ANA CAROLINA MARTINS DOS SANTOS

Caracterização das células do epitélio coclear de fetos de cão

São Paulo
2015

ANA CAROLINA MARTINS DOS SANTOS

Caracterização das células do epitélio coclear de fetos de cão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angelica Miglino

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3187
FMVZ

Santos, Ana Carolina Martins dos
Caracterização das células do epitélio coclear de fetos de cão / Ana Carolina
Martins dos Santos. -- 2015.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Cóclea. 2. Células-tronco. 3. Fetos de cão. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Caracterização das células do epitélio coclear de fetos de cão”, protocolado sob o nº 2947/2013, utilizando 25 (vinte e cinco) fetos de cão, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria Angelica Miglino, foi aprovado em reunião de 16/10/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Characterization of cells of fetal epithelium cochlear dog”, protocol number 2947/2013, utilizing 25 (twenty-five) fetuses dog, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angelica Miglino, was approved in the meeting of day 16/10/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 17 de outubro de 2013.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente no exercício

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Ana Carolina Martins dos

Título: Caracterização das células do epitélio coclear de fetos de cão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus pais **José Paulo** e **Maria Elena**, meus exemplos, por toda a dedicação, ajuda, amor, paciência, apoio, incentivo nas minhas lutas, acreditar nos meus sonhos e por compreender meus momentos de nervosismo, Amo vocês.

Aos meus sobrinhos **Gabriel, Ana Beatriz, Alice e Maurício** que mesmo nos meus momentos difíceis e quando vocês estavam por perto faziam me sentir melhor obrigada por sempre estarem do meu lado, Amo vocês.

Aos meus irmãos **Denis e Paula** que me apoiaram, e, apesar de algumas vezes estarmos distantes, isso nunca mudou a importância que vocês têm na minha vida, e o amor que sinto por vocês.

Agradecimentos

A **Prof. Dra. Maria Angélica Miglino** minha orientadora por todos os ensinamentos dedicação e profissionalismo todo conhecimento que foi passado. Pela atenção e confiança que foi dada.

Ao **Dr Phelipe de Oliveira Favaron** pela ajuda, dedicação, apoio e ensinamentos.

Aos **Prof Dr. Durvanei** por abrir as portas de seu laboratório onde foi realizada uma parte do meu trabalho e **Dra. Sonia will** que esteve presente no início do meu trabalho me ajudando na parte prática e me aconselhando.

Aos **Dr. Bruno Vasconcelos** que me ajudou e orientou no começo do meu trabalho e a **Dra. Sonja Ellen Lobo** a qual fui orientada durante oito meses, e no decorrer desses meses aprendi muito.

Aos **Professores Dr. Antônio Chaves de Assis Neto e Dr. José Roberto Kfoury**, por ceder seus laboratórios e equipamentos e pelo conhecimento passado durante as disciplinas.

A **Dra. Ana Claudia Carreira**, pela dedicação e ajuda nos experimentos do meu trabalho a todos os conselhos.

Ao **NUCELL** (Núcleo de Terapia Celular e Molecular) e ao técnico **Tulio Felipe Pereira**, pela execução dos experimentos de citometria de fluxo.

Ao **Eduardo Malavassi**, por me ajudar no laboratório do Prof. Dr. Jose Roberto Kfoury.

Aos funcionários **Ronaldo Agostinho, Jaqueline Santana e Dra. Rose Eli, Paulinha** pela atenção e suporte no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do LCT, João **Leonardo, Mariah, Fabiele Russo, Isabella Fernades, Raphael Cruz e Katia Guimarães** e agradecimento especial a **Dra. Dylaila e Dra. Graciela Pignatari**, pela ajuda nos momentos de duvidas.

Aos colegas de laboratório **Rafael Carvalho, Marcio Nogueira, Dayane Alcântara, Fernanda Menezes, Renan Olio, Bruna Andrade, Dailiany Orechio, Patrícia e Luciana**, por toda ajuda.

Aos colegas **Diego e Amilton**, por toda ajuda no laboratório do Prof Dr. Antônio Chaves de Assis Neto.

Aos amigos **Marcio Pereira, Cesar Prado, Adriana Raquel, Luciano Cesar, Carla Carvalho, Thais, Marcão, M.A. (Maria Angélica) Paulo Ramos e Natal (Franceliussa Delys)**, por todos os momentos de alegria e por todo apoio nos momentos difíceis durante essa jornada.

As amigas **Jessica Borghesi** e **Lara Carolina Mario**, com vocês aprendi um novo significado para amizade, obrigada por toda ajuda, incentivo, disposição e conselhos, que me deram desde o começo do meu mestrado até agora.

A amiga **Sara Jane**, pela companhia nos finais de semana e feriados e por dividir momentos difíceis durante o meu mestrado.

As bibliotecárias **Elza** e **Neusa**, por toda ajuda e paciência nos auxiliando durante nosso trabalho.

A **CAPES** pela concessão da bolsa.

EPIGRAFE

Não é preciso alarde para quem sabe, no íntimo, ter a força das tempestades e a profundidade das raízes das árvores...
...Ser forte não é só empunhar a espada, mas saber dançar com ela, junto ao coração...(Poema Lunar)

RESUMO

SANTOS, A. C. M. dos. **Caracterização das células do epitélio coclear de fetos de cão.** [Characterization of the cochlear epithelial cells dog fetuses]. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A maioria das perdas auditivas adquiridas ou congênitas decorre de dano ou perda das células ciliares da cóclea ou dos seus neurônios associados. A irreversibilidade da surdez em mamíferos ocorre devido à incapacidade de substituição das células perdidas, seja por divisão celular ou por regeneração de células endógenas no epitélio da orelha interna. Com isso o objetivo deste trabalho foi obtenção de linhagens de células progenitoras do epitélio coclear de fetos de cães com 40 dias de gestação, colaborando com futuras pesquisas relacionadas a trabalhos de tratamento para surdez neurosensorial. Foram utilizados oito fetos caninos com idade compreendidos a 40 dias de gestação, nos quais, foi realizada uma dissecação no crânio, expondo a cóclea para a retirada do epitélio coclear, visando sua análise morfológica, e obtenção de suas células. Para análise morfológica do tecido colear realizou-se as técnicas macroscópica, microscópica e de imunohistoquímica. As células obtidas da cóclea foram fotodocumentadas, e submetidas às análises de método colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), análise do ciclo celular, análise da imunofenotipagem e da diferenciação celular. Em cultivo as células apresentaram formato fibroblastóide. Na caracterização imunofenotípica apresentaram marcação positiva para marcadores de células-tronco mesenquimais e de pluripotência e marcação negativa para células hematopoiéticas. Apresentaram ainda a capacidade de diferenciação para linhagens celulares osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. Essas análises sugeriram resultados satisfatórios na obtenção, quantificação e caracterização dessas células, as quais foram adquiridas a partir de células do epitélio coclear de feto de cão, as quais poderão constituir fontes de células a serem utilizadas na terapia celular da espécie canina destinada ao tratamento de surdez causada por lesões ou danos do epitélio coclear.

Palavras-chave: Cóclea. Células-tronco. Fetos de cão.

ABSTRACT

SANTOS, A. C. M. dos. **Characterization of the cochlear epithelial cells dog fetuses**. [Caracterização das células do epitélio coclear de fetos de cão]. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Most acquired or congenital hearing loss results from damage or loss of hair cells of the cochlea or their associated neurons. The irreversibility of deafness in mammals is due to the lost cells replacement inability, either by cell division or by regeneration of endogenous cells in the epithelium of the inner ear. Therefore, the objective of this work was to increase knowledge about getting progenitor cell lines of the cochlear epithelium from dogs' fetuses with 40 days of gestation, collaborating with future research related to treatment work for sensorineural deafness. Eight canine fetuses were used aged as mentioned above, in which, a dissection was performed in the skull, exposing the cochlea to the withdrawal of the cochlear epithelium, for their morphological analysis and cells obtainment. For morphological analysis of the cochlear tissue was held the macroscopic techniques, microscopy and immunohistochemistry. The cochlea cells obtained were photo documented and analyzed for the colorimetric method MTT (3- (4,5- dimethylthiazol -2- yl) -2,5 - Diphenyltetrazolium Bromide), cell cycle analysis, immunophenotyping analysis and cell differentiation. In culture, the cells showed fibroblast format. In immunophenotype characterization, they presented positive staining for mesenchymal stem cell markers and pluripotency and negative marking for hematopoietic cells. They also exhibit the differentiation capacity for cell osteogenic lineages, adipogenic and chondrogenic. These analyzes suggested satisfactory results in obtainment, quantification and characterization of these cells, which were acquired from the dog fetal cells' cochlear epithelium, which may be cells of fonts to be used in cellular therapy of canine species for the treatment of deafness caused by injury or damage to the cochlear epithelium.

Keywords: Cochlea. Stem cells. Dog fetuses.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	15
3	OBJETIVOS	16
3.1	OBJETIVOS GERAIS	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
4.1	DESENVOLVIMENTO DA ORELHA E DA VIA AUDITIVA EM CÃES	17
4.2	ANATOMIA DA ORELHA EM CÃES	19
4.3	VIA AUDITIVA EM CÃES	22
4.4	DISTÚRBIOS AUDITIVOS EM CÃES	24
4.5	CÉLULAS-TRONCO.....	27
5	MATERIAL E MÉTODO	30
5.1	ANIMAIS UTILIZADOS	30
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA	30
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	31
5.4	IMUNOHISTOQUÍMICA	31
5.5	CULTIVO CELULAR DO EPITÉLIO COCLEAR.....	32
5.5.1	Isolamento e cultivo das células da cóclea.....	32
5.5.2	Análise morfológica	33
5.5.3	Teste de viabilidade e criopreservação celular.....	33
5.5.4	Ensaio de avaliação do metabolismo celular pelo método colorimétrico-MTT	34
5.5.5	Análise das fases do ciclo celular.....	34
5.5.6	Caracterização celular por imunocitoquímica	35
5.5.7	Caracterização celular por citometria de fluxo	36
5.6	DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	36
5.6.1	DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA E OSTEOGÊNICA.....	36
5.6.2	DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA	37
6	RESULTADOS	39
6.1	ANÁLISE MORFOLÓGICA DA CÓCLEA	39
6.2	IMUNOHISTOQUÍMICA DA CÓCLEA.....	41

6.3	ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO EPITÉLIO COCLEAR DE FETOS DE CÃES E CULTIVO CELULAR	43
6.4	MORFOLOGIA CELULAR.....	44
6.5	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR DE CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR.....	46
6.6	ATIVIDADE METABÓLICA CELULAR REALIZADA MEDIANTE A UTILIZAÇÃO DO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT	47
6.7	ANÁLISE DAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR	49
6.8	CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR IMUNOCITOQUÍMICA.....	50
6.9	CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	52
6.10	DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	55
7	DISCUSSÃO	58
8	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A orelha, também conhecida como órgão vestibulococlear permite ao animal desenvolver o sentido da audição, bem como auxilia a espécie a manter o equilíbrio do corpo, permitindo a identificação e localização do som, mantendo também a posição da cabeça em relação à gravidade. Anatomicamente a orelha do cão pode ser dividida em três partes: orelha externa, média e interna (LODISH et al., 2005; DYCE; SACK; WENSING, 2010).

A surdez é uma incapacidade parcial ou total de detecção ou percepção de ouvir, causada por diferentes fatores tais como, idade, ruídos intensos e repetitivos, doenças infecciosas, intoxicações e traumas físicos (HUTCHIN; CORTOPASSI, 2000; WHITE et al., 2006). A surdez pode ser analisada em seus dois tipos: surdez condutiva localizada na orelha externa ou média, causada por lesões que afetam o mecanismo de transmissão dos estímulos sonoros até a cóclea, e surdez neurossensorial, caracterizada pela ocorrência de anormalidades situadas entre os receptores da orelha interna (presença de lesões da cóclea, do nervo auditivo) e as regiões auditivas do cérebro (GUYTON; HALL, 2011).

Dentre as doenças auditivas que acometem os cães, destacam-se as otites, as quais são clinicamente classificadas de acordo com a porção do conduto auditivo acometida, podendo ser caracterizada como otite externa, média ou interna (GOTTHELF, 2007). As espécies de animais domésticos também estão suscetíveis a diversas outras doenças, e, muitas dessas espécies (principalmente roedores) têm sido utilizados como modelos para entender o comprometimento da via auditiva.

