relação em experimentos após 11-14 dias de indução padrão com FGF, o segundo representa experimentos após 6-8 dias de indução com FGF.

Essa observação pode ser vista em paralelo com dados de imunohistoquímica obtidos através do software InCell (por outro pesquisador do laboratório) onde foram estudados marcadores óticos mais reconhecidos como Pax2, Pax8, Foxg1 e Sox2: nesse caso, é aceito que somente as células com maior brilho dentre as duplamente positivas são os OPs desejados.

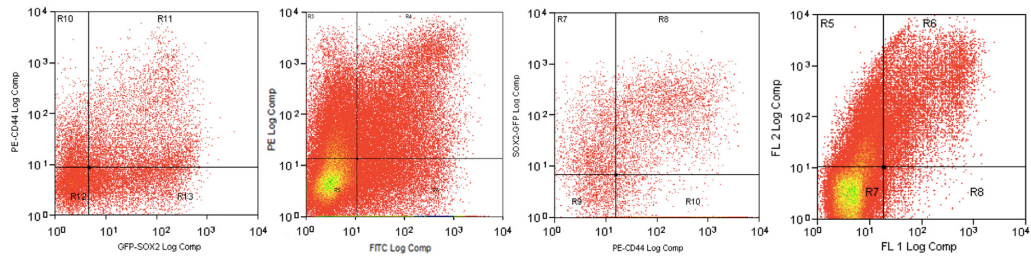


Figura 15 – Experimentos dias 12 a 14. Ambos os eixos representam a intensidade de fluorocromo captada pelo citômetro nas diferentes cores utilizadas (verde/GFP para Sox2 e vermelho PE para CD44)

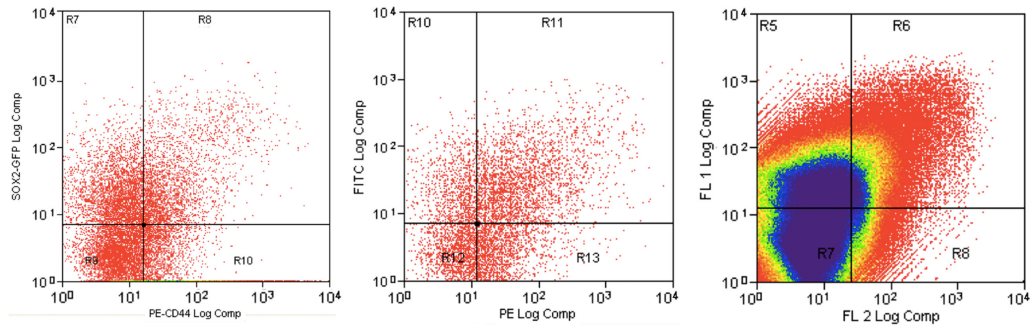


Figura 16 – Experimentos dias 6 a 7. Ambos os eixos representam a intensidade de fluorocromo captada pelo citômetro nas diferentes cores utilizadas (verde/GFP/FL1/FITC para Sox2 e vermelho PE/FL2 para CD44)

5) Inibição de TGF beta após indução com FGF

Na análise por *microarray*, foi vista uma maior expressão de genes em dois ramos da via TGF beta nos progenitores óticos (DFNB, FGF, OEPs e ONPs) em comparação com as hES:

- via de sinalização BMP, associada a neurogênese, especificação do mesoderme ventral e diferenciação osteoblástica: BMP7, BMPR2, ID2, ID4, MAPK1, NOG, SMAD1, SMAD9 (SMAD8).
- interrupção de G1/ciclo celular: CDKN2B (p15), CREBBP (similar a p300), DCN, TGFB2, TGFBR1, THBS1, THBS3.

Foi proposta a seguinte questão: haveria algum efeito nos OPs se a via TGF beta fosse bloqueada após a indução com FGF?

