

VÍTOR YAMASHIRO ROCHA SOARES

**O Papel das Vesículas Extracelulares na Fisiopatologia da Perda
Auditiva Ocasionalada pelo Schwannoma Vestibular**

Brasília, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

VÍTOR YAMASHIRO ROCHA SOARES

**O Papel das Vesículas Extracelulares na Fisiopatologia da Perda
Auditiva Ocasionalada pelo Schwannoma Vestibular**

Tese apresentada como requisito necessário para a
obtenção de Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Costa Pires de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Fayez Bahmad Júnior

Brasília

2017

VÍTOR YAMASHIRO ROCHA SOARES

**O Papel das Vesículas Extracelulares na Fisiopatologia da Perda
Auditiva Ocasionalada pelo Schwannoma Vestibular**

Tese apresentada como requisito necessário para a
obtenção de Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

Aprovado em 8 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Augusto Costa Pires de Oliveira
Universidade de Brasília – UnB (Presidente)

Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. André Luiz Lopes Sampaio
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Lucas Moura Viana
Faculdades Integradas da União Educacional do Planalto Central – FACIPLAC

Dedico este trabalho a minha querida família, meus pais Antônio e Olinda, meus irmãos Renato e Vânia, e minha esposa Rafaella, com amor, admiração e gratidão por todo o apoio recebido em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Costa Pires de Oliveira, pelos ensinamentos e apoio, por ser além de professor um amigo, grande exemplo de ser humano, ele é responsável pela concretização de vários ideais.

Ao Prof. Dr. Fayez Bahmad Jr, pelo apoio, dedicação e amizade, por ser visionário, fornecendo os alicerces necessários para que outras pessoas possam crescer ao seu redor.

À Profa. Dra. Konstantina Stankovic, pelo suporte, pela confiança e por ter aberto as portas da Universidade de Harvard, e a oportunidade de aprender um pouco do seu vasto conhecimento,

Ao Prof. Dr. Márcio Nakanishi, pela sua importância e credibilidade diante de difíceis decisões na minha vida profissional.

A todos os meus amigos componentes do grupo de pesquisa da Profa. Dra. Konstantina Stankovic: Sonam Dilwali, Cherian Kandathil, Jessica West, Lukas Landegger, Chen-Chi Wu, Shyan-Yuan Kao, Andrew Lysaght, Takeshi Fujita, Colin Fadzen, George Chao, Kris Kristiansen, Fujisaka Michiro, Grace Shin, Nadia Atai, Sara Sivaraman, Boris Margarian, Monica He, Eleni Asimacopoulos, pelo apoio e pela companhia, tornando agradável e valiosa a experiência de conhecer um novo país.

A todos os profissionais e amigos do Department of Otology and Laryngology e do Eaton-Peabody Laboratory, Massachusetts Eye & Ear Infirmary, Harvard Medical School, Boston, MA, EUA, pelo acolhimento e ensinamentos

A todos os profissionais e amigos do Centro Cirúrgico e do Departamento de Neurocirurgia do Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, EUA, pelo conforto, ajuda e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves, pelo apoio estrutural e financeiro com a aquisição de uma bolsa de estudos.

A todos os pacientes, pela generosidade e auxílio durante o período de estudo, fornecendo amostras biológicas e informações pessoais apenas com intuito de ajudar outras pessoas em um futuro próximo.

A todos os animais que participaram do estudo, pela contribuição honrosa de tecidos biológicos, a partir dos quais informações importantes puderam ser coletadas e estudadas e, com certeza, guiarão futuras pesquisas de grande relevância para a humanidade.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pela oportunidade de realização do curso de doutorado e pelo apoio recebido sempre que precisei.

Aos colegas e funcionários do Programa de Pós-graduação pelo companheirismo durante essa trajetória.

Aos médicos, fonoaudiólogos e funcionários do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário de Brasília – HUB, pelo apoio e ensinamentos, não só durante o doutorado como também durante meu aperfeiçoamento médico.

A todos que direta ou indiretamente participaram na concretização desse ideal.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

(Albert Einstein)

RESUMO

SOARES, VYR. O Papel das Vesículas Extracelulares na Fisiopatologia da Perda Auditiva Ocasionalada pelo Schwannoma Vestibular. 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Introdução: Apesar do schwannoma vestibular (SV) ser um tumor do nervo vestibular, a perda auditiva (PA) é o sintoma mais comum, presente em 95% dos pacientes. Entretanto, a fisiopatologia dessa PA ainda é desconhecida. A compressão do nervo coclear pelo tumor não é capaz de elucidar completamente sua fisiopatologia e levanta a hipótese que a PA provocada pelo SV pode estar relacionada às substâncias secretadas pelo tumor presentes no líquido que banha a cóclea. **Objetivo:** Este trabalho identifica se as vesículas extracelulares (VE) derivadas do SV são mediadores no dano de células cocleares. **Métodos:** VEs foram isoladas de cultura de linhagem celular (células HEI-193) e de cultura de células primárias de SV de pacientes com boa audição (BA) e de pacientes com PA. As VEs foram caracterizadas usando o Nanosight e microscopia eletrônica de transmissão. O conteúdo de RNA das VEs foi extraído. O efeito das VEs sobre cultura de neurônios do gânglio espiral e sobre cultura *ex-vivo* de cócleas de camundongos foi estudado usando um sistema de cultura duplo e pela marcação das VEs com PKH-67. Mudanças provocadas pelas VEs nas células cocleares foram quantificadas utilizando imunohistoquímica e microscopia confocal. Transfecção da linhagem celular de SV com plasmídeo contendo GFP (proteína fluorescente verde) foi confirmada com reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). **Resultados:** Células tumorais humanas de pacientes com PA produzem VEs que podem causar danos em neurônios do gânglio espiral. Em contraste, VEs de células tumorais associados com BA não foram capazes de provocar danos as células cocleares. **Conclusão:** Este é o primeiro relato de VEs derivadas de SV. Essas VEs quando originadas de SV associados a PA eram capazes de causar danos seletivos nas células cocleares, identificando assim um novo e potencial mecanismo de perda auditiva neurosensorial em pacientes com SV.

PALAVRAS-CHAVE: Vesículas Extracelulares; Schwannoma Vestibular; Perda Auditiva; Micro RNAs.

ABSTRACT

SOARES, VYR. The Role of Extracellular Vesicles in the Pathophysiology of Hearing Loss Caused by Vestibular Schwannoma. 2017. Tese (Doctoral) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Introduction: Although vestibular schwannoma (VS) is a tumor of the vestibular nerve, hearing loss (HL) is the most frequent symptom, presenting in 95% of the patients. However, the pathophysiology of HL is not well understood. The compression of cochlear nerve by the tumor is not able to explain the cause of hearing loss perfectly and raise the hypothesis that HL may be related to tumor secretome that reach the cochlea. **Objective:** This research explores the role of VS-secreted extracellular vesicles (EVs) as a major contributing factor in cochlear cells damage. **Methods:** EVs were isolated from VS cell line HEI-193 and primary cultured human VS cells from patients with good hearing or poor hearing. The EVs were characterized using a Nanosight device and transmission electron microscopy and by extracting their RNA content. The EVs' effects on cultured murine spiral ganglion cells and organotypic cochlear cultures were studied using a transwell dual-culture system and by direct labeling of EVs with PKH-67 dye. EV-induced changes in cochlear cells were quantified using confocal immunohistochemistry. Transfection of VS cells with a green fluorescent protein-containing plasmid was confirmed with reverse transcription PCR. **Results:** Human VS cells, from patients with poor hearing, produced EVs that could damage spiral ganglion neurons. In contrast, EVs derived from VS cells from patients with good hearing did not damage the cultured cochlear cells. **Conclusion:** This is the first report on EVs derived from VSs and on the capacity of EVs from VSs from patients with hearing loss to selectively damage cochlear cells, thereby identifying a potential novel mechanism of VS-associated sensorineural hearing loss.

KEYWORDS: Extracellular Vesicles; Vestibular Schwannoma; Hearing Loss; Micro RNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura anatômica do ouvido.....	22
Figura 2 – Corte histológico da porção distal do CAI, sáculo e cóclea de um paciente de 75 anos com SV esquerdo.....	33
Figura 3 – Biogênese das VEs e sua interação com as células receptoras.....	39
Figura 4 – Esquema representativo da biogênese do miRNA.....	45
Figura 5 – Figura esquemática do órgão de Corti mostrando a localização dos principais miRNA expressos na fase pós-natal de camundongos.....	47
Figura 6 – Envolvimento dos miRNAs em três doenças do ouvido humano.....	48
Figura 7 – Câmara de Neubauer.....	53
Figura 8 – Cultura de cóclea de camundongos visualizadas à microscopia confocal.....	57
Figura 9 – Fluxograma com as modalidades de tratamentos as quais as culturas cocleares foram submetidas.....	59
Figura 10 – Células HEI-193 transfectadas com o plasmídeo GFP com diferentes concentrações de lipofectamina.....	67
Figura 11 – Seleção das células HEI-193 transfectadas com plasmídeo pCT-CD63-GFP utilizando puromicina.....	68
Figura 12 – SVs secretam VEs que contêm pequenos RNAs.....	72
Figura 13 – VEs de células HEI-193 coradas com PKH-67.....	73
Figura 14 – VEs podem ser internalizadas por células cocleares, incluindo NGE..	74
Figura 15 – VEs podem transferir RNA para as células coleares em cultura, incluindo NGE.....	76
Figura 16 – VEs de células HEI-193 danificam células cocleares em cultura.....	78
Figura 17 – O dano neural causado pelas VEs de células HEI-193 pode ser prevenido pela heparina.....	80
Figura 18 – Dados audiométricos dos pacientes.....	83
Figura 19 – VEs isoladas de SV associados a PA provocam danos em culturas de cócleas.....	85
Figura 20 – O concentrado sobrenadante de células HEI-193 pode causar danos nas CCs, enquanto as VEs podem causar danos em fibras neurais e NGEs.....	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios diagnósticos da neurofibromatose tipo 2.....	24
Quadro 2 – Classificação das vesículas extracelulares.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número anual de casos de schwannoma vestibular diagnosticados e sua incidência correspondente.....	26
Gráfico 2 – Dados demográficos e audiométricos dos pacientes estratificados pelos limiares de audição.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARF6	fator 6 de ribosilação do ADP (adenosina difosfato)
APC	ângulo pontocerebelar
ATP	adenosina trifosfato
BA	boa audição
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
CAI	conduto auditivo interno
CBA/CaJ	linhagem de camundongos
CC	células ciliadas
CCE	células ciliadas externas
CCI	células ciliadas internas
cDNA	DNA complementar
CD-UPRT	citocina deaminase fundida com uracil fosforibosiltransferase
cm	centímetro
COL9A1	isoforma curta do gene do colágeno
Cop-GFP	primer da proteína fluorescente verde
CO ₂	dióxido de carbono
CS	células de Schwann
Ctrl	controle negativo
Cy5	anticorpos secundário de coloração vermelha
Cy3	anticorpos secundário de coloração verde
DAPI	marcador nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindole
dB	decibel
Dicer/TRBP	proteína ligante de RNA responsiva a transativação
DGCR8	proteína ligante dsRNA do gene 8
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
DNMT3	DNA metiltransferase
Drosha	enzima RNase classe III
dTMP	deoxitimidina monofosfato
dTTP	deoxitimidina trifosfato

EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	fator de crescimento epidérmico
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EGFRvIII	variante mutante do mRNA EGFR
ERM	proteína da família ezrina-radixina-moesina
ESCRT	complexo endossomal de classificação requerido para transporte
FU	unidade fluorescente
<i>g</i>	unidade de aceleração correspondendo a 9,8065 m/s ²
GAPDH	primer da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
G-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos
GFP	proteína fluorescente verde
GTPases	enzima que hidrolisa a GTP (guanosina trifosfato)
HBSS	solução balanceada de Hanks
HDL	lipoproteína de alta densidade
HEI	House Ear Institute
HEI-193	linhagem de células derivadas de schwannoma vestibular humano
Hep	heparina
Hsc70	proteína do choque tóxico
Hz	hertz
IL-8	interleucina 8
kb	kilo (quilo) pares de base
KHz	kilo (quilo) hertz
Lamp2b	proteína de membrana associada a lisossomo tipo 2
M	solução um molar
MCP-1	proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1
MEEI	Massachusetts Eye and Ear Infirmary
MFGE8	proteína globular da gordura do leite associada ao fator 8 do EGF
µg	micrograma
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
min	minutos
MIP-1β	proteína inflamatória de macrófagos tipo 1 beta
miRNA	micro RNA
ml	mililitro
µl	microlitro

mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
mM	milimolar
μM	micromolar
μm	micrômetro
μm ²	micrômetro quadrado
mRNA	RNA mensageiro
MYO VII	miosina VIIA
MVB	corpos multivesiculares (em inglês, multivesicular bodies)
NEURO F	neurofilamento
NF2	neurofibromatose tipo 2
ng	nanograma
NGE	neurônios do gânglio espiral
NHS	soro normal de cavalo estéril ou <i>normal horse serum</i>
nm	nanômetro
nt	nucleotídeos
NT-3	neurotrofina-3
OEA	otoemissões acústicas
PA	perda auditiva
PANS	perda auditiva neurosensorial
PAR4	proteína de resposta a apoptose prostática
pb	pares de base
PBS	solução tampão fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDCD6IP	proteína de interação tipo 6 de morte programada
PEATE	potenciais evocados auditivos de tronco encefálico
pg	picograma
PI3K/AKT	fosfoinosídeo 3-cinase/proteína cinase B
PKH-67	marcador fluorescente verde
PTA	média tritonal ou <i>pure tone average</i>
PTEN	homólogo da tensina e fosfatase
p/v	partes por volume
P3	camundongo no terceiro dia de vida
P5	camundongo no quinto dia de vida

qRT-PCR	PCR quantitativa via transcriptase reversa
RANTES	proteína regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
RCE	radiocirurgia estereotáxica
rDNase	desoxirribonuclease recombinante
RIN	número de integridade do RNA
RISC	complexo silenciador induzido por RNA
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
RNM	ressonância nuclear magnética
rRNA	RNA ribossomal
RTE	radioterapia estereotáxica
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
s	segundos
SCH	schwannomatose
SEM	erro padrão da média ou <i>standard error of mean</i>
SNARE	fator solúvel sensível a N-etilmaleimida
SV	schwannoma vestibular
SBF	soro bovino fetal
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TC	tomografia computadorizada
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
Tr	transfectado
TSG101	proteína do gene 101 de susceptibilidade a tumor
TSPAN29	tetraspanina 29
TUJ-1	proteína beta-tubulina
VE	vesículas extracelulares
XPO5	exportina 5
WD	discriminação das palavras ou <i>word discrimination</i>
5-FC	5-fluorocitosina
5-FU	5-fluorouracil
5-FdUMP	5-fluoro-deoksiuridina monofosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 SCHWANNOMA VESTIBULAR.....	21
2.1.1 Definição.....	21
2.1.2 Biologia Molecular.....	24
2.1.3 Epidemiologia.....	25
2.1.4 Sintomatologia.....	27
2.1.5 Diagnóstico.....	28
2.1.6 Tratamento.....	30
2.1.7 Perda da Audição no Schwannoma Vestibular.....	32
2.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	35
2.2.1 Definição e Terminologia.....	35
2.2.2 Isolamento e Caracterização.....	37
2.2.3 Conteúdo e Biogênese.....	37
2.2.4 Funções Biológicas.....	40
2.2.5 Aplicações Clínicas.....	41
2.2.6 Perda da Audição e as Vesículas Extracelulares.....	43
2.3 MICRO RNA.....	43
2.3.1 Introdução.....	43
2.3.2 Biogênese e Captação.....	44
2.3.3 MicroRNA e a Orelha Interna.....	47
2.3.4 MicroRNA e o Schwannoma Vestibular.....	49
3 OBJETIVOS	51
3.1 OBJETIVO GERAL.....	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	52
4.1.1 Cultura da Linhagem de Células HEI-193.....	52

4.1.2 Cultura de Células Primárias Tumorais	53
4.1.3 Cultura de Neurônios do Gânglio Espiral	55
4.1.4 Cultura <i>ex-vivo</i> de Cócleas de Camundongos	56
4.2 ISOLAMENTO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	60
4.2.1 Preparo de SBF sem Vesículas Extracelulares	60
4.2.2 Isolamento de Vesículas Extracelulares de Células HEI-193	60
4.2.3 Isolamento de Vesículas Extracelulares de Células Primárias	61
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS VESICULAS EXTRACELULARES.....	61
4.3.1 Análise Usando Nanosight	61
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	62
4.4 EXTRAÇÃO DE RNA.....	62
4.5 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO RNA.....	63
4.6 AMPLIFICAÇÃO DO RNA.....	64
4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	64
4.8 MARCAÇÃO DAS VEs COM PKH-67.....	65
4.9 TRANSFEÇÃO COM O PLASMÍDIO pCT-CD63-GFP.....	66
4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA DAS AMOSTRAS.....	67
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
4.12 COMITÊ DE ÉTICA.....	70
5 RESULTADOS	71
5.1 SCHWANNOMA VESTIBULAR SECRETA VESÍCULAS EXTRACELULARES	71
5.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS PELO SCHWANNOMA VESTIBULAR CONTÊM RNA.....	71
5.3 NEURÔNIOS DO GÂNGLIO ESPIRAL SÃO CAPAZES DE INTERNALIZAR VESÍCULAS SECRETADAS PELO SCHWANNOMA VESTIBULAR.....	73
5.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES PODEM TRANFERIR RNA DO SCHWANNOMA VESTIBULAR PARA AS CÉLULAS COCLEARES <i>IN VITRO</i>	75
5.5 VESÍCULAS SECRETADAS PELAS CÉLULAS HEI-193 DANIFICAM CÉLULAS COCLEARES.....	76
5.6 DANO NEURAL CAUSADO PELAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS HEI-193 PODE SER PREVENIDO PELA HEPARINA.....	78
5.7 VESÍCULAS SECRETADAS PELO SCHWANNOMA VESTIBULAR	

ASSOCIADO A PERDA DE AUDIÇÃO CAUSAM DANOS AS CÉLULAS COCLEARES.....	81
6 DISCUSSÃO.....	87
7 CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
APÊNDICE.....	109
ANEXOS.....	111
Anexo A - Protocolo de Extração de RNA Total.....	112
Anexo B - Protocolo de Extração de microRNA.....	114

1 INTRODUÇÃO

As vesículas extracelulares (VE) incluem os exossomos, microvesículas e outras estruturas vesiculares liberadas pelas células. São vesículas, medindo entre 30 e 1000 nm, que contém o perfil genético das células de origem, incluindo RNA, DNA e microRNA (miRNA), e proteínas dentro de uma membrana bilipídica.(1-3) VEs são produzidas por células normais como também por células defeituosas, tais como células neoplásicas,(4) de qualquer órgão e têm sido identificadas em virtualmente todos os fluidos corporais.(5) VEs têm sido reconhecidas como importantes mediadores na comunicação intercelular pela transferência de sua carga genética entre células, tanto localmente como sistemicamente.(6) VEs têm emergido como importantes marcadores séricos de doenças humanas, incluindo doenças neurodegenerativas(7) e neoplasias do sistema nervoso central,(8) sendo hábil de acuradamente prever doenças 1 a 10 anos antes de se tornarem clinicamente manifestas.(7) Além disso, terapêutica utilizando VEs estão sendo desenvolvidas e já têm entrado na arena clínica.(8) VEs produzidas por schwannomas vestibulares (SV) ainda não haviam sido descritas.

