

# *El Uso de Células Troncales en el Restablecimiento de la Audición. ¿Será Esto Posible? Avances de la Investigación*

*José Antonio Aparecido de Oliveira*

Recientemente se ha publicado que las células troncales tienen potencial como material para trasplante en el sistema nervioso central y la retina. Algunas células transplantadas se diferencian en componentes celulares de estos tejidos. Por lo tanto hay posibilidades de que la célula troncal neuronal pueda sobrevivir en la cóclea y se diferencie en componentes celulares del epitelio del oído interno (Sakamoto y cols.,2001) como las células ciliadas auditivas lesionadas.

El carácter permanente de la pérdida auditiva en los humanos se debe principalmente a la incapacidad del epitelio sensorial coclear para regenerar las células mecanorreceptoras o sea, las células ciliadas auditivas, después de una lesión (Huawet y cols 2003).

Los recientes avances en Genética y Biología molecular han aumentado la esperanza de la regeneración o protección de estas células. La terapia celular es un área de investigación que crece rápidamente, siendo aplicable potencialmente al tratamiento de las patologías del oído interno.

Estudios recientes en trasplante de células del oído interno han sugerido que esta terapia celular puede progresar en dirección a las aplicaciones clínicas. Recientemente han ocurrido avances en los estudios de trasplante de células con interés en el oído interno. Sin embargo, todavía deben resolverse problemas relacionados con la escogencia de las células para el trasplante, la posibilidad de inducción de la diferenciación apropiada en las células injertadas y su recuperación funcional (Nakagawa e Ito, 2004).

Un proceso terapéutico potencial de recuperación de la pérdida de células sensoriales en muchas formas de sordera nuerosensorial es el trasplante de células troncales exógenas mantenidas in vitro. Una fuente ideal para estas células troncales óticas debería ser un linaje de células humanas derivadas de la cóclea fetal y expandidas y mantenidas in vitro reteniendo sus capacidades multipotenciales (Rivolta Mur, 2004).

En el oído interno de mamíferos adultos y en la vida pos-embrionaria, la regeneración de las células auditivas, neuronas del ganglio espiral o sus axones, no ocurren naturalmente. Esta disminución de las neuronas excitables limita el éxito de la rehabilitación. Las células troncales embrionarias y las células troncales neuronales adultas poseen el potencial para diferenciarse en neuronas (Regala y cols, 2005).

El reciente descubrimiento de células madres en el oído interno adulto que

son capaces de diferenciarse en células ciliadas así como el hallazgo de células madres embrionarias que pueden convertirse en células ciliadas, ha producido esperanza para el futuro como tratamiento basado en células madres (Pellicer y colaboradores, 2005).

Al comprender el mecanismo que gobierna la génesis y la regeneración de las células ciliadas podrían desarrollarse estrategias con base en la célula, para atrasar, prevenir o inclusive revertir la pérdida auditiva en individuos con problemas en el oído interno (Dahal y colaboradores, 2004).

Se evaluó si las células troncales neuronales pueden sobrevivir en el espacio endolinfático de ratones normales. Se evaluó la localización de las células troncales neuronales trasplantadas en el oído interno lesionado de ratones. Esas células neuronales se observaron en la superficie del epitelio sensorial y ocasionalmente, dentro de ese epitelio. Esto sugiere que las células troncales neuronales pueden sobrevivir en el oído interno. Sin embargo pocas de estas células pueden entrar en el epitelio.

Las células troncales neuronales se obtuvieron de ratones. Se utilizó la gentamicina como tratamiento tóxico a través de la membrana de la ventana redonda. Al mismo tiempo, las células troncales neuronales suspendidas en solución se inyectaron a través de la pared coclear lateral. El hueso temporal se extrajo al sexto día después del trasplante.

En el utrículo tratado con gentamicina, las células troncales neuronales se encontraron dentro del epitelio. Estos hallazgos sugieren que las células trasplantadas entran fácilmente al epitelio sensorial que se está degenerando. Este modelo experimental se considera posible para la evaluación de la habilidad de diferenciación de las células troncales neuronales en el oído interno (Sakamoto y colaboradores, 2001).