O inibidor TGF- β RI Kinase Inhibitor VI (SB431542, Calbiochem) foi associado a inibição efetiva de fosforilação por Smad2 através de expressão mediada por vetor de ALK4, ALK5, ou ALK7 ativos em células NIH 3T3, enquanto não foi observado grande efeito na fosforilação de SmadI por outros receptores de TGF beta tipo I em culturas de NIH 3T3 com expressão ativa de ALK1, 2, 3, ou 6.

Foi escolhido SB431542 pela sua disponibilidade em curso no laboratório para testar seu efeito em OPs em expansão no OSCFM apesar de não haver sinais de expressão aumentada de Smad2 nos OPs em comparação com hES.

OPs purificados manualmente foram colhidos após 14 dias de indução padrão com FGF e plaqueados como demonstrado abaixo em OSCFM:

Tabela 7 – Experimentos realizados com diferentes densidades celulares em dois tipos de placas

Formato	Número total de células	Densidade
Placa de 6 poços	100.000/poço	10.416,6/cm ²
Placa de 48 poços	20.000/poço	18.181,81/cm ²

Seis horas após o plaqueamento, as células foram expostas a SB431542 em três concentrações diferentes: 1:100, 1:1,000 e 1:10,000 diluídos em DMSO. Como controle, um poço foi mantido somente com OSCFM e outro com OSCFM e DMSO 1:1000.

As células foram mantidas em incubadora de CO₂ a 5% por 40 horas e então as amostras na placa de 6 poços foram coletadas para extração de RNA. As células que estavam na placa de 48 poços deveriam ter sido submetidas a exposição de BrdU, porém o laboratório foi evacuado devido a disparo no alarme de oxigênio. As células foram expostas a BrdU por 60 horas e então fixadas com etanol. Entretanto, não havia anti-BrdU para completar o experimento. Foi observado que poucas células sobreviveram nos poços com maior concentração do inibidor, dessa forma essa condição foi excluída da análise.

Foram realizadas duas réplicas porém com células de passagem mais tardia (1 e 3). A coleta das amostras para extração de RNA foi realizada

48 horas após a exposição ao inibidor. Duas placas de 48 poços foram expostas a EdU por 12 horas 48 horas após o tratamento com inibidor. Foram fixadas com PFA e as taxas de proliferação foram medidas dividindo o número total de células coradas com EdU pelo número total de células por campo.

A extração de RNA foi realizada usando kit Qiagen e a mensuração da quantidade total de RNA em ng/ μ L foi feita no equipamento Nanodrop. Foi realizada normalização dos níveis de RNA para o preparado de c-DNA.

Tabela 8 – Quantidade de RNA obtida por cada condição do experimento em triplicata

Amostra	ng/μL
TZ (início)	769.4
Controle Exp1	171.5
DMSO Exp1	159.7
1:10000 Exp1	87.7
1:1000 Exp1	121.5
Controle Exp2	47.1
DMSO Exp2	153.3
1:10000 Exp2	61.9
1:1000 Exp2	188.2
Controle Exp3	3.6
DMSO Exp3	3.7
1:10000 Exp3	1.5
1:1000 Exp3	3.2

As amostras do Exp3 foram excluídas da análise devido aos baixos níveis de RNA.

Resultados

Taxas de proliferação:

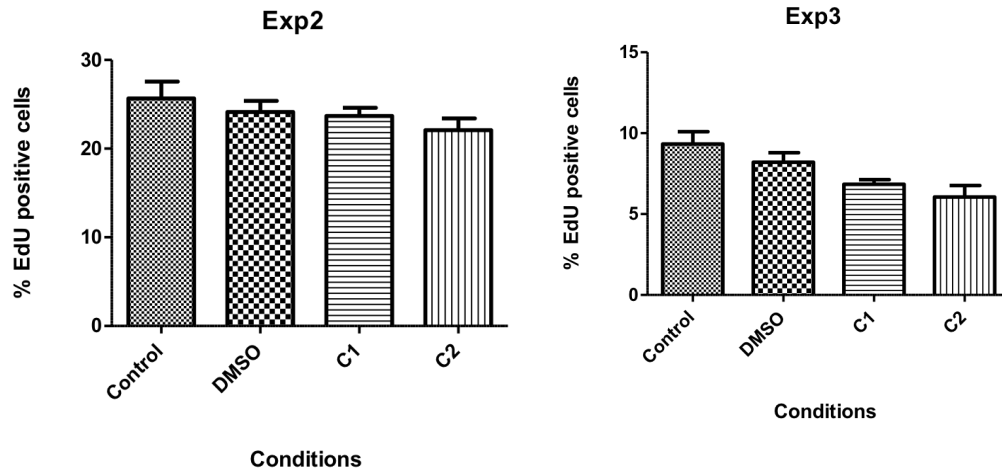


Figura 17 – Representação das taxas de proliferação de cada uma das condições estudadas em dois experimentos

Foi realizado qRT-PCR para análise comparativa de marcadores de células ciliadas, células de suporte e de progenitores óticos. Os resultados foram inconsistentes, sem reprodutibilidade.

6) Solução de problemas relacionados ao uso do Microkit Qiagen para extração de RNA

As figuras abaixo mostram as diferentes quantidades e características de RNA obtido de acordo com o número total de células coletadas para extração com o Microkit da Qiagen. Esses dados foram compilados devido a inconsistências na qualidade do RNA obtido em diversos experimentos realizados pelos pesquisadores do laboratório.

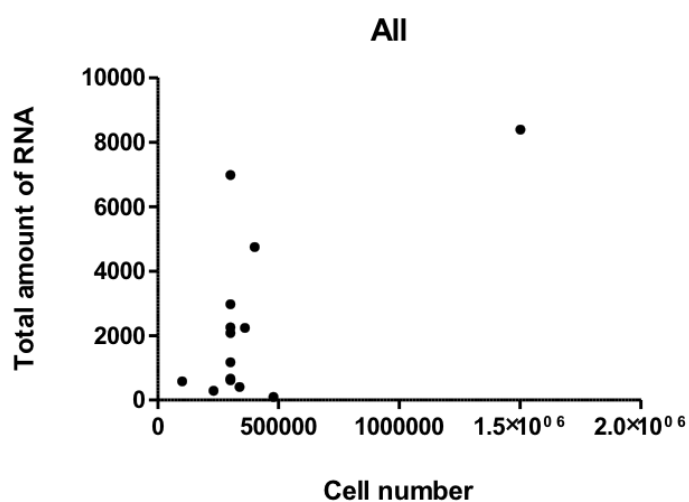


Figura 18 – Representação das quantidades totais de RNA obtidas (eixo y) em experimentos com diferentes contagens celulares (eixo x)

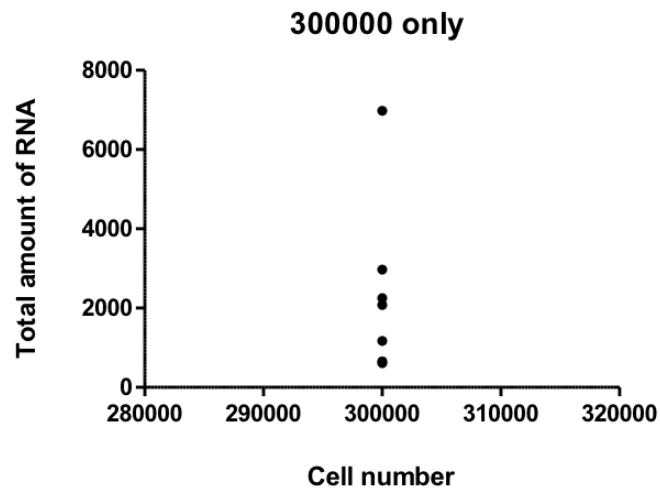


Figura 19 – Representação das quantidades totais de RNA obtidas (eixo y) em diferentes experimentos com a mesma contagem celular (eixo x)

Os resultados mostram que deve haver outros fatores que influenciam a quantidade total de RNA obtida e não apenas a contagem celular ao final dos experimentos.