A maioria das perdas auditivas adquiridas ou congênitas decorre de dano ou perda das células ciliares da cóclea, ou dos seus neurônios associados. A irreversibilidade da surdez em mamíferos ocorre devido à incapacidade de substituição das células perdidas, seja por divisão celular ou por regeneração de células endógenas do epitélio da orelha interna (BARBOZA JR; OITICICA; BATISSOCO, 2008). Com isso novas pesquisas surgiram no campo da terapia celular visando à utilização de células-tronco como método inovador de tratamento para doenças que não respondem bem aos tratamentos convencionais (GAGE, 2000; MIMEAULT; BATRA, 2006; TROUNSON, 2006). Diversos estudos surgiram então utilizando células isoladas a partir da orelha interna, com intuito de fazer com

que ocorresse regeneração coclear (MALGRANGE et al., 2002; LOU; ZHANG; YUAN, 2007; CHAO et al., 2013; MIZUTARI et al., 2013). Com isso o objetivo deste trabalho foi estudar no cão este assunto, tentando ampliar o conhecimento sobre a obtenção de linhagens de células progenitoras derivadas do epitélio coclear de fetos de cães com 40 dias de gestação.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Atualmente muitas pesquisas são realizadas abordando a surdez. Trabalhos recentes têm avaliado a utilização de diferentes tipos de células para terapia desta afecção. Mais da metade das aproximadamente 400 doenças hereditárias caninas são equivalentes às doenças humanas, incluindo cardiopatias, distrofia muscular, câncer de próstata e surdez (TOBIAS et al., 2013). Desta forma, a surdez no cão pode servir como modelo para a surdez no humano, de modo que, a caracterização e a diferenciação de células progenitoras derivadas do epitélio coclear de fetos de cães poderá contribuir para estudos futuros de terapia celular na espécie e em outras espécies. Assim, levantamos a hipótese se seria possível obter células progenitoras derivadas do epitélio coclear em cães, com características mesenquimais, com alto potencial de diferenciação *in vitro*, capazes de expressar marcadores de células tronco, proliferação e pluripotência.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Obter, caracterizar e diferenciar células progenitoras derivadas do epitélio coclear de fetos de cães com aproximadamente 40 dias de gestação.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estabelecer culturas de células progenitoras derivadas do epitélio coclear de fetos de cães com aproximadamente 40 dias de gestação;
2. Avaliar o potencial de expansão e viabilidade das células derivadas do epitélio coclear na espécie;
3. Caracterizar o fenótipo das células progenitoras derivadas do epitélio coclear de fetos de cães mediante a técnica de citometria de fluxo e de imunocitoquímica;
4. Avaliar o potencial de diferenciação dessas células em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 DESENVOLVIMENTO DA ORELHA E DA VIA AUDITIVA EM CÃES

A orelha é um órgão complexo que está dividido em três partes, a orelha externa, média e interna, sendo que cada uma possui origem embrionária diferente (DYCE, 2010). As estruturas derivadas da orelha externa e média originam-se a partir do primeiro e segundo arcos faríngeos, bem como da primeira intervenção da fissura faríngea e da bolsa faríngea na espécie. A orelha interna deriva-se de uma placa ectodérmica espessada localizada a nível do rombencéfalo (MCGREADY et al., 2009; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

A orelha interna inicia sua formação antes das orelhas externa e média. A orelha interna tem como precursores embrionários os placóides óticos, espessamentos bilaterais do ectoderma superficial adjacentes a porção média do mielencéfalo. Os placóides óticos invaginam-se para formar a fosseta ótica, o qual faz contato com o mielencéfalo. Posteriormente as bordas da fosseta ótica se fecham separando a vesícula ótica do ectoderma superficial. A cavidade da vesícula ótica é preenchida por um fluido chamado endolinfa. Algumas células que se desprendem da parede ventromedial do epitélio ótico, originam, posteriormente os glânglios sensoriais do nervo vestibulococlear, VIII par de nervos cranianos (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

Provenientes da vesícula ótica surge uma série de invaginações das quais originam-se os ductos endolinfáticos, semicirculares e trocleares. A vesícula ótica logo começa a se alongar e diferencia-se em duas partes distintas: o utrículo dorsal e o sáculo ventral. Dois divertículos planos e discóides crescem a partir da porção utricular da vesícula ótica. Um destes divertículos planos toma uma posição vertical, paralela ao plano mediano, enquanto o segundo plano é horizontal, dispendo-se em um ângulo reto com o primeiro. A divisão do divertículo vertical dá origem à estruturas semicirculares anterior e posterior (ALMEIDA, 1999; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010). Posteriormente, as porções centrais desaparecem devido à apoptose, e, os dois tubos restantes são designados como ductos semicirculares laterais. As dilatações da porção final destes ductos são conhecidos

como ampolas, as quais recebem terminações nervosas que alcançam também o utrículo e o sáculo, formando as maculas (ALMEIDA, 1999; REECE, 2012). O ducto coclear durante seu alongamento enrola-se, dando origem a cóclea membranosa ao final da organogênese. A diferenciação da parede do ducto coclear forma o órgão de “Corti”. A cóclea faz uma comunicação com o sáculo, formando um ducto de união. Os ductos vestibulares e cocleares no estágio embrionário são envolvidos por células mesenquimas, das quais se origina a matriz cartilaginosa. Esta matriz cartilaginosa sofre apoptose, deixando um espaço entre o labirinto membranoso e a cartilagem, formando dois espaços perilinfáticos, os quais são posteriormente ocupados com fluido, a perilinfa. Estes espaços são denominados: rampa timpânica e rampa vestibular. Esta cápsula cartilaginosa posteriormente é substituída por formação óssea (ALMEIDA, 1999; HYTTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

A orelha média é formada a partir do desenvolvimento da 1ª bolsa faríngea que se estrutura na tuba auditiva (conduto faringotimpânico). O recesso da porção distal do conduto faringotimpânico se expande ao encontro da 1ª fenda ectodérmica, da qual originará a cavidade timpânica primitiva. A membrana timpânica, localizada dentro da cavidade timpânica, também é derivada desta 1ª fenda. Os primórdios do desenvolvimento dos ossículos da orelha média surgem a partir da primeira bolsa faríngea, localizada dorsalmente. Estes ossículos provêm do mesenquima derivado da crista neural. Este conjunto de ossículos tem origem dupla, ou seja: o martelo e bigorna surgem a partir do mesênquima derivado da crista neural do primeiro arco faríngeo. O estapédio surge a partir do mesênquima derivado do segundo arco faríngeo. Estes ossículos são primariamente compostos de mesênquima condensado, depois tornam-se cartilagosos e finalmente ossificados (ALMEIDA, 1999; MCGEADY et al., 2006).

A orelha externa deriva-se da primeira fenda faríngea, durante a organogênese o período fetal, sendo formada pela aurícula, pelo meato acústico externo e pelas camadas externas da membrana timpânica. No fundo do meato acústico, existem células epiteliais que proliferam e formam uma massa sólida, o tampão do meato. Contudo, ao final do desenvolvimento embrionário, um canal se desenvolve neste tampão, estendendo-se até a futura abertura do meato até o nível da membrana timpânica, para então formar o meato acústico externo (MCGREADY et al., 2009; HYTTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

4.2 ANATOMIA DA ORELHA

A orelha também conhecida como órgão vestibulococlear, permite ao animal desenvolver o sentido da audição, bem como o equilíbrio do corpo, permitindo a identificação e localização do som, e mantendo a posição da cabeça em relação à gravidade. Anatomicamente a orelha do cão pode ser dividida em três partes: orelha externa, média e interna (MATOUSEK, 2004; DYCE; SACK; WENSING, 2010). Dentre as diversas raças de cães podemos ter variações anatômicas relativas ao tamanho ao formato dos componentes da orelha, isso pode ser resultado da reprodução seletiva (EVANS; SACK, 1973).

A orelha externa é composta de uma porção vertical e outra horizontal unidas em forma de “L”, constituindo um tubo cartilaginoso cônico, conduzindo ondas sonoras até a membrana timpânica. O conduto auditivo externo inicia sua porção horizontal proximalmente junto ao osso temporal, e termina distalmente sua porção vertical nos componentes cartilaginosos da base do pavilhão auricular (DYCE; SACK; WENSING, 2010). A membrana timpânica (tímpano) é uma porção membranosa fina e ligeiramente opaca que separa a orelha externa da orelha média. Está localizada dentro da cavidade timpânica onde encontram-se os três ossículos timpânicos (martelo, bigorna e estapédio) e a janela da cóclea (GOTTHELF, 2007).

A orelha média consiste em um espaço da cavidade timpânica, a qual forma um pequeno recesso epitimpânico, constituída por uma bula ventral grande e uma bula timpânica. Na sua parede medial é encontrada uma caixa timpânica e o promontório, que abriga a cóclea. A janela coclear está localizada na parte caudolateral do promontório, coberto por uma fina membrana. A janela vestibular está localizada na superfície dorsolateral do promontório, coberto por um diafragma fino, sobre o qual a platina do estapédio é ligada (GETTY, 1986). A tuba auditiva serve para equalizar a pressão estabelecida entre o interior da cavidade e o meio externo. A membrana timpânica fecha a janela vestibular, mediante sua ligação mecânica formada pelos ossículos timpânicos, sendo eles o martelo, bigorna e estapédio. A amplificação das ondas sonoras é realizada pela força de alavanca dos ossículos da orelha e pela área de superfície da membrana timpânica, a qual

envia ondas sonoras para superfície menor da área da janela vestibular (REECE, 2012).

A orelha interna é responsável por receber os sinais auditivos e manter o equilíbrio, localizado no labirinto ósseo da parte petrosa do osso temporal (GUYTON; HALL, 2011). Existem funcionalmente três partes relacionadas à orelha interna. A primeira é definida como ductos semicirculares, contendo células ciliadas que detectam aceleração da endolinfa, provocada pela rotação do cabeça; segunda é o utrículo e sáculo, contendo células ciliadas da mácula a qual corresponde a uma aceleração linear da cabeça e da sua posição estática; a terceira parte é o ducto coclear, que é a porção auditiva do labirinto. Dentro do ducto coclear está presente o órgão de Corti, o qual é responsável pela transmissão de estímulos auditivos ao cortex cerebral, sendo composto de células de suporte e células ciliadas (COLVILLE; BASSERT, 2010; DYCE; SACK; WENSING, 2010; GUYTON; HALL, 2011).

Existem três ductos semicirculares orientados perpendicularmente uns aos outros, e a rotação da cabeça em torno de qualquer plano provoca a endolinfa a fluir para um ou mais ductos. Cada um dos ductos semicirculares se liga em cada uma das extremidades com o utrículo, que se conecta ao sáculo através da intervenção ducto e saco endolinfático, a qual comunica-se com o ducto coclear. Receptores estão presentes no utrículo e sáculo, que contêm células ciliadas. Os sáculos maculais estão posicionados na posição vertical, enquanto o utrículo mácula é orientado em uma direção horizontal (plano dorsal), responsáveis pela sensação estática da posição da cabeça e aceleração e desaceleração linear (FERNANDEZ; BERNARDINI, 2010).

A extensão do labirinto coclear dentro da cóclea é conhecida como ducto coclear. A cóclea é composta por um labirinto ósseo, dentro do qual é encontrada uma estrutura celular que é o labirinto membranoso. O labirinto ósseo inclui a cápsula ótica, o limite ósseo externo da cóclea, e o modíolo, um tubo ósseo que forma o eixo central da cóclea (REECE, 2012) Em roedores e alguns mamíferos, como, por exemplo, os gatos e os cães, o ducto coclear é maior. Nos cães ele tem pelo menos três giros completos (FERNANDEZ; BERNARDINI, 2010). Determinadas regiões dentro do ducto coclear, passam por um alto grau de diferenciação, e formam a partir de células epiteliais, a região sensorial da cóclea, o órgão de Corti,

constituído pelas células ciliadas externas, células ciliadas internas e células de suporte, que repousam sobre a membrana basilar (REECE, 2012).

As células ciliadas externas têm o formato cilíndrico, e os seus núcleos localizam-se na porção basal da célula. Elas apresentam diâmetro menor que as células ciliadas internas, e, em números ocorrem cerca de 4 vezes mais que as células ciliadas internas. As células ciliadas internas apresentam formato globoso com um núcleo disposto centralmente. Forma uma fileira única de células dispostas ao longo do epitélio espiral sensorial (KLEIN, 2010).

As células de suporte estruturalmente são divididas em células com e sem filamentos. As células pilares internas, externas e células “Deiters” são estruturalmente semelhantes, apresentando microfilamentos e microtúbulos citoplasmáticos, formando uma rede de suporte firme no órgão de Corti. (ANGELBORG; ENGSTRÖM, 1972).

A membrana basilar a estrutura sobre a qual o órgão de Corti repousa, é composta principalmente por uma matriz extracelular com fibras embebidas em uma substância homogênea (ANGELBORG; ENGSTRÖM, 1974). As células de “Deiters” estendem-se desde a membrana basilar até a lâmina reticular, estando em contato íntimo com as células ciliadas externas. A sua base está em contato com a membrana basilar e a sua porção média relaciona-se com as células ciliadas externas, onde há maior concentração de mitocôndrias e retículo endoplasmático sugerindo ser essa uma zona de transporte. As células de “Boettcher” são encontradas no giro coclear basal entre as células de “Claudius” e a membrana basilar, portanto as suas superfícies apicais nunca entram em contato com a endolinfa (SPICER; SCHULTE, 1993). As células basais separam as células ciliadas internas das externas, formando uma base de suporte triangular para o epitélio sensorial além de um túnel preenchido por líquidos, o túnel de Corti, que dá passagem para filetes nervosos em direção às células ciliadas externas. As células pilares internas separam as células ciliadas internas do fluido do interior do túnel de Corti e ocorrem aproximadamente na proporção 1:1 (DUVALL; RHODES, 1967).

4.3 VIA AUDITIVA EM CÃES

Os conhecimentos sobre a inervação da cóclea datam de estudos antigos, quando se descobriu que algumas fibras nervosas trafegavam da cóclea em direção ao sistema nervoso central. Estas fibras aferentes diferenciam-se de outras derivadas do sistema nervoso central em direção à periferia, as fibras eferentes. Após estudos iniciais, inúmeros outros achados foram relatados sobre os padrões de inervação e estruturas das sinapses nas células ciliadas (OLIVEIRA, 1993; FERNANDEZ; BERNARDINI, 2010).

A inervação da orelha interna origina-se através do VIII par de nervos cranianos, nervo vestibulo coclear também considerados como dois nervos separados: nervo coclear, que inerva o órgão de Corti, e o nervo vestibular, que inerva os órgãos de equilíbrio (CHRISMAN, 1985).

