

Descrição das células resultantes da inativação da sinalização *Notch* de células suportes do Órgão de Corti de Gerbos Neonatais

Characterization of Hair Cell-Like Cells Converted From Supporting Cells After Notch Inhibition in Cultures of the Organ of Corti From Neonatal Gerbils

Descripción de las celdas resultantes de la inactivación de la señalización Notch de las celdas de soporte del Órgano de Corti de Jerbos Neonatales

Agda Araújo Gomes Alves*, Maria de Fátima Ferreira de Oliveira*,
Katielle Menezes de Oliveira*, Grazielle de Farias Almeida*,
Pedro de Lemos Menezes*, Kelly Cristina Lira de Andrade*

Li Y, Jia S, Liu H, Tateya T, Guo W, Yang S, et al. Characterization of Hair Cell-Like Cells Converted From Supporting Cells After Notch Inhibition in Cultures of the Organ of Corti From Neonatal Gerbils. *Frontiers In Cellular Neuroscience*. 2018; 12:1–12.

A audição é um dos principais sentidos, uma vez que propicia habilidades como localização sonora, alerta, auxílio na comunicação, além de estar envolvida em todo desenvolvimento fonético do indivíduo e na modulação e controle da própria voz, entre outras características¹. Ao perder parcialmente ou totalmente este sentido, seja por uso de medicação ototóxicas, exposição a ruído por longos períodos sem proteção, ou qualquer outro fator

que leve à morte de células ciliadas da cóclea e, subsequentemente, à perda auditiva sensorineural (caráter irreversível), o indivíduo terá a saúde física e mental alteradas. Dentre os efeitos negativos da perda auditiva estão o isolamento social e a depressão. A reabilitação, a depender do tipo de perda auditiva, é realizada por meio da adaptação de aparelhos auditivos e, em alguns casos, com a cirurgia do implante coclear. Todavia, com o avançar

*Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL, AL, Brasil

da ciência, seria possível desenvolver novas células ciliadas e implantá-las? Seria possível permitir ao indivíduo a recuperação da sua audição sem que o mesmo precise utilizar dispositivos?

Buscando responder esse questionamento, o artigo de Li e colaboradores (2018) apresenta como título: Caracterização de células semelhantes a células ciliadas convertidas de células de suporte após a inibição da sinalização *Notch* em culturas do órgão de Corti de Gerbos Neonatais. O objetivo do presente estudo foi investigar se a inibição da sinalização *Notch* após o nascimento é suficiente para converter células de suporte em células ciliadas que transduza a estimulação mecânica e funcione como uma célula ciliada madura.

A pesquisa foi aprovada pelos Comitês Institucionais de Cuidados e Uso Animal da *Creighton Universidade and Beijing Capital Medical University*, uma vez que utilizou a explantação coclear de gerbos mongóis recém-nascidos pós-natal (0 dias -P0) ou 5 dias (P5). Os autores detalharam e descreveram todos os processos utilizados para o preparo da cultura de estudo e cultura controle, assim como substâncias, dosagem e temperatura que foram utilizadas na pesquisa.

Inicialmente, os filhotes de gerbos recém-nascidos receberam uma dose letal de pentobarbital sódico e, em seguida, foram decapitados e as cócleas foram dissecadas e mantidas em meio L-15 (*Life Technologies, Grand Island, NY, EUA*). A membrana basilar e o órgão associado de Corti foram desembrulhados do modíolo. Os giros apical e basal foram dissecados e explantados em lamelas plásticas e colocadas no fundo das placas de cultura contendo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *Life Technologies*) com alto teor de glicose.

O diferencial deste estudo foi que além de inibir a proteína *Notch* das células suporte para verificar se as mesmas produzem células semelhantes às células ciliadas (CSCCs) desenvolvidas na cóclea, os autores verificaram também as suas propriedades. Para isto, utilizaram mecanotransdução de gravação (MET) para examinar a capacitância atual e não linear, a partir do registro da mecanotransdução das células ciliadas externas (CCEs) com uma câmara experimental montada no palco de um microscópio. Para medições de capacitância não linear (CNL), os autores referiram as substâncias, dosagem e o passo a passo de como a cultura foi banhada, o protocolo aplicado, o software que foi

utilizado para análise, assim como a forma como é feito o cálculo da função de capacitância.