Os schwannomas vestibulares são tumores originados no nervo vestibular, responsável pela transmissão de informações sobre o equilíbrio entre a orelha interna e o cérebro. O SV é o quarto tumor intracranial mais frequente em adultos.(9) Os SVs ocorrem esporadicamente como um tumor unilateral em 95% dos pacientes ou em associação com neurofibromatose tipo 2 (NF2), sendo patognomônico dessa última a presença de tumores bilaterais. Os SVs se originam das células de Schwann (CS) produtoras de mielina presentes no nervo vestibular devido a uma perda somática da função da proteína merlin por mutação no gene *NF2*,(10,11) ou por outras causas ainda não definidas. A perda auditiva neurosensorial (PANS) ocorre em 95% dos pacientes com esses tumores,(12) sendo o sintoma mais frequente. Entretanto a causa de perda de audição (PA) ainda não é bem entendida. A PANS pelo crescimento do SV resulta em parte pela compressão do nervo coclear adjacente que serve como via de condução sensorial. Entretanto, observações clínicas sugerem que podem haver outras explicações para a PANS: (i) surdez em pacientes com SV pode ocorrer subitamente, sem mudanças no tamanho tumoral;(13) (ii) SV com grandes dimensões podem não causar PA enquanto

pequenos podem;(14,15) e (iii) o tamanho do SV esporádico dentro do conduto auditivo interno (CAI) não se correlaciona com a intensidade da perda auditiva ipsilateral(15,16), embora exista correlação entre o tamanho do SV e a PA em pacientes com NF2.(17) Exame histopatológico em pacientes não-tratados demonstra dano coclear ipsilateral incluindo perda de células ciliadas internas (CCI) (75% dos espécimes), células ciliadas externas (CCE) (88%) e neurônios do gânglio espiral (NGE) (85%).(14) Além disso, a expressão genética de tumores associados com perda da audição difere daquela de tumor acompanhados de boa audição.(18)

Assim, esse dano às células cocleares, as quais são banhadas por fluidos na proximidade do schwannoma vestibular, levanta a hipótese que a perda de audição pode estar relacionada a substâncias secretadas pelo próprio tumor. Este trabalho identifica se as vesículas extracelulares derivadas do SV são mediadores no dano de células cocleares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SCHWANNOMA VESTIBULAR

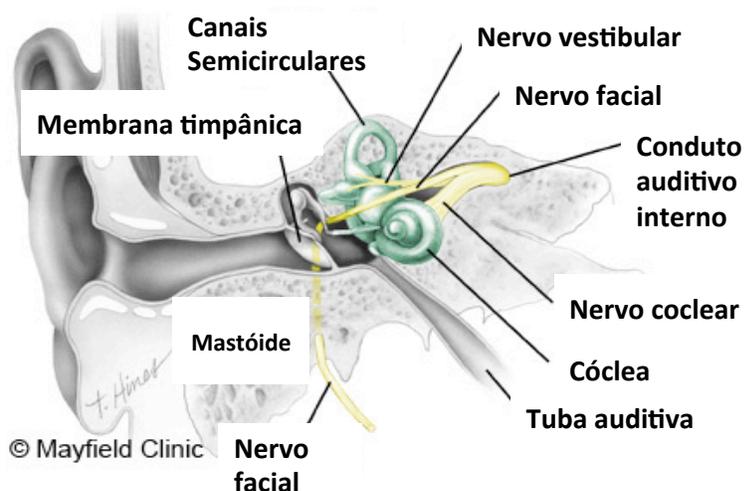
2.1.1 Definição

O schwannoma vestibular, também conhecido com neurinoma do acústico, consiste em um tumor benigno originado das células de Schwann do componente vestibular do nervo vestibulo-coclear (VIII par craniano). Especificamente, origina-se lateral a junção entre as células da glia e as células de Schwann (zona de Obersteiner-Redlich).(19-21) O nervo vestibulo-coclear transmite informações sobre o equilíbrio (porção vestibular superior e inferior) e sobre a audição (porção coclear). Emerge do sulco bulbo-pontino lateralmente ao nervo facial e medialmente ao flóculo cerebelar. Penetra no osso temporal juntamente com o nervo facial (VII par craniano) através do conduto auditivo interno. O CAI possui um comprimento de aproximadamente 10 mm, diâmetro horizontal de 7 mm e diâmetro vertical de 4 mm. Assim, os nervos vestibulares, o nervo coclear e o nervo facial estão intimamente relacionados dentro dessa estrutura anatômica, como explicitado na figura 1.(22,23)

O SV foi denominado inicialmente como neuroma (ou neurinoma) do acústico. O seu aspecto histológico caracterizado pela presença de fibras paralelas semelhantes a axônios sugeria um neuroma. Além disso, a presença frequente de perda auditiva pelos pacientes por ele acometido indicaria sua provável origem no nervo coclear. O termo schwannoma vestibular só se tornou realmente consenso em 1992.(24) Os pacientes submetidos a exames vestibulares mostravam alterações nas provas calóricas, sugerindo sua origem vestibular. A prova calórica, entretanto, avalia apenas a função no canal semicircular lateral que é inervado pela porção superior do nervo vestibular. Acreditava-se assim que a principal origem do tumor situava-se no nervo vestibular superior. Contudo, a predileção do SV pelo nervo vestibular superior e inferior ainda não é definida, uma vez que estudos envolvendo pacientes submetidos a cirurgia evidenciam que mais de 90% dos casos têm origem no nervo vestibular inferior.(25,26) Em contrapartida, estudos anatomopatológicos

do osso temporal de pacientes sintomáticos e assintomáticos mostram que são acometidos igualmente.(21)

A. Anatomia Normal



B. Schwannoma Vestibular

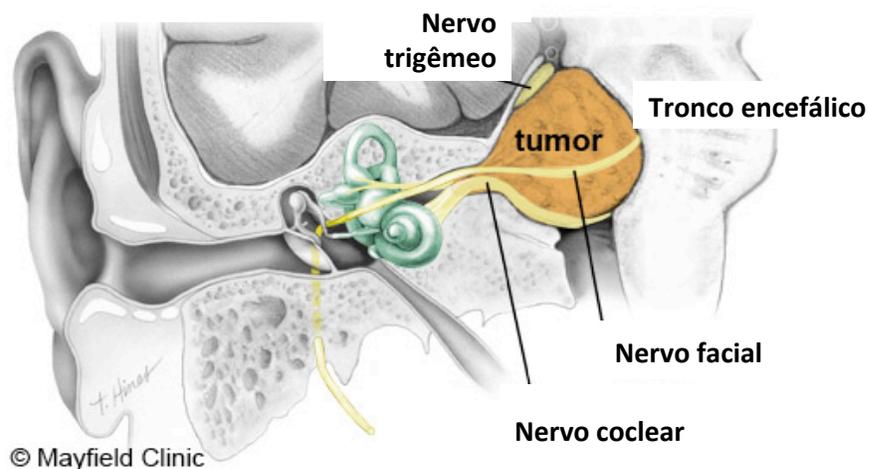


Figura 1 – Estrutura anatômica do ouvido. (A) Anatomia normal do ouvido, mostrando a íntima relação entre os nervos vestibulares, o nervo facial e o nervo coclear dentro do conduto auditivo interno. (B) Schwannoma vestibular com expansão para o ângulo pontocerebelar, deslocando os nervos coclear, facial e trigêmeo, e comprimindo o tronco encefálico. Fonte: Modificado de: Tew J, Warnick R, Andaluz N. Mayfield Clinic, University of Cincinnati, Department of Neurosurgery, Ohio. Acesso em 28 de setembro de 2016. <http://www.mayfieldclinic.com/PE-Acoustic.htm>.(23)

Schwannomas vestibulares podem ser identificados em duas entidades: schwannoma vestibular esporádico (ou unilateral) e neurofibromatose tipo 2.

Os schwannomas vestibulares esporádicos consistem na apresentação mais comum, constituindo 95% de todos os SVs. Usualmente ocorrem entre a 4ª ou 5ª década de vida, acometendo 10 em 1 milhão de pessoas por ano.(27) Apesar de serem tumores benignos unilaterais e com crescimento lento podem se tornar grandes o suficiente para provocar hidrocefalia, compressão do tronco encefálico e morte. Entretanto, mais comumente eles estão associados a perda da audição, zumbido e alterações do equilíbrio. Apesar da grande maioria dos SVs serem sólidos, alguns podem se apresentar com cistos intra ou extratumorais. Os schwannomas vestibulares císticos formam um grupo particularmente agressivo de SVs, podendo apresentar um crescimento rápido e invadir os nervos cranianos adjacentes. As chances de paralisia facial ou perda da audição seja com cirurgia ou com radioterapia são evidentemente maiores.(28)

A NF2 é uma síndrome rara, autossômica dominante, caracterizada por schwannomas vestibulares bilaterais com múltiplos meningiomas, tumores de nervos cranianos, gliomas ópticos, e tumores espinhais. Os critérios diagnósticos podem ser vistos no quadro 1.(29,30) A média de idade é de 25 anos, com muitos sintomas se manifestando bem antes ao diagnóstico. A sua incidência gira em torno de 1 em 33.000 nascidos vivos.(31) A doença se manifesta com bastante heterogeneidade variando de um indivíduo para outro. Apesar disso, pode-se distinguir duas formas básicas. Uma forma é mais severa, chamada de Wishart. Os indivíduos apresentam um início precoce com múltiplos tumores intracraniais (schwannomas e meningiomas) que resultam em cegueira, surdez, paralisias e possível morte por volta dos 40 anos. A outra forma é denominada Gardner, e é menos debilitante. Os pacientes permanecem assintomáticos por um longo período da vida, os schwannomas permanecem estáveis por longos anos e apresentam poucos meningiomas.(30)

Uma outra patologia que cursa com presença de schwannomas foi recentemente definida como schwannomatose (SCH). Caracteriza-se pela presença de múltiplos schwannomas, mas sem acometimento do nervo vestibular. É uma patologia rara, acometendo 1 em cada 40.000 nascidos vivos. Os critérios diagnósticos para SCH foram delimitados por MacCollin et al (32). Para o diagnóstico definido de SCH, é necessária a confirmação anatomopatológica de pelo

menos dois schwannomas, na ausência de tumor no nervo vestibular, demonstrada por exame de imagem realizado após os 18 anos de idade.(33)

Quadro 1 – Critérios diagnósticos da neurofibromatose tipo 2

<p>NF2 Confirmada ou Definitiva</p> <p>Schwannoma vestibular bilateral</p> <p>ou</p> <p>História familiar de NF2 (parente de primeiro grau) mais:</p> <ul style="list-style-type: none"> - SV unilateral antes dos 30 anos de idade ou - Dois 2 dos seguintes: meningioma, glioma, schwannoma, ou opacidade lenticular subcapsular posterior juvenil / catarata cortical juvenil
<p>Sugestivo de ou Provável NF2</p> <p>SV unilateral antes dos 30 anos de idade mais pelo menos 1 dos seguintes: meningioma, glioma, schwannoma, ou opacidade lenticular subcapsular posterior juvenil / catarata cortical juvenil;</p> <p>ou</p> <p>Múltiplos meningiomas (2 ou mais) mais:</p> <ul style="list-style-type: none"> - SV unilateral antes dos 30 anos de idade ou - Um dos seguintes: glioma, schwannoma, ou opacidade lenticular subcapsular posterior juvenil / catarata cortical juvenil;

Fonte: modificado de Hoa M, Slattery III WH. Neurofibromatosis 2. Otolaryngol Clin N Am 2012;45:315-32.(30)

2.1.2 Biologia Molecular

O gene supressor tumoral *NF2* está localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q12)(10,11). Mutações ou deleções promovendo a perda de sua função são frequentemente encontradas em indivíduos com NF2, SV esporádicos, meningiomas e em ocasionalmente outros tipos tumorais como o mesotelioma(34-36). A região de codificação do gene *NF2* compreende 90kb de DNA no cromossomo 22. Ele traduz uma proteína denominada merlin (proteína semelhante a

ezrina-radixina-moesina - ERM) ou schwannomina (derivada de schwannoma). Esta proteína é amplamente expressa em tecidos humanos, sendo mais significativa em células de Schwann, células meníngeas, cristalino e nervos. A merlin pertence a família ERM. Todas as proteínas pertencentes a essa família apresentam um domínio N-terminal globular (domínio FERM) e um C-terminal peculiar. As proteínas ERM estão envolvidas na remodelação celular por meio do citoesqueleto de actina.(37)

Apesar de ser um produto de um gene supressor tumoral, a merlin é considerada uma proteína multifuncional. Ela pode regular a proliferação celular, a motilidade e apoptose. Pode interagir com proteínas da superfície celular, alterando a dinâmica do citoesqueleto e regulando o transporte iônico.(38) Estudos com animais verificaram que a superexpressão do gene *NF2* em fibroblastos de camundongos e em schwannomas de ratos limitaram o crescimento celular e suprimiram a transformação celular. Já a perda da função da merlin alteraram o controle do crescimento em células de Schwann e em células meníngeas.(39,40)

2.1.3 Epidemiologia

A incidência do schwannoma vestibular tem aumentado nas últimas décadas.(41,42) Um estudo prospectivo realizado na Dinamarca envolvendo bases de dados de toda sua população mostra o aumento na incidência do schwannoma vestibular. Em 1976, a sua incidência era de 7,8 casos por 1 milhão de pessoas em 1 ano, saltando para 19 casos por 1 milhão de pessoas por ano em 2008. Já em 2011, apresentou incidência de 30,7 casos para 1 milhão de pessoas por ano.(43) O gráfico 1 representa essa mudança epidemiológica. Esse aumento da incidência também é verificado entre os pacientes idosos. A média de idade ao diagnóstico era de 48,2 anos em 1976, aumentando para 57,1 anos em 2011.(41,43) Tal fato, poder ser simplesmente devido ao envelhecimento da população. Poderia se pensar em um número maior de SV incidentais diagnosticados nessa idade. Contudo, estudos envolvendo indivíduos sintomáticos e assintomáticos não mostram diferenças entre a idade ao diagnósticos e do tamanho do SV.(44,45)

Vários fatores têm contribuído para esse aumento do número de casos diagnosticados. O acesso a informação é maior, aumentou o conhecimento tanto pela população em geral quanto pelos profissionais da saúde sobre o schwannoma vestibular e sua sintomatologia. O fator mais importante, talvez, tenha sido o acesso crescente a exames de diagnósticos mais modernos, incluindo ressonância nuclear magnética (RNM), audiometrias e potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE). Com a difusão da RNM na prática clínica e melhora na aquisição de imagens e utilização de contraste paramagnético (por exemplo o gadolínio), lesões com até 3 mm podem ser diagnosticadas. Isso é verificado nos estudos epidemiológicos que evidenciam a redução do tamanho do schwannoma vestibular ao diagnóstico. Até a década de 70 nenhum tumor intrameatal era diagnosticado, e os tumores grandes correspondiam a 40% de todos os diagnosticados. A média de tamanho era de 28,6 mm no período de 1976-1984. Já na primeira década do século 21, os tumores grandes correspondem apenas 6% dos diagnósticos enquanto que os tumores intrameatais já somam 33%, com média de tamanho de 9,9 mm no período de 2003-2011.(41,43)

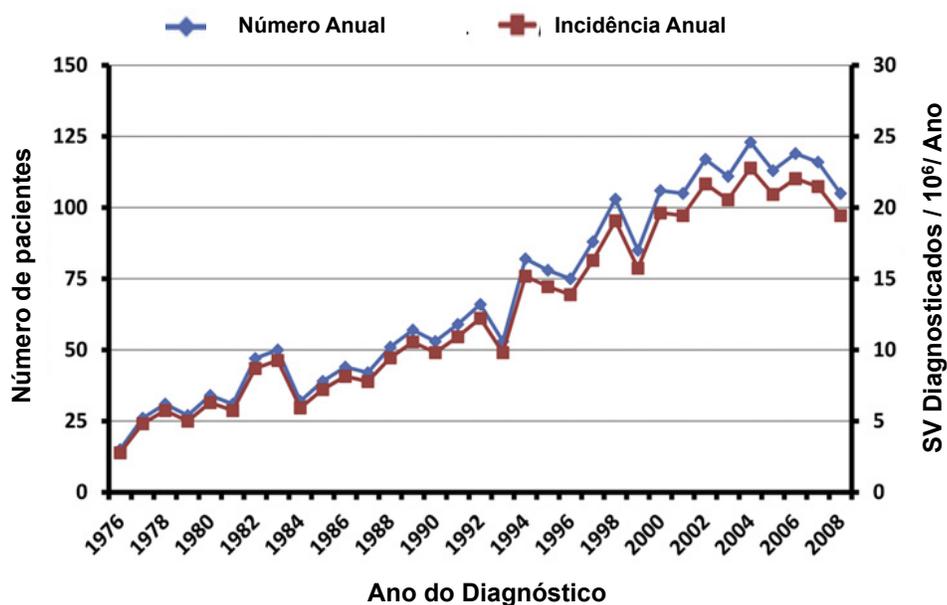


Gráfico 1 – Número anual de casos de schwannoma vestibular diagnosticados e sua incidência correspondente. Fonte: Stangerup SE, Caye-Thomasen P. Epidemiology and natural history of VS, *Otolaryngol Clin N Am* 2012;45:257-68. (41)

2.1.4 Sintomatologia

O sintoma inicial mais frequente é a perda de audição, presente em 95% dos pacientes.(46,47) Usualmente a hipoacusia é gradual, unilateral e neurosensorial, iniciando em frequências agudas. Alguns pacientes podem apresentar uma perda de audição súbita. Dos pacientes com SV até 26% podem apresentar surdez súbita durante o curso clínico. Já os pacientes que apresentam um quadro de perda súbita da audição apenas 1 a 2% são diagnosticados com schwannoma vestibular.(48) Mesmo com essa pequena probabilidade é imperativo o rastreio de pacientes com surdez súbita para descoberta de lesões retrococleares, tal como o schwannoma vestibular. Uma outra parte dos pacientes podem também apresentar uma audição normal ou até mesmo uma perda de audição bilateralmente simétrica. Esse padrão auditivo pode ocorrer em 1 a 15% dos pacientes com SV. Em pacientes com audição normal outros sintomas se tornam relevantes, tais como desequilíbrio, cefaléias e disfunções neurológicas (do nervo trigêmeo e do nervo facial). Em casos de hipoacusia bilateral, o rastreio para neurofibromatose tipo 2 também é recomendado.(49,50)

O zumbido é o segundo sintoma mais comum, estando presente em 53 a 70% dos pacientes.(46,51) Usualmente, o zumbido é unilateral, ipsilateral ao tumor, agudo e contínuo.(48) Geralmente estão acompanhados de perda de audição. Poucos pacientes apresentam zumbido sem perda da audição, por isso que pacientes com zumbidos assimétricos devem ser investigados para excluir lesões retrococleares.

A presença de vertigem não é tão frequente quanto se pensaria uma vez que o tumor é proveniente do nervo vestibular (superior ou inferior). Apenas 15 a 58% dos pacientes referem vertigem. A explicação para isso provavelmente se deve ao crescimento lento tumoral associado a uma capacidade do organismo de compensar a hipofunção vestibular ipsilateral, seja centralmente ou através do sistema vestibular contralateral.(47,52)

O acometimento do nervo trigêmeo é menos frequente e está relacionado ao tamanho tumoral. Pacientes com tumores pequenos (menos que 1 cm) praticamente não têm disfunção trigeminal. Os sintomas são mais frequentes em tumores grandes (maiores que 3 cm) em que os pacientes referem hiperestesia, parestesia, dores ou

redução do reflexo corneano.(46) Cefaléias também estão relacionadas ao tamanho tumoral. Apresentam início gradual e são de moderada intensidade. Pode ser holocranianas, mas alguns pacientes referem algia ipsilateral ao tumor.(46,48) Já disfunções do nervo facial são pouco comuns considerando a proximidade do nervo facial ao tumor. Apenas 10% dos pacientes apresentam algum tipo de disfunção do nervo facial. Sabe-se que as fibras do nervo facial são resistentes a compressão tumoral. Normalmente os sintomas são por hiperfunção (espasmos) ou hipofunção (paresias ou paralisias faciais).(46,47,51,53)

Sintomas de hipertensão intracraniana e disfunções de pares de nervos cranianos mais inferiores eram comuns em relatos antigos. O diagnóstico era feito tardiamente e os tumores alcançavam grandes dimensões ocupando o ângulo pontocerebelar e comprimindo o cerebelo e IV ventrículo.(54) Atualmente, com diagnóstico precoce de tumores intrameatais, os relatos desses sintomas têm se tornando cada vez mais raros.