9. REFERÊNCIAS

9. REFERENCIAS

ABTO, Associação Brasileira de Transplante de Órgãos [Internet]. Disponível em <http://www.abto.org.br/>.

Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *The Journal of cell biology*. 2002;159(1):123–34.

Baraky, LR. Prevalência de surdez incapacitante no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil [tese]. São Paulo:, Faculdade de Medicina; 2011 [acesso 2016-08-11]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5143/tde-23082011-133536/>.

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature*. 1963;197(4866):452–4.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763–76.

Bento, Ricardo Ferreira. *Tratado de Otologia*. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2013.

Bento RF, Caropreso CA, Miniti A. A via translabiríntica na cirurgia do neurinoma do acústico. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 1989;55:57-63.

Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2002;20(1):11–20.

Chao T-TT, Wang C-HH, Chen H-CC, Shih C-PP, Sytwu H-KK, Huang K-LL, et al. Adherent culture conditions enrich the side population obtained from the cochlear modiolus-derived stem/progenitor cells. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2013;77(5):779–84.

Chen H-CC, Lee J-TT, Shih C-PP, Chao T-TT, Sytwu H-KK, Li S-LL, et al. Hypoxia Induces a Metabolic Shift and Enhances the Stemness and Expansion of Cochlear Spiral Ganglion Stem/Progenitor Cells. *BioMed research international*. 2015;2015:359537.

Chen H-CC, Sytwu H-KK, Chang J-LL, Wang H-WW, Chen H-KK, Kang B-HH, et al. Hypoxia enhances the stemness markers of cochlear stem/progenitor cells and expands sphere formation through activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Hearing research*. 2011;275(1-2):43–52.

Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, Caesens P, Deneef C, Vankelecom H. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology*. 2005;146(9):3985–98.

Chen W, Cacciabue-Rivolta DI, Moore HD, Rivolta MN. The human fetal cochlea can be a source for auditory progenitors/stem cells isolation. *Hearing research*. 2007;233(1-2):23–9.

Chen W, Johnson SL, Marcotti W, Andrews PW, Moore HD, Rivolta MN. Human fetal auditory stem cells can be expanded *in vitro* and differentiate into functional auditory neurons and hair cell-like cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27(5):1196–204.

Chen W, Jongkamonwiwat N, Abbas L, Eshtan SJ, Johnson SL, Kuhn S, et al. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature*. 2012;490(7419):278–82.

Ding X, Wu J, Jiang C. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life sciences*. 2010;86(17-18):631–7.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & development*. 2003;17(10):1253–70.

Golebiewska A, Brons NHC, Bjerkvig R, Niclou SP. Critical Appraisal of the Side Population Assay in Stem Cell and Cancer Stem Cell Research. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):136–47.

Goodell M, Brose K, Paradis G, Conner A, Mulligan R. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(4):1797–806.

Heid C, Stevens J, Livak K, Williams P. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996;6(10):986–94.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [Internet]. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/>

Iwatani H, Ito T, Imai E, Matsuzaki Y, Suzuki A, Yamato M, et al. Hematopoietic and nonhematopoietic potentials of Hoechst(low)/side population cells isolated from adult rat kidney. *Kidney international*. 2004;65(5):1604–14.

Kirschenbaum B, Nedergaard M, Preuss A, Barami K, Fraser R, Goldman S. *In vitro* neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991). 1994;4(6):576–89.

Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2007;23(10):1289–91.

Kwan T, White PM, Segil N. Development and Regeneration of the Inner Ear. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1170(1):28–33.

Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nature Medicine*. 2003;9(10):1293–9.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.

Liu W, Rui G, Helge R, Liu W, Rui G, Helge R. Morphological Study of Surgically Obtained Cochlear Specimens – Technical Aspects. *Journal of Otology* [Internet]. 9(1). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672293014500104>

Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(5):2074–7.

Lou X, Dong Y, Xie J, Wang X, Yang L, Tokuda M, et al. Comparing the cultivated cochlear cells derived from neonatal and adult mouse. *Journal of translational medicine*. 2014;12:150.