La producción de células ciliadas de una fuente renovable de células progenitoras que pueden ser trasplantadas al oído interno lesionado (cóclea) es un requisito para la terapia potencial de recolocación de células en este órgano. Se presentó un protocolo experimental para crear de rutina células progenitoras de células troncales embrionarias in vitro. Estas células progenitoras expresan un conjunto de genes marcadores que definen el desarrollo del oído interno. Fue demostrado que estas células progenitoras se integran en el oído interno en desarrollo, en lugares de lesión epitelial y que las células integradas forman grupos de cilios cuando se colocan en el epitelio sensorial coclear y vestibular in vivo (Huawet y colaboradores 2003).

Hasta ahora nuestro conocimiento del oído interno de mamíferos y de su fisiopatología fue estimulada por el uso de modelos animales inicialmente en la forma de ratones transgenicos, mutantes. Sin embargo, hay diferencias entre las especies en términos de las vías de señales y en el medio en que se colocan las células troncales. Hay una clara necesidad de un sistema auto renovable humano, in vitro, que ayudaría a realizar experimentos que puedan hacer entender los mecanismos de diferenciación celular en la cóclea humana y que en el futuro podría ser utilizado para propósitos terapéuticos. Con ese objetivo se aislaron y se expandieron in vitro, células progenitoras auditivas de la cóclea humana.

En fetos de edades 9-10 semanas todavía no se ha establecido la diferenciación terminal. Varios linajes celulares se han establecido y las células progenitoras se están utilizando bajo diferentes condiciones de cultivo. Las células de más de 10 semanas todavía permanecen proliferativas y sin diferenciación (Rivolta y Moore, 2004).

Células de fetos de ratón se inyectaron en el modiolo de ratones tratados con cisplatino. Se retiraron los huesos temporales 14 días después del trasplante y se realizaron estudios histológicos. Las células fetales del trasplante fueron determinadas por inmunohistoquímica por un marcador neuronal o glial. El análisis histológico reveló la sobrevida de células derivadas del trasplante en el modiolo de la cóclea. Las células inyectadas en la porción basal de la cóclea migraron para la extremidad apical del modiolo.

Las células injertadas que expresaban un marcador de célula neural fueron identificadas pero la mayoría de las células troncales injertadas se diferenciaron en células gliales. Estos hallazgos sugieren la posibilidad del uso de células troncales en terapia celular para restaurar las neuronas del ganglio espiral (Tamura y colaboradores, 2004).

Las células troncales indiferenciadas del ratón se transplantaron a un ratón con oído interno lesionado por neomicina. La evaluación se realizó por inmunohistoquímica, cuatro semanas después del trasplante. Se encontraron algunas células troncales. Estos resultados indican que el oído interno lesionado puede tener alguna actividad induciendo a las células troncales en células ectodérmicas, pero el efecto fue insuficiente para inducir células ciliadas del oído interno. Por otro lado el tratamiento con células troncales transplantadas en oído interno de embrión de gallina, dirigió la célula troncal para formar una población como células de la cresta neural y células de la placa ótica. Se encontraron colonias de células cerca de las vesículas óticas pero no fueron encontradas haciendo parte de la pared de la vesícula ótica. Algunas colonias de células troncales se encontraron en el ganglio vestíbulo coclear (Sakamoto y colaboradores, 2004).

Para regenerar la célula ciliada del oído interno de mamíferos se transplantaron células troncales neuronales en explantes de oído interno de ratón. Las células troncales se integraron con éxito en el epitelio sensorial del órgano vestibular, pero no tanto en el órgano de Corti. Este método es útil para investigar la eficiencia de los medios de transporte y de trasplante de células troncales en el oído interno (Fugino, 2004).

Para explicar las estrategias potenciales para la recolocación de células en la coclea se transplantó una variedad de tipos de células troncales en la pared lateral. Se exploró el potencial de estas células para expresar moléculas que se conocen son importantes para la función de la pared lateral. Se usaron células troncales neuronales, embrionarias, células troncales derivadas de la médula ósea. Algunas células troncales embrionarias y de la médula ósea fueron diferenciadas in vitro en un fenotipo de célula mesotelial antes del trasplante. Las células fueron transplantadas contra la superficie de la pared lateral de la cóclea o en cada una de las tres rampas cocleares. Las células troncales sobrevivieron bien al trasplante persistiendo por más de tres semanas el tiempo más largo

experimentado. Las células troncales mostraron la habilidad de integrarse en el ligamento espiral en una minoría de los casos quedando el resto de las células cerca de la estría vascular. En la mayoría de los casos sin embargo, las células transplantadas permanecieron adyacentes al ligamento espiral hasta una semana después del trasplante. Algunas células troncales exhibieron expresión de marcadores moleculares de las células del ligamento espiral incluyendo conexina 26 (Sauvaget y colaboradores, 2004).