O nervo vestibulococlear, exclusivamente sensitivo é formado pelos nervos vestibular e coclear, que adentram a face ventro-lateral da ponte, pela sua margem caudal, lateralmente aos nervos, facial e intermédio. O mesmo ocupa o meato acústico interno na sua porção petrosa do osso temporal. O nervo vestibular tem suas células de origem no gânglio vestibular, o qual encontra-se situado no meato acústico interno, cujas fibras aferentes somáticas conduzem os impulsos relacionados ao equilíbrio. Já o nervo coclear tem suas células de origem no gânglio espiral, localizado na parte petrosa do osso temporal, cujas fibras aferentes somáticas conduzem os impulsos acústicos devido a estímulos do órgão de Corti por ondas sonoras (CHRISMAN, 1985; FERNANDEZ; BERNARDINI, 2010).

A via auditiva esta relacionada aos receptores da audição, os quais se localizam no órgão de Corti, situado no ducto coclear da orelha interna. Esta via possui 4 neurônios, os quais desempenham funções distintas. Os neurônios I localizado no gânglio espiral da cóclea são bipolares, seus prolongamentos periféricos são pequenos e terminam em contato com os receptores no órgão de Corti. Os prolongamentos centrais constituem a porção coclear do nervo vestibulococlear e terminam na ponte, fazendo sinapse com os neurônios II (MACHADO, 2010; PRADA, 2014).

Os neurônios II estão situados nos núcleos cocleares dorsal e ventral. As fibras do neurônio I transmitem frequências altas dirigindo-se ao núcleo coclear

dorsal, enquanto as que veiculam em frequência baixas dirigem-se ao núcleo coclear ventral. Fibras emergentes dos núcleos cocleares cruzam o plano mediano com trajeto transversal na região caudal da ponte, constituindo o corpo trapezóide. Admite-se que do núcleo coclear ventral partem fibras que se dirigem aos núcleos dorsal e ventral do corpo trapezoide (núcleos Olivares) homo e contra lateral para aí estabelecerem relevos intermediários. As fibras do corpo trapezoide, fletindo-se rostralmente, constituem o lemnisco lateral contralateral e se dirigem-se ao colículo caudal, onde estabelecem sinapses com o neurônio III. As fibras que não decussam também se projetam em direção ao colículo caudal por intermédio do lemnisco lateral ipsilateral. Portanto, o estímulo proveniente de cada orelha é projetado em ambos os antímeros dos níveis neuronais superiores, o que é de grande importância para a localização espacial de procedência do som (CHRISMAN, 1985; PRADA, 2014).

Os Neurônios III localizados no colículo caudal e seus axônios junto com fibras do lemnisco medial, constituem o braço do colículo caudal, por intermédio do qual alcançam o núcleo geniculado medial, no corpo geniculado medial (no tálamo), onde efetuam sinapses com neurônio IV. Os colículos estão implicados no mecanismo reflexo de resposta a estímulos auditivos. Assim, deles partem fibras que estabelecem sinapse com neurônios motores do teto mesencefálico, cujos axônios cruzam o plano mediano e se dirigem caudalmente formando o trato tetoespinal, que se incorpora no fascículo longitudinal medial do funículo ventral da medula espinhal. Essa via permite ao animal girar reflexamente a cabeça ao ouvir um som. No tronco encefálico, parte das fibras do trato tetoespinal abandona o fascículo longitudinal medial para dirigir-se a núcleos de nervos cranianos motores somáticos e viscerais, permitindo igualmente respostas reflexas á audição de sons. Também dos colículos caudais partem projeções para a formação reticular constituindo-se a partir daí, uma via auditiva extralemniscal. Os Neurônios IV estão localizados no corpo geniculado medial, cujos axônios formam a radiação auditiva, que passando pela cápsula interna chega à área auditiva do córtex, localizada no lobo temporal (MACHADO, 2010; PRADA, 2014).

Figura 1 - Desenho esquemático representando a via auditiva nos cães

Fonte: (FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010 adaptação de SANTOS, A. C. M., 2015)

Legenda: 1 Nervo coclear, 2 Núcleos cocleares dorsal e ventral, 5 Núcleo Colículo caudal, 6 Núcleo geniculado medial e 7 Radiação acústica.

4.4 DISTÚRBIOS AUDITIVOS EM CÃES

Podemos definir surdez como uma incapacidade parcial ou total de detecção ou percepção de ouvir, causada por diferentes fatores como, idade, ruídos, doenças, intoxicações e traumas físicos (HUTCHIN; CORTOPASSI, 2000; WHITE et al., 2006).

A surdez pode ser classificada em dois tipos: surdez condutiva localizada na orelha externa ou média causada por lesões do mecanismo para transmissão dos estímulos sonoros até a cóclea, e surdez neurossensorial caracterizada por ocorrência de anormalidades situadas entre os receptores da orelha interna, presença de lesões da cóclea, nervo auditivo e nas regiões auditivas do cérebro (GUYTON; HALL, 2011). As principais causas de surdez neurossensorial incluem: surdez hereditária, lesão neuronal por substâncias tóxicas e surdez senil (LUTTGEM, 1994).

Dentre as doenças auditivas que acometem os cães, temos as otites que são clinicamente classificadas de acordo com a porção acometida do conduto auditivo podendo ser otite externa, média ou interna. Quanto ao envolvimento pode ser unilateral ou bilateral (GOTTHELF, 2007).

Dentre fatores que relacionam-se às afecções que acometem o canal auditivo dos cães, destacam-se as características anatômicas do canal auditivo, a maceração do epitélio de recobrimento do canal auditivo por trauma, as variações climáticas, os pólipos; as neoplasias e os fatores perpetuantes, onde incluem-se as infecções bacterianas ou fúngicas, e as complicações decorrentes das otites crônicas (MÜLLER; HEUSINGER, 1994).

A otite externa é a inflamação parcial ou total do conduto auditivo externo (orelha externa) (SCHMIDLIN et al., 2010). Nos cães, esta otopatia é caracterizada por uma secreção auricular, e apresenta lesões que são capazes de envolver o pavilhão auricular e a pele ao redor da orelha com escoriações. Devido à secreção, pode levar a um quadro de dermatite piotraumática ou otohematoma (JERO et al., 2001; MATOUSEK, 2004).

A otite média é definida como doença inflamatória presente na cavidade da orelha média, podendo ou não ser infecciosa. Essa inflamação pode ocorrer devido à ruptura da membrana timpânica. Ocorre em alguns casos após cicatrização desta membrana, pois os animais podem ter sofrido ruptura da membrana timpânica que cicatrizou, deixando bactérias e leveduras presas na bula timpânica. Por isso, mesmo com a membrana intacta não se pode descartar otite média (JACOBSON, 2002; GOTTHELF, 2007). Foram criados modelos experimentais de infecção da orelha média, permitindo o estudo eletrofisiológico e anatomopatológico da cóclea. Esses autores afirmaram que perdas auditivas neurossensoriais, permanentes ou não, poderiam ser o resultado de um processo inflamatório da orelha média. Eles observaram lesão nas células ciliadas externas na base da cóclea em casos de otite média, bem como evidências de uma permeabilidade da membrana da janela redonda para substâncias tóxicas da orelha média. A otite interna é relativamente comum no cão e provem do resultado da extensão da infecção da orelha média. Pode ser observada perda da função dos órgãos da orelha interna, cóclea ou aparelho vestibular (JACOBSON, 2002; GOTTHELF, 2007). As otites média e interna aparecem em menor frequência, mas também assumem importância clínica,

sobretudo devido à dificuldade no diagnóstico, e à relutância na reversão do quadro clínico (WHITE et al., 2006).

A maioria das perdas auditivas adquiridas ou congênitas decorre de dano ou perda das células ciliares da cóclea ou dos seus neurônios associados. A irreversibilidade da surdez em mamíferos ocorre devido à incapacidade de substituição das células perdidas, seja por divisão celular ou por regeneração de células endógenas no epitélio da orelha interna (BARBOZA JR; OITICICA; BATISSOCO, 2008). Clinicamente, a função das células ciliadas que foram perdidas pode ser parcialmente restaurada por estímulo elétrico do nervo auditivo, sendo possível com o uso de implantes cocleares (TATEYA et al., 2003).

O implante coclear é um dispositivo eletrônico com uma tecnologia sofisticada, capaz de substituir o órgão sensorial da audição, proporcionando aos seus usuários a sensação auditiva. Geralmente usado em portadores de surdez neurosensorial de graus severo e profundo (BENTO et al., 2004; CAROLINA; SILVA; ARAÚJO, 2007). Sua função é converter a energia sonora em baixos de níveis de corrente elétrica para estimular o nervo auditivo, ultrapassando as células ciliadas lesionadas na orelha interna. Com isso o implante coclear se tornou cada vez mais um tratamento eficaz para pessoas com deficiências auditivas, ainda nesse mérito surgiram diversos estudos para entender as melhorias e habilidades auditivas do implante coclear (NOBLE et al., 2008). No entanto apesar do avanço da biotecnologia relacionada a esses transplantes em humanos, o uso da terapia celular em animais surgiu como uma possibilidade para o tratamento desta doenças uma vez que não há condições de realizar esta técnica em animais, principalmente em cães onde essa doença é tão frequente quanto em humanos.

Os cães são ótimos modelos animais experimentais para o tratamento de doenças que se assemelham a espécie humana. O modelo animal é potencialmente usado em todos os campos das pesquisas biológicas atualmente, sendo fundamental nos avanços científicos. O uso de animais de experimentação tornou-se obrigatório antes da realização dos mesmos, em seres humanos, a relação entre a espécie humana e animais de outras espécies ganhou contornos mais definidos, (VIEIRA; HOSSNE, 1998).

Existem diversas razões para utilizar o cão em estudos de doenças humanas. Mais da metade das aproximadamente 400 doenças hereditárias caninas são equivalentes às doenças humanas, incluindo cardiopatias (GOMATHI DEVI et al.,

2009), distrofia muscular (AMBROSIO et al., 2007), câncer de próstata (TOLEDO et al., 2010) e otites e surdez (CUNHA et al., 2003).

Assim como em primatas não-humanos, os cães são um modelo muito valioso em estudos na medicina humana. Por apresentar um longo período de vida, estes animais permitem o estudo, a longo prazo tal como a terapia gênica (HORN et al., 2004).

4.5 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco podem ser definidas pela sua capacidade de auto-renovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos e também possui capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (GAGE, 2000; MIMÉAULT; BATRA, 2006; TROUNSON, 2006).

As células-tronco podem ser classificados de acordo com o período que foram isoladas, podendo ser incluídas em três categorias: embrionária, fetal e adulta. Quanto ao seu potencial de diferenciação podem ser: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (GAGE, 2000). As totipotentes possuem capacidade de gerar todos os tipos celulares incluindo os anexos extra-embrionários; as pluripotentes possuem capacidade de se diferenciar nas três camadas germinativas, contudo não são capazes de diferenciar nos anexos extra-embrionários, e as multipotentes, tem a capacidade de originar apenas um sub-grupo de linhagens celulares, tendo uma capacidade limitada de diferenciação (PERA; REUBINOFF; TROUNSON, 2000; SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005).

Inicialmente as células tronco mesenquimais (CTM), foram isoladas da medula óssea de guinea-pig por Friedenstein et al. (1970). No entanto Dominici et al. (2006) definiu três critérios para poder classificar células-tronco mesenquimais, sendo: aderência ao plástico, capacidade de expressar marcadores tais como, CD105, CD73 e CD90 e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou HLA de classe II, e capacidade de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, condrocitos e adipocitos.

Nos últimos anos, a terapia celular dominou a mídia e as esperanças dos pacientes portadores de doenças incuráveis sem perspectivas de tratamento eficaz pelos meios convencionais atualmente estabelecidos. Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria (WENCESLAU, 2009).

Células isoladas da orelha interna foram estudadas em aves onde foi possível observar a recuperação estrutural e funcional da audição após trauma acústico ou medicamentoso em aves (CORWIN; COTANCHE, 1988). Após a morte das células ciliadas, as células de suporte não sensoriais recebem sinais moleculares ou genéticos, desencadeando proliferação e transdiferenciação em células ciliadas imaturas, ocorrendo a reinervação das células ciliadas (MATSUI; RYALS, 2005). No entanto em mamíferos essa reparação espontânea que ocorre nas aves não acontece, com isso diversos estudos surgiram nesse campo para tentar entender como ocorre este processo reparador. Mizutari et al. (2013). demonstrou em seus estudos que através da inibição da via de sinalização Notch novas células ciliadas podem ser induzidas resultando na recuperação parcial da audição. Wang et al. (2006) estudando cóclea de rato recém-nascido, demonstrou que essas células possuem capacidade de formar esferas com capacidade de proliferação em cultura, podendo expressar genes expressos em células ciliadas como Myosina VIIa e Espin. Esses dados, sugeriu que a formação dessas células em esferas, poderia gerar células ciliadas, as quais poderiam reconstruir as células ciliadas da cóclea danificada.