2.1.5 Diagnóstico

A audiometria tonal é o primeiro exame diagnóstico realizado, acompanhada de teste de limiars e de reconhecimento de fala. Usualmente, os pacientes apresentam uma perda auditiva assimétrica e em altas frequências. Entretanto, alguns pacientes podem apresentar perdas em frequências graves ou uma curva audiométrica plana. Uma característica do schwannoma vestibular, por ser uma patologia retrococlear, é a redução na discriminação da fala incompatível com os limiars da audiometria tonal.(52) Assim, na presença de perda auditiva assimétrica com reduzido reconhecimento de fala torna necessária uma melhor investigação com testes eletrofisiológicos da audição e exames de imagens do ângulo pontocerebelar.

Normalmente, a impedanciometria mostra-se normal com curva tipo A devido a perfeita anatomia do ouvido médio e preservação da mobilidade da membrana timpânica. A pesquisa do reflexo do músculo estapédio, por sua vez, pode se mostrar ausente sugerindo a possibilidade de lesão retrococlear. Este reflexo consiste na contração do músculo estapédio em resposta a um som de alta

intensidade. Trata-se de um teste objetivo, independente da colaboração do paciente. É preciso que a cóclea, o nervo auditivo, o núcleo coclear ventral, o complexo olivar superior, o núcleo motor do nervo facial e o ramo motor do nervo facial (responsável pela inervação do músculo estapédio) tanto ipsilaterais quanto contralaterais estejam preservados para que o mesmo seja presente. Contudo, a sensibilidade deste teste é bastante variável, devendo ser avaliada em conjunto com os outros testes audiométricos.(55,56) Um outro teste envolvendo o reflexo do estapédio que pode ser utilizado na suspeita de lesão retrococlear é o teste do *decay* (fadiga periestimulatória) do reflexo. O teste consiste no fornecimento de um sinal de 10 dB acima do limiar do reflexo para a frequência de 500 Hz por 10 segundos e o reflexo contralateral é registrado. Repete-se o mesmo estímulo para a frequência de 1000 Hz. Não é testado em frequências agudas em decorrência da adaptação fisiológica em ouvintes normais e assim perde-se seu valor clínico. Se a amplitude da resposta diminuir em 50% durante os 10 segundos de teste, é considerado anormal e indicativo de comprometimento do nervo coclear. Assim como o reflexo do estapédio, a sensibilidade deste teste é variável.(55)

O potencial evocado auditivo do tronco encefálico é o registro da atividade elétrica dos neurônios das vias auditivas baixas em resposta a um estímulo sonoro. O registro forma ondas numeradas de I a VII referentes as áreas neuronais estimuladas. As ondas de I a VII correspondem: a porção distal do nervo coclear (I), a porção proximal do nervo coclear (II), ao núcleo coclear (III), ao núcleo do complexo olivar superior (IV), aos núcleos do lemnisco lateral (V), ao colículo inferior (VI) e ao corpo geniculado medial (VII). As ondas I e V são as maiores e as mais replicáveis. Após os registros e comparação entre as ondas, uma comparação interaural é realizada. A diferença interaural entre as ondas I e V é mais aplicável para o diagnóstico de lesões retrococleares, incluindo schwannoma vestibular. Uma diferença de latência de 0,2 milissegundos é considerada anormal. O PEATE tem uma sensibilidade variável. Estudos anteriores a RNM apresentavam sensibilidade de até 100%. O diagnóstico era feito tardiamente com tumores de grandes dimensões que apresentavam comprometimento do nervo coclear. Contudo com tumores menores que 1 cm, intrameatais, a sensibilidade caiu drasticamente com até 58% em alguns estudos.(52,57,58)

Os exames de imagem aumentaram a sensibilidade no diagnóstico do schwannoma vestibular. A tomografia computadorizada (TC), introduzida na década

de 70, falha no diagnóstico de tumores pequenos. Essa deficiência foi suprida pela RNM com contraste de gadolínio que se tornou o exame de escolha. Os protocolos para o conduto auditivo interno empregam uma imagem multiplanar com cortes finos e com resolução submilimétrica, maximizando a identificação de pequenas lesões. Tumores com 3 mm puderam ser diagnosticados. O SV apresenta-se com uma imagem esférica ou ovóide. Quando pequenos, ficam inteiramente confinados ao CAI. A medida que crescem, deixam o poro acústico e se direcionam para o ângulo pontocerebelar (APC). O SV é um tumor isointenso e hipointenso em T1 e T2 respectivamente, e apresenta aumento de sinal com gadolínio.(59) As imagens em T2 também auxiliam na detecção de cistos tumorais e da extensão do SV dentro do CAI, devido ao baixo sinal do tumor em contraste ao hipersinal do líquido cefalorraquidiano e do cisto intratumoral.(47)

Outras técnicas, tais como citologia do líquido, tomografia com emissão de pósitrons, e tomografia com emissão de fóton único, não são usadas rotineiramente. Para o diagnóstico do schwannoma vestibular, apenas a RNM, TC e exames audiológicos são suficientes.

2.1.6 Tratamento

O tratamento do schwannoma baseia-se em sua benignidade e na sua história natural de crescimento lento. Outros fatores que devem ser considerados são: a qualidade de vida do paciente, preservação de suas funções neurológicas (audição e mímica facial) e a escolha pessoal do paciente. Existem três modalidades terapêuticas: (1) observação; (2) radioterapia; e (3) cirurgia.

O acompanhamento tumoral com revisão da sintomatologia e com estudos de imagens seriados é sustentado pela história natural do schwannoma vestibular. Na maioria dos casos, o SV pode permanecer com tamanho inalterado por anos ou apresentar um crescimento lento. Estudos evidenciam que o schwannoma vestibular pode crescer a uma taxa de 0,3 a 1,4 mm/ano.(60) Existem relatos de redução do tamanho tumoral após longos períodos de acompanhamento.(61) O padrão de crescimento é diferente entre tumores intrameatais e intra-extrameatais. Os tumores intrameatais estão restritos ao conduto auditivo interno. Desses, 83% irão

permanecer intrameatais e 17% crescerão e alcançarão o ângulo pontocerebelar. Já os tumores intra-extrameatais se estendem ao APC. Destes, 1% poderão reduzir de volume, 70% permanecerão inalterados e 29% aumentarão de tamanho.(62) Assim, o simples acompanhamento do crescimento tumoral pode beneficiar dois terços dos pacientes.

O tratamento conservador é a modalidade preferida em pacientes assintomáticos, com pequenos tumores e em pacientes idosos (acima de 65 anos). Também é uma opção para pacientes que se recusam a cirurgia ou radioterapia mesmo com tumores de tamanho médio. Como o comportamento tumoral é imprevisível, alguns SV podem crescer continuamente com risco de compressão cerebelar e disfunções neurológicas. É considerada uma falha quando a taxa de crescimento é maior ou igual a 3 mm/ano. A porcentagem de falha varia entre 9% a 40%. Além do crescimento tumoral acentuado, outras razões para a falha do tratamento conservador são o aumento de sintomas cocleovestibulares (vertigem incapacitante e deterioração da audição) e a mudança na escolha prévia do paciente.(63-66)

O objetivo principal da microcirurgia é a ressecção completa tumoral com a preservação das funções neurológicas (nervo facial, nervo coclear, nervo trigêmeo, tronco encefálico). A taxa de controle, independente da técnica utilizada, alcança 95%. A recorrência do tumor após a remoção completa é extremamente rara. As técnicas cirúrgicas utilizadas são: a via pela fossa média, a retrosigmóidea e a translabiríntica.(67,68) A via fossa média é também conhecida por técnica transtemporal-supralabirintina. O conduto auditivo interno pode ser acessado sem destruição da orelha interna (cóclea e labirinto). O acesso ao ângulo pontocerebelar é limitado, com necessidade de extensiva retração do lobo temporal. Assim, essa via é indicada para tumores pequenos restritos ao CAI com menos de 1 cm de extensão medial ao APC e sem contato com o tronco encefálico em pacientes com audição preservada.(69) A via retrosigmóidea é também conhecida como técnica suboccipital lateral. Essa é a técnica mais comumente usada e indicada para tumores de todos os tamanhos, particularmente quando o objetivo é a preservação da audição. Alcança-se um amplo acesso ao ângulo pontocerebelar com exposição do IV ao XII par craniano.(70) A via translabiríntica permite um acesso direto ao APC e a identificação de todo trajeto do nervo facial. O CAI é perfeitamente exposto desde o fundo até o poro acústico sendo que toda a drilagem é extradural. Essa via está

indicada quando o paciente apresenta uma audição não útil ou quando a preservação da audição é improvável (tumores acima de 2,5 cm).(71)

A radiocirurgia estereotáxica (RCE) e a radioterapia estereotáxica (RTE) são opções terapêuticas com o objetivo de controle tumoral acompanhado de pouca morbidade. Desde sua introdução, ganhou grande aceitação pelos bons resultados em termos de controle do crescimento tumoral e a preservação das funções neurológicas. A RCE combina a localização estereotáxica com radiação, com a finalidade de distribuir a energia dessa radiação (fótons, prótons) em um alvo definido por imagens em 1 a 5 sessões. A RTE é similar mas a radiação é fracionada em mais de 5 sessões.(72) As indicações incluem idade avançada, falhas com microcirurgia prévia, escolha do paciente, comorbidades com elevado risco anestésico, e tumores pequenos com menos de 3 cm de diâmetro e com volume inferior a 15 cm³.(73)

2.1.7 Perda da Audição no Schwannoma Vestibular

Embora a hipoacusia seja o principal sintoma em pacientes com SV, a sua fisiopatologia ainda é desconhecida. Dada a proximidade do tumor ao nervo coclear, a degeneração do nervo coclear pela compressão tumoral seria a principal hipótese. Mahmud et al (74) estudaram 11 ossos temporais de pacientes com SV unilaterais que não foram submetidos à cirurgia e não encontraram correlação entre os limiares auditivos e o tamanho ou o volume tumoral. Também não houve relação entre a redução na discriminação das palavras e aumento do tamanho tumoral. Quando compararam a contagem de neurônios do gânglio espiral (NGE) e o tamanho ou volume tumoral houve significância estatística. Assim, tumores maiores apresentam uma população reduzida de NGE, corroborando com outros estudos com ossos temporais humanos de pacientes com SV que mostram claramente a degeneração de neurônios do gânglio espiral.(75,76) Contudo, essa população reduzida de NGE não foi capaz de explicar a redução dos limiares auditivos nesses pacientes, sugerindo que outros fatores além da contagem do NGE têm implicações sobre os resultados audiométricos.

Roosli et al (14) estudaram 32 ossos temporais de pacientes com SV e utilizaram o lado contralateral como controle. Houve uma maior perda de células ciliadas internas, células ciliadas externas, neurônios do gânglio espiral e uma maior quantidade de precipitado protéico na orelha interna do lado ipsilateral ao tumor (Figura 2). Não houve invasão coclear diretamente pelo tumor e não foi identificado oclusão de vasos cocleares ou redução do número desses vasos no lado acometido pelo tumor. Além disso, foi encontrado precipitados acidófilos dentro da cóclea, juntamente com a endolinfa e a perilinfa. A elevação dos níveis de proteínas na perilinfa tem sido descrita em pacientes com SV em níveis 5 a 15 vezes superiores ao normal.(77) Análise proteômica da perilinfa também evidenciam uma elevada concentração de proteínas em pacientes com SV quando comparados com controle.(32) Apesar de origem incerta, essas proteínas podem ser resultado de transudação ou material proteináceo gerado pelo próprio tumor e capaz de alcançar a cóclea.(79) Acredita-se que esse material seja produto de genes ativados pelo tumor e que poderiam interferir no funcionamento normal da cóclea.(80)

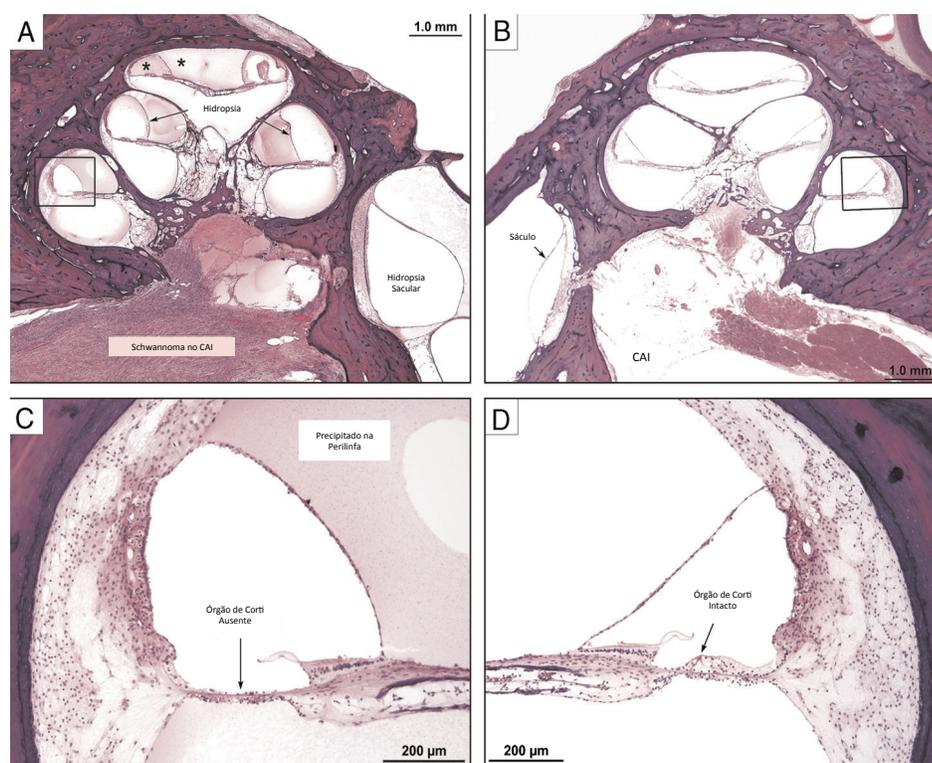


Figura 2 – Corte histológico da porção distal do CAI, sáculo e cóclea de um paciente de 75 anos com SV esquerdo. (A) SV no CAI que alcança o fundo mas sem invasão da orelha interna. A cóclea mostra precipitado acidófilo dentro do espaço endolinfático e perilinfático (asterisco) tão bem como hidropsia endolinfática em todos os giros. Há também hidropsia do sáculo. (B) Visão do ouvido contralateral mostrando ausência de hidropsia e sem precipitado dentro da orelha interna. Amplificação dos quadrados pode ser vista em (C) e (D). Perda de células ciliadas ipsilateral ao SV (C) e órgão de Corti intacto no lado contralateral (D). Fonte: modificado de Roosli C, Linthicum FH Jr, Cureoglu S, Merchant SN. Dysfunction of the cochlea contributing to hearing loss in acoustic neuromas: an underappreciated entity. *Otol Neurotol* 2012;33(3):473-80.(14)

A possibilidade de dano coclear pelo SV tem implicações sobre a acurácia dos exames audiológicos utilizados no diagnóstico. Se a perda de audição ocasionada pelo SV fosse unicamente pela compressão do nervo coclear e sem efeito sobre a cóclea, era de se esperar a ausência de respostas ao PEATE e preservação das otoemissões acústicas (OEA). As otoemissões acústicas avaliam o funcionamento das células ciliadas externas, estando presentes em PA de até 40 dB. Entretanto, clinicamente se observa um comprometimento e até ausência das OEA.(81) O dano coclear evidenciado por Roosli et al (14) com perda de CCE explicam porque as OEA podem estar ausentes em pacientes com SV. Clinicamente, também se observa que pequenos tumores com perda auditiva documentada podem apresentar PEATE normal. Uma explicação pode ser pelo mecanismo da perda de audição ser puramente coclear.(82)

Tumores são conhecidos por produzir citocinas e o SV não seria uma exceção. Tem-se demonstrado que as citocinas são importantes para a perfeita homeostase coclear.(83) Dessa forma, aventa-se a hipótese de que citocinas ou outras substâncias liberadas pelo schwannoma vestibular poderiam alcançar a cóclea e provocar mudanças degenerativas dentro do labirinto. Isso explicaria a deterioração auditiva em pacientes submetidos a radiocirurgia, radioterapia estereotáxica ou quando o tumor é parcialmente removido. O SV residual, apesar de ter o crescimento controlado, permaneceria liberando substâncias que alterariam a homeostase coclear e ocasionaria danos as células ciliadas e aos neurônios do gânglio espiral.(84)

O mecanismo coclear como adjuvante na perda auditiva pelo SV é fortalecido pelo estudo de Stankovic et al (18). Estudando o genoma de SV estratificados pelos limiares auditivos (comparação entre pacientes com boa audição e com perda auditiva), os autores encontraram possíveis genes determinantes de perda auditiva associados ao SV. Os quatro genes que podem estar associados a PA foram: *PEX5L*, *RAD54B*, *PSMAL* e *CEA*. De alguma forma, esses genes regulariam a hiperexpressão de proteínas que alcançariam a cóclea e alterariam sua homeostase. Questiona-se se não só citocinas como também outras substâncias secretadas pelo tumor, ou a carga genética do SV associado a perda de audição, poderiam alcançar a cóclea e serem expressos pelas células cocleares. Nesse contexto, as vesículas extracelulares, em especial os exossomos, ganham importância.

2.2 VESÍCULAS EXTRACEULARES

2.2.1 Definição e Terminologia

O termo vesículas extracelulares é uma denominação geral para componentes celulares liberados para fora das células que são revestidos por membrana. Existem inúmeros termos para descrevê-las tais como exossomos, vesículas exossomos-*like*, microvesículas, microvesículas formadas por “*shedding*” de membrana, epididimossomos, argossomos, prominossomos, prostassomos, dexossomos, texossomos, oncossomos, corpos apoptóticos. As VEs são classificadas de acordo com a sua célula de origem, função biológica exercida ou a partir da sua biogênese.(85) De acordo com sua biogênese, existem três principais classes de vesículas extracelulares, que são: exossomos, microvesículas e os corpos apoptóticos. As características de cada classe podem ser vistas no quadro 2. As duas primeiras apresentam semelhanças: são derivadas de membrana celular, apresentando uma camada bilipídica, com tamanho variando de 30 nm a 1.000 nm dependendo da célula de origem.(1) As duas classes apresentam proteínas e ácidos nucléicos em seu interior, mas os exossomos podem acomodar componentes adicionais. Isso porque os mecanismos de biogênese dos exossomos podem ser

regulados e a carga protéica e genética dos exossomos será determinada a partir da função que ele exercerá.