Recientemente se investigó la capacidad de células troncales embrionarias de ratones para producir un linaje de células ciliadas. Sin embargo, la eficiencia de las células troncales convertidas en linajes de células ciliadas bajo estas condiciones es pequeña. Las células troncales de los precursores neuroectodérmicos (tipo de célula progenitora de las células ciliadas) tiene el potencial para aumentar significativamente la eficiencia con la cual las células ciliadas pueden ser creadas *in vitro*. Estas células son tratadas con diferentes factores de crecimiento y medio acondicionador de las líneas de células cocleares para inducir la diferenciación posterior.

Si estas células multipotenciales pueden colocarse correctamente en la región de las células ciliadas del órgano de Corti, ellas pueden tomar la morfología de las células ciliadas. Estas células no necesitan estar completamente diferenciadas. Las células troncales indiferenciadas o las células troncales diferenciadas de las células primitivas, parecidas con el ectodermo primitivo, se inyectaron en la rampa media del oído izquierdo de cuatro cobayos sordos. Estos dos tipos de células fueron identificados en la cóclea de todos los animales implantados después de 14 o 28 días. No hubo evidencia de rechazo inmune. La morfología celular muestra que las células indiferenciadas transplantadas parecían células parcialmente diferenciadas. Algunas de las células implantadas se localizaban cerca del órgano de Corti alterado. Sin embargo, no hubo evidencia de integración en la estructura coclear. Así se demostró que el xeno trasplante de las células troncales de ratones en la rampa media de cobayos es posible y ha demostrado la sobrevivencia de células troncales implantadas en la rampa media (Dahl y colaboradores, 2004).

Para recuperar las neuronas del ganglio espiral (SGNs), las células troncales neuronales son una alternativa atractiva para la terapia celular de sustitución. En este estudio, células adultas de ratones fueron transducidas con neurogenina 2 (ng2) y después transplantadas en oído interno de cobayas normales y sordas. En oídos internos lesionados y en animales transplantados con neurogenina 2, las células sobrevivientes expresaron el marcador neuronal tubulina IIIB. Las células transplantadas se encontraron adyacentes a las neuronas del ganglio espiral y de sus procesos periféricos y también cerca del epitelio sensorial. Los resultados ilustraron que las células troncales neuronales pueden sobrevivir y diferenciarse en oído interno lesionado. También se demostró la posibilidad de transferencia de genes para generar progenie específica para la recolocación de células en el oído interno (Zheggoing y colaboradores 2005).

Las células troncales en el oído interno de adultos que son capaces de diferenciarse en células ciliadas al igual que las células troncales embrionarias, dan esperanzas para tratamientos futuros con base en células troncales.

Retrasar o revertir la sordera es uno de los mayores desafíos de la Medicina Moderna. A pesar de los fascinantes avances de la biotecnología de las células troncales y de la terapia génica, su aplicación clínica es muy limitada actualmente. Las ventajas de su uso terapéutico no deben sobre valorizarse sin embargo el desarrollo constante de nuevas técnicas puede abrir campo a las futuras estrategias para el tratamiento de enfermedades que tienen un abordaje terapéutico muy limitado. Por eso la terapia basada en células madres puede no ser la solución definitiva del problema de la sordera.

Las terapias futuras podrían combinar terapias con células madres, terapia génica y tratamiento farmacológico junto a aparatos electrónicos (implante coclear), de forma individualizada para cada paciente (Pellicer y colaboradores, 2005).

### Lecturas recomendadas

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

10. Sakamoto, T; Ito, J; Sasai, Y; Ladher, R. Development of in vitro culture system of mature inner ear hair cells. 5<sup>th</sup> Molecular Biology of Hearing of Hearing and Deafness, Bethesda, Maryland. pp 231. 2004.
11. Sauvaget, E; Pak, K; Li, Y; Liebe, K; Ryan, AF. Transplantation of stem cells into the lateral wall of the inner ear. 5<sup>th</sup> Molecular Biology of Hearing of Hearing and Deafness, Bethesda, Maryland. pp 230. 2004
12. Tamura, T. Nakagawa, T. Iguchi, F; Tateya, I; Endo, T; Kim, T, Dong, Y; Kita, T; Kojima, K Naito, Y; Omori, K; Ito, J. Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. Acta Otolaryngol. Suppl 551:65-68, 2004.