Estudos realizados por Malgrange et al. (2002) demonstraram que as células derivadas do órgão de Corti de ratos recém nascidos quando cultivadas em placas não aderentes e induzido com fator de crescimento epidérmico (EGF) e/ou fator de crescimento fibroblástico (FGF2) são capazes de formar esferas. Essas esferas demonstram propriedades de auto-renovação, proliferação e expressão de marcadores genéticos característicos do desenvolvimento embrionário da orelha interna e do sistema nervoso, e diferenciação em diferentes tipos celulares incluindo células ciliadas de suporte. Entretanto Lou et al. (2007) estudando a cóclea e o órgão de Corti de ratos jovens que ainda encontravam-se imaturos ou seja, não tinham completado todo o processo de diferenciação, quando induzidos também com fatores de crescimento tornaram-se esferas. Tais esferas possuíam células-tronco multipotentes com a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de

células da orelha interna sugerindo assim, utilização destas células na regeneração das células lesionadas da orelha interna.

Li et al. (2003) determinou que o epitélio utricular de mamíferos adultos contém células que exibem os traços característicos de células-tronco. Estas células tronco da orelha interna têm a capacidade de auto-renovação, e formam esferas que expressam genes marcadores da orelha interna e do sistema nervoso como Pax-2, BMP4, BMP7, MyoVIIIa, Brn3.1, GAPDH e Nestin, podendo concluir que essas células troncos são capazes de se diferenciar em células semelhantes a células sensoriais.

As pesquisas envolvendo células-tronco estão cada vez mais em pauta, uma vez que elas podem contribuir para compreensão de diversas doenças existentes sem cura pelos métodos convencionais. Sendo assim esses estudos possibilitam o entendimento de vias de sinalização e aperfeiçoam técnicas terapêuticas. Com isso o uso das células tronco pode ser visto atualmente como um modelo de pesquisa necessário para fornecer novos conhecimentos de biologia básica que visam uma melhora na qualidade de vida dos seres humanos e animais.

5 MATERIAL E METODO

5.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados oito fetos de cães com aproximadamente 40 dias de gestação, provenientes de campanhas de castração realizadas no estado de São Paulo na cidade de São Paulo. As coletas foram realizadas de acordo com os princípios recomendados pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) (nº 2947/3013). Durante as coletas os úteros foram retirados e levados para o laboratório de cultivo celular do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP. Todos os procedimentos de coleta foram realizados dentro de fluxo laminar.

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Para análise da idade estimada dos fetos, foi realizado o Crown-Rump dos mesmos. A mensuração dos animais estendeu-se da crista nugal até à última vértebra sacral (EVANS; SACK, 1973). Para o processamento microscópico, o crânio do indivíduo foi aberto e o osso temporal foi dissecado expondo a cápsula da cóclea, sendo ambas as cócleas direita e esquerda dissecadas. Após, a coleta o material foi desidratado em uma série crescente de etanóis, de 70 a 100%, e diafanizado em xilol. Em seguida, o material foi incluído em paraplast (Paraplast Embedding Media-Paraplast Plus, Oxford Lab., USA). Os cortes de 5µm foram feitos em micrótomo automático LEICA RM 2125RT, e corados por hematoxilina-eosina (H.E).

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, e lavadas em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4, em seguida as amostras selecionadas foram fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido de desidratações a seco em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente o material foi colocado em um suporte metálico para revestimento em ouro ("sputtering" Emitech K550). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

5.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram realizadas reações de imunohistoquímica em cortes de cóclea para Nestin (1:500, sc-33677, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), B-tubulina (1:700, sc-4775, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Sox-2 (1:100, sc-17320, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e Myosina VIIa (1:50 ab3481 abcam Inc, Reino Unido). O controle negativo das reações imunohistoquímicas foi realizado utilizando o IgG (1:300, Goat anti-mouse IgG-AP 308F, Chemical International, Temecula, California, USA). Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, e na segunda passagem de etanol 100% os cortes tiveram a peroxidase endógena bloqueada em 3% H₂O₂ em etanol 100%, por 20 minutos. Estes cortes foram então hidratados em concentrações decrescentes de etanol, e em seguida foram tratados com tampão citrato 0,1M pH 6,0 e irradiados em microondas de uso caseiro, na potência máxima (700MHz), três vezes durante cinco minutos. Depois, os cortes foram equilibrados em tampão fosfato-salina (PBS) 0,1M pH 7,4 onde o bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com o kit Dako ProteinBlock (X 0909, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) por 20 minutos. As inclusões com anticorpos primários foram realizadas em câmara úmida overnight à 4°C. Após esse período, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase Kit Dako LSAB (K 0690, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos, seguido de streptoavidina do mesmo Kit também por 30 minutos. A reação

foi visualizada pela adição do revelador DAB (Revelador Líquido DAB + SubstrateChromogen System, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) de 60 a 90 segundos, seguido de contra-coloração com hematoxilina e montagem em Permount (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA).

5.5 CULTIVO CELULAR DE EPITÉLIO COCLEAR

5.5.1 Isolamento e cultivo das células da cóclea

Dentro do fluxo laminar, os fetos de cães tiveram o crânio dissecado até a porção petrosa do osso temporal onde se localiza a cóclea, sendo realizada uma micro dissecação do ducto coclear para obtenção de células do epitélio. Os fragmentos foram lavados duas vezes em PBS contendo 10% de penicilina e estreptomicina (LGC Biotecnologia, Cat. BR30238-01, Cotia, São Paulo). Em seguida, com auxílio de bisturi foi realizada a dissociação mecânica do tecido, os explantes foram depositados em placas de Petri de 100mm (Corning, Cat.3296, NY, USA), emergidos em soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Cat. BR330110-01, Cotia, São Paulo) por 4 horas, mantidos em estufa a 37° C e 5% de CO². Após este período de quatro horas, era acrescentado 10 ml de meio de cultivo. Foram testados três meios de cultivo: ALPHA-MEM (LGC Biotecnologia, Cat. BR3007-05, Cotia, São Paulo), DMEM-High Glucose (LGC Biotecnologia, Cat. BR30003-05, Cotia, São Paulo) e DMEM-F12 (LGC Biotecnologia, Cat. BR30004-05, Cotia, São Paulo), suplementados com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicillina e streptomicina, 1% e aminoácidos não essenciais (LGC Biotecnologia, Cat. BR30238-01, Cotia, São Paulo). Após 24 horas de cultivo já se observava as primeiras células aderentes. Em média a cada cinco dias era possível obter uma confluência de 80% onde as células eram tripsinizadas. Para tanto, as células eram lavadas com PBS e acrescentado tripsina 0,25% (LGC Biotecnologia, Cat. BR30042-01, Cotia, São Paulo) e mantidas por cinco minutos na estufa a 37°C. Ao final, para neutralizar a tripsina colocava-se a mesma quantidade de meio de cultura e centrifugava por

cinco minutos a 1200 rpm, para então expandir as células. Todos os experimentos foram realizados na passagem 4.

5.5.2 Análise morfológica

Para a análise morfológica das células derivadas do epitélio coclear, as amostras foram avaliadas a cada 3 dias através de um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100). As células foram avaliadas periodicamente até serem congeladas, desta maneira foi possível observar e descrever as variações morfológicas durante seu crescimento.

5.5.3 Teste de viabilidade celular de criopreservação celular

Alíquotas de 1×10^6 células derivadas de epitélio coclear foram congeladas para realização de experimentos futuros. As células foram tripsinizadas como já descrito anteriormente e aproximadamente um milhão de células foram ressuspendidas em 1,5 ml de meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (LGC Biotecnologia, Cat.13-0091.01, Cotia, São Paulo) igualmente distribuídas em criotubos (Corning, Cat.430055, NY,USA). Seguido este procedimento, os criotubos foram transferidos para o aparelho Mister Froozen e mantidas em freezer -80°C overnight. Depois de 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados.

Quando necessário, as células foram submetidas ao descongelamento rápido no banho-maria a 37°C . Depois de descongelada, a suspensão celular contida nos criotubos foi transferida para tubos cônico de polipropileno de 15 ml (Corning, Cat.430055, NY,USA) contendo aproximadamente 5 ml de meio de cultivo. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em meio de cultivo, transferidas para garrafas e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C para expansão celular.

5.5.4 Ensaio de avaliação do metabolismo celular pelo método colorimétrico-MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, descrito por Carmicheal et al. (1987), consiste na redução do MTT (3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide]), composto de coloração amarela, pela enzima desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), presente somente em células viáveis. O experimento foi realizado durante 7 dias, utilizando três meios de cultivo diferentes: DMEM-HIGH, ALPHA-MEN e DMEM-F12, sendo feitas as leituras no primeiro, quarto, sétimo e sétimo dia. Para tanto, 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 wells em um volume de 210 μ L/poço para cada dia de experimento. Em cada dia de experimento, o meio de cultura foi removido, e em seguida adicionado 100 μ l de meio novo e mais 10 μ l da solução A de MTT (Life Technologies, Cat. V-13154, Carlsbad, CA, USA) (1 mL de PBS diluído na solução A de MTT 5mg). Essa mistura foi incubada por 4 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período, acrescentou mais 100 μ l da solução B (0,01M HCl diluído em 10 ml de água destilada e acrescentados na solução B de MTT 1g), permanecendo por mais 4 horas a 37 °C, protegido da luz. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (MQuant– Bio Tek Instruments, VT, USA) no comprimento de onda de 545 nm.

5.5.5 Análise das fases do ciclo celular

As células foram retiradas do cultivo e centrifugadas por 5 min a 1500 rpm, após este período o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão para citometria (FACS FLOW - BD). Do mesmo modo as células foram centrifugadas durante 3 min a 2000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas com o máximo de cuidado em 1mL de etanol 70% RNase, transferidas para microtubos e armazenadas à uma temperatura de -20°C. As células foram tratadas com 40 mg/ml (PI), 10mg/ml (RNase A), e as amostras

analisadas no citometro de fluxo FACS Arial Cell Sorter (Becton Dickinson, San Jose, Califronia, USA) e analisadas pelo software Modfit 2.9.

5.5.6 Caracterização celular por imunocitoquímica

Primeiramente, 1×10^4 células provenientes do cultivo celular de epitélio coclear foram plaqueadas em placas de cultivo de 24 wells, as quais continham lamínula de vidro. Quando as células atingiram confluência de 80% todo meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas com PBS por 2 vezes e acrescentado paraformoldeído 4% por 30 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas em solução de TBS (Tampão Salino de Tris) por 2 vezes para a retirada de todo paraformoldeído. Em seguida, foi adicionado Triton a 0,1%, nos anticorpos nucleares como Nanog (n-17, sc30331, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e OCT-4 (sc-4420, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) até cobrir toda a superfície da lamínula por 10 minutos, para promover a permeabilização da membrana celular. Posteriormente, as células foram novamente lavadas 2 vezes com solução de TBS. Para evitar reações inespecíficas, foi utilizado a solução de 5% de soro fetal bovino e 0,1 % de Triton diluídos em TBS durante 60 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as células foram incubadas “overnight” a 4°C com anticorpos primários sendo eles anti-mouse: Vimentina (sc-73259, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD73 (sc-14684), (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), OCT-4 (sc-4420, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Nestina (sc-33677, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), STRO-1 (sc-47733, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), VEGF (ab1316, Diluição 1:100, Cambridge, UK) e β -tubulina (sc-47751, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e CD117 (A4502, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), Myosina VIIa (ab3481 abcam Inc, Reino Unido) Tra-1 (sc-21705, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) diluídos em PBS na proporção de 1:50. Passado este período, as células foram lavadas 3 vezes com TBS, e incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG mouse-conjugado a FITC, anti-IgG goat-conjugado a FIT e anti-IgG rabbit-conjugado a FIT) na diluição de 1:500 por 30 minutos em câmara escura. As células foram novamente lavadas com TBS por 3 vezes e posteriormente montadas com solução de montagem Vectashield com DAPI

(ABCYS, Paris France). As células foram observadas no microscópio de fluorescência LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) em objetivas de 20x e 40x.

5.5.7 Caracterização celular por citometria de fluxo

Para análise imunofenotípica foi utilizado o método de citometria de fluxo. As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBSA na concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas com anticorpos primários (diluição de 1:100) por 30 minutos a 4°C. Após este período as células foram incubadas com o anticorpo secundário (diluição 1:500) por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas e analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, USA). O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas e células marcadas apenas com o anticorpo secundário inespecífico. Para cada amostra, foram contados 10000 eventos. Os anticorpos primários utilizados foram: Nanog (n-17, sc30331), OCT-4 (sc-4420), Sox-2 (sc-17320), TRA-1-60 (sc-21705), Vimentina (sc-73259), Citoqueratina 18 (RGE53, sc-32329), β -tubulina (sc-47751), Stro-1(sc-47733), CD73 (sc-14684), CD90, CD105 (ab53321), CD 117(A4502, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), CD34 (BD555824, inc. E.U.A), VEGF (ab1316), Nestina (sc-33677) e Myosina VIIa (ab3481).

5.6 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

5.6.1 Diferenciação Adipogênica e Osteogênica

Para a diferenciação adipogênica e osteogênica foram plaqueadas 1×10^4 células para teste e 1×10^3 células para controle sendo cultivadas em placas de 24 wells contendo lamínula de vidro. A diferenciação iniciou quando as células atingiram

confluência de 80%. Primeiramente, o meio de cultivo foi removido e adicionou-se 1 ml de meio de indução (adipócitos ou osteócitos) para os testes e para os controles adicionou-se somente DMEM-HIGH, 15% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. As placas foram reincubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado 2 vezes por semana. O meio utilizado para troca continha o dobro da concentração dos agentes indutores. As amostras foram cultivadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 21 dias até a diferenciação celular, e monitoradas em microscópio de luz invertido (Nikon Eclipse TS-100).