Quadro 2 – Classificação das vesículas extracelulares. A classificação das vesículas extracelulares pode ser baseada na sua origem celular e na sua função biológica, alternativamente as vesículas extracelulares podem também ser categorizadas tendo como base sua biogênese

Tipo de Vesícula	Características			
	Origem	Tamanho	Marcadores	Conteúdo
Exossomos	Via endossomal: dobramentos de membrana intraluminais de corpos multivesiculares e fusão de corpos multivesiculares com membrana celular	30-120 nm	Tetraspaninas (tais como TSPAN29 e TSPAN30), componentes ESCRT, PDCD6IP, TSG101, Flotilina, MFGE8	mRNA, microRNA, e outros RNAs não codificantes, proteínas de membrana e citoplasmáticas incluindo receptores e moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC)
Microvesículas	Superfície celular: evaginações da membrana celular	50-1.000 nm	Integrinas, selectinas ligantes do CD40	mRNA, miRNA, RNAs não codificantes, proteínas citoplasmáticas e proteínas de membrana incluindo receptores
Corpos Apoptóticos	Superfície celular: evaginações da membrana celular de células apoptóticas	500-2.000 nm	Expressivas quantidades de fosfatidilserinas	Fragmentos nucleares e organelas celulares

ESCRT, complexo endossomal de classificação requerido para transporte. MFGE8, proteína globular da gordura do leite associada ao fator 8 do EGF (fator de crescimento epidérmico). PDCD6IP, proteína de interação tipo 6 de morte programada (também conhecida como ALIX). TSG101, proteína do gene 101 de susceptibilidade a tumor. TSPAN29, tetraspanina 29. Fonte: modificado de Andaloussi AE, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov 2013;12:347-57.(1)

De forma geral, os termos exossomos e microvesículas têm sido utilizados em várias publicações. Ainda não se tem o completo entendimento da biogênese das

vesículas extracelulares, existem inconsistências na individualização dessas vesículas durante o processo de purificação e na sua identificação.(1) Por isso, reservou-se o termo vesículas extracelulares como referência às vesículas incluídas no presente estudo.

2.2.2 Isolamento e Caracterização

As vesículas extracelulares têm sido isoladas de todos os fluidos corporais, incluindo sangue, urina, líquido, saliva, lágrimas, ascite, sêmen, secreção nasal, leite materno, dentre outros.(5) O método de isolamento mais utilizado é a centrifugação diferenciada para a eliminação de debris celular seguindo de uma ultracentrifugação (100.000g ou 120.000g) para formação do pellet com nanopartículas ou seguido de suspensão em gradiente de sacarose. Outros métodos consistem em isolamento por filtração seriada, utilização de anticorpos e separação por microfluidos(86). As partículas são quantificadas através de seus movimentos brownianos utilizando o Nanosight. As VEs podem ser visualizadas e caracterizadas pela microscopia eletrônica, com os exossomos apresentando um formato arredondado de taça de vidro quando vistos superiormente (*cup shape glass*).(87)

2.2.3 Conteúdo e Biogênese

A superfície dos exossomos é caracterizada pela presença de várias famílias de proteínas: tetraspaninas (CD63, CD81, CD9), proteínas do choque tóxico (Hsc70), proteínas lipossomais (Lamp2b) e proteínas de fusão (CD9, flotilina, anexinas) (quadro 2). Essas proteínas acima são exclusivamente expressadas na superfície dos exossomos, o que os diferencia de outras vesículas como, os corpos apoptóticos e as microvesículas “shedding”. Algumas dessas proteínas como as tetraspaninas são utilizadas como marcadores e em processos de isolamento de exossomos. Entretanto mais de 11.000 proteínas têm sido associadas com exossomos.(1)

Exossomos também contêm ácidos nucleicos, RNA e miRNA. Presença de RNA mensageiro (mRNA) foi reportada pela primeira vez por Valadi et al (2) em 2007. Eles também encontraram presença de pequenos fragmentos de RNA, incluindo miRNA. Contudo, os exossomos não continham ou apenas possuíam uma pequena quantidade de RNA ribossomal (rRNA 18S- e 28S-) quando comparados com as células doadoras. Não foi detectada a presença de DNA. Sabe-se que o RNA, quando se apresenta livre, é facilmente degradado por ribonucleases (RNases, enzimas que degradam moléculas de RNA em pequenos componentes). Valadi et al (2) também demonstraram que o conteúdo de RNA exossomal fica protegido dentro da camada bilipídica não sendo assim degradado pelas RNases. Além disso, a quantidade de RNA era suficiente para a síntese de DNA complementar (cDNA) e regulava a produção de novas proteínas pela célula receptora.

O conteúdo de RNA dos exossomos difere da sua célula de origem. Ekström et al (88) compararam o perfil de RNA de mastócitos e seus exossomos. O número de mRNA detectados no exossomos foi 15% do número de mRNA presente na célula doadora. Entretanto, havia mRNAs presentes apenas nos exossomos e uma diferença no perfil desses mRNAs entre as células e seus exossomos. Foi demonstrado, também, que os exossomos são enriquecidos de microRNAs, com muitos miRNAs presentes apenas nos exossomos, e alguns deles em elevadas concentrações. Acredita-se que o conteúdo de RNA presentes nos exossomos seja selecionado especificamente para exercer determinadas funções, ao invés de ser uma amostra randômica do perfil de RNA da célula de origem. Em adição, os microRNAs têm a capacidade de regular a translação de muitos diferentes tipos de mRNAs, ilustrando a enorme capacidade dos microRNAs exossomais de regular a produção de proteínas nas células receptoras.

Os exossomos são uma população homogênea de vesículas formadas a partir de invaginações da membrana dos corpos multivesiculares (MVB – *multivesicular bodies*) (Figura 3). Os MVB são endossomos, organelas membranosas responsáveis pelo processamento de moléculas e ligantes internalizados pela membrana plasmática. Durante, o processo de maturação dos endossomos ocorre múltiplas invaginações de sua membrana originando inúmeras vesículas em seu interior, momento no qual são denominadas de MVB.(89) A seleção do conteúdo dos exossomos envolve o ESCRT e outras proteínas associadas tais como o PDC6IP (ALIX) e TSG101. Uma outra via alternativa,

independente de ESCRT, pode produzir exossomos com composição bioquímica diferente. Os exossomos são secretados a partir da fusão das vesículas destacadas dos MVB com a membrana plasmática. Este processo depende de GTPases (RAB27A, RAB11 e RAB31). Um mecanismo alternativo para a liberação de exossomos envolve a proteína SNARE (fator solúvel sensível a N-etilmaleimida).(1,90)

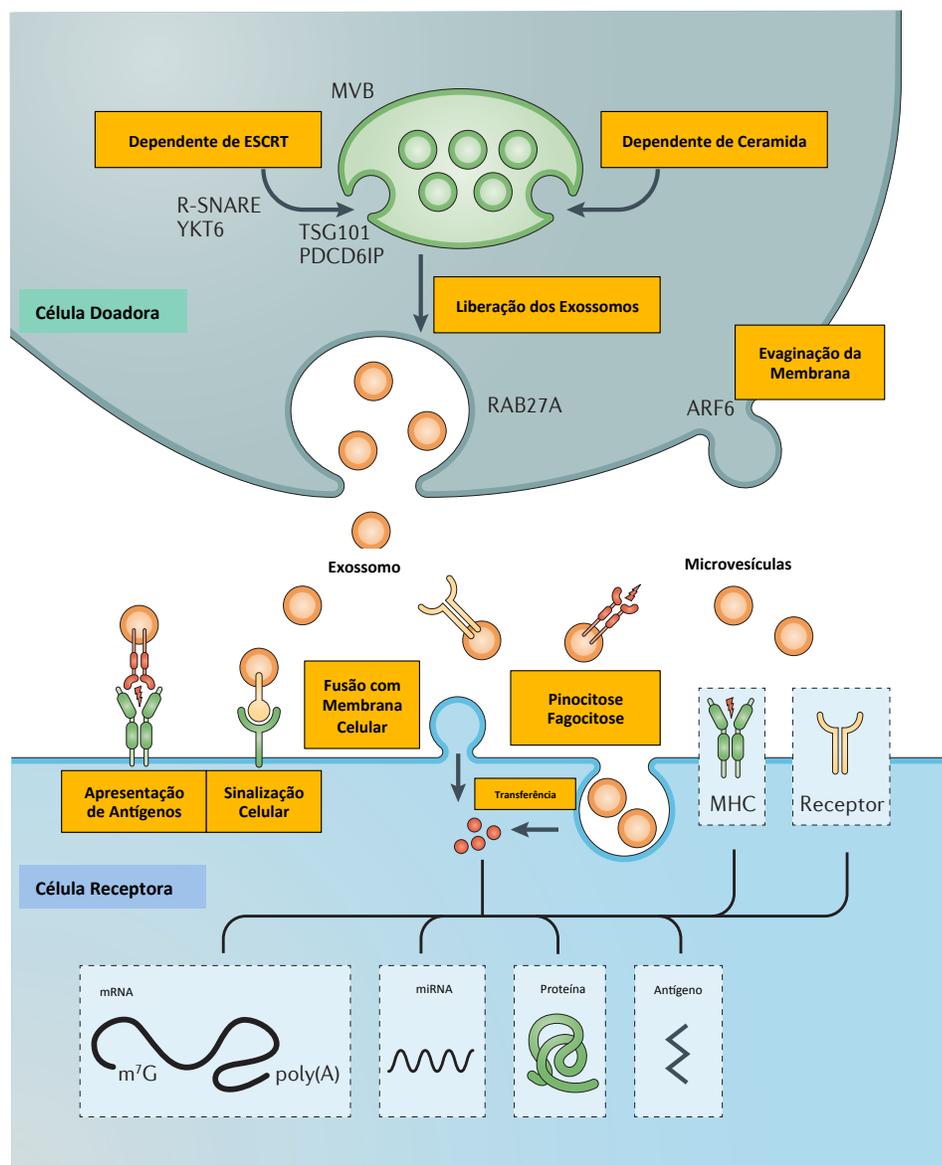


Figura 3 – Biogênese das VEs e sua interação com as células receptoras. Fonte: modificado de Andaloussi SE, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov 2013;12(5):347-57.(1)

Os exossomos apresentam a mesma orientação da membrana plasmática da célula de origem, similarmente as microvesículas. Microvesículas entretanto consistem em uma população heterogênea de vesículas formadas a partir da evaginação e fissão da membrana plasmática celular. Esse processo é controlado por microdomínios de lipídios de membrana e proteínas regulatórias como ARF6 (fator 6 de ribosilação do ADP) (Figura 3).(1) Os corpos apoptóticos são formados a partir de dobramentos ou evaginações na membrana plasmáticas de células em processo tardio de apoptose. As microvesículas também podem ser formadas em células em apoptose mas em estágios precoces.(90)

2.2.4 Funções Biológicas

As vesículas extracelulares participam da comunicação intercelular e na regulação do microambiente celular por meio: (1) da apresentação e/ou internalização de antígenos e transferência de moléculas com complexo de histocompatibilidade principal; (2) de receptores na superfície celular que se ligam a uma proteína na membrana da vesícula e ativam uma via de sinalização intracelular; (3) da transferência de proteínas, fatores de transcrição, partículas infecciosas ou oncogênicas; (4) da transferência de material genético para célula receptoras por meio da fusão das vesículas à membrana celular ou através da endocitose das vesículas, para que o RNA exossomal seja traduzido em proteínas e assim modular a função imunológica, induzir apoptose, promover proliferação celular, estimular a angiogênese (Figura 3).(2-4,85)

Obregon et al (91) estudaram o papel das vesículas derivadas de células dendríticas na regulação da resposta imune. Os autores demonstraram primeiramente a presença de moléculas do MHC, CD40, CD83 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) nos exossomos. As vesículas foram internalizadas pelas células epiteliais por três vias: receptores de membrana, fusão e por fagocitose. As vesículas oriundas de células dendríticas ativadas e internalizadas pelas células epiteliais foram capazes de induzir a liberação de mediadores inflamatórios e citocinas, tais como IL-8 (interleucina-8), MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1), RANTES (proteína regulada sob ativação, expressa e secretada por células

T normais), MIP-1 β (proteína inflamatória de macrófagos tipo 1 beta), TNF- α , G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), demonstrando a importância das vesículas na regulação tanto da imunidade inata e quanto da imunidade adaptativa.

Skog et al (4) estudaram vesículas provenientes de glioblastoma, um agressivo tumor cerebral. A capacidade de angiogênese foi mensurada em linhagem celular tumoral suplementada com vesículas extracelulares de glioblastoma. A formação de microtúbulo dobrou em 16 horas de experimento, suportando o papel das vesículas na angiogênese tumoral. A capacidade das vesículas de estimular a proliferação celular foi estudada em gliomas humanos. *In vitro*, após três dias, a suplementação de gliomas com vesículas tumorais promoveu um aumento no número de células de até 5 vezes quando comparado com o controle, suportando o papel também das vesículas em estimular a proliferação celular. Interessantemente, a caracterização do conteúdo dessas vesículas revelou que elas eram enriquecidas de RNA e proteínas relacionadas a proliferação celular (crescimento tumoral) e angiogênese.

Wang et al (92) mostraram a indução de apoptose por exossomos derivados de astrócitos ativados. Os astrócitos são indispensáveis como suporte a neurônios. Contudo seu estado ativado está implicado com uma série de doenças neurológicas como, por exemplo, a doença de Alzheimer. Nesse estado, os astrócitos induzem uma resposta inflamatória e ativam vias de sinalização pró-apoptóticas, como a ativação de caspases (proteínas relacionadas a morte celular). Foi demonstrado que os exossomos desses astrócitos continham de PAR4 (proteína de resposta a apoptose prostática) e ceramidas (lipídios pró-apoptóticos) e que após serem internalizados por astrócitos *in vitro* induziram a morte celular.

2.2.5 Aplicações Clínicas

As vesículas extracelulares podem ter grandes aplicações no diagnóstico de doenças. Elas abrigam não só proteínas e ácidos nucleicos de sua célula de origem como também possuem proteínas e transcritos únicos, que podem servir como biomarcadores. Além disso as VEs podem ser isoladas em praticamente todos os líquidos corporais. Vesículas presentes no líquido derivadas de tumores cerebrais

podem ser isoladas em sangue periférico. Skog et al (4) encontraram a presença de EGFRvIII mRNA (variante mutante do mRNA EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico – encontrada especificamente em muitos glioblastomas) nas vesículas derivadas desses tumores. Interessantemente, esse RNA foi isolado não só no tecido tumoral biopsiado como também no sangue periférico desses pacientes portadores de glioblastoma. Todas as 30 amostras controles foram negativas. Gliomas positivos para EGFRvIII mRNA respondem 50 vezes mais ao tratamento com inibidores do EGFR (erlotinib, gefitinib) do que os tumores que não possuem esse mRNA. Em termos práticos, a biópsia tumoral poderia ser dispensada entre os pacientes que tivessem a presença do marcador no sangue periférico.

A utilização de VEs na terapêutica de algumas doenças poderia acontecer de três formas: (1) reduzir a produção ou a captação das vesículas pelas células; (2) utilizar as VEs como imunoterapia; (3) uso das VEs para entregar drogas ou genes. Sabe-se que a produção de VEs por tumores está aumentada e que as VEs teriam a função de inibir a resposta imunológica e promover a proliferação tumoral. A inibição da produção das VEs ou a inibição da captação dessas VEs pelas células-alvo poderiam combater a proliferação tumoral ou melhorar a resposta imunológica do hospedeiro. Obregon et al (91) reduziu a internalização de vesículas derivadas de células dendríticas por células epiteliais por meio da adição de citocalasina D. Esta droga consiste em uma micotoxina capaz de bloquear a clivagem citoplasmática impedindo a formação de estruturas de microfilamento e inibindo a motilidade celular e a fagocitose. Atai et al (93) demonstram que a heparina promove a agregação de VEs impedindo sua internalização pelas células receptoras, sendo um potencial agente no desenvolvimento de terapias para doenças nas quais as VEs estejam relacionadas com a patogênese.

A primeira publicação da utilização de VEs com modificações em seu conteúdo de mRNA/proteínas para tratamento de câncer foi realizada por Mizrak et al (3). Os autores produziram células que expressavam CD-UPRT (citosina deaminase fundida com uracil fosforibosiltransferase), uma combinação potente para ativação de pró-drogas. A CD converte 5-fluorocitosina (5-FC) em 5-fluorouracil (5-FU), que é tóxico para as células expressando UPRT em decorrência da sua conversão para 5-fluoro-deoxiuridina monofosfato (5-FdUMP), um inibidor irreversível da timidina sintetase. Essa disfunção enzimática restringe a produção de dTMP (deoxitimidina monofosfato) e produtos fosforilados (deoxitimidina trifosfato -

dTTP). A depleção de dTTP resulta na inibição da síntese de DNA e a célula entra em apoptose. As VEs dessas células eram enriquecidas de CD-UPRT e capazes de transferir este terapêutico mRNA/proteína para as células tumorais. Quando essas vesículas foram injetadas diretamente no tumor de camundongos em combinação com a pró-droga (5-FC) sistemicamente houve uma redução no crescimento desses tumores.

2.2.6 Perda da Audição e as Vesículas Extracelulares

Não existem trabalhos relacionando mecanismos de perda de audição com as vesículas extracelulares. Entretanto, Sonam et al (94) estudaram os efeitos da secreção de fragmentos frescos de schwannoma vestibular mantidos em meio de cultura por 72 horas sobre cultura de cócleas de camundongos. Os autores demonstraram que as secreções de SV associados com perda auditiva promoveram graus variados de dano coclear, incluindo perda de células ciliadas e fibras axonais. O TNF- α foi um dos mediadores inflamatório responsáveis pelo dano coclear. Isso suporta ainda mais a hipótese de que substâncias ou até mesmo vesículas liberadas pelos SVs estariam implicadas na perda auditiva.

2.3 MICRO RNA

2.3.1 Introdução

MicroRNAs consistem em pequenos RNA não-codificantes de fita única. Possuem entre 18 e 25 nucleotídeos (nt). São moléculas que regulam a expressão gênica pós-transcricional. Os miRNAs são moléculas estáveis resistindo a variações de temperatura e pH, ciclos de congelamento e descongelamento e podem ser armazenados por períodos prolongados.(95) Estão presentes em diversos líquidos corporais, incluindo sangue periférico, seja no soro ou no plasma.

