

O Uso de Células-Tronco na Restauração da Audição. Será Isso Possível? Avanços na Pesquisa

—————
José Antonio Aparecido de Oliveira

Recentemente tem sido relatado que células-tronco têm potencial como um material para transplante no sistema nervoso central e retina. Algumas células transplantadas diferenciam-se em componentes celulares destes tecidos. Portanto, há possibilidade que a célula-tronco neural sobreviva na cóclea, e se diferencie em componentes celulares do epitélio da orelha interna (Sakamoto et al., 2001) com as células ciliadas auditivas lesadas.

Apermanência da perda auditiva, em humanos, deve-se principalmente à inabilidade do epitélio sensorial coclear para regenerar as células mecanorreceptoras após lesão, ou seja, as células ciliadas auditivas (Huawet et al., 2003).

Os avanços recentes em Genética e Biologia Molecular têm aumentado as esperanças para a regeneração ou proteção destas células. A terapia celular é uma área de pesquisa que cresce rapidamente, sendo potencialmente aplicável ao tratamento dos problemas da orelha interna.

Estudos recentes, em transplante de células na orelha interna, têm sugerido que esta terapia celular pode progredir em direção à aplicações clínicas. Ocorreram recentes avanços nos estudos de transplante de células focando a orelha interna. Contudo, problemas relacionados à escolha de células para transplante, sua avaliabilidade à indução de diferenciação apropriada das células enxertadas e a sua recuperação funcional ainda necessitam ser conseguidas (Nakagawa & Ito, 2004).

Um processo terapêutico potencial de recuperação da perda de células sensoriais em muitas formas de surdez neurossensorial é o transplante de células-tronco exógenas mantidas *in vitro*. Uma fonte ideal para estas células-tronco óticas deveria ser uma linhagem de células humanas derivadas da cóclea fetal e expandidas e mantidas *in vitro* retendo suas capacidades multipotentes (Rivolta Moore, 2004).

Na orelha interna de mamíferos adultos e na vida pós-embrionária, a regeneração das células auditivas, neurônios do gânglio espiral ou seus axônios não ocorrem naturalmente. Este decréscimo dos neurônios excitáveis limita o sucesso da reabilitação. As células-tronco embrionárias e células-tronco neurais adultas possuem o potencial de se diferenciar em neurônios (Regala et al, 2005).

O descobrimento recente de células-mãe, na orelha interna adulta, que são capazes de se diferenciar em células ciliadas, assim como, o achado de células-mãe embrionárias que podem converter-se em células ciliadas, tem produzido esperanças para o futuro como tratamento baseado em células-mãe (Pellicer et al, 2005).

Compreendendo o mecanismo que governa a gênese e regeneração das células ciliadas, acredita-se na possibilidade de desenvolver estratégias, com base na célula para atrasar, prevenir ou mesmo reverter a perda auditiva em indivíduos com problemas na orelha interna (Dahal et al., 2004).

Foi avaliado se células-tronco neurais podem sobreviver no espaço endolinfático de ratos normais. Foi examinada a localização das células-tronco neurais transplantadas na orelha interna lesada de ratos. Essas células neurais foram observadas na superfície do epitélio sensorial e, ocasionalmente, dentro desse epitélio. Isto sugere que células-tronco neural pode sobreviver na orelha interna. Contudo, poucas podem entrar no epitélio.

Células-tronco neurais foram obtidas de ratos. A gentamicina foi usada como tratamento tóxico, através da membrana janela redonda. Ao mesmo tempo, células-tronco neurais suspensas em solução tampão foram injetadas através da parede coclear lateral. O osso temporal foi retirado no sexto dia após o transplante.

No utrículo tratado com gentamicina, células-tronco neurais foram encontradas dentro do epitélio. Estes achados sugerem que as células transplantadas facilmente entram no epitélio sensorial em degeneração. Este modelo experimental é considerado possível para avaliação da habilidade de diferenciação das células-tronco neurais na orelha interna (Sakamoto et al., 2001).

A geração de células ciliadas de uma fonte renovável de células progenitoras que podem ser transplantadas na orelha interna lesada (cóclea) é um requerimento para potencial terapia de recolocação de células neste órgão. Foi apresentado um protocolo experimental para criar, rotineiramente, células progenitoras de células-tronco embrionárias *in vitro*. Estas células progenitoras expressam um conjunto compreensível de gens marcadores que definem o desenvolvimento da orelha interna. Foi mostrado que estas células progenitoras integram, na orelha interna em desenvolvimento, em lugares da lesão epitelial e que células integradas formam feixes de cílios quando situadas no epitélio sensorial coclear e vestibular *in vivo* (Huawet et al., 2003).