Malgrange B, Belachew S, Thiry M, Nguyen L, Rogister B, Alvarez M-LL, et al. Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mechanisms of development*. 2002;112(1-2):79–88.

Morrison SJ, Allan C, Spradling. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell*. 2008;132(4):598–611.

Oghalai J, Holt J, Nakagawa T, Jung T, Coker N, Jenkins H, et al. Harvesting human hair cells. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*. 2000;109(1):9–16.

Oiticica J, Barboza-Junior LC, Batissoco AC, Lezirovitz K, Mingroni-Netto RC, Haddad LA, et al. Retention of progenitor cell phenotype in otospheres from guinea pig and mouse cochlea. *Journal of translational medicine*. 2010;8:119.

Oshima K, Grimm CM, Corrales C, Senn P, Martinez Monedero R, Géléoc GSS, et al. Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*. 2007;8(1):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, Suchert S, Blevins NH, Heller S. Curing hearing loss: Patient expectations, health care practitioners, and basic science. *Journal of Communication Disorders*. 2010;43(4):311–8.

Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell stem cell*. 2011;8(5):486–98.

Pfister O, Oikonomopoulos A, Sereti K, Sohn RL, Cullen D, Fine GC, et al. Role of the ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2 in the Phenotype and Function of Cardiac Side Population Cells. *Circulation Research*. 2008;103(8):825–35.

Rask-Andersen H, Boström M, Gerdin B, Kinnefors A, Nyberg G, Engstrand T, et al. Regeneration of human auditory nerve. *In vitro/in vivo* demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion. *Hearing research*. 2005;203(1-2):180–91.

Reynolds B, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, NY)*. 1992;255(5052):1707–10.

Santini MP, Forte E, Harvey RP, Kovacic JC. Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells. *Development (Cambridge, England)*. 2016;143(8):1242–58.

Savary E, Hugnot JP, Chassigneux Y, Travo C, Duperray C, van de Water T, et al. Distinct Population of Hair Cell Progenitors Can Be Isolated from the Postnatal Mouse Cochlea Using Side Population Analysis. *STEM CELLS*. 2007;25(2):332–9.

Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, et al. Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *The American journal of pathology*. 2003;163(1):3–9.

Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan . [et al]*. 2015;111:3.

Taylor RR, Jagger DJ, Forge A. Defining the Cellular Environment in the Organ of Corti following Extensive Hair Cell Loss: A Basis for Future Sensory Cell Replacement in the Cochlea. PLoS ONE [Internet]. 2012;7(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030577>

Taylor RR, Jagger DJ, Saeed SR, Axon P, Donnelly N, Tysome J, et al. Characterizing human vestibular sensory epithelia for experimental studies: new hair bundles on old tissue and implications for therapeutic interventions in ageing. *Neurobiology of Aging*. 2015;36(6):2068–84.

Toma J, Akhavan M, Fernandes K, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan D, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature cell biology*. 2001;3(9):778–84.

Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, et al. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *The Journal of cell biology*. 2005;170(7):1135–46.

Tropepe V, Coles B, Chiasson B, Horsford D, Elia A, McInnes R, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science (New York, NY)*. 2000;287(5460):2032–6.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* [Internet]. 2012;40(15). Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks596>

van De Water T. Historical Aspects of Inner Ear Anatomy and Biology That Underlie the Design of Hearing and Balance Prosthetic Devices. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* [Internet]. 2012;295(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ar.22471>

van Wijngaarden P, Franklin RJ. Ageing stem and progenitor cells: implications for rejuvenation of the central nervous system. *Development (Cambridge, England)*. 2013;140(12):2562–75.

Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, et al. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS letters*. 2004;565(1-3):6–10.

Wong ACY, Ryan AF. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2015;7:58.

Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, Uchida S, Mimura T, Usui T, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2005;46(5):1626–31.

Zhou S, Schuetz J, Bunting K, Colapietro A, Sampath J, Morris J, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature medicine*. 2001;7(9):1028–34.