Os miRNAs regulam diversos processos biológicos, incluindo desenvolvimento, proliferação celular, transdução de sinal intracelular, metabolismo, entre outros. Alterações em sua biogênese ou na sua quantidade estão associadas a vários processos patológicos, como câncer (invasão e metástases), doenças autoimunes, e doenças neurodegenerativas.(96)

2.3.2 Biogênese e Captação

A biogênese dos miRNAs é espacialmente organizada em dois compartimentos: nuclear e o citoplasmático (Figura 4). No núcleo celular, os genes codificadores de miRNA são transcritos com auxílio das enzimas RNA polimerase II e III originando o “pri-microRNA”. Após, o pri-miRNA é então clivado por um complexo composto por Drosha, enzima RNase classe III e, DGCR8 (proteína ligante dsRNA do gene 8 – Região Crítica da Síndrome de DiGeorge), gerando o “pré-microRNA” com aproximadamente 70 nt. O fragmentos de “pré-miRNA” são ativamente transportado para o citoplasma pela exportina 5 (XPO5). Esses precursores do miRNA são clivados pelo complexo Dicer/TRBP (proteína ligante de RNA responsiva a transativação), outra enzima RNase classe III, e então transformados em um duplex miRNA/miRNA. Uma fita de miRNA se associa com o complexo RISC (complexo silenciador induzido por RNA) que irá alvejar mRNA gerados. A regulação da expressão gênica mediada pelo miRNA dependendo das complementariedade com a molécula alvo. Se ocorrer uma perfeita complementariedade o alvo de mRNA será clivado e degradado. Se a complementariedade for imperfeita, parcial, ocorrerá uma repressão translacional.(97)

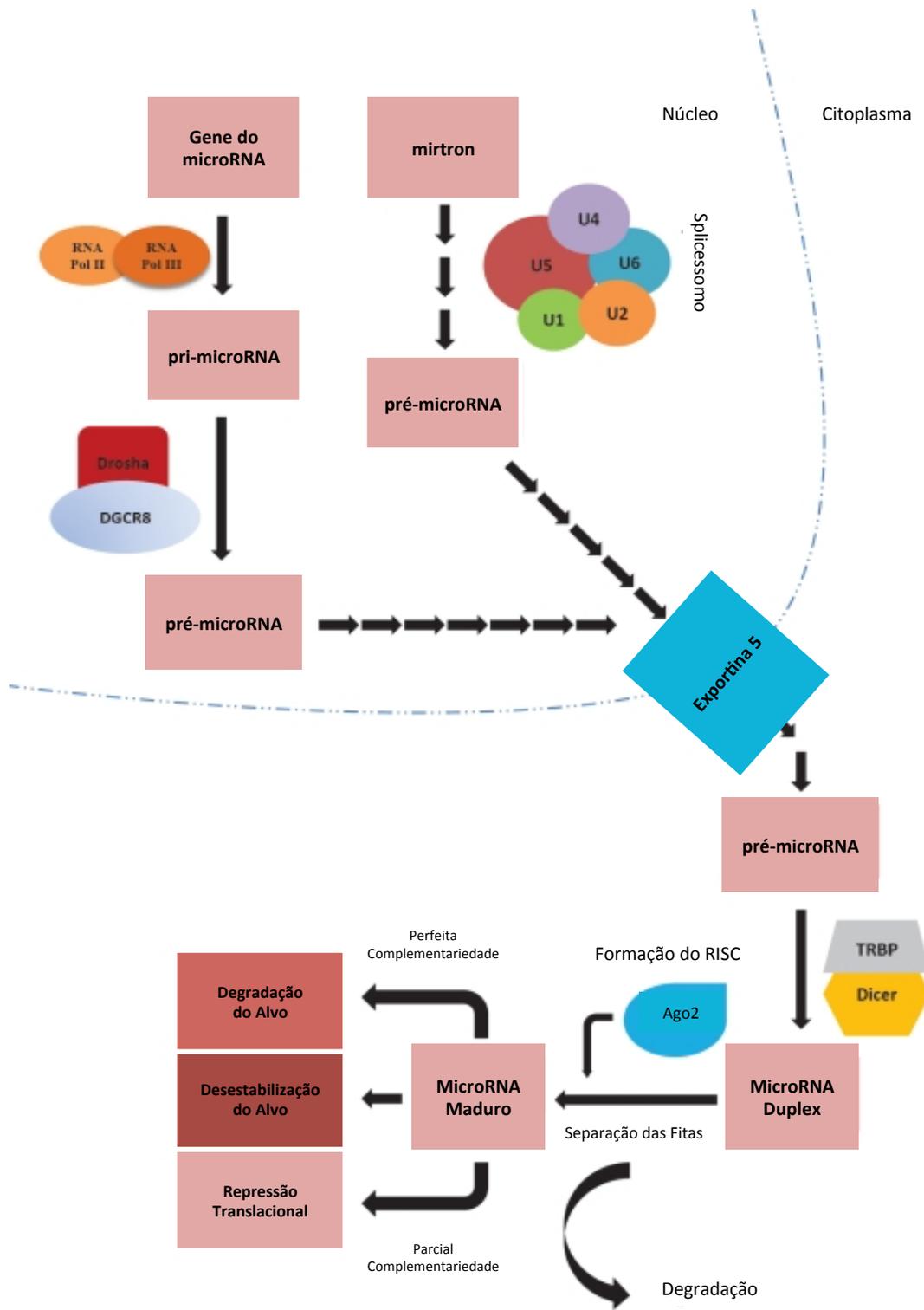


Figura 4 – Esquema representativo da biogênese do miRNA. A biogênese do miRNA começa no núcleo onde os genes de miRNA são transcritos pela RNA polimerase II ou III, produzindo “pri-microRNAs”. Estes são então clivados pela ação do microprocessador contendo Drosha-DGCR8 e, formando os pré-microRNAs. Quando o comprimento e a estrutura secundária de um íntron se assemelha ao de um miRNA (referido com mirtron), um mecanismo alternativo produz o pré-microRNA. Estes são transportados para o citoplasma através da exportina-5, onde interagem com proteínas para formar o RISC. Dicer cliva o pré-microRNA em uma fita dupla de microRNA, onde uma proteína Argonoute produz um miRNA maduro através da seleção de uma fita. A complementariedade da fita do miRNA com seus alvos determinará o destino do transcrito. Se a complementariedade for completa, o alvo será clivado e, se for imperfeita, ocorrerá uma repressão translacional. Alternativamente o miRNA poderá desestabilizar os RNAs alvos através de uma deadenilação. Fonte: modificado de Erkan EP, Breakefield XO, Saydam O. miRNA signature of schwannomas: Possible role(s) of “tumor suppressor” miRNAs in benign tumors. *Oncotarget* 2011 Mar;2(3): 265-70.(97)

Existem várias possibilidades para a liberação desses miRNA formados no meio extracelular: (1) liberação passiva pelas células em decorrência de lesão celular, processo inflamatório crônico ou necrose, (2) secreção ativa por meio de vesículas celulares tais como os exossomos, os L-exossomos, as microvesículas e os corpos apoptóticos; (3) secreção ativa pela formação de complexos com lipoproteínas (HDL – lipoproteína de alta densidade) e proteínas ligantes de RNA. Já a captação celular dos miRNA circulantes é feita através de: internalização das vesículas contendo miRNA por meio de endocitose, fagocitose ou difusão direta da membrana pelas células receptoras; captação pelas proteínas ligadoras de miRNA presentes em receptores na superfície celular; captação de específicos miRNA por receptores de microvesículas presentes na células; transferência livre de miRNA através das junções GAP.(95)

2.3.3 MicroRNA e a Orelha Interna

A presença de miRNA na orelha interna foi primeiramente descrita em 2005 por Wienholds et al (98) que estudando zebrafish detectaram miRNAs (miRs-200a, -96, -183 e -182) no sistema de linha lateral e em órgãos sensoriais durante a embriogênese. Em mamíferos, a presença de miRNA foi descrita em 2006 por Sivakumaran et al (99). O miR-9 foi descrito como um regulador da isoforma curta do gene do colágeno, *COL9A1*. O colágeno é expresso na orelha interna e é essencial para a manutenção da audição. Defeitos nesse gene estão associados a diversas doenças sindrômicas incluindo perda de audição. O número de miRNAs expressos na orelha interna aumenta durante o período da embriogênese mas permanece relativamente estável durante o período pós-natal. Muitos miRNAs continuam sendo expressos durante toda a fase adulta, indicando que miRNAs participam tanto do desenvolvimento quanto da manutenção das estruturas da orelha interna (Figura 5).(100)

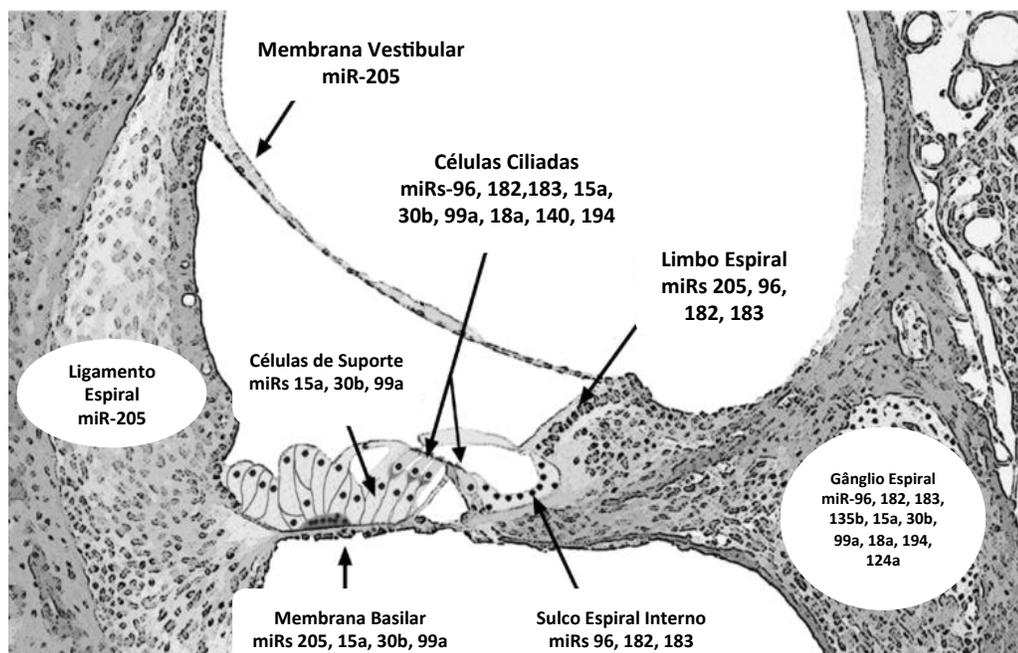


Figura 5 – Figura esquemática do órgão de Corti mostrando a localização dos principais miRNA expressos na fase pós-natal de camundongos. Fonte: modificado de Patel M, Hu BH. MicroRNAs in inner ear biology and pathogenesis. Hear Res 2012;287:6-14.(100)

À medida que os microRNAs foram estudados, descobriu-se que eles estão relacionados a diversas doenças do ouvido. O miR-21 está relacionado ao crescimento do SV.(101) Friedland et al (102) também associaram o miR-21 a proliferação e crescimento dos colesteatomas. Inúmeros miRNAs têm sido associados ao processo inflamatório que provoca a otite média aguda e crônica.(103) (Figura 6)

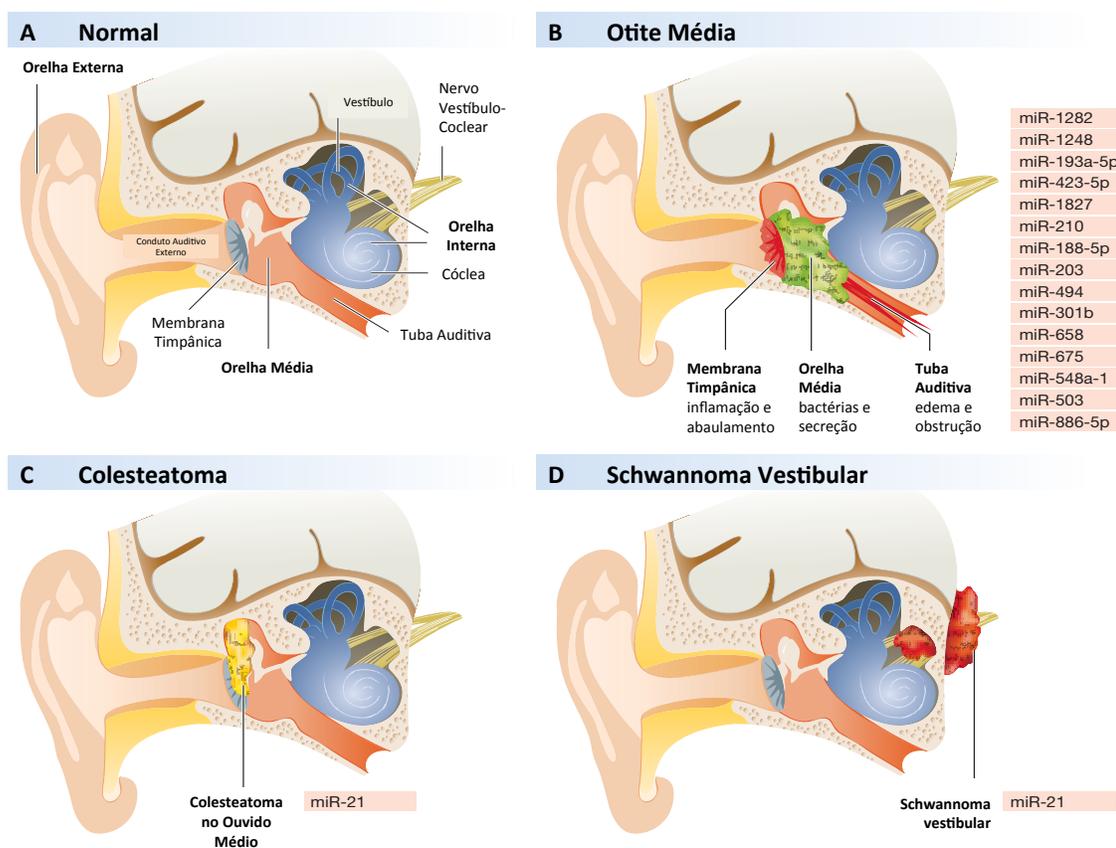


Figura 6 – Envolvimento dos miRNAs em três doenças do ouvido humano. (A) O ouvido humano normal é dividido em orelhas externa, média e interna. (B) Otite média é um processo inflamatório da orelha média estando os miRNAs envolvidos no processo inflamatório e proliferação. (C) Superexpressão do miR-21 que é responsável pelo crescimento e expansão do colesteatoma. (D) Elevados níveis de miR-21 em SV estando relacionados ao crescimento tumoral. Fonte: modificado de Rudnicki A, Auraham KB. MicroRNAs: the art of silencing in the ear. EMBO Mol Med 2012;4:849-9.(104)

2.3.4 MicroRNA e o Schwannoma Vestibular

Estudos compararam o perfil de miRNA do schwannoma vestibular com bainha de nervos normais utilizando a técnica de microarranjo e qRT-PCR. Saydam et al (105) mostraram que 12 miRNAs estão desregulados no SV, sendo 8 superexpressados (5-10 vezes) e, 4 com redução da expressão (5-10 vezes). Os miRNAs com maiores quantidades eram let-7d (cerca de 22 vezes), pertencente a família let-7, miR-451 (cerca de 17 vezes), e miR-23b (cerca de 15 vezes).

A família let-7 age como um supressor tumoral controlando as vias de sinalização cancerígenas, incluindo a via Ras, como também silenciado oncogenes, como o *HMGA2* e *c-Myc*. Interessantemente, o miR-451 também age como um supressor tumoral, sendo que sua superexpressão em câncer gástrico e em câncer de cólon reduziu a proliferação celular e aumentou a responsividade a radiação ionizante.(106)

Os miR-23b e miR-29 apresentam expressão aumentada em SV, mas apresentam expressão reduzida em tumores malignos. O miR-23b está com expressão reduzida em câncer de próstata. Estudos mostram que esse miRNA modula a proteína glutaminase mitocondrial. Esta proteína promoveria uma fonte extra de ATP (adenosina trifosfato) para as células cancerígenas. Assim a elevação do miR-23b em schwannomas bloquearia essa fonte de ATP impedindo um crescimento acelerado desse tumor.(107) De modo similar, o aumento na expressão de miR-29 atenuaria o crescimento do schwannoma vestibular. Quando a expressão do miR-29 está reduzida existe um aumento dos seus alvos oncogênicos, tais como Tc11 (leucemia de células T/linfoma 1), Mc11 (um membro da família Bcl-2 anti-apoptótico) e DNA metiltransferase (DNMT3) que são responsáveis pelo bloqueio da apoptose celular e silenciamento de genes supressores tumorais em leucemia linfocítica crônica, colangiocarcinoma e câncer de pulmão.(108,109)

Cioffi et al (101) investigaram a expressão do perfil de miRNA em 4 schwannomas vestibulares humanos usando a técnica de microarranjo comparando com nervos vestibulares normais e encontraram uma superexpressão do miR-21. O alvo do miR-21 é um mRNA supressor tumoral PTEN (homólogo da tensina e fosfatase). O PTEN inibe a via PI3K/AKT (fosfoinosídeo 3-cinase/proteína cinase B) que promove a proliferação celular, aumento na sobrevivência e formação tumoral. A via

PI3K/AKT é ativa em SV. Assim, níveis elevados de miR-21 em SV podem contribuir para o crescimento tumoral reduzindo a PTEN e hiperativando a via PI3K/AKT.

Não existem trabalhos até o presente momento relacionando a expressão de miRNA pelo SV e mecanismos de perda de audição.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar o papel das vesículas extracelulares na fisiopatologia da perda auditiva em pacientes portadores de schwannoma vestibular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as vesículas extracelulares secretadas pelo schwannoma vestibular;
- Identificar a presença de RNA nas vesículas extracelulares;
- Verificar a capacidade de internalização das vesículas extracelulares pelas células cocleares;
- Verificar a capacidade das células cocleares receptoras em expressar o conteúdo de RNA contido nas vesículas
- Identificar e quantificar os danos às células cocleares provocados pelas vesículas extracelulares derivadas da linhagem celular HEI-193
- Identificar e quantificar os danos às células cocleares provocados pelas vesículas extracelulares derivadas de células tumorais primárias comparando as diferenças entre os tumores associados a perda de audição e os tumores associados a boa audição.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Quatro tipos celulares foram cultivados. Utilizou-se cultura de uma linhagem celular e cultura de células primárias de SV humano para o isolamento e caracterização das vesículas extracelulares. Cultura de neurônios do gânglio espiral e cultura *ex-vivo* de cóclea de camundongo foram utilizadas para testar o efeito das VEs sobre as células cocleares.

4.1.1 Cultura da Linhagem de Células HEI-193

Uma linhagem contínua de células tumorais derivadas de schwannoma vestibular humano, denominada HEI-193, foi adquirida do *House Ear Institute* (HEI), situado em Los Angeles, Califórnia (CA), Estados Unidos (EUA). Essas células são oriundas de um paciente portador de neurofibromatose tipo 2, e foram imortalizadas com um vetor viral, papiloma vírus humano, genes *E6-7(110)*. Após a aquisição, um estoque foi mantido no próprio *Massachusetts Eye and Ear Infirmary* (MEEI), conservadas em nitrogênio líquido a -196°C .

As células foram cultivadas em meio de cultura contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), 1% de solução com penicilina/estreptomicina (100 U/ml; 100 U $\mu\text{g/ml}$; Invitrogen) e 1% de GlutaMAXTM (Invitrogen) e eram mantidas em estufa a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO_2 . Utilizou-se células entre a quarta e a décima quinta passagem, uma vez que células cultivadas por um longo período podem perder as características fenotípicas das células originais.

A contagem de células a serem cultivadas era realizada sob microscopia por meio de um hematocitômetro, a câmara de Neubauer com superfície não espelhada (Neubauer Improved, New Optik, BRA). Ela é constituída de duas áreas de

contagem ao centro, sobre as quais é inserida uma lamínula para a leitura ao microscópio. No centro destas câmaras existem linhas perpendiculares e verticais com marcações em quadrantes. Três tipos de quadrantes denominados A, B e C podem ser encontrados e juntos formam um quadrado maior (Figura 7). Uma alíquota de 10 μ l da suspensão de células foi transferida para a câmara. As células dentro de dois quadrados grandes foram contadas, incluindo aquelas que estavam sobre as linhas superiores e direitas do perímetro externo do quadrado médio. Excluiu-se da contagem as células sobre as linhas inferiores e à esquerda dos quadrados maiores. A quantidade de células por ml foi calculada dividindo o número de células multiplicadas por 10^4 pelo número de quadros grandes.