Até agora, nossa compreensão da orelha interna de mamífero e sua patofisiologia foi estimulada pelo uso de modelos animais, primariamente na forma de ratos transgênicos, mutantes. Contudo, há diferenças entre espécies, em termos de vias sinalizadoras e no meio que as células-tronco são colocadas. Há uma necessidade clara de um sistema auto-renovável humano, *in vitro*, que ajudaria a experimentação que pode esclarecer mecanismos de diferenciação celular na cóclea humana e que no futuro poderia ser usado para propósitos terapêuticos. Com esse objetivo foram isoladas e expandidas, *in vitro*, células progenitoras auditivas da cóclea humana. Nesta idade de fetos, de 9 - 10 semanas, a diferenciação terminal não foi ainda estabelecida. Várias linhagens celulares foram estabelecidas e células progenitoras estão sendo usadas sob diferentes condições de cultura. Células por mais que 10 semanas ainda permanecem proliferativas, sem diferenciação (Rivolta & Moore, 2004).

Células de ratos fetais foram injetadas no modíolo de ratos tratados com cisplatina. Os ossos temporais foram coletados 14 dias após transplante e realizados exames histológicos. As células fetais do transplante foram determinadas por

imunohistoquímica por um marcador neural ou glial. A análise histológica revelou sobrevivência de células derivadas do transplante no modíolo da cóclea. As células injetadas na porção basal da cóclea migraram para a extremidade apical do modíolo.

As células enxertadas expressando um marcador de célula neural foram identificadas, mas a maioria das células-tronco enxertadas diferenciou-se em células gliais. Estes achados sugerem o possível uso de células-tronco em terapia celular para restauração dos neurônios do gânglio espiral (Tamura et al., 2004).

As células-tronco indiferenciadas de rato foram transplantadas em rato com orelha interna lesada por neomicina. A avaliação foi realizada por imunohistoquímica, quatro semanas após o transplante. Algumas células-tronco foram encontradas. Estes resultados indicam que a orelha interna alterada pode ter alguma atividade induzindo célula-tronco em células ectodérmicas, mas o efeito foi insuficiente para induzir células ciliadas da orelha interna. Por outro lado, tratamento com células-tronco transplantadas em rudimentos da orelha interna de embrião de galinha, dirigiu a célula-tronco para formar uma população como células da crista neural e célula da placa ótica. Colônias de células foram encontradas perto das vesículas óticas, mas não foram encontradas fazendo parte da parede da vesícula ótica. Algumas colônias de células-tronco foram encontradas no gânglio vestibulococlear (Sakamoto et al., 2004).

Para regenerar a célula ciliada da orelha interna de mamíferos foram transplantadas células-tronco neurais em explantes de orelha interna de rato. As células-tronco integraram-se com sucesso no epitélio sensorial do órgão vestibular, mas nem tanto no órgão de Corti. Este método é útil para investigar a eficiência dos meios para transportar e transplantar células-tronco na orelha interna (Fugino, 2004).

De modo a explorar estratégias potenciais para recolocação de células na cóclea foi transplantada uma variedade de tipos de células-tronco na parede lateral. Foi explorado o potencial destas células para expressar moléculas que são sabidamente importantes para a função da parede lateral. Foram usadas células-tronco neurais, embrionárias, células-tronco derivadas da medula óssea. Algumas células-tronco embrionárias e da medula óssea foram diferenciadas *in vitro* em um fenótipo de célula mesotelial antes do transplante. As células foram transplantadas contra a superfície da parede lateral da cóclea ou em cada uma das três escalas cocleares. Células-tronco sobreviveram bem ao transplante persistindo por mais de três semanas, o mais longo tempo testado. Células-tronco exibiram a habilidade de integrar-se no ligamento espiral, em uma minoria de exemplos, ficando o resto próximo a estria vascular. Na maioria dos casos, contudo, as células transplantadas permaneceram adjacentes ao ligamento espiral, mesmo uma semana após transplante. Algumas células-tronco exibiram expressão de marcadores moleculares das células do ligamento espiral, incluindo conexina 26 (Sauvaget et al., 2004).

Recentemente foi investigada a capacidade de células-tronco embrionárias de ratos produzirem linhagem de células ciliadas. Contudo, a eficiência das células-tronco convertida em linhagem de células ciliadas sob estas condições é pequena. As células-tronco dos precursores neurectodérmicos (tipo de célula progenitora da

célula ciliada) têm o potencial para aumentar significativamente a eficiência com a qual as células ciliadas podem ser geradas *in vitro*. Estas células são tratadas com diferentes fatores de crescimento e meio condicionador das linhas de células cocleares para induzir diferenciação posterior.

Se estas células multipotentes podem ser corretamente colocadas na região das células ciliadas do órgão de Corti, elas podem tomar a morfologia da célula ciliada. Estas células não têm necessariamente que ser terminalmente diferenciadas. As células-tronco indiferenciadas ou as células-tronco diferenciadas das células primitivas, parecidas com o ectoderma primitivo, foram injetadas na escala média da orelha esquerda de quatro cobaias surdas. Estes dois tipos de células foram identificados na cóclea de todos animais implantados depois de 14 ou 28 dias. Não houve evidência de rejeição imune. A morfologia celular mostra que as células indiferenciadas transplantadas pareciam células parcialmente diferenciadas. Algumas das células implantadas localizavam-se perto do órgão de Corti alterado. Entretanto, não houve evidência de integração na estrutura coclear. Assim foi demonstrado que o xenotransplante das células-tronco de ratos na escala média de cobaia é possível e tem demonstrado sobrevivência de células-tronco implantadas na escala média (Dahl et al., 2004).