O meio utilizado para a indução da diferenciação osteogênica era composto por ALPHA-MEM suplementado com 7,5% de Soro Fetal Bovino comum, 100 µM de ácido ascórbico (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 mM de beta-glicerolfostato (Sigma, St. Louis, Mo. USA) e 0,1mM de dexametasona (Decadron injetável, Schering-Plough, SP, Brasil) em cada poço. As células diferenciadas em osteócitos e os seus controles foram fixados em paraformaldeído a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram coradas com a coloração de Von Kossa e Alizarina Red e a seguir, montadas em permout.

A diferenciação adipogênica foi induzida adicionando ALPHA-MEM suplementado com 7,5% SBF, 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 100 µM de indometacina (Sigma-Aldrich) e 1 mM de dexametasona em cada poço (Decadron injetável, Schering-Plough, SP, Brasil). As células diferenciadas em adipócitos e os seus controles foram fixados em solução de paraformaldeído a 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente, e após, lavados em água destilada e incubados em álcool 70% por 2 a 3 minutos e coradas com a coloração Oil Red.

5.6.2 Diferenciação Condrogênica

Para a diferenciação em condrócitos uma suspensão celular contendo 10⁶ células indiferenciadas, foi ressuspensa em 2 ml de meio indutor (StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit / GIBCO – Invitrogen cell culture) em um tubo cônico de polipropileno de 15 mL e então, centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos. O botão celular obtido foi cultivado no próprio tubo, em estufa úmida, a 37°C com 5%

de CO₂ e a metade do meio de cultivo foi cuidadosamente removido e um 1 ml de meio novo de indução adicionado 2 vezes por semana. Após 21 dias, a amostra foi lavada com PBS e fixada em solução de paraformaldeído 4% por 2 horas. A seguir, a amostra foi desidratada em banhos sucessivos de álcool a 50, 70, 90%, seguidos de três banhos a 100% com duração de 10 minutos cada. Na sequência, receberam dois banhos de xilol com duração de 2 minutos, respectivamente, e então, foi colocada em banho com *paraplast* líquido a 60°C, em estufa seca, por 30 minutos e incluída em *paraplast*. Foram realizados cortes de 4 µm os quais foram colocados sobre lâminas de vidro. Na sequência, foram coradas com: Hematoxilina-Heosina, Tricromo de Masson e Picrosírius. (JUNQUEIRA et al., 1979; TOLOSA et al., 2003).

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA CÓCLEA

As análises macroscópicas realizadas em fetos de cães com aproximadamente 40 dias gestacionais, mostraram que a cóclea encontrava-se localizada dentro da porção petrosa do osso temporal, sendo que sua estrutura nesse período era totalmente identificada em formato de cartilagem, a qual posteriormente seria substituído por tecido ósseo. Internamente, foi possível observar o ducto coclear (Figuras 2A e 2B). Mediante análise de microscopia de varredura verificou-se a presença dos giros cocleares em formato de caracol e das células ciliadas externas (Figuras 2C e 2D análise microscópica observou-se as divisões da porção interna da cóclea, onde foram identificados os giros cocleares, divididos nas seguintes porções: escala vestibular, ducto coclear e escala timpânica. A escala vestibular era revestida por epitélio pavimentoso simples, e uma camada de tecido conjuntivo. O ducto coclear apresentou formato triangular, sua base formava uma região com células diferenciadas denominadas estria vascular. Dentro do ducto coclear verificou-se a presença do órgão de “corti”, o qual repousava sobre a membrana basilar. O labirinto ósseo era a estrutura que formava a escala vestibular e a escala timpânica, sendo que no ápice da cóclea ambas se uniam formando a helicotrema (Figura 2E e 2F).

Figura 2 - Análise morfológica da cóclea de fetos de cães com 40 dias gestacionais

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Em [A] observamos imagem macroscópica da cóclea, notar: cápsula coclear (seta) e modíolo (MO). Em [B], [C] e [D] microscopia eletrônica de varredura da cóclea. Observar em [B] osso temporal (Ot) envolvendo a cóclea (C), em [C] ápice da cóclea (pontilhado) e giros cocleares (seta) e em [D] células ciliadas externas (Ce) evidenciadas pela seta. Em [E] e [F] análise histológica da cóclea. [E] evidenciar o ápice da cóclea (A) e os giros cocleares (G) e nervo coclear representado pela seta; [F] escala timpânica (Et), ducto coclear (Dc) e escala vestibular (Ev).

6.2 IMUNOHISTOQUÍMICA DA CÓCLEA

Nas análises de imunohistoquímica do tecido coclear utilizou-se os seguintes marcadores: Nestina, sendo um marcador de células neuronais; β -tubulina, marcador de citoesqueleto; Sox-2, marcador de células pluripotentes e Miosina VIIa marcador de células ciliadas. Notou-se marcação imunopositiva para Nestina, marcador citoplasmático para células-tronco neuroepiteliais durante o período de embriogênese no epitélio coclear (Figura 3 A). Na sequência, obteve-se também imunomarcação para o marcador β -tubulina também foi expresso no citoplasma de citoesqueleto de células neurais (Figura 3 B). Obteve-se expressão imunopositiva para o marcador nuclear Sox-2, sendo ele responsável pelo desenvolvimento do epitélio sensitivo e células suporte da orelha interna (Figura 3 C). Por fim verificou-se expressão positiva para o marcador citoplasmático Myosina VIIa, anticorpo específico para células ciliadas (Figura 3 D).

Figura 3 – Análise de imunohistoquímica do tecido cóclear de fetos de cães com 40 dias gestacionais

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Em [A] notar intensa marcação para Nestina, [B] expressão positiva para B-tubulina, [C] marcação imunopositiva para Sox-2 e [D] para Miosina VIIa. Em [E] controle negativo das análises de imunohistoquímica. Aumento de 40x.

6.3 ISOLAMENTO DAS CELUAS DERIVADAS DE FETOS DE CÃES E CULTIVO CELULAR

O método de isolamento utilizado foi o de explante celular, mediante identificação do tecido da cóclea, e dissociado em pequenos fragmentos, os quais foram colocados em placas de cultivo. Foi adicionado soro fetal bovino para aderência do material na placa. Após 12 horas deste procedimento, adicionou-se o meio de cultura, complementado com suplementos necessários para o crescimento celular.

Nas coletas primarias cultivou-se células derivadas da cóclea de fetos de cães em três meios diferentes sendo eles DMEM-HIGH GLUCOSE, ALPHA-MEM e DMEM-F12, verificando que o melhor crescimento para o meio DMEM-HIGH (Figura 4A). Neste meio observou-se um melhor crescimento de células na placa, apresentando tais células morfologia característica de fibroblasto. Em contrapartida os demais meios ALPHA-MEM e DMEM-F12, um crescimento celular reduzido, com uma morfologia disforme (Figura 4 B e 4 C).

Após 24 horas da adição do meio de cultivo, verificou-se as primeiras células liberadas a partir dos fragmentos do explante coclear (Figura 4 D). No primeiro dia após a liberação das células do explante, estas atingiram confluência de 50% (Figura 4 E). A confluência de 80% das células foi observada a partir do segundo dia, e, portanto a partir deste período realizava-se a tripsinização (Figura 4 F).

As células foram cultivadas até a passagem 4 (P4) para a realização dos experimentos, sendo o meio de cultivo trocado a cada dois dias.

Figura 4 - Análise cultivo celular da cóclea de feto de cão com 40 dias gestacional

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Análise do cultivo celular primário utilizando diferentes meios DMEM-HIGH glicose, ALPHA-MEM, DMEM-F12, representados pelas figuras [A], [B] e [C] respectivamente. Notar em [A] confluência de células e formato fibroblastóide (seta), em [B] e [C] pouca confluência celular (halo) com células disformes (setas). Em [D] explante celular (Ex) liberando células (halo). [E] representação do cultivo primário com 50% de confluência celular. [F] observa-se 80% de confluência celular no cultivo primário. O meio de cultivo utilizado nos cultivos das figuras D, E e F foi o DMEM-HIGH Glicose. Aumento em A, B, D, E e F de 4x e em C 10x.

6.4 MORFOLOGIA CELULAR

As células derivadas do epitélio coclear de fetos de cães foram cultivadas até a passagem 4. Durante este período de cultivo as células eram fotografadas a cada 3 dias para análise morfológica. Através das imagens documentadas e da análise por microscopia eletrônica de varredura, observou-se que as células apresentavam formato fibroblastóide com citoplasma alongado e núcleo centralizado característico desse tipo celular. Este formato fibroblastóide foi prevalente nas células desde a passagem 1 (Figura 5 A e 5 B) até a passagem 4 (Figura 5 C e 5 D), não apresentando mudanças em sua morfologia.

Figura 5 - Análise morfológica das células da cóclea de feto de cão

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Em [A] cultivo celular, evidenciando o formato fibroblastóide (seta), em [B] microscopia eletrônica de varredura das células, notar o citoplasma alongado com ramificações (seta branca) e núcleo centralizado (seta preta). Em [A] e [B] células na passagem 1. Em [C] cultivo celular apresentando células fibroblastóides (seta) e [D] microscopia eletrônica de varredura demonstrando morfologia celular com ramificações no citoplasma (seta branca) e núcleo centralizado (seta preta). Em [C] e [D] células na passagem 4. Notar que em ambas as passagens não houve diferenças morfológicas. Aumento em [A] e [C] 4x.

6.5 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR DE CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR

Para averiguar a capacidade das células serem criopreservadas e continuarem tendo a mesma viabilidade de antes, realizou o teste de criopreservação. Para isso alíquotas de 1×10^6 de células foram congeladas.

Posteriormente as mesmas foram descongeladas em banho maria a 37°C . Durante a metodologia empregada esta solução de descongelamento foi transferida para um tubo falcon com 3 mL de meio de cultivo, sendo centrifugados a 1200rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e seu pellet foi ressuspensionado em meio de cultivo e acondicionado em garrafas de cultura.

Após o descongelamento as células apresentavam característica morfológica fibroblastoíde assim como antes do congelamento. Mantiveram também a mesma capacidade de crescimento, permanecendo uma confluência de 80% com dois dias de cultivo como observada anteriormente. As células foram congeladas na passagem 1 e somente descongeladas para realização dos experimentos (Figura 6 A e 6 B).

Figura 6 - Análise de viabilidade celular após descongelamento

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: [A] observa-se morfologia das células em cultivo primário antes de serem congeladas. [B] representação do cultivo celular após o descongelamento das células, onde sua morfologia esteve preservada mesmo depois do seu descongelamento. Aumento em [A] 4x e [B] 10x.

6.6 ATIVIDADE METABÓLICA CELULAR, REALIZADA MEDIANTE A UTILIZAÇÃO DO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT

A análise da atividade metabólica realizada pelo método colorimétrico MTT, evidencia se há atividade metabólica nas células, ou seja, se elas permanecem viáveis. No presente estudo essas análises foram realizadas durante sete dias, sendo feitas as leituras a cada três dias. Para este teste analisou-se a viabilidade celular nos seguintes meios: DMEM-HIGH glicose, ALPHA-MEM e DMEM-F12.

O gráfico 1 demonstra a atividade metabólica das células cultivadas em meio DMEM-HIGH glicose. Observa-se neste gráfico que houve um crescimento progressivo durante todo o período analisado.

No gráfico 2 observamos a atividade metabólica das células cultivadas em meio ALPHA-MEM, tendo um crescimento contínuo até o quarto dia, seguido de um crescimento não significativo até o sétimo dia.

No gráfico 3, as células foram cultivadas em meio DMEM-F12, apresentando um crescimento similar as células cultivadas em ALPHA-MEM. As células mantiveram um crescimento linear até o quarto dia seguido de uma redução no seu crescimento até o final do experimento.

Gráfico 1 - Ensaio de viabilidade de células progenitoras de cóclea de feto de cão com 40 dias gestacionais na passagem 4. Células cultivadas em meio DMEM-HIGH glicose e analisadas pelo método colorimétrico MTT. Amostras triplicadas analisadas durante 7 dias

Gráfico 2 - Ensaio de viabilidade de células progenitoras de cóclea de feto de cão com 40 dias gestacionais na passagem 4. Células cultivadas em meio ALPHA-MEM e analisadas pelo método colorimétrico MTT. Amostras triplicadas analisadas durante 7 dias

Gráfico 3 - Ensaio de viabilidade de células progenitoras de cóclea de feto de cão com 40 dias gestacionais na passagem 4. Células cultivadas em meio DMEM-F12 e analisadas pelo método colorimétrico MTT. Amostras triplicadas analisadas durante 7 dias

6.7 ANÁLISES DAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR

As fases do ciclo celular de células derivadas da cóclea de feto de cão em P2, apresentaram os seguintes valores: 4,69% de debris celular, 78,42% fase G0G1, no qual as células encontram-se em período de interfase celular, 0,31% na fase S ocorre a duplicação do DNA, e 21,27% de G2M fase responsável pela divisão celular. Em P3 foram obtidos os seguintes dados: 8,49% debris celular, 20,18 % G0G1, 16,79 S e 63,03 G2M. Na sequência foram analisados os dados em P4, 4.89 % debris celular, 41.05 % G0G1, 13.74 % S e 45.21 % G2M. Finalizando este experimento foram analisadas as células em P5: 14,44% debris celular, 65,77% G0G1, 26,14% S e 8,09% G2M. Assim como representados pela figura 6.

Figura 7- Análise das diferentes fases do ciclo celular

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Análise das fases do ciclo celular em diferentes passagens provenientes da cóclea de feto de cão. Em A, B, C e D: análises realizadas nas seguintes passagens 2, 3, 4 e 5 respectivamente.