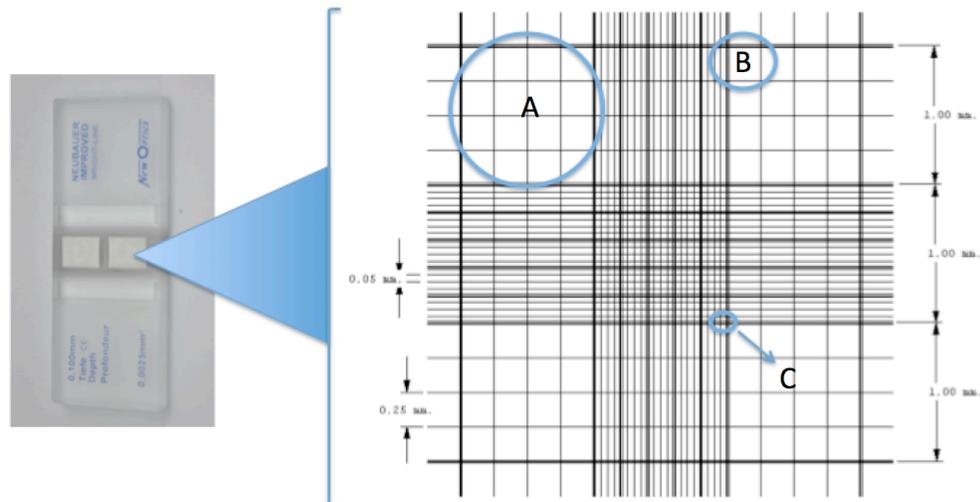


Figura 7 – Câmara de Neubauer. Uma amplificação da sua superfície central à direita evidenciando a presença dos quadrados grandes (A), médios (B) e pequenos (C).

4.1.2 Cultura de Células Primárias Tumorais

Utilizou-se células tumorais primárias oriundas de pacientes com diagnóstico de schwannoma vestibular esporádico. Os espécimes foram tratados de acordo com protocolo do estudo aprovado pelo Comitê de Ética e Estudos Humanos do *Massachusetts Eye and Ear Infirmary* e *Massachusetts General Hospital* (#196424-

22, #717176, #15-003), e de acordo com a Declaração de Helsinki. A idade dos pacientes foi definida no momento do diagnóstico. Dois testes auditivos foram utilizados: (1) média tritonal (PTA – *pure tone average*), que corresponde a média dos limites inferiores (em dB) nas frequências sonoras 0,5, 1 e 2 KHz durante dois tons e, (2) discriminação das palavras (WD – *word discrimination*), que corresponde ao percentual de palavras faladas de uma lista padronizada que um paciente pode compreender no silêncio. O tamanho do tumor (maior diâmetro paralelo ao rosto pétreo), média tritonal e a discriminação das palavras corresponderam às últimas aferições antes da cirurgia de ressecção do tumor. Taxa de crescimento do tumor foi obtido a partir do diâmetro transversal e das mudanças das dimensões em exames de ressonância magnética de conduto auditivo interno realizados em série. O diagnóstico de todos os espécimes era confirmado com exame histopatológico no transoperatório e no pós-operatório.

As células tumorais primárias de pacientes com schwannoma vestibular foram manipuladas e cultivadas de acordo com protocolos padronizados já estabelecidos na literatura.⁽¹¹¹⁾ Os espécimes tumorais foram coletados imediatamente após a ressecção e transportados para o laboratório em solução fisiológica estéril dentro de uma caixa térmica com gelo. O tempo total entre a ressecção até o processamento da amostra foi de aproximadamente 20 minutos. Os tecidos tumorais eram lavados três vezes com solução tampão fosfato (PBS) estéril para remover coágulos sanguíneos e tecidos cauterizados. Para a dissecação inicial, as amostras eram imersas no meio DMEM/F12 (Invitrogen), consistindo de 39% de DMEM e 39% de mistura nutriente F12, e suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich), 1% de solução com penicilina/estreptomicina (100 U/ml; 100 U µg/ml; Invitrogen) e 1% de GlutaMAX™ (Invitrogen). A amostra principal era dividida em pequenos pedaços com aproximadamente 1 mm³ utilizando pinças delicadas nº. 5 (Fine Science Tools, Foster City, CA, EUA). Após, as células tumorais eram imersas em meio de cultura DMEM/F12 acrescido de uma mistura enzimática composta de 160 U/ml de colagenase tipo I (Sigma-Aldrich) e 250 U/ml de hialuronidase tipo I-S (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂ por um período de 18 horas. Após a incubação, os pedaços tumorais foram triturados com o auxílio de um jelco 18G (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e a solução centrifugada a 1.000g durante 5 min em temperatura ambiente. O pellet resultante foi ressuscitado com o meio de cultura DMEM/F12 suplementado e as células

foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro tratadas com poli-L-lisina e laminina (BD BioCoat™, BD Biosciences). O meio de cultura era substituído após 24 horas e, então, a cada 3 dias.

4.1.3 Cultura de Neurônios do Gânglio Espiral

Camundongos CBA/CaJ tipo selvagem foram adquiridos do Laboratório Jackson (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA). Seguiu-se o protocolo para cultura de neurônios do gânglio espiral desenvolvido por Kao et al (112), mas com algumas modificações. Utilizou-se apenas camundongos recém-nascidos entre o terceiro (P3) e o quinto dia de vida (P5). A partir do P5, a dissecação dos tecidos cocleares era dificultada pela presença de ossificação do modíolo. Inicialmente, eles eram crio-anestesiados (5 min a 0°C) e, em seguida, eram decapitados e realizada assepsia com álcool etílico a 70% (p/v). A pele era removida e o crânio era seccionado ao meio ao longo do plano sagital. Após a remoção do tecido cerebral, cada metade do crânio era colocada em um prato de cultura estéril de 60 x 15 mm (Greiner Bio-One, Monroe, NC, EUA) contendo solução balanceada de Hanks (HBSS) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) a 4°C. Os passos seguintes foram realizados sob microscopia (Microscópio Carl Zeiss, Munique, ALE) em um ambiente estéril, frequentemente transferindo os tecidos dissecados para uma nova solução de HBSS. As cócleas eram isoladas do restante do osso temporal e o labirinto ósseo era removido utilizando pinças Dumont delicadas nº. 5 (Fine Science Tools, Foster City, CA, EUA). O ligamento espiral e estria vascular eram identificados e removidos. O gânglio espiral e o modíolo eram separados do tecido adjacente através de corte entre o limbo e o gânglio espiral.

Os tecidos eram transferidos para um tubo de 1,5 ml contendo uma solução de dissociação composta por HBSS, tripsina (2,5 mg/ml) (Gibco) e colagenase IV (0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) e incubados a 37°C por 25 min. A digestão enzimática foi interrompida com a adição de SBF 10% (Sigma-Aldrich). O tecido foi dissociado gentilmente com auxílio de uma pipeta e as células em suspensão eram centrifugadas a 1.000g durante 3 min em temperatura ambiente. O pellet resultante era ressuspendido com o meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen), consistindo de

39% de DMEM e 39% de mistura nutriente F12, e suplementado com 10% de SBF, 1% de solução com penicilina/estreptomicina (100 U/ml; 100 U µg/ml; Invitrogen), e 1% de GlutaMAX™ (Invitrogen), 5% de soro de cavalo estéril (NHS, Gibco), neurotrofina-3, 16 ng/ml (NT-3) (Promega, Madison, WI, EUA), fator neurotrófico derivado do cérebro, 8 ng/ml (BDNF) (Promega), e suplemento B-27 (Gibco) a 2%. As células eram, então, cultivadas em placas de 24 poços (CytoOne, Ocala, FL, EUA) contendo lamínulas de vidro tratadas com poli-L-lisina e laminina (BD Biosciences) e, então, colocados em uma incubadora a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂ por um período de 24 horas, até o início do experimento.

4.1.4 Cultura *ex-vivo* de Cócleas de Camundongos

Para a cultura de cócleas de camundongo, seguiu-se o mesmo protocolo de dissecação utilizado para a cultura de neurônios do gânglio espiral (subcapítulo 4.1.3), mas com modificações (113,114). Optou-se pela cultura apenas da porção média da cóclea em detrimento das porções apical e basal devido a: (1) qualidade da dissecação dessa porção, uma vez que ao redor do quinto dia de vida a porção basal já apresenta algum grau de ossificação dificultando a dissecação; (2) maior maturidade em relação ao ápice coclear.

Após a remoção do ligamento espiral e da estria vascular, as células ciliadas (CC) e os neurônios do gânglio espiral foram individualizados do restante do labirinto membranoso com auxílio de pinças delicadas nº. 55 (Fine Science Tools). A porção média era isolada das porções apical e basal e, a estrutura formada pelo gânglio espiral e órgão de Corti era preservada e cultivada em uma placa de cultura de 35 x 10 mm com 4 poços (Greiner Bio-One) com uma lamínula de vidro previamente tratada com BD Cell-Tak™ (BD Biosciences) para facilitar a aderência do tecido na superfície da lamínula. O tecido coclear era incubado a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂ por um período de 24 horas. O meio de cultura era composto por DMEM (Invitrogen), 1% de solução com ampicilina (Gibco), e 1% de suplemento N2 (Invitrogen), até o início do experimento. Por inibir o efeito do Cell-Tak™, o meio de cultura não era suplementado com 10% de SBF 1X nas primeiras 24 horas. Os espécimes dissecados eram individualmente inspecionados através de microscopia

para a presença de células neuronais e a organização das células ciliadas. Por meio da cultura organotípica de cóclea pode-se estudar as células ciliadas e os neurônios do gânglio espiral em detalhes, permitindo a identificação e a quantificação dessas células cocleares. Estes são os dois tipos celulares mais comumente afetados em pacientes portadores de schwannoma vestibular (14). (Figura 8).

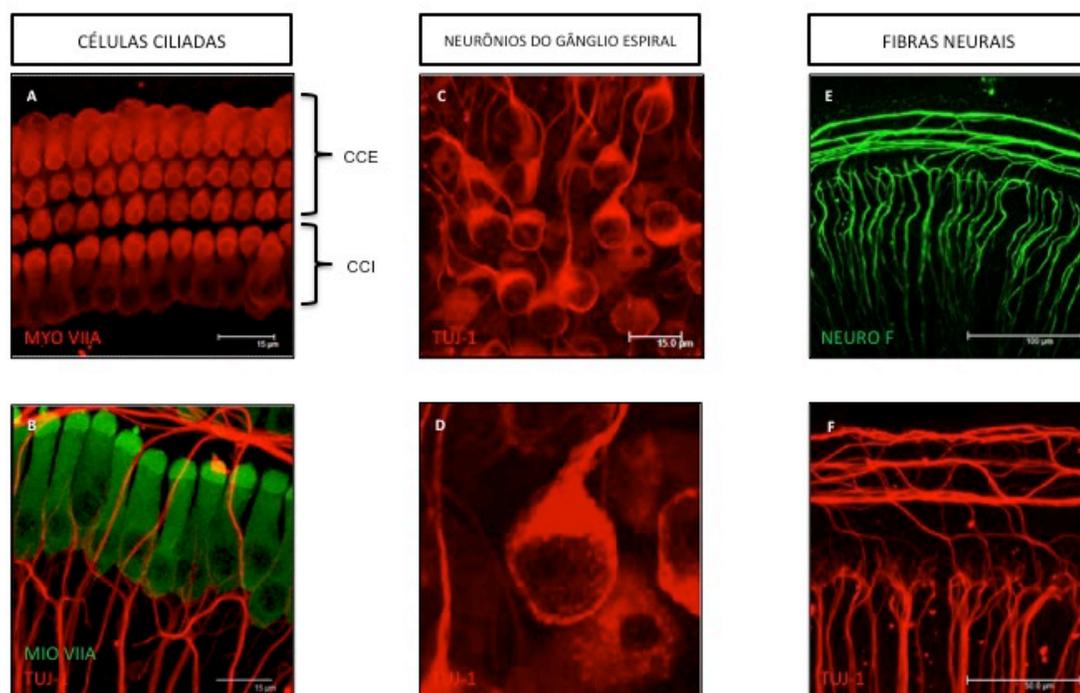


Figura 8 – Cultura de cóclea de camundongos visualizadas à microscopia confocal. (A) Três fileiras de células ciliadas externas e uma fileira de células ciliadas internas (126X – 15µm). (B) Imagem amplificada de células ciliadas internas (252X). (C) Neurônios do gânglio espiral (126X – 15 µm). (D) Detalhe de um neurônio do gânglio espiral. (E) Fibras nervosas oriundas dos NGE (63X – 100 µm). (F) Imagem amplificada das fibras e suas ramificações próxima ao limbo. MYO VIIA – miosina VIIA; TUJ-1 – beta-tubulina; NEURO F – neurofilamento; CCE – células ciliadas externas; CCI – células ciliadas internas.

Após, as cócleas cultivadas foram submetidas a três diferentes tratamentos. No primeiro, as VEs (6 μ l, $2,5 \times 10^{10}$ partículas/ μ l) isoladas de meio de cultura de células HEI-193 foram aplicadas diretamente nas culturas *ex-vivo* de cócleas de camundongos recém-nascidos (P3-P5). Culturas tratadas com volume igual de PBS 1X serviram como controle negativo. O segundo tratamento consistiu na utilização de uma placa de cultura dupla (#353104, Fisher Scientific, Hampton, NH, EUA). Na placa de cultura superior, utilizou-se 4 grupos: (1) controle (n=11), sem células; (2) 1×10^6 células HEI-193 (n=3); (3) 4×10^6 células HEI-193 (n=3); e no (4) 4×10^6 células HEI-193 e heparina em uma concentração de 200 μ g/ml (n=3). A heparina promove a agregação das vesículas extracelulares dificultando a sua captação pelas células receptoras.(93) A placa superior possui uma membrana com permeabilidade para partículas com tamanho inferior a 1 μ m suficiente para a passagem das vesículas extracelulares secretadas pelas células HEI-193. No compartimento inferior, eram posicionadas culturas organotípicas de cócleas de camundongos que serviriam como as receptoras das VEs. Para o terceiro experimento, utilizou-se VEs derivadas de cultura de células primárias de SV. Essas células tumorais em cultura possuem as mesmas características das células tumorais originais (111). Os pacientes foram estratificados pela audição de acordo com os critérios da Academia Americana de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço (115). Pacientes com BA apresentam a média tritonal ou *pure tone average* (PTA) menor ou igual a 30 dB e, um índice de reconhecimento de fala ou *word recognition* (WR) superior a 70%. Três grupos foram comparados: (1) grupo controle com adição de 6 μ l de PBS 1X (filtrado duas vezes); (2) VEs provenientes de cultura de células tumorais de pacientes com boa audição e, (3) VEs provenientes de cultura de células tumorais de pacientes com perda de audição.

Todas as culturas eram incubadas por 48 horas até o início do processamento da amostra. As culturas cocleares foram coradas com anticorpos anti-MYOVIIA para CCI e CCE e/ou anti-TUJ-1 para corar fibras nervosas e a soma dos NGEs. Todos os espécimes foram avaliados sob microscopia confocal. (Figura 9)

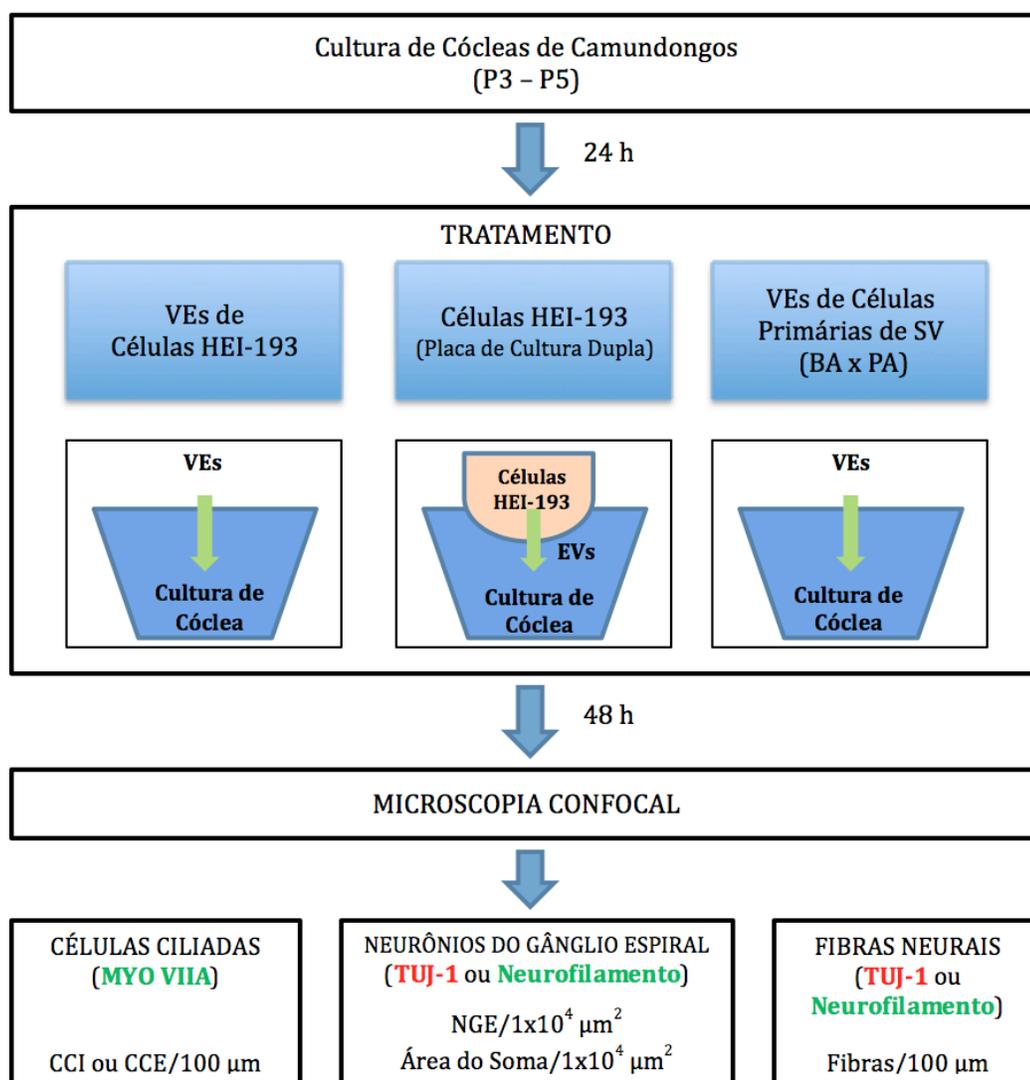


Figura 9 – Fluxograma com as modalidades de tratamentos as quais as culturas cocleares foram submetidas.

4.2 ISOLAMENTO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

4.2.1 Preparo de SBF sem Vesículas Extracelulares

O SBF possui em sua composição vesículas extracelulares de origem não humana. Para evitar qualquer contaminação externa foi necessário a remoção das VEs presentes no SBF. O preparo do SBF (Sigma-Aldrich) livre de vesículas extracelulares seguiu um protocolo de centrifugações seriadas. Inicialmente, o soro bovino fetal era colocado em tubos de centrifugação tipo “Falcon” de 50 ml (BD Biosciences) e centrifugado a 300g por 10 min a 4°C, seguido de nova centrifugação 2.000g por 5 min a 4°C. Após, o sobrenadante era filtrado com filtro de 0,8 µm (Thermo-Scientific, Lafayette, CO, USA). Em seguida, o SBF (Sigma-Aldrich) era colocado dentro de um tubo tipo Beckman (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, EUA), e ultracentrifugado a 100.000g por 16 horas a 4°C com um 70iT rotor. O sobrenadante presente no tubo tipo Beckman era armazenado (SBF sem VE), enquanto que o pellet (rico em microvesículas) era descartado.