Os autores investigaram, ainda, a imunocitoquímica e microscopia eletrônica e, para isso, descreveram em sua metodologia todo o processo de tratamento e análise das lâminas de cultura, que ao final foram marcadas com rodamina-faloidinacôm com o objetivo de visualização dos estereocílios.

Utilizou-se também microscopia eletrônica de varredura (MEV) para produzir imagens de alta resolução da superfície da cultura de estudo e cultura controle e, para isso, mais uma vez, descreveram todo o preparo das amostras e qual a região de corte foi utilizada para estudo.

Em relação à análise estatística, as médias e desvios-padrão foram calculados com base em medições de diferentes amostras e repetições biológicas e, para isto, foi utilizado o teste t de estudante, e o valor de $p \leq 0,01$ foi considerado significativo.

Verificou-se que a inibição da sinalização do *Notch* pode induzir a formação do feixe de estereocílios nas células de suporte, apesar de que na cultura de estudo P0 observou-se cinco a seis fileiras de feixes de células ciliadas da cultura de estudo tratada com DMEM, diferente do que foi encontrado no grupo controle (três fileiras de pacotes de estereocílios bem organizados de CCE se uma linha de células ciliadas internas (CCIs)). Foi observado também que os pacotes de estereocílios na cultura tratada com DMEM exibiram diferentes orientações, tamanhos, formas e um aumento significativo no número de feixes de estereocílios, tanto na região apical quanto basal. Utilizando esse mesmo procedimento para análise na cultura de estudo P5, verificou-se que o aumento do número de feixes de estereocílios na região apical não foi tão grande quanto o observado em culturas preparadas a partir de gerbilos P0. Na parte basal, não foi observada diferença significativa na contagem de feixes ou células entre culturas tratadas com DMEM e cultura de controle.

Ao utilizar o MEV para examinar a morfologia do feixe de estereocílios em culturas tratadas com DMEM e controle (todas preparadas a partir de P0) após oito dias *in vitro*, foram observadas diferenças entre os dois grupos: 1) nas culturas de controle são quatro filas de feixes de estereocílios e nenhum feixe de estereocílios é visto na superfície apical das células de suporte. Nas culturas tratadas com DMEM, no entanto, são observadas cinco a seis fileiras de feixes de estereocílios; 2)

ostereocílios nas culturas de controle exibem uma morfologia de feixes bem organizada com cinóclio centrada nos estereocílios em forma de “V”. Em contrapartida, os estereocílios recém-emergidos no ápice das CSCCs exibem a formação de feixes com vários tamanhos, formas e comprimentos. A maioria dos pacotes não exhibe nenhum sinal claro de escada, além de que os estereocílios vistos em CSCCs parecem ser mais finos do que aqueles vistos em células ciliadas endógenas. Foi utilizado um substituto diferente (LY411575) para descartar a possibilidade de que a formação de estereocílios em células de suporte foi devido ao esforço de DMEM. Contudo, os resultados encontrados foram semelhantes.

Em relação aos sinais de estereocílios supranumerários, observou-se um aumento no número de estereocílios e/ou surgimento de um feixe de estereocílios extra ao lado do existente. Um aumento significativo ($p < 0,01$) no número total de estereocílios foi observado após a inibição de *Notch*. Segundo os autores, os estereocílios supranumerários pareciam ser alongamento de microvilosidades, uma vez que estas ainda estavam presentes em abundância nas células ciliadas.

Examinou-se a morfologia do feixe de estereocílios de CSCCs usando MET, visto que estes eram percebidos na superfície apical de uma célula pilar externa (PO) localizada entre CCEs e uma célula pilar interna (PI). A ultraestrutura do estereocílio do CSCC assemelha-se à das células ciliadas, sendo estas capazes de transduzir a estimulação mecânica para resposta elétrica.

O MET também foi utilizado para examinar a ultraestrutura da parede lateral de CSCCs na região da CCE de três culturas, encontrando-se uma camada de cisternas subsuperficiais já presente abaixo da membrana plasmática na CCE. Em contraste, a CSCC adjacente não mostra nenhum sinal de cisternas na subsuperfície. Utilizando este mesmo método, foi verificada também assimetria na corrente das CSCCs, uma vez que a corrente interna era maior que a corrente externa, assemelhando-se à das células ciliadas. A presença de correntes de MET de CSCCs sugere que os feixes de estereocílios recém-emergidos são funcionais, apesar do fato de a magnitude da corrente do MET ser menor que a das células ciliadas. Registros de grampeamento de voltagem mostraram que as correntes de células inteiras da Deiters derivadas de CSCCs retiveram a

mesma cinética e magnitude observadas em células de Deiters normais e a CNL.