6.8 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR IMUNOCITOQUÍMICA

Realizou-se a técnica de imunocitoquímica para analisar diferentes marcadores celulares. Verificou-se a expressão positiva para marcadores de células mesenquimais, CD73 (Figura 8 A) e Stro-1 (Figura 8 B). Marcação imunopositiva para Vimentina (Figura 8 C), marcador de estrutura celular; β -tubulina (Figura 8 D), expresso em citoesqueleto de células neuronais; Miosina VIIa (Figura 8 E), de células ciliadas e Nestina (Figura 8 F) células precursoras neuronais.

Constatou-se marcação positiva para os anticorpos: VEGF (Figura 9 A) de fator de crescimento endotélio vascular; CD117 (Figura 9 B) de células precursoras hematopoiética e para marcadores de pluripotência como Oct-4 (Figura 9 C) e Tra-1 (Figura 9 D).

As marcações observadas nas imagens foram realizadas em DAPI na coloração azul, representando o núcleo celular. E em verde em FITCH corando o citoplasma das células.

Figura 8 - Fotomicrografia de imunocitoquímica de células de cóclea

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Expressão de marcadores nas células de cóclea de feto de cães com 40 dias gestacionais. Notar expressão imunopositividade para marcadores de células-tronco mesenquimais, para estrutura celular, células ciliadas e células precursoras neuronais. Em [A] Stro-1, [B] CD73, [C] B-tubulina, [D] Vimetina., [E] Miosina VIIa, [F] Nestin. Em azul Dapi marcando o núcleo das células e em verde FITCH citoplasma celular.

Figura 9 - Fotomicrografia de imunocitoquímica de células de cóclea

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Expressão de marcadores nas células de cóclea de feto de cães com 40 dias gestacionais. Notar expressão imunopositividade para marcadores de fator de crescimento endoteliore vascular, para células precursoras hematopoiética e para pluripotência. Em [A] VEGF, [B] CD117, [C] Oct-4, [D] Tra-1. Em azul Dapi marcando o núcleo das células e em verde FITCH citoplasma celular.

6.9 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a análise de citometria de fluxo, células progenitoras de cóclea de fetos de cães foram analisados para os seguintes marcadores: Marcadores de citoesqueleto podendo observar marcação negativa para Vimentina (0%) e marcação positiva para Citoqueratina 18 (42,5%) e β -tubulina (29,5%). Marcadores mesenquimais apresentaram marcação considerável para Stro-1 (28,6%) e CD105 (21,2%), no entanto apresentaram marcação insignificante para CD73 (3,64%) e CD90 (3,64%) (Figura 10).

Houve uma alta expressão para marcadores de fator de crescimento vascular VEGF (77,1%) e células precursoras hematopoiéticas CD117 (31,4%). No entanto marcação negativa para células hematopoiéticas CD34 (0,027%) e CD45 (0,457%). Para o marcadores de células progenitoras neuronais Nestin (0,054%) obtivemos expressão negativa, já para células ciliadas Miosina VIIa (39,1%) observou-se expressão positiva (Figura 11).

Quando testados os marcadores de pluripotência demonstraram expressão positiva para Tra-1 (14,7 %), alta marcação para Sox-2 (44,2%) e Oct-4 (38%) e expressão negativa para Nanog (0,073%) (Figura 12).

Figura 10 – Histograma da imunofenotipagem das células da cóclea por citometria de fluxo

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Obteve expressão positiva para marcadores de citoesqueleto (citoqueratina e β-tubulina), também observou-se expressão para marcadores de celular mesenquimais (STRO-1, CD-73, CD-90 e CD-105) e ausência de marcação para vimentina.

Figura 11 - Histograma da imunofenotipagem das células da cóclea por citometria de fluxo

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Observar níveis altos de expressão positiva para marcador de fator de crescimento vascular(VEGF), marcação positiva para células precursoras hematopoiéticas (CD-117), expressão positiva para marcador de células ciliadas (Miosina VIIa) e marcação quase nula de células hematopoiéticas (CD-45 e CD-34) e células precursoras neurais (Nestina).

Figura 12 - Histograma da imunofenotipagem das células da cóclea por citometria de fluxo

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: observar marcação positiva para os seguintes marcadores de células pluripotentes (Tra-1, Sox-2 e Oct-4) e expressão negativa para Nanog.

6.10 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Para a diferenciação celular, as células foram mantidas em cultivo durante 21 dias, sobre meios de cultivos específicos para a indução da diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Na diferenciação osteogênica observou-se mudança na morfologia celular, uma vez que estas células antes da diferenciação apresentavam formato fibroblastóide, e, após a indução estas perderam suas ramificações, apresentando uma matriz extracelular com pontos de calcificação. Isso foi possível ser analisado pela coloração de Von Kossa (Figura 13 A e 13 B), diferindo das células controles, as quais mantiveram a mesma morfologia anterior ao experimento (Figura 13 C).

Na diferenciação adipogênica, observou-se mudança da morfologia celular, apresentando um formato mais alongado, ocorrendo uma movimentação do núcleo para periferia da célula, e em seu citoplasma foram formadas vesículas de gordura características de adipocitos. Sendo assim, foi possível verificar essas características mediante a utilização da coloração Oil Red (Figura 13 D e 13 E). Nota-se a diferencia nas células induzidas para as células controles, as quais mantiveram a mesma morfologia fibroblastóide (Figura 13 F).

Para diferenciação condrogênica, as células foram mantidas em tubo falcon por 21 dias em formato de pellet. Pode-se notar pela coloração de hematoxilina e eosina (Figura 14 A), picrossírios (Figura 14 B) e tricrômio de masson (Figura 14 C) a formação de condrocitos, verificando também suas lacunas condrocitárias, diferindo portanto das células controles (Figura 14 D).

Figura 13 - Diferenciação osteogênica e adipogênica

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Em [A] e [B] diferenciação osteogênica, coradas com coloração de Von Kossa. Observar pontos de calcificação (seta) e matriz extracelular (Mc). Em [C] células controles da diferenciação adipogênica demonstrando morfologia fibroblastóide. Em [D] e [E] diferenciação adipogênica coradas com coloração Oil Red. Observar vesículas de gordura (setas) no citoplasma celular e núcleo das células deslocadas para periferia do citoplasma. Em [F] células controle da diferenciação adipogênica demonstrando formato fibroblastóide das células.

Figura 14 - Diferenciação condrogênica

Fonte: (SANTOS, 2015)

Legenda: Diferenciação condrogênica, coradas com hematoxilina-eosina [A], picrosírios [B] e tricômio de masson [C]. Observar células com formato arredondado semelhante a condrocitos, diferindo da morfologia das células controles [D].

7 DISCUSSÃO

O entendimento sobre a anatomia da orelha e seus constituintes é especialmente útil para o treinamento e experimentação em procedimentos tais como implantes cocleares, implantação de próteses auditivas, neurectomias translabirínticas, bem como em estudos sobre traumas acústicos, contribuindo deste modo par o desenvolvimento de novas pesquisas nesta área (SEIBEL; LAVINSKY; IRION, 2006).

Atualmente tem sido descritos trabalhos sobre a morfologia da cóclea em diferentes animais tais como a cobaia (ALBUQUERQUE et al., 2009), o rato (JERO et al., 2001), os primatas (*Callithrix sp*) (BORIN et al., 2008), o porquinho da Índia e os camundongos (COMPTON, 1973), buscando a sua aplicabilidade em pesquisas otológicas futuras.

Neste trabalho observamos que a cóclea do cão diferente da humana apresenta 3 giros completos (FERNANDEZ; BERNARDINI, 2010). No homem ela demonstra entre 2,5 - 2,75 giros, primatas não humanos apresentam 2,5 giros, enquanto que camundongos possuem 1,5 giros e os porquinhos da Índia demonstram 4,5 giros (COMPTON, 1973; BORIN et al., 2008;). Por meio da microscopia de luz, notou-se que a cóclea de cão é dividida nas seguintes estruturas: escala vestibular, ducto coclear e escala timpânica, sendo as mesmas estruturas presentes em outras espécies tais como em humanos (COMPTON, 1973), ratos (ALBUQUERQUE et al., 2009) camundongos e porquinhos da Índia (COMPTON, 1973; BORIN et al., 2008).

As células ciliadas externas, presentes no ducto coclear, tem sido alvo de pesquisas, as quais versam sobre sua capacidade de contração, sendo efetores cocleares ativos devido a sua eletromotilidade, ou seja, suas propriedades biomecânicas como, por exemplo, otoemissões acústicas (OLIVEIRA, 1993).

A nestina utilizada como um marcador de células imaturas foi utilizada neste estudo, pois a presença dos progenitores neurais durante o desenvolvimento inicial (CHAO et al., 2013), sugeria que na presente investigação expressão de epítomos de nestina poderia ser expressa no epitélio sensorial e no órgão de Corti de feto canino aos 40 dias. Resultados semelhantes foram encontrados durante o período embrionário de camundongo (CHAO et al., 2013). Assim pode-se inferir que está

expressão está relacionada com a plasticidade das células epiteliais, ou seja, com sua capacidade de se proliferar e se diferenciar.

As proteínas Sox compõem um grupo de fatores de transcrição que regulam diversos processos de desenvolvimento, sendo também um marcador de células-tronco, expresso em células progenitoras neurais (DABDOUB et al., 2008). Análise deste marcador no tecido coclear de fetos caninos demonstrou pouca marcação no tecido coclear, o que é justificado pelo fato deste marcador ser expresso em células progenitoras.

Entretanto no órgão de “Corti” e gânglio espiral observou-se a expressão das proteína tubulina, principal componente dos microtúbulos, o qual está presente nas células ciliadas. A seu turno, estudos realizados em ratos (BANERJEE et al., 2008), também demonstram a expressão desta proteína na região sensorial da cóclea - órgão de “Corti” que é a estrutura auditiva formada basicamente por células de sustentação, e células receptoras ciliadas, as quais por sua vez, são responsáveis por otoemissões acústicas (OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002).

Outro marcador expresso positivamente nas células ciliadas presentes no órgão de “Corti” de fetos de cães é a miosina VIIa, proteína essencialmente importante, uma vez, que reveste externamente os estereocílios, os quais movimentam-se de acordo com a vibração oriunda do ossículo estapédio da janela oval, movimentando assim o líquido que circunda as células ciliadas (PIATTO et al., 2005).

Estudos sobre caracterização das células do epitélio coclear contribuíram para o desenvolvimento de terapias inovadoras para reconstituir as células da cóclea, nos casos de perda auditiva neurosensorial. Não há autorregeneração destas células em mamíferos, que são responsáveis por conduzir impulsos elétricos ao gânglio espiral da cóclea, e, este conduz esses impulsos ao corte auditivo (MATSUI 2005). Trabalhos realizados na reconstituição das células ciliadas de mamíferos conseguiram demonstrar a regeneração tanto do aparelho auditivo como do aparelho vestibular (CORWIN; COTANCHE, 1988; RYALS; RUBEL, 1988; LOMBARDI et al., 1993).

De outra parte outras investigações demonstram que o transplante de células tronco para o tratamento da surdez neurossensitiva, revela um futuro promissor nesta área. Células tronco, embrionárias (CORRALES et al., 2006) e neurais (PARKER et al., 2007) tem sido aplicadas em experimentos para o tratamento da

surdez. Essa regeneração ocorre por um processo de transdiferenciação direta e mitótica, processo pelo qual a célula muda o destino, ou seja, células vizinhas às células ciliadas, que são células suporte, convertem-se em células ciliadas sendo induzidas mediante a inibição da via de sinalização NOTCH dando origem as células ciliadas (DOETZLHOFER et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2006). Artigos recentes demonstraram recuperação dessas células ciliadas cultivadas in vitro a partir de células derivadas da cóclea de feto de camundongo (DOETZLHOFER et al., 2004; WHITE et al., 2006; OSHIMA et al., 2007; SAVARY et al., 2007; SHI; KIRWAN; LIVESEY, 2012). Assim sendo, o material investigado nesta pesquisa poderá ser relevante para o tratamento da surdez em cães.