4.2.2 Isolamento de Vesículas Extracelulares de Células HEI-193

Um total aproximado de 4×10^6 células tumorais HEI-193 eram cultivadas em cada placa de cultura de 15 cm com 25 ml de meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de SBF (Sigma-Aldrich), 1% de solução com penicilina/estreptomicina (100 U/ml; 100 U µg/ml; Invitrogen) e 1% de GlutaMAX™ (Invitrogen) como previamente descrito (93). Após 24 horas, a placa de cultura era lavada com PBS 1X. Um meio de cultura era adicionado similar ao anterior, mas suplementado com apenas 5% de SBF livre de vesículas extracelulares. As células eram então incubadas por 48 horas. As vesículas extracelulares eram purificadas a partir de 50 ml de meio de cultura através de centrifugação diferenciada. O meio de cultura sobrenadante de cada placa de cultura era colocado em tubos de centrifugação tipo “Falcon” de 50 ml (BD Biosciences). Inicialmente, era centrifugado a 300g por 10 min a 4°C, seguido

de nova centrifugação 2.000g por 5 min a 4°C. Após, o sobrenadante era filtrado com filtro de 0,8 µm (Millipore). A finalidade desses passos iniciais era a eliminação de restos celulares e debris. Em seguida, o meio de cultura era colocado dentro de um tubo tipo Beckman (Beckman Coulter Life Sciences), e ultracentrifugado a 100.000g por 80 minutos a 4°C com um 70iT rotor. O pellet com as vesículas extracelulares era suspenso com 200 µl de PBS 1X (filtrado duas vezes com filtros de 0,22 µm – Thermo-Scientific) a 4°C e estocado a -80°C.

4.2.3 Isolamento de Vesículas Extracelulares de Células Primárias

Após uma semana em cultura (subcapítulo 4.1.2), o meio de cultura DMEM/F12 suplementado era substituído por um com 5% de SBF livre de vesículas extracelulares, e mantido na estufa por 48 horas. O sobrenadante de cada placa de cultura era colocado em tubos de centrifugação tipo “Falcon” (BD Biosciences) e as vesículas extracelulares eram purificadas do sobrenadante através de centrifugação diferenciada conforme já mencionado no subcapítulo 4.2.2. O pellet com as vesículas extracelulares foi suspenso com 200 µl de PBS 1X (filtrado duas vezes com filtros de 0,22 µm – Thermo-Scientific) a 4°C e estocadas a -80°C. Quando as vesículas isoladas tinham como destino o tratamento de culturas cocleares, o antibiótico utilizado no meio de cultura era a ampicilina em substituição a penicilina/estreptomicina. A ampicilina não apresenta ototoxicidade.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS VESICULAS EXTRACELULARES

4.3.1 Análise Usando Nanosight

O aparelho Nanosight LM20 (Malvern Instruments Ltda., Malvern, ENG) foi utilizado para avaliar a distribuição de tamanho e a concentração das vesículas extracelulares. Esse aparelho é composto por um microscópio com uma câmara

acoplada para a captura de imagens a 30 quadros por segundo, por uma câmara de amostragem com um laser e por um computador com o software NTA 2.3 (Malvern Instruments Ltda.) para o processamento das imagens. As vesículas suspensas (subcapítulo 4.2) eram inicialmente diluídas (1:100) em PBS 1X (filtrado duas vezes). Cerca de 1 ml da diluição era injetado na câmara de amostragem onde um feixe de laser incidia sobre as vesículas presentes na suspensão aquosa. A câmara acoplada a um microscópio com magnificação de 20X registrava as imagens com as variações de dispersão da luz e o movimento browniano das vesículas. Com a ajuda do software, obteve-se a distribuição de tamanho e a concentração de vesículas na suspensão líquida.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para a caracterização quanto à morfologia e ao tamanho das vesículas. Após serem isoladas por meio de ultracentrifugação (subcapítulo 4.2), o pellet rico em microvesículas era suspenso em 50 µl de PBS 1X (filtrado duas vezes) a 4°C e fixados em paraformaldeído a 2%. As amostras foram enviadas para a Universidade de Amsterdã onde era realizada a MET. Uma grade recoberta com filme de carbono era posicionada sobre uma gota da suspensão com VEs. Em seguida, as grades foram colocadas diretamente no topo de uma gota de 2% de acetato de uranila. As grades foram examinadas com um microscópio eletrônico de transmissão Technai-12 G2 Spirit Biotwin (FEI, Eindhoven, Holanda).

4.4 EXTRACÇÃO DE RNA

Uma quantidade padronizada de 1×10^6 células (HEI-193 e células tumorais primárias) e as microvesículas isoladas (conforme subcapítulo 4.2) foram submetidas à extração de RNA total e microRNA. Os kits utilizados foram o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA) para extração do RNA total e, miRNeasy Mini

Kit (Qiagen) e o RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) para extração de microRNAs. Após a separação das VEs do meio de cultura por ultracentrifugação, ao invés do pellet ser ressuspensionado com PBS 1X, ele era tratado com 4 µl de rDNase I (Ambion, Life Technologies, Grand Island, NY) e 8 µl de SUPERase In™ (20 U/µl) (Ambion). Esse tratamento inicial com desoxirribonuclases (DNase) e inibidores de ribonuclease (RNase) evita possíveis contaminações com DNA oriundos de outras fontes não-VE e impede a degradação do RNA com conseqüente interferência nos resultados das reações subseqüentes, como a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa). Para passos seguintes para a extração de RNA total e microRNA seguiram as instruções do fabricante com processos de lise de membranas plasmáticas e nucleares e processos de purificação e seleção dos RNAs (Anexos A e B). O RNA extraído foi diluído em água sem RNase (Nuclease-Free Water, Ambion) e estocado a -80°C.

4.5 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO RNA

A avaliação quantitativa e qualitativa do RNA extraído foi realizada através do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo-Scientific, Waltham, MA, EUA), considerando-se uma unidade de absorvância de 40 µg/ml medida em comprimento de onda de 260 nm. A pureza do RNA extraído foi avaliada pela relação dos valores de absorvância nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm (relação 260/280), sendo considerados ideais os valores entre 1,8 e 2,0. Os resultados foram obtidos em ng/µl. Como a quantidade de RNA purificado das microvesículas era pequena, às vezes inferiores a 2 ng/µl, utilizou-se também o Agilent Bioanalyzer 2100 através do kit RNA 6000 pico (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Essa tecnologia se baseia na separação eletroforética no RNA em um microchip e a leitura do sinal de fluorescência, fornecendo informações em relação a integridade do RNA (RIN – número de integridade do RNA), a concentração de RNA em pg/µl e distribuição por tamanho. O RIN é deduzido a partir das bandas do RNA ribossomal (28S e 18S), variando de 1 a 10. Quanto maior for o seu valor maior será o grau de preservação do RNA. Como as vesículas extracelulares não apresentam RNA ribossomal, o valor do RIN não era aplicável em sua análise.

4.6 AMPLIFICAÇÃO DO RNA

Para a realização da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) foi utilizado o SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen). Esse kit é capaz de realizar a síntese de cDNA e realizar a amplificação da PCR em apenas um único tubo. Cada 50 µl da reação em cadeia da polimerase (PCR) continha 25 µl 2X Reaction Mix, 0,2µM de cada *primer*, 1,0 µl de RT/Platinum® Taq Mix, e 100 pg de RNA. O equipamento utilizado para a amplificação foi o termociclador MJ Research PTC-100 (MJ Research Inc., St. Bruno, Quebec, CAN) e o programa de ciclagem teve a seguinte configuração: 1 ciclo de 50°C por 30 min e 94°C por 2 min para a síntese do cDNA e pré-desnaturação; 40 ciclos para completa desnaturação (15s a 94°C), anelamento (30s a 55°C), extensão (60s a 72°C) e 10 min a 72°C para o final da extensão. Os primers utilizados foram: GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) (*forward* 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' e *reverse*: 5'-TCAGAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'); Cop-GFP (*forward* 5'-AGGACAGCGTGATCTTCACC-3' e *reverse* 5'-CTTGAAGTGCATGTGGCTGT-3'). Os experimentos efetuados eram providos de controle negativo, consistindo de uma reação com os mesmos primers da reação experimental, mas substituindo o RNA da amostra por água destilada (Ambion). Os produtos da reação RT-PCR eram armazenados a -20°C até a utilização.

4.7 ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese era realizada em gel de agarose 1,5% (Agarose-LE™, Ambion) dissolvida em tampão TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) (Gibco). A solução era aquecida em forno de micro-ondas até a dissolução da agarose e posteriormente brometo de etídio (0,5 µg/ml) era adicionado. O gel era despejado em uma cuba de eletroforese e a cuba era preenchida com TAE 1X após a solidificação do gel. Aplicou-se 15 µL do produto de RT-PCR juntamente com 3 µl de corante azul, permitindo a visualização da corrida eletroforética. Utilizou-se um marcador padrão de peso molecular de 50 e 100 pb (Invitrogen). A eletroforese foi

realizada através da aplicação de diferença de potencial constante de 100 Volts. Os fragmentos foram visualizados através do transiluminador ultravioleta ChemiDoc MP System e com o auxílio do software ImageLab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

4.8 MARCAÇÃO DAS VEs COM PKH-67

Utilizou-se o corante PKH-67 em dois diferentes experimentos com a finalidade de confirmar se as vesículas secretadas pelas células tumorais, tanto a linhagem celular HEI-193 quanto a cultura de células primárias de SV, eram internalizadas pelas células cocleares. O PKH-67 *Fluorescent Cell Linker* Kit (Sigma-Aldrich) é capaz de marcar regiões lipídicas de membranas celulares com marcador fluorescente verde, podendo alcançar uma meia-vida que chega a 12 dias *in vivo*. A marcação das membranas plasmáticas de células HEI-193 e das VEs com marcador PKH-67 seguiu o protocolo do fabricante e as modificações de Ekström et al (88).

Primeiramente, as próprias vesículas (5×10^{11} partículas/ μl) foram coradas com o PKH-67 e adicionadas diretamente à cultura de neurônios do gânglio espiral. As VEs possuem remanescentes da membrana celular sendo portanto coradas pelo PKH-67. As VEs eram suspensas em 200 μl de PBS 1X (filtrado duas vezes) após serem ultracentrifugadas (subcapítulo 4.2) e, então, foram marcadas com PKH-67. O excesso de marcador na solução contendo as vesículas extracelulares foi eliminado com a lavagem da solução 3 vezes utilizando tubos Vivaspin 2 (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha) durante 3 min, a 4.000g, em temperatura ambiente. Após, a solução era diluída em PBS 1X (filtrado duas vezes) e ultracentrifugada a 100.000g, por 90 min a 4°C. O pellet foi suspenso em 200 μL de PBS 1X (filtrado duas vezes) e 20 μl dessa suspensão eram adicionados diretamente ao meio de cultura contendo neurônios do gânglio espiral e células de Schwann dissociados (células receptoras). A quantificação do número de células (NGE ou CS) internalizando as vesículas secretadas foi efetuada após 4 e 24 horas sob microscopia. Esse tipo de cultura em uma única camada de células dissociadas facilita a visualização das vesículas internalizadas pelas células receptoras, uma vez que os NGE e as CS poderiam ser vistos isoladamente e evita assim a contaminação de fundo presente em múltiplas camadas celulares, tal como na

cultura *ex-vivo* de cóclea. O foco em NGE é motivado pelos achados histopatológicos que evidenciam uma maior perda dessas células em ossos temporais humanos afetados pelo schwannoma vestibular.

No segundo experimento, corou-se a própria linhagem celular HEI-193, derivadas de NF2, com PKH-67 (4×10^6 células HEI-193) e essas células foram cultivadas na porção superior de uma placa de cultura dupla. A placa superior possuía uma membrana com permeabilidade para partículas com tamanho inferior a 1 μm . Como as vesículas possuem componentes da membrana celular adquiridos durante sua formação, as vesículas carregariam o PKH-67 em sua membrana. Essas vesículas atravessariam a membrana permeável da placa de cultura superior e atingiriam a cultura de NGE cultivadas na porção inferior. A taxa de internalização das vesículas pelas células (NGE ou CS) era feita após 24 e 48 horas, sob microscopia.

4.9 TRANSFEÇÃO COM O PLASMÍDIO pCT-CD63-GFP

Utilizou-se um plasmídeo contendo uma proteína fluorescente verde (GFP – *green fluorescent protein*) com intuito de avaliar se o material genético (RNA) presente nas VEs poderia ser expressado pelas células receptoras. Células HEI-193 foram transfectadas com o plasmídeo GFP para a avaliar a melhor concentração de lipofectamina (Lipofectamine[®] 2000 Reagent, Invitrogen[™]) a ser utilizada (Figura 10).

Após, novas células HEI-193 foram transfectadas com o plasmídeo pCT-CD63-GFP (Cyto-Tracers, System Biosciences Inc., Mountain View, CA, EUA) e a eficiência da transdução foi verificada sob microscopia invertida para avaliação das células vivas (Live Microscopy, Zeiss). As células transfectadas foram selecionadas com puromicina 1 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, EUA). A puromicina é um antibiótico com elevada citotoxicidade. Entretanto, o plasmídeo pCT-CD63-GFP contém um gene resistente a essa citotoxicidade da puromicina. Assim, enquanto as células não-transfectadas morrem quando se adiciona puromicina ao meio de cultura, as células transfectadas permanecem vivas e se multiplicando (Figura 11). As VEs dessas células foram isoladas (subcapítulo 4.2.2)

e o RNA extraído (subcapítulo 4.4) com intuito de avaliar a presença do mRNA GFP (168 pb) através de RT-PCR (subcapítulo 4.6) nessas vesículas.

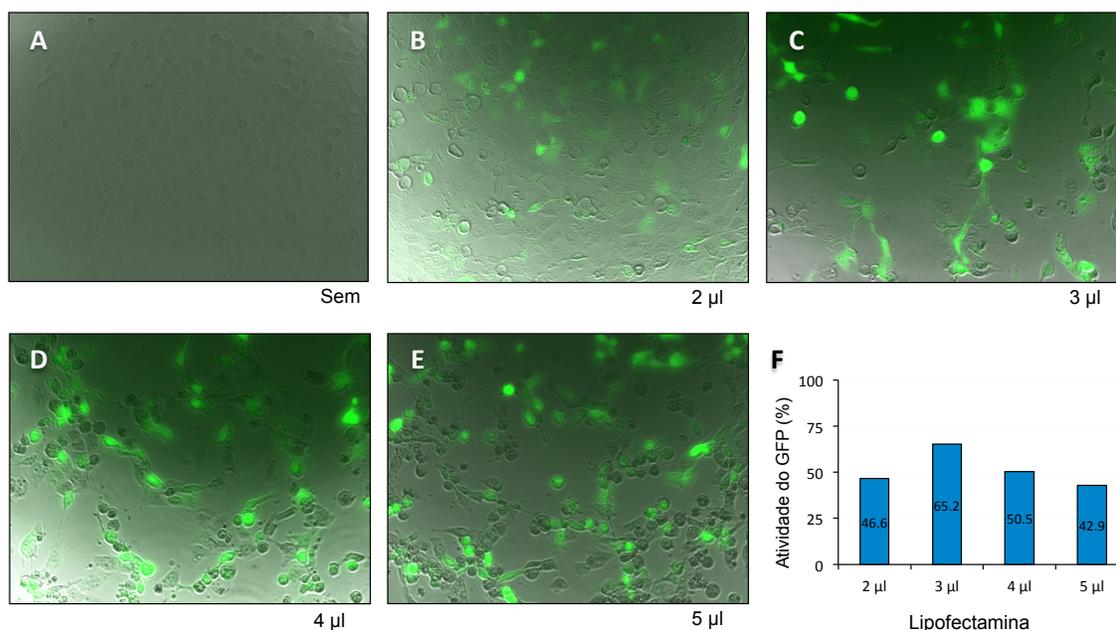


Figura 10 – Células HEI-193 transfectadas com o plasmídeo GFP com diferentes concentrações de lipofectamina. Testou-se 0, 2, 3, 4, 5 µl de lipofectamina (A, B, C, D e E respectivamente). (F) A atividade da GFP foi maior quando utilizou-se 3 µl de lipofectamina. Amplificação: 20X.

4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA DAS AMOSTRAS

A identificação das células ciliadas, externas e internas, foi realizada com o auxílio do anticorpo primário policlonal miosina VIIA (MYOVIIA) de coelho (Proteus Biosciences, Ramona, CA, EUA). Já os neurônios do gânglio espiral e suas fibras nervosas foram caracterizados com o auxílio do anticorpo primário monoclonal de camundongo β -tubulina classe III (TUJ-1) (Covance Inc., Dedham, MA, EUA) e anticorpo primário policlonal de galinha anti-neurofilamento H (EMD Millipore, Darmstadt, ALE). Os anticorpos secundários utilizados foram anti-coelho, Cy5 (vermelho) e Cy3 (verde), anti-galinha, Cy3, e anti-camundongo, Cy5 (Jackson

ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, EUA). As células em apoptose foram coradas utilizando o Poly Caspase Assay Kit (verde) e seguindo o protocolo do fabricante (Neuronomics, Edina, MN, EUA).

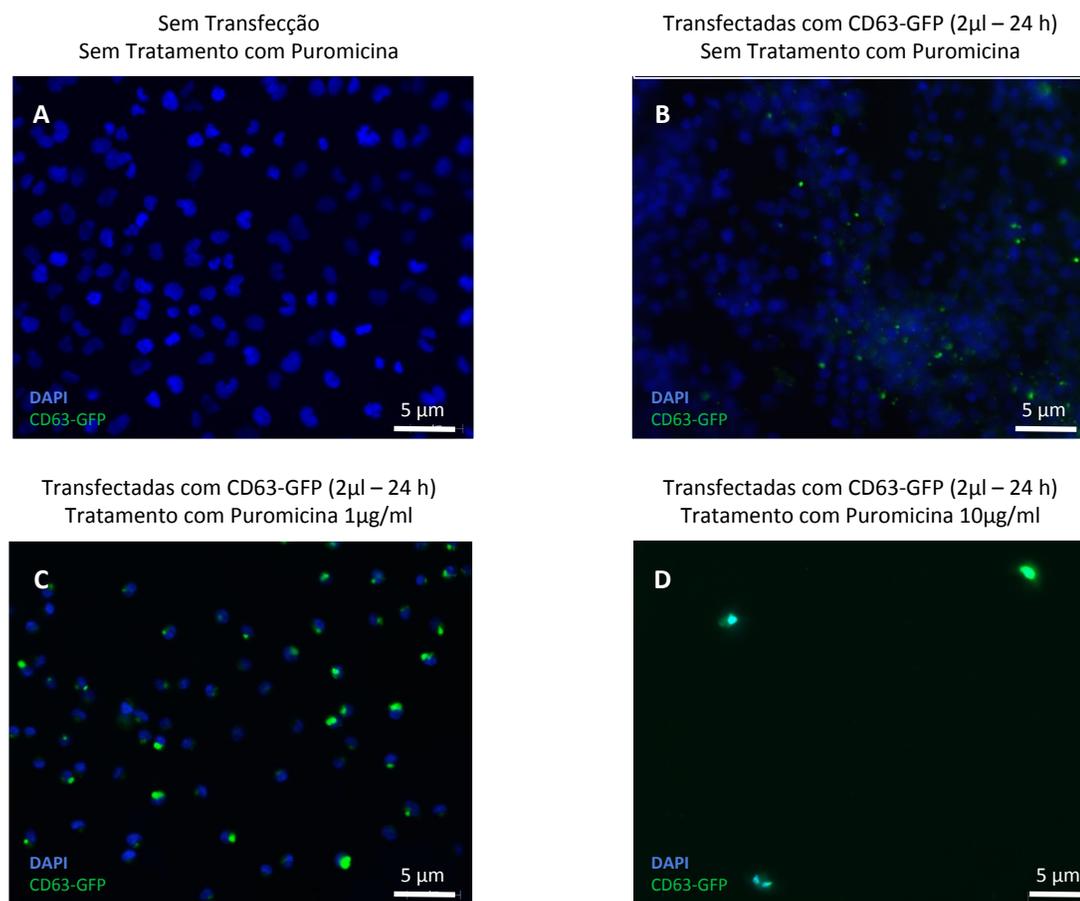


Figura 11 – Seleção das células HEI-193 transfectadas com plasmídeo pCT-CD63-GFP utilizando puomicina. (A) células HEI-193 não transfectadas. (B) células HEI-193 transfectadas, mas sem tratamento com puomicina. (C) células HEI-193 transfectadas e tratadas com puomicina 1 µg/ml. (D) células HEI-193 transfectadas e tratadas com puomicina 10 µg/ml. Escala: 5 µm.

