

LUIZ CARLOS DE MELO BARBOZA JUNIOR

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

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barboza Junior, Luiz Carlos de Melo

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

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

Orientador: Ricardo Ferreira Bento.

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

USP/FM/DBD-165/12

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

Leonardo da Vinci

(1452-1519)

Dedico

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Siglas

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

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

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