As células do epitélio coclear de fetos de cães foram isoladas pelo método de explante, onde o tecido foi mecanicamente dissociado. Este resultado difere-se de outros trabalhos que utilizaram células provenientes de cóclea e de outras estruturas da orelha interna na qual utilizaram como método a digestão enzimática. Este método foi observado nos estudos em camundongos, ele consiste na utilização de tripsina como agente dissociador do material (LI; LIU; HELLER, 2003; MARTINEZ-MONEDERO; EDGE, 2007; DIENSTHUBER; OSHIMA; HELLER, 2009), ou na utilização de collagenase (DOETZLHOFER et al., 2004), e ou a associação entre ambas (tripsina mais collagenase) (WHITE et al., 2012). Sabe-se que a utilização de tripsina como método de digestão enzimática conduz a uma cultura de células epiteliais que quando digeridas com collagenase, formam cultura de células fibroblastóides (ALCANTARA, 2010; PAROLINI et al., 2014). Na sequência testou-se os meios de cultivos mais citados na literatura para cultivo de células de cães, sendo eles DMEM-HIGH glicose (VAGS et al., 2009), ALPHA-MEM (BERTOLO et al., 2015) e DMEM-F12 (VAGS et al., 2009). Com isso cultivou-se células de cultura primária de cóclea com esses distintos meios, sendo possível observar que as células tiveram uma melhor aderência e crescimento além de uma morfologia mais semelhante a fibroblasto no meio DMEM-HIGH glicose, ao contrario das células cultivadas nos demais meios (ALPHA-MEM e DMEM-F12) que tiveram um crescimento retardado com baixa aderência celular e morfologia disforme. Esses resultados foram confirmados através do teste de atividade metabólica MTT, verificando maior atividade metabólica das células para o meio DMEM-HIGH glicose. No entanto os trabalhos já publicados em camundongos utilizando células da orelha interna diferem quanto à escolha do meio de cultura. Estes trabalhos utilizaram a

associação dos meios DMEM-HIGH glicose e DMEM-F12 (1:1) (LI; LIU; HELLER, 2003; DOETZLHOFER et al., 2004; MARTINEZ-MONEDERO; EDGE, 2007; SAVARY et al., 2007; YERUKHIMOVICH et al., 2007; DIENSTHUBER; OSHIMA; HELLER, 2009; WHITE et al., 2012; CHAO et al., 2013). Apesar de maior similaridade entre células de cóclea com as da orelha interna comparadas com os demais tipos celulares derivados de cão, nosso meio de escolha foi somente o DMEM-HIGH e não a associação com o DMEM-F12 como utilizados por esses autores, uma vez que como observado em cultivo e pelos gráficos de MTT o meio DMEM-F12 foi o que teve uma menor atividade no metabolismo celular das células de cóclea e por isso, optou-se pela utilização somente do DMEM-HIGH.

Uma das características das células-tronco é apresentar morfologia fibroblástico e possuir aderência ao plástico. Isso foi observado neste estudo assim como descrito pelos autores (WENCESLAU, 2009; CHAO et al., 2013; FAVARON et al., 2014). No entanto estudos realizados com orelha interna utilizaram fatores de indução, B27 e N2 (YERUKHIMOVICH et al., 2007) para induzir a formação de esferas em células da cóclea (YERUKHIMOVICH et al., 2007; DIENSTHUBER; OSHIMA; HELLER, 2009), utrículo (LI; LIU; HELLER, 2003). Estudos realizados pelos autores Chao et al. (2013) em células derivadas de modíolos cultivadas em condições aderentes, exibiram um aumento significativo da percentagem de células em relação a sua população quando comparada as células cultivadas em condições de cultura em suspensão convencionais.

Como já mencionado anteriormente verificou-se pelo MTT que as células cultivadas em DMEM-HIGH apresentaram uma atividade metabólica mais satisfatória, tendo um crescimento contínuo até o final do sétimo dia de experimento, o que não foi observado nos demais meios. Esses resultados estão de acordo com os resultados apresentados por (FRANCIOLLI, 2012), a qual apresenta um crescimento contínuo.

Analisando os dados do ciclo celular pode-se observar que as células estavam realizando seus processos vitais, interfase e divisão celular. O ciclo celular de uma célula eucariótica apresenta o período de interfase representado pelas fases G1, S e G2, representam um aumento nas estruturas celulares e duplicação do material genético, e pelo período de divisão celular, na qual é responsável pela divisão do material genético e da divisão celular propriamente dita (LODISH et al., 2005). Este teste é importante para saber se as células estão realizando o processo

de divisão celular, uma vez que um organismo necessita deste processo para reparo tecidual, manutenção de células mortas e desenvolvimento embrionário (LODISH et al., 2005).

A caracterização imunofenotípica foi realizada pelas técnicas de, imunocitoquímica e citometria de fluxo. A técnica de imunocitoquímica é uma técnica qualitativa, onde é possível avaliar se há ou não expressão dos anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Nesta técnica notou-se marcação imunopositiva para todos os anticorpos testados. Marcadores de células mesenquimais (Stro-1 e CD73), o marcador Stro-1 tem a capacidade de renovação e de diferenciação em várias linhagens de tecidos mesenquimais como adipócitos, condrócitos e osteoblastos. Este é um marcador que não é só exclusivo de células mesenquimais e sua expressão é gradativamente perdida durante a expansão em cultura, sendo mais identificado nas passagens iniciais (KOLF; CHO; TUAN, 2007). O CD73 (ecto-5'-nucleotidase) é um dos anticorpos mais utilizados para caracterização de células-tronco mesenquimais (WENCESLAU, 2009). Achados estes semelhantes foram encontrados pelos autores (WENCESLAU, 2009; ALCANTARA, 2010) em células caninas.

Quanto aos marcadores de citoesqueleto (β -tubulina e Vimentina), o β -tubulina é um marcador de proteínas estruturais de microtúbulos. Segundo Banergee et al. (2008) em seu estudo em roedores, houve a expressão deste marcador nas células cocleares.

Por sua vez, a vimentina é um marcador de desenvolvimento celular e tecidual. Também é responsável pela ancoragem do núcleo e posicionamento de suas organelas no citoplasma (IVASKA et al., 2007). Marcadores neurais (miosina VIIa e nestina), o marcador miosina VIIa expressa nas células ciliadas, em diferentes estruturas da orelha interna, como por exemplo modíolo (CHAO et al., 2013), utrículo (MARTINEZ-MONEDERO; EDGE, 2007). Neste trabalho observou-se marcação positiva dessas células para a região do órgão de Corti, presente no epitélio coclear.

A proteína nestina é utilizada como marcador de células imaturas. Neste estudo a expressão de epítomos de nestina foi expressa nas células cocleares, o que pode sugerir sua relação com a plasticidade das mesmas, ou seja, sua capacidade de se proliferar e diferenciar (LOU; ZHANG; YUAN, 2007). Outra proteína presente nos cílios destas células é a miosina VIIa que apresenta uma importância estrutural

e funcional no órgão de Corti. Neste trabalho constatou-se a marcação positiva para esta proteína nestas células.

Este trabalho apresentou marcação positiva para a proteína VEGF, do qual é um agente angiogênico, com muitas funções na biologia vascular, que vai desde a permeabilidade vascular até a migração endotelial, proliferação e diferenciação. Sabe-se que a perda auditiva induzida por ruídos tem sido associada as alterações no fluxo sanguíneo coclear, o que ressalta ainda mais a importância desta proteína (PICCIOTTI et al., 2006).

Quanto aos marcadores de células precursoras hematopoiéticas (CD 117), Estes foram expressos neste estudo, assim como demonstrado por (WENCESLAU, 2009), em células mesenquimais de cães. Marcador de células pluripotentes (Oct-4 e Tra-1). Neste estudo observou-se marcação positiva para marcadores de pluripotência como oct-4 e Tra-1.

Continuando a caracterização imunofenotípica das células, foi realizado a citometria de fluxo, sendo esta uma técnica quantitativa, o que proporciona um resultado mais fidedigno à pesquisa uma vez que se pode avaliar a porcentagem de expressão do anticorpo nas células. Os marcadores de citoesqueleto CK 18 e β tubulina apresentaram neste estudo valores significativos de marcação, assim como descrito por (ALCANTARA, 2010) em seu estudo com cão. Já o marcador Vimentina não obteve expressão.

Seguindo o parâmetro de Dominici et al. (2006), para caracterizar uma célula-tronco mesenquimal humana, são definidas expressões positivas para os marcadores mesenquimais CD105, CD90 e CD73, e marcação negativa para os marcadores de células hematopoiéticas CD 34 e CD 45. Neste estudo obteve-se marcação positiva para os marcadores mesenquimais Stro-1 e CD105. No entanto obteve-se expressão negativa para CD 90 e CD73. Este resultado negativo pode ser explicado pelo fato de ter sido utilizado anticorpo monoclonal não específico para cão. No entanto tivemos alta expressão para os marcadores de fator de crescimento endotelial VEGF e o de células progenitoras hematopoiéticas CD117, e como esperado marcação negativa para os anticorpos CD 34 e CD45.

Para os marcadores neurais Nestina e Miosina VIIa, os quais apresentaram resultados diferentes, pode se dizer que o primeiro não foi expresso, pelo fato do marcador não ser específico para a espécie estudada. Entretanto a Miosina VIIa que

é um marcador tanto de células neurais quanto de células ciliadas (CHAO et al., 2013).

Para finalizar constatou-se que os marcadores de pluripotência - SOx2 (DABDOUB et al., 2008) e Oct4 foram altamente expressos, entretanto, o TRA-1 teve uma marcação menos significativa apesar deste ser um marcador de pluripotência, o que pode ser explicado pelo fato deste marcador diminuir sua expressão durante o processo de diferenciação (PERA; REUBINOFF; TROUNSON, 2000).

Dando sequência aos testes para caracterizar as células progenitoras derivadas da cóclea de fetos de cães, realizou-se o ultimo critério preconizado por Dominici et al. (2006), que classifica uma célula-tronco. Este ultimo critério é a capacidade das células se diferenciarem “*in vitro*” nas três linhagens celulares diferentes: osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. Para realizar este teste é necessário utilizar meios específicos de indução (PITTENGER et al., 1999). Neste estudo obtivemos um resultado satisfatório para indução destas três linhagens, assim como já descrito em células-tronco derivadas de tecidos caninos (LIMA et al., 2012). Assim este estudo demonstra a capacidade desta fonte celular ser considerada para ser testada em surdez canina.

8 CONCLUSÕES

1. As células derivadas do epitélio coclear de fetos de cães de 40 dias de idade gestacional, apresentam morfologia fibroblastóide com capacidade de aderência ao plástico.
2. Mediante análise específica (método de MTT) pode-se verificar que estas células tem maior viabilidade celular quando cultivadas em meio DMEM-HIGH glicose.
3. A expressão para marcadores de células mesenquimais e de pluripotência, e não expressão para marcadores de células hematopoiéticas.
4. Quando submetidas ao ensaio de diferenciação celular das células derivadas do epitélio coclear de fetos caninos possuem capacidade de se diferenciar nas linhagens celulares osteogênicas, adipogênica e condrogênica.
5. Finalizando o estudo, os resultados sugerem que as células derivadas do epitélio coclear de fetos caninos podem ser inclusas em estudos clínicos na espécie para tratar surdez.

REFERÊNCIA

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. .; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: elsevier, 2012.
- ALBUQUERQUE, A. A. S.; ROSSATO, M.; OLIVEIRA, J. A. A. de; HYPPOLITO, M. A. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 75, n. 1, p. 43–49, fev. 2009.
- ALCANTARA, D. **Obtenção e caracterização de linhagens celular primaria de osteossarcoma canino**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ALMEIDA, jorge mamede de. **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- AMBROSIO, C.; ZUCCONI, E.; MARTINS, D.; VANUCCHI, C.; PEREZ, M.; VIEIRA, N.; VALADARES, M.; JAZEDJE, T.; MIGLINO, M.; ZATZ, M. Extreme Clinical Variability in GRMD: From Neonatal Death to Asymptomatic Carriers. **Neuromuscular Disorders**, v. 17, n. 9-10, p. 776, 10 out. 2007.
- ANGELBORG, C.; ENGSTRÖM, B. The tympanic covering layer. An electron microscopic study in guinea pig. **Acta Otolaryngologica. Supplementum**, v. 319, p. 43–56, jan. 1974.
- ANGELBORG, C.; ENGSTRÖM, H. Supporting elements in the organ of Corti. I. Fibrillar structures in the supporting cells of the organ of Corti of mammals. **Acta Otolaryngologica. Supplementum**, v. 301, p. 49–6, jan. 1972.
- BANERJEE, A.; JENSEN-SMITH, H.; LAZZELL, A.; PRASAD, V.; ELGUEZABAL, G.; HALLWORTH, R.; LUDUEÑA, R. F. Localization of betav tubulin in the cochlea and cultured cells with a novel monoclonal antibody. **Cell Motility And The Cytoskeleton**, v. 65, n. 6, p. 505–14, jun. 2008.
- BARBOZA JR, L. C. de M.; OITICICA, J.; BATISSOCO, A. C. Perspectives in the Treatment of Hearing Loss with Stem Cells. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 12, n. 1, p. 111–115, mar. 2008.
- BENTO, R. F.; BRITO NETO, R. de; CASTILHO, A. M.; GÓMEZ, V. G.; GIORGI, S. B.; GUEDES, M. C. Resultados auditivos com o implante coclear multicanal em pacientes submetidos a cirurgia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 5, p. 632–637, out. 2004.
- BERTOLO, A.; GEMPERLI, A.; GRUBER, M.; GANTENBEIN, B.; BAUR, M.; PÖTZEL, T.; STOYANOV, J. In vitro cell motility as a potential mesenchymal stem

cell marker for multipotency. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 4, n. 1, p. 84–90, jan. 2015.

BORIN, A.; COVOLAN, L.; MELLO, L. E.; OKADA, D. M.; CRUZ, O. L. M.; TESTA, J. R. G. Estudo anatômico do osso temporal de um primata não-humano (*Callithrix* sp). **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 3, p. 370–373, jun. 2008.

CHAO, T.-T.; WANG, C.-H.; CHEN, H.-C.; SHIH, C.-P.; SYTWU, H.-K.; HUANG, K.-L.; CHEN, S.-Y. Adherent culture conditions enrich the side population obtained from the cochlear modiolus-derived stem/progenitor cells. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 5, p. 779–84, maio 2013.

CHRISMAN, L. C. **Neurologia dos pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1985.

COLVILLE, T.; BASSERT, J. M. **Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

COMPTON, R. W. Morphological, physiological, and behavioral studies of the facial musculature of the coati (*Nasua*). **Brain, Behavior and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 85–126, jan. 1973.