APÊNDICE

Parecer CAPPesq



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO DA ORELHA INTERNA HUMANA ATRAVÉS DA TÉCNICA FACS

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento **Versão:** 2

Pesquisador Executante: Milene Massucci Bissoli **CAAE:** 00914512.6.0000.0068

Co-autores: Dra Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 8896

Número do Parecer: 128.418

Data da Relatoria: 17/10/12

Apresentação do Projeto: A surdez é um problema que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e boa parte das causas de surdez está relacionada a perda de células ciliadas da cóclea. Diversos experimentos estão sendo realizados na tentativa de buscar meios para efetivar a terapia celular para o tratamento da surdez, porém poucos trabalhos têm sido feitos com seres humanos. A possibilidade de se isolar células tronco da orelha interna que possam ser utilizadas para regenerar as células ciliadas e os neurônios do gânglio espiral seria uma das possibilidades para o tratamento da surdez. Este projeto busca cumprir o passo inicial deste caminho, isolando e identificando estas células tronco.

Pacientes submetidos a cirurgia para retirada de tumores cujo procedimento implica na destruição da orelha interna e pacientes em morte encefálica doadores de órgãos podem ser fonte inestimável de material para estudo laboratorial.

Objetivo da Pesquisa: Investigar a possibilidade de que a orelha interna de pacientes indicados para exérese do bloco labiríntico e de pacientes em morte encefálica doadores de órgãos possam ser fonte de células-tronco adultas humanas, uma vez que as mesmas podem ser expandidas, in vitro, constituindo linhagem celular que poderá viabilizar estratégias futuras para terapias celular e molecular na surdez.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há benefícios diretos para os participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto e o termo do consentimento estão apresentados adequadamente. O tema é relevante e os métodos estão adequados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O termo de consentimento é adequado.

Recomendações: Nenhuma

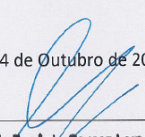
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O protocolo está em condições de ser aprovado pela CAPPesq.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

São Paulo, 24 de Outubro de 2012


Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Termo de consentimento – doadores de órgãos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – DOADORES
DE ÓRGÃOS**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1.NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA “IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO DA ORELHA INTERNA HUMANA ATRAVÉS DA TÉCNICA FACS”.

PESQUISADOR : Ricardo Ferreira Bento

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 33.144

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Otorrinolaringologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	<input type="checkbox"/>	RISCO MÉDIO	<input type="checkbox"/>
RISCO BAIXO	<input checked="" type="checkbox"/>	RISCO MAIOR	<input type="checkbox"/>

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 – O objetivo deste estudo é saber se estão presentes na orelha interna do ser humano adulto células-tronco, que são células capazes de substituir células auditivas mortas. A orelha interna é uma parte do aparelho auditivo que se encontra dentro do osso que fica atrás do pavilhão auditivo. Se essas células estiverem presentes será possível realizar estudos que, no futuro, poderão ser importantes na descoberta do tratamento para vários tipos de surdez.

2 – Durante o procedimento da captação dos diversos órgãos para doação, e ao mesmo tempo, será realizada a retirada da orelha interna para estudo em laboratório das características das células ali presentes.

3 – A retirada da orelha interna é feita através de corte na região atrás da orelha junto à linha dos cabelos. Então é realizado o desgaste do osso para identificar as partes da orelha e chegar na orelha interna. A orelha interna é retirada e preparada para o estudo no laboratório. Será realizada sutura (fechamento com pontos) da incisão realizada atrás da orelha de forma a não haver nenhum prejuízo estético, ou seja, não será possível ver nenhuma alteração na fisionomia ou na face do doador.

O bloco material assim retirado será encaminhado para o laboratório de investigação médica da Otorrinolaringologia na Faculdade de Medicina da USP. Lá serão realizados procedimentos de: separação celular, cultura e identificação dos tipos celulares, imunofluorescência e contagem das células.

4 – Não se espera nenhum desconforto durante o procedimento pois o doador já está anestesiado para a captação dos órgãos.