As células ciliadas também possuem especializações na membrana basolateral responsáveis pelas propriedades elétricas e mecânicas, por isso o estudo também mensurou as correntes da célula inteira de CSCCs nas regiões das CCEs e CCIs para determinar se possuíam cinética de canal iônico similar àquelas observadas em CCE e CCI. Foram observadas diferentes magnitudes e cinética de ativação comparando células ciliadas e CSCCs.

A motilidade somática à base de prestina é uma propriedade única das CCEs. Foram mensuradas as CNL de CSCCs e CCEs adjacentes em dois momentos diferentes (8 e 12 dias após o tratamento com DMEM). CCEs na mesma região eram usadas como controles. A resposta CNL tornou-se significativamente maior aos 12 dias em cultura.

A pesquisa mostrou-se relevante, pois os autores examinaram sistematicamente as propriedades morfológicas e eletrofisiológicas das células resultantes da inibição da sinalização *Notch* das células suporte. Apesar da conclusão do estudo mostrar que estas células não podem substituir as células ciliadas maduras, os autores sugerem que a sinalização *Notch* pode regular a formação de estereocílios e estabilidade durante o desenvolvimento.

Apesar da pouca literatura encontrada a cerca do tema, é possível perceber que as células de suporte são um atraente alvo para intervenções destinadas a produzir novas células ciliadas. Os autores do presente artigo utilizaram uma estratégia diferente para induzir a produção das células ciliadas, através da inibição da sinalização *Notch*. A maior parte da literatura²⁻³ a cerca deste tema induz as células de suporte através da transferência gênica mediada por vírus de *Math1* (terapia gênica *Atoh1*). Estes estudos²⁻³ afirmam que após essa indução, as células epiteliais não sensitivas na cóclea madura, expressam de forma excessiva o *Math1*, que por sua vez, retêm a competência para gerar novas células ciliadas in vivo e atraem os neurônios auditivos.

Ainda que a estratégia utilizada pelo presente artigo fosse diferente, o alcance dos resultados foi similar. Sabe-se que quando a sinalização de *Notch* é inibida para estimular a diferenciação de células ciliadas, a geração de novas células resulta no aumento no nível do fator de transcrição *Atoh1*, em resposta à inibição da sinalização de *Notch*⁴.

Além disto, seria importante investigar mais profundamente a utilização do LY411575. No



decorrer do estudo, foi descrito a utilização deste apenas para descartar a possibilidade de formação de esterocílios devido ao esforço do DMEM. Contudo, não foram analisados os demais aspectos eletrofisiológicos das CSCCs resultantes dessa nova aplicação. Outro estudo⁴ sugere que a administração local de LY411575 promove a recuperação auditiva apoiando a transdiferenciação celular nas células ciliadas.

Mediante o apresentado, percebe-se um grande passo ao conseguir converter células de suporte em CSCCs. Entretanto, são necessários mais estudos na área para investigar de qual forma pode-se modificar a estrutura destas novas células a fim de que estas consigam chegar à maturação desenvolvendo as mesmas propriedades das células ciliadas. Talvez, em um futuro mais próximo do que se possa imaginar, a melhora ou até mesmo a recuperação total de uma deficiência auditiva até então con-

siderada irreversível, como é o caso das perdas auditivas sensorineurais, seja uma realidade.

Referências

1. Fernandes ACS, Casais-e-Silva. Anatomia e Fisiologia dos Órgãos da Audição e do Equilíbrio. Salvador: EDUNEB; 2012.
2. Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y. Math1 Gene Transfer Generates New Cochlear Hair Cells in Mature Guinea Pigs In Vivo. *Journal of Neuroscience*. 2003; 23(11): 4395-4400.
3. Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, Brough DE, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nature Medicine*. 2005; 11: 271-276.
4. Mizutari K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Borda ASB. Notch Inhibition Induces Cochlear Hair Cell Regeneration and Recovery of Hearing after Acoustic Trauma. *Neuron*. 2013; 77(1): 58-69.