CORRALES, C. E.; PAN, L.; LI, H.; LIBERMAN, M. C.; HELLER, S.; EDGE, A. S. B. Engraftment and differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells in the cochlear nerve trunk: growth of processes into the organ of Corti. **Journal of Neurobiology**, v. 66, n. 13, p. 1489–500, nov. 2006.

CORWIN, J. T.; COTANCHE, D. A. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. **Science**, v. 240, n. 4860, p. 1772–4, 24 jun. 1988.

CUNHA, F. M.; COUTINHO, S. D.; MATERA, A.; FIORIO, W. A. B.; RAMOS, M. C. C.; SILVEIRA, L. M. G. Avaliação clínica e citológica do conduto auditivo externo de cães com otite. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, n. 1/3. 2003. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/3242> >. Acesso em 12 abr. 2015.

DABDOUB, A.; PULIGILLA, C.; JONES, J. M.; FRITZSCH, B.; CHEAH, K. S. E.; PEVNY, L. H.; KELLEY, M. W. Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 47, p. 18396–401, 25 nov. 2008.

DIENSTHUBER, M.; OSHIMA, K.; HELLER, S. Stem/progenitor cells derived from the cochlear sensory epithelium give rise to spheres with distinct morphologies and features. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO**, v. 10, n. 2, p. 173–90, jun. 2009.

DOETZLHOFER, A.; WHITE, P. M.; JOHNSON, J. E.; SEGIL, N.; GROVES, A. K. In vitro growth and differentiation of mammalian sensory hair cell progenitors: a requirement for EGF and periotic mesenchyme. **Developmental Biology**, v. 272, n. 2, p. 432–47, 15 ago. 2004.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006.

DUVALL, A. J.; RHODES, V. T. Reissner's membrane. An ultrastructural study. **Archives of Otolaryngology**, v. 86, n. 2, p. 143–51, ago. 1967.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v. 2, n. 1, p. 11–45, mar. 1973.

FAVARON, P. O.; MESS, A.; WILL, S. E.; MAIORKA, P. C.; DE OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Yolk sac mesenchymal progenitor cells from New World mice (*Necromys lasiurus*) with multipotent differential potential. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e95575, 6 jan. 2014.

FERNANDEZ, V. L.; BERNARDINI, M. **Neurologia em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2010.

FRANCIOLLI, A. L. R. **Multipotencialidade das células da membrana amniótica e do saco vitelino no modelo equino (*Equus caballus*, Linnaeus 1758)**. 2012. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 3, n. 4, p. 393–403, out. 1970.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1433–8, 25 fev. 2000.

GETTY, R. **Sisson/grossman: anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

GOMATHI DEVI, L.; GIRISH KUMAR, S.; MOHAN REDDY, K.; MUNIKRISHNAPPA, C. Photo degradation of methyl orange an azo dye by advanced Fenton process using zero valent metallic iron: influence of various reaction parameters and its degradation mechanism. **Journal of hazardous materials**, v. 164, n. 2-3, p. 459–67, 30 maio 2009.

GOTTHELF, L. N. **Doenças do ouvido em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HORN, P. A.; MORRIS, J. C.; NEFF, T.; KIEM, H.-P. Stem cell gene transfer--efficacy and safety in large animal studies. **The Journal of The American Society of Gene Therapy**, v. 10, n. 3, p. 417–31, set. 2004.

HUTCHIN, T. P.; CORTOPASSI, G. A. Mitochondrial defects and hearing loss. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 57, n. 13-14, p. 1927–37, dez. 2000.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials domestic animal embryology**. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2010.

IVASKA, J.; PALLARI, H.-M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J. E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 10, p. 2050–62, 10 jun. 2007.

JACOBSON, L. S. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 73, n. 4, p. 162–70, dez. 2002.

JERO, J.; TSENG, C. J.; MHATRE, A. N.; LALWANI, A. K. A surgical approach appropriate for targeted cochlear gene therapy in the mouse. **Hearing Research**, v. 151, n. 1-2, p. 106–114, jan. 2001.

KLEIN, B. G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 204, jan. 2007.

LI, H.; LIU, H.; HELLER, S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. **Nature Medicine**, v. 9, n. 10, p. 1293–9, out. 2003.

LIMA, S. A. F.; WODEWOTZKY, T. I.; LIMA-NETO, J. F.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; ALVARENGA, F. C. L. Diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 463–469, maio 2012.

LODISH, H. .; BERK, A. .; MATSUDAIRA, P. .; KAISER, C. A. .; KRIEGER, M. .; SCOTT, M. P. **Biologia celular e molecular**. 5. ed. porto alegre: Artmed, 2005.

LOMBARDI, D.; SOLDATI, T.; RIEDERER, M. A.; GODA, Y.; ZERIAL, M.; PFEFFER, S. R. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. **The EMBO journal**, v. 12, n. 2, p. 677–82, fev. 1993.

LOU, X.; ZHANG, Y.; YUAN, C. Multipotent stem cells from the young rat inner ear. **Neuroscience Letters**, v. 416, n. 1, p. 28–33, 6 abr. 2007.

LUTTGEN, P. J. Deafness in the dog and cat. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 24, n. 5, p. 981–9, set. 1994.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. são paulo: atheneu, 2010.

MALGRANGE, B.; BELACHEW, S.; THIRY, M.; NGUYEN, L.; ROGISTER, B.; ALVAREZ, M.-L.; RIGO, J.-M.; VAN DE WATER, T. R.; MOONEN, G.; LEFEBVRE, P. P. Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture.

Mechanisms of Development, v. 112, n. 1-2, p. 79–88, mar. 2002.

MARTINEZ-MONEDERO, R.; EDGE, A. Stem cells for the replacement of inner ear neurons and hair cells. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 51, n. 6-7, p. 655–661, 2007.

MATOUSEK, J. L. Diseases of the ear pinna. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 34, n. 2, p. 511–40, mar. 2004.

MATSUI, J. I.; RYALS, B. M. Hair cell regeneration: an exciting phenomenon...but will restoring hearing and balance be possible? **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 42, n. 4 Suppl 2, p. 187–98, jan. 2005.

MCGREADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E. S.; RYAN, M. T. Veterinary Embryology. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 2, p. 198, 1 fev. 2009.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 11, p. 2319–45, nov. 2006.

MIZUTARI, K.; FUJIOKA, M.; HOSOYA, M.; BRAMHALL, N.; OKANO, H. J.; OKANO, H.; EDGE, A. S. B. Notch Inhibition Induces Cochlear Hair Cell Regeneration and Recovery of Hearing after Acoustic Trauma. **Neuron**, v. 77, n. 1, p. 58–69, 9 jan. 2013.

MÜLLER, E.; HEUSINGER, A. [Microbiological results of ear swabs from dogs and cats]. **Tierärztliche Praxis**, v. 22, n. 1, p. 80–4, fev. 1994.

NOBLE, W.; TYLER, R.; DUNN, C.; BHULLAR, N. Unilateral and bilateral cochlear implants and the implant-plus-hearing-aid profile: comparing self-assessed and measured abilities. **International Journal of Audiology**, v. 47, n. 8, p. 505–14, ago. 2008.

OLIVEIRA, J. A. A. de. O mecanismo eletrobiomecânico ativo da cóclea. **Brasilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 59, p. 236–248, 1993.

OLIVEIRA, J. A.A.; CANEDO, M.C.; ROSSATO, M. Otoproteção das células ciliadas auditivas contra a ototoxicidade da amicacina. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v. 68, n. 1, p. 7-13, fev. 2002.

OSHIMA, K.; GRIMM, C. M.; CORRALES, C. E.; SENN, P.; MARTINEZ MONEDERO, R.; GÉLÉOC, G. S. G.; EDGE, A.; HOLT, J. R.; HELLER, S. Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO**, v. 8, n. 1, p. 18–31, mar. 2007.

PARKER, M. A.; CORLISS, D. A.; GRAY, B.; ANDERSON, J. K.; BOBBIN, R. P.; SNYDER, E. Y.; COTANCHE, D. A. Neural stem cells injected into the sound-damaged cochlea migrate throughout the cochlea and express markers of hair cells, supporting cells, and spiral ganglion cells. **Hearing Research**, v. 232, n. 1-2, p. 29–43, out. 2007.

PAROLINI, O.; SOUZA-MOREIRA, L.; O'VALLE, F.; MAGATTI, M.; HERNANDEZ-CORTES, P.; GONZALEZ-REY, E.; DELGADO, M. Therapeutic effect of human amniotic membrane-derived cells on experimental arthritis and other inflammatory disorders. **Arthritis & Rheumatology**, v. 66, n. 2, p. 327–39, fev. 2014.

PERA, M.; REUBINOFF, B.; TROUNSON, A. Human embryonic stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 1, p. 5–10, 1 jan. 2000.

PIATTO, V. B.; NASCIMENTO, E. C. T.; ALEXANDRINO, F.; OLIVEIRA, C. A.; LOPES, A. C. P.; SARTORATO, E. L.; MANIGLIA, J. V. Genética molecular da deficiência auditiva não-sindrômica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 2, p. 216–223, abr. 2005.

PICCIOTTI, P. M.; FETONI, A. R.; PALUDETTI, G.; WOLF, F. I.; TORSELLO, A.; TROIANI, D.; FERRARESI, A.; POLA, R.; SERGI, B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in noise-induced hearing loss. **Hearing Research**, v. 214, n. 1-2, p. 76–83, abr. 2006.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–7, 2 abr. 1999.

PRADA, I. **Neuroanatomia funcional em medicina veterinária com correlações clínicas**. 1. ed. Jaboticabal: Terra Molhada, 2014.

REECE, W. O. **Dukes / fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

RYALS, B. M.; RUBEL, E. W. Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. **Science**, v. 240, n. 4860, p. 1774–6, 24 jun. 1988.

SAVARY, E.; HUGNOT, J. P.; CHASSIGNEUX, Y.; TRAVO, C.; DUPERRAY, C.; VAN DE WATER, T.; ZINE, A. Distinct population of hair cell progenitors can be isolated from the postnatal mouse cochlea using side population analysis. **Stem Cells**, v. 25, n. 2, p. 332–9, fev. 2007.

SILVA, R. C. L.; ARAÚJO, S. G. Os resultados do implante coclear em crianças portadoras de Neuropatia Auditiva : revisão de literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 12, n. 3. 2007. Disponível em:<
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-80342007000300014&script=sci_arttext>. Acesso em 12 abr. 2015.

- SCHMIDLIN, P. C.; FROES, T. R.; GARCIA, D. A. A.; PARCHEN, H.; FERREIRA, F. M. Avaliação ultrassonográfica do meato acústico em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, 2010. Disponível em:<
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010000400009
>. Acesso em 12 abr. 2015.
- SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar?: perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p. 13–19, 2005.
- SEIBEL, V. A.; LAVINSKY, L.; IRION, K. Comparação morfométrica da orelha interna entre ovinos e humanos através da tomografia computadorizada. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 3, p. 370–376, jun. 2006.
- SHI, Y.; KIRWAN, P.; LIVESEY, F. J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. **Nature Protocols**, v. 7, n. 10, p. 1836–46, out. 2012.
- SPICER, S. S.; SCHULTE, B. A. Cytologic structures unique to Deiters cells of the cochlea. **The Anatomical Record**, v. 237, n. 3, p. 421–30, nov. 1993.
- TATEYA, I.; NAKAGAWA, T.; IGUCHI, F.; KIM, T. S.; ENDO, T.; YAMADA, S.; KAGEYAMA, R.; NAITO, Y.; ITO, J. Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. **Neuroreport**, v. 14, n. 13, p. 1677–81, 15 set. 2003.
- TOBIAS, I. C.; BROOKS, C. R.; TEICHROEB, J. H.; BETTS, D. H. Derivation and culture of canine embryonic stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 1074, p. 69–83, jan. 2013.
- TOLEDO, D. C.; FALEIRO, M. B. R.; RODRIGUES, M. M. P.; DI SANTIS, G. W.; AMORIM, R. L.; MOURA, V. M. B. D. de. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1372–1377, jun. 2010.
- TROUNSON, A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 2, p. 208–19, abr. 2006.
- VIEIRA, S. .; HOSSNE, W. S. **A ética e a metodologia**. são paulo: pioneiras, 1998.
- WANG, W.; ANDERSON, B. T.; PHILLIPS, N.; ROBERT K. KAUFMANN. Feedbacks of Vegetation on Summertime Climate Variability over the North American Grasslands. Part I: Statistical Analysis. **Earth Interactions**, v. 10, p. 1, 2006.
- WENCESLAU, C. V. **Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos**. 2009. 197 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

WHITE, P. M.; DOETZLHOFER, A.; LEE, Y. S.; GROVES, A. K.; SEGIL, N. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. **Nature**, v. 441, n. 7096, p. 984–7, 22 jun. 2006.

WHITE, P. M.; STONE, J. S.; GROVES, A. K.; SEGIL, N. EGFR signaling is required for regenerative proliferation in the cochlea: conservation in birds and mammals. **Developmental Biology**, v. 363, n. 1, p. 191–200, 1 mar. 2012.

YAMAMOTO, M.; UEDA, R.; TAKAHASHI, K.; SAIGO, K.; UEMURA, T. Control of axonal sprouting and dendrite branching by the Nrg-Ank complex at the neuron-glia interface. **Current Biology** : CB, v. 16, n. 16, p. 1678–83, 22 ago. 2006.

YERUKHIMOVICH, M. V.; BAI, L.; CHEN, D. H.-C.; MILLER, R. H.; ALAGRAMAM, K. N. Identification and characterization of mouse cochlear stem cells. **Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 251–60, jan. 2007.