5 – Com esse estudo não há nenhum benefício direto ao paciente que será submetido ao exame, porém se confirmarmos nossa hipótese de que existem células-tronco na orelha interna adulta será possível realizar, em outras ocasiões, novas pesquisas com objetivo futuro de tratamento de diversos tipos de surdez.

6 – Como não se trata de um tratamento ou terapia específica não apresentamos alternativas à participação do estudo.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Milene Massucci Bissoli, que pode ser

encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 Telefone(s) 3069-6539, E-mail milene.bissoli@gmail.com. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Identificação e Isolamento de Células-Tronco da Orelha Interna Humana Através da Técnica FACS**”. Eu discuti com a Dra. Milene Massucci Bissoli. sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Termo de consentimento – pacientes

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES
PORTADORES DE SCHWANNOMA VESTIBULAR**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

- 1. NOME:**.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL**
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
-

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA “IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO DA ORELHA INTERNA HUMANA ATRAVÉS DA TÉCNICA FACS”.

PESQUISADOR : Ricardo Ferreira Bento

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 33.144

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Otorrinolaringologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	<input type="checkbox"/>	RISCO MÉDIO	<input type="checkbox"/>
RISCO BAIXO	<input checked="" type="checkbox"/>	RISCO MAIOR	<input type="checkbox"/>

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 – O objetivo deste estudo é saber se estão presentes na orelha interna do ser humano adulto células-tronco, que são células capazes de substituir células auditivas mortas. A orelha interna é uma parte do aparelho auditivo que se encontra dentro do osso que fica atrás do pavilhão auditivo. Se essas células estiverem presentes será possível realizar estudos que, no futuro, poderão ser importantes na descoberta do tratamento para vários tipos de surdez.

2 – Durante a cirurgia para tratamento da doença (Schwannoma Vestibular), normalmente é realizado o broqueamento (desgaste ósseo) das estruturas da orelha interna (também chamada de bloco labiríntico) para se ter acesso ao tumor. Nos participantes do estudo, ao invés de realizar o broqueamento simples será realizada uma remoção em bloco dessas estruturas, ou seja, o bloco labiríntico será retirado como um todo e servirá de material para o estudo. Apenas com o bloco labiríntico íntegro é possível realizar os procedimentos para descobrir se existem ou não as células-tronco adultas.

3 – Um paciente portador de Schwannoma Vestibular que opta pelo tratamento cirúrgico rotineiramente é submetido aos seguintes procedimentos: avaliação audiológica pré-operatória (incluindo audiometria e emissões otoacústicas), avaliação clínica e anestésica pré-operatória (padrão do HCFMUSP) e cirurgia. A cirurgia será realizada pela via transótica, ou seja, será realizada uma incisão atrás do pavilhão auditivo e broqueamento da mastóide até a identificação da cápsula ótica, sua remoção, identificação e remoção do tumor.

O bloco labiríntico assim retirado será encaminhado para o laboratório de investigação médica da Otorrinolaringologia na Faculdade de Medicina da USP.

4 – O fato de decidir participar ou não deste estudo não gera nenhum risco adicional ao paciente pois para o tratamento da doença são necessários os procedimentos descritos, independentemente da realização do broqueamento convencional ou da remoção do bloco labiríntico para estudo celular.

5 – Com esse estudo não há nenhum benefício direto ao paciente que será submetido ao exame, porém se confirmarmos nossa hipótese de que existem células-tronco na orelha interna adulta será possível realizar, em outras ocasiões, novas pesquisas com objetivo futuro de tratamento de diversos tipos de surdez.

6 – Como não se trata de um tratamento ou terapia específica não apresentamos alternativas à participação do estudo.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Milene Massucci Bissoli, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 Telefone(s) 3069-6539, E-mail milene.bissoli@gmail.com. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Identificação e Isolamento de Células-Tronco da Orelha Interna Humana Através da Técnica FACS**”. Eu discuti com a Dra. Milene Massucci Bissoli. sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____