Para recuperar os neurônios do gânglio espiral (SGNs), células-tronco neurais são uma alternativa atraente para terapia celular de substituição. Nesse estudo, células adultas de ratos foram transduzidas com neurogenina 2 (ng2) e depois transplantadas em orelhas internas de cobaias normais e ensurdecidas. Em orelhas internas lesadas e em animais transplantados com ng2, células sobreviventes expressaram o marcador neuronal tubulina IIIB. As células transplantadas foram encontradas adjacentes aos neurônios do gânglio espiral e de seus processos periféricos e também, perto do epitélio sensorial. Os resultados ilustraram que as células-tronco neurais podem sobreviver e se diferenciar em orelha interna lesada. Também foi demonstrada a possibilidade de transferência de gens para gerar progenia específica para terapia de recolocamento de células na orelha interna (Zheggoing et al, 2005).

As células-tronco na orelha interna de adultos que são capazes de se diferenciar em células ciliadas, tanto quanto as células-tronco embrionárias, liberam esperanças para os tratamentos futuros com base em células-tronco.

Retardar ou reverter a surdez é um dos maiores desafios da Medicina moderna. Apesar dos fascinantes avanços da biotecnologia das células-tronco e da terapia gênica, sua aplicação clínica é muito limitada atualmente. As vantagens do seu uso terapêutico não devem ser supervalorizadas, porém, o desenvolvimento constante de novas técnicas pode abrir futuras estratégias de tratamento para enfermidades que têm uma abordagem terapêutica muito limitada. Por isso, a terapia baseada em células-mãe pode não ser a solução definitiva do problema da surdez.

As terapêuticas futuras combinam terapêuticas com células-mãe, terapêutica gênica e tratamento farmacológico junto a aparelhos eletrônicos (implante coclear), de forma individualizada para cada paciente (Pellicer et al., 2005)

Leituras recomendadas

1. Dahl, HHM; Hildebrand, MS; Peverelli, M; Sheperd, RK; Hardman, J; Coleman, B; Robertson, A. Differentiation of mouse embryonic stem cells and transplantation into the guinea pig cochlea. 5th Molecular Biology of Hearing of Hearing and Deafness, Bethesda, Maryland. pp 178. 2004
2. Fujino, K; Kim, T.; Nishida, A.T. Nakagawa, T; Omori, K; Naito, Y; Ito, J. Transplantation of neural stem cells into explants of Rat inner ear. Acta Otolaryngol. Suppl 551:31-33, 2004.
3. Li, H; Corrales E; Edge, A; Heller, S. Stem cells as therapy for hearing-loss. Trends in Molecular Medicine, 10: 309-15. 2004.
4. Kojima, K; Tanaka, A; Tashiro, K; Hirotall, K; Nishiot, T; Murat, M; Kato, N; Kawaguchi, S; Ito, J.; Vanderwater, TR. Identification and characterization of a multipotent otic progenitor cell lineage from a developing mammalian inner ear. 5th Molecular Biology of Hearing of Hearing and Deafness, Bethesda, Maryland. pp 179. 2004.
5. Li, H; Roblin, G; Liu, H; Heller, S. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. PNAS 100:13995 – 13500.2003
6. Nakagawa, F; Ito, J. Application of cell therapy to inner ear disease. Acta Otolaryngol. Suppl 551:6-9, 2004.
7. Pellincer, M; Giraluavez, F; Pumarola, F; Barquinero, J. células madre em el tratamiento de la sordera. Acta Otorrinolaringol Esp.56:227-32, 2005.
8. Regala, C; Duan, M; Zou, J; Salminen, M; Olivius, P. Xenografted fetal dorsal root ganglion. Embryonic stem cells and adult neural stem cells survival following implantation into the adult vestibulocochlear nerve. Experimental Neurology 193:3326-3333, 2005.
9. Sakamoto, T.; Nakagawa, T., Endo, T. Kim, T. Iguchi, F; Naito, Y; Sasai, Y; Ito, J. Fates of mouse embryonic stem cells transplanted into the inner ears of adult mice and embryonic chickens. Acta Otolaryngol. Suppl 551:48-52, 2004.
10. Sakamoto, T; Ito, J; Sasai, Y; Ladher, R. Development of in vitro culture system of mature inner ear hair cells. 5th Molecular Biology of Hearing of Hearing and Deafness, Bethesda, Maryland. pp 231. 2004.
11. Sauvaget, E; Pak, K; Li, Y; Liebe, K; Ryan, AF. Transplantation of stem cells into the lateral wall of the inner ear. 5th Molecular Biology of Hearing of Hearing and Deafness, Bethesda, Maryland. pp 230. 2004
12. Tamura, T. Nakagawa, T. Iguchi, F; Tateya, I; Endo, T; Kim, T, Dong, Y; Kita, T; Kojima, K Naito, Y; Omori, K; Ito, J. Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. Acta Otolaryngol. Suppl 551:65-68, 2004.