Após 48 horas sob tratamento, os espécimes (culturas de *ex-vivo* de cócleas e cultura de NGE) eram lavados duas vezes com solução de PBS 0,1M e então fixados com paraformaldeído 4% durante 20 minutos. Em seguida, os espécimes permaneceram 30 minutos em uma solução de permeabilização composta de PBS

0,1M (94%), Triton-X-100 (1%), e NHS (5%). Uma solução contendo os anticorpos primários era adicionada e mantida por toda a noite (*overnight*). Os anticorpos eram diluídos em uma solução de bloqueio contendo PBS 0,1M (98,6%), Triton-X-100 (0,4%), e NHS (1%). Os espécimes eram lavados três vezes com solução de PBS 0,1M e então corados com os anticorpos secundários durante 80 minutos. Após era adicionado DAPI (azul) por 5 minutos e, em seguida, os espécimes foram lavados duas vezes com solução de PBS 0,1M e colocado em slides de vidro com solução Vectashield® (Vectashield® Mounting Media, Burlingame, CA, EUA).

As imagens foram obtidas por meio de microscopia confocal (Confocal Leica SP5), com cortes seccionais sequenciais de 0,5 μm , de acordo com protocolo publicado mas com modificações(116). As amostras eram avaliadas sob amplificação de 20X, 63X e 126X. Para uma perfeita representação da morfologia de cada espécime, as fotografias eram realizadas da região central. Além disso, os vários cortes seccionais eram projetados em um único plano utilizando o Leica software. A contagem de células ciliadas (internas e externas) e das fibras neuronais foi efetuada ao longo de 100 μm do comprimento coclear. O número de neurônios e a área dos corpos celulares desses neurônios foram quantificados em uma área de $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ com o auxílio do programa Image J(117). Especificamente, todas as células para serem contabilizadas deveriam estar apropriadamente coradas, com presença de núcleo, e distinguível com uma célula individual, independente do tamanho ou do grau de degeneração.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o software Windows Excel 2013 e GraphPad Prism 6 para Windows para a análise estatística. O teste D'Agostinho-Pearson foi utilizado para testar a normalidade da distribuição. O teste *t* de *student* foi aplicado como teste paramétrico quando dois grupos foram comparados. Os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram aplicados como testes não-paramétricos para comparações de dois grupos diferentes e para comparações com mais de dois grupos, respectivamente. O teste de múltiplas comparações de Dunn e a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses foram conduzidos para ratificar os

valores de p gerados. Os testes de múltiplas comparações evitam o erro tipo I, quando se refuta a hipótese nula sendo esta verdadeira. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.12 COMITÊ DE ÉTICA

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Estudos Humanos do Massachusetts General Hospital e do Massachusetts Eye and Ear Infirmary (protocolos #196424-22, #717176-2, #15-003), e pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Animais do MEEI (protocolos #15-003, #09-01-002, #09-03-003, #11-013).

5 RESULTADOS

5.1 SCHWANNOMA VESTIBULAR SECRETA VESÍCULAS EXTRACELULARES

A liberação de vesículas extracelulares por schwannoma vestibular não havia sido reportada anteriormente. As vesículas foram isoladas, inicialmente, após centrifugações seriadas do meio de cultura da linhagem celular de um SV humano, células HEI-193, onde essas células estavam condicionadas. Numerosas pequenas vesículas foram identificadas por meio da MET (n=2; Figura 12A). O tamanho dessas VEs variaram entre 30 nm a 680 nm e o tamanho mais frequente foi de 102 nm (Figura 12C). Como foram utilizados meios de cultura sem VEs, as vesículas detectadas tinham como origem as células HEI-193. A morfologia das vesículas era semelhante ao formato de cálice ou copo quando visualizados superiormente, consistente com a descrição de outros autores (87) e, sugerindo a presença importante de exossomos como o maior componente dessas vesículas. Similarmente, vesículas foram observadas em meios de cultura onde as células primárias de SV humano foram cultivadas (n=2; Figura 12B). Essas células primárias foram obtidas de pacientes com SV esporádico que foram submetidos à cirurgia. O tamanho e a concentração dessas vesículas provenientes de células primárias de SV esporádico (n=4) eram similares às VEs da linhagem celular HEI-193 (Figura 12C).

5.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS PELO SCHWANNOMA VESTIBULAR CONTÊM RNA

A presença de pequenos RNAs foi identificada na linhagem celular HEI-193 (n=10; Figura 12D) e em células primárias de SV (n=10; Figura 12E). O pico em 25s é consistente com a presença miRNA, mas também poderia conter outras espécies de pequenos RNAs não-codificantes. Além disso, foi identificado pequenos RNAs

em VEs de células HEI-193 (n=10; Figura 12F) e de células primárias de SV (n=10; Figura 12G). Similarmente, o pico foi em 25s.

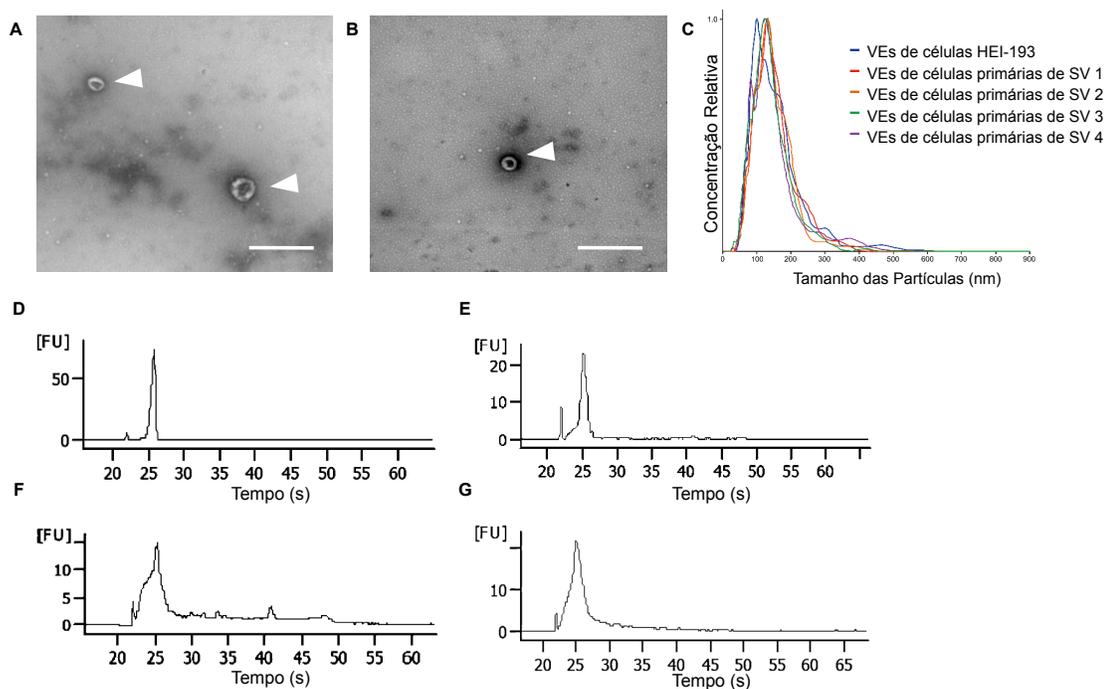


Figura 12 – SVs secretam VEs que contêm pequenos RNAs. Imagens de microscopia eletrônica mostram VEs presentes em meios de culturas de (A) células HEI-193 e de (B) células primárias de SV. As vesículas com formato arredondado com bordas definidas semelhante a copo ou taça, evidenciam a presença de exossomos (cabeça da seta). (C) Distribuição pelo tamanho e pela concentração das vesículas da linhagem celular HEI-193 e das células tumorais primárias (n=4). A maior concentração foi estabelecida como 1. Imagens representativas de espectrofotometria de pequenos fragmentos de RNA extraídos de (D) células HEI-193 e (E) células primárias de SV humanos. Imagens representativas de espectrofotometria de pequenos fragmentos de RNA extraídos de VEs isoladas das (F) células HEI-193 e das (G) células primárias de SV humanos. FU, unidade fluorescente. Escala: 500 nm (A,B).

5.3 NEURÔNIOS DO GÂNGLIO ESPIRAL SÃO CAPAZES DE INTERNALIZAR VESÍCULAS SECRETADAS PELO SCHWANNOMA VESTIBULAR

Para confirmar se as vesículas secretadas pelas células tumorais, tanto a linhagem celular HEI-193 quanto a cultura de células primárias de SV, eram internalizadas pelas células cocleares, utilizou-se o corante PKH-67 em dois diferentes experimentos. No primeiro, as próprias vesículas extracelulares foram coradas com o PKH-67. A comparação entre o corante PKH-67 em um meio de cultura com vesículas e sem vesículas pode ser visto na figura 13. Após, as VEs coradas foram adicionadas diretamente à cultura de NGE dissociados (células receptoras) (Figura 14A-D). No segundo experimento, corou-se células HEI-193 com PKH-67 cultivadas na porção superior de uma placa de cultura dupla que permitia a passagem as vesículas por elas liberadas para o compartimento inferior onde havia uma cultura de NGE (células receptoras) (Figura 14E-G).

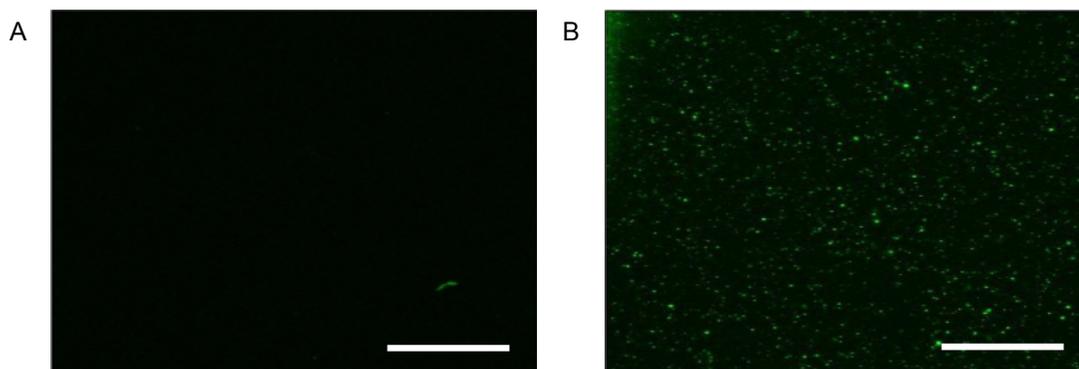


Figura 13 – VEs de células HEI-193 coradas com PKH-67. Meio de cultura livre de VEs corado com PKH-67 (A) e VEs de células HEI-193 coradas com PKH-67 (B). Escala: 50 μ m.

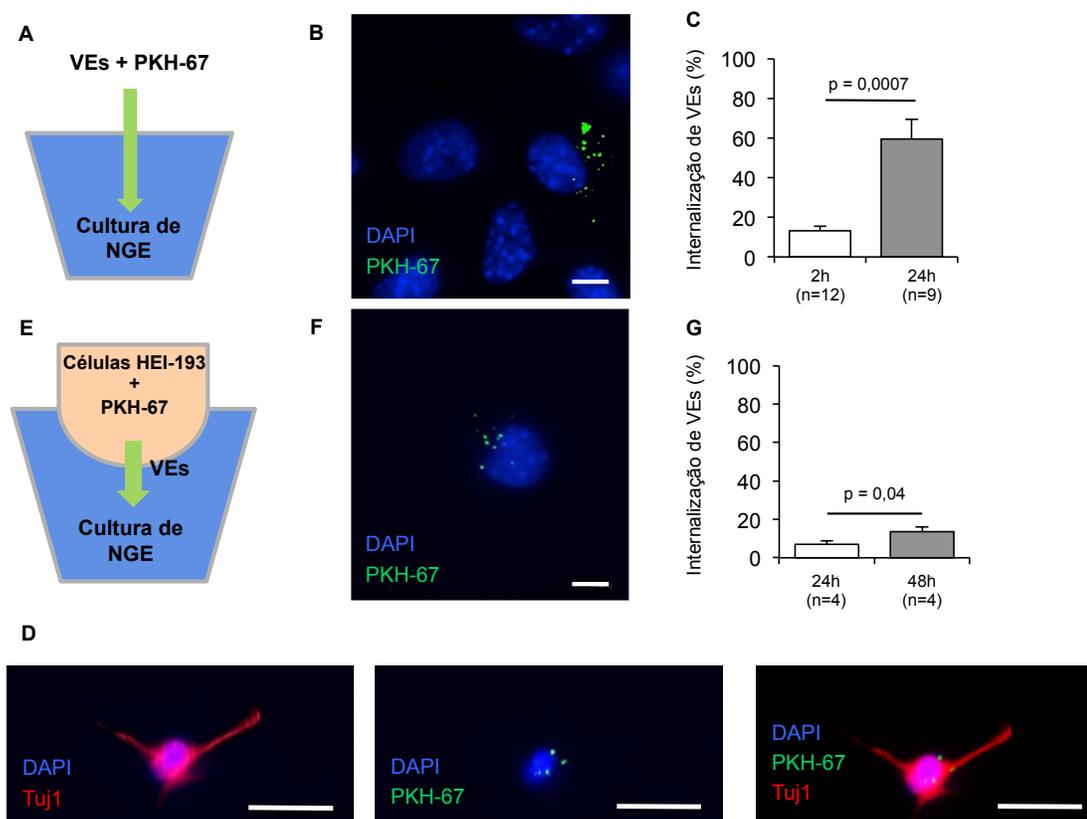


Figura 14 – VEs podem ser internalizadas por células cocleares, incluindo NGE. Para estudar a internalização das vesículas, (A-D) VEs coradas com PKH-67 eram adicionadas diretamente em culturas de células cocleares ou (E-G) células HEI-193 doadoras coradas com PKH-67 e cultivadas em placas de cultura dupla, permitindo que as novas VEs formadas e marcadas com PKH-67 atravessassem a membrana e alcancem as células cocleares no compartimento inferior. (B-F) VEs marcadas com PKH-67 foram identificadas como pontos verdes no citoplasma e (C,G) quantificadas (média \pm SEM). (D) NGE com presença de vesículas internalizadas. Escala: 2 μ m (B,D,F). DAPI, 4',6'-diamidino-2-fenilindol. SEM, erro padrão da média.

Utilizando essas duas formas de marcação de VEs, foi possível comprovar que células presentes na cultura de neurônios do gânglio espiral eram capazes de internalizar as vesículas (Figura 14B e F, respectivamente). A porcentagem de células internalizando as vesículas aumentou de 2h a 24h em cultura e foi significativamente maior para as VEs coradas diretamente (Figura 14C) do que para aquelas indiretamente marcadas (Figura 14G; $p=0,001$), provavelmente pela maior quantidade de vesículas marcadas disponíveis para as células receptoras no primeiro experimento. Utilizando um marcador neuronal, TUJ-1, identificou-se que dentre as células dissociadas em cultura, os NGE eram capazes de internalizar as vesículas (Figura 14D).

5.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES PODEM TRANFERIR RNA DO SCHWANNOMA VESTIBULAR PARA AS CÉLULAS COCLEARES *IN VITRO*

Foi estabelecido que as células cocleares podem internalizar as vesículas secretadas pelas células tumorais. Testou-se então se essas células poderiam expressar o material genético contido nas vesículas. Transfectou-se células HEI-193 com o plasmídeo pCT-CD63-GFP, um plasmídeo contendo o gene GFP. A partir desse gene, a célula é capaz de expressar uma proteína fluorescente verde, a GFP. O RNA das vesículas secretadas pelas células transfectadas foi extraído e transcrito reversamente em cDNA. VEs de células HEI-193 não-transfectadas com o plasmídeo, não apresentaram GFP mRNA (Figura 15A, linha 1). As VEs oriundas das células transfectadas contêm o GFP mRNA (Figura 15A, linha 2). Essas vesículas foram então introduzidas em culturas de neurônios de gânglio espiral e a expressão de GFP foi verificada sob microscopia. A expressão da proteína GFP foi verificadas em diferentes tipos de células (Figura 15B), incluindo neurônios corados com TUJ-1 (Figura 15C, cabeça da seta) e células não neuronais (Figura 15D, asterisco).

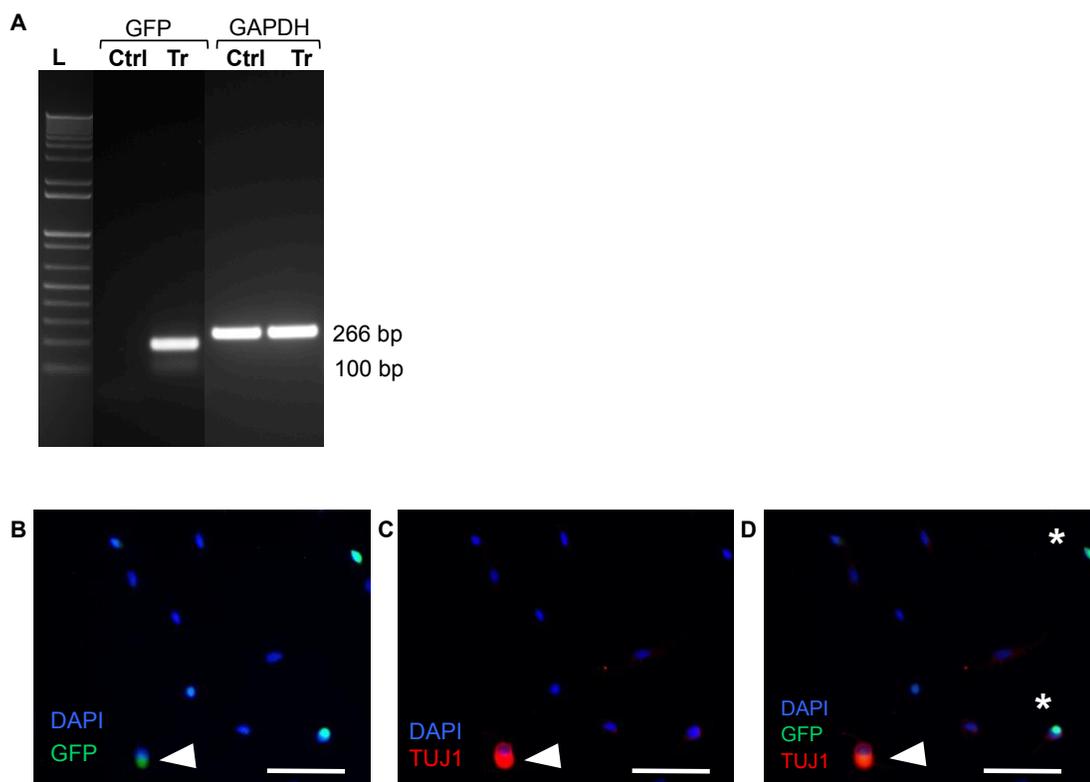


Figura 15 – VEs podem transferir RNA para as células cocleares em cultura, incluindo NGE. (A) VEs isoladas de células HEI-193 (linha 1) não apresentam o mRNA GFP, mas VEs de células HEI-193 transfectadas com o plasmídeo pCT-CD63-GFP (linha 2) contêm o mRNA GFP. L: DNA leader 100 bp. GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase): mRNA para controle das amostras das linhas 1 e 2. (B-D) Adição de VEs carregando o mRNA GFP diretamente em cultura de NGEs resultou na expressão da proteína GFP pelas células receptoras, incluindo um NGE (cabeça de seta). Escala: 5 μ m (B,C,D). DAPI, 4',6'-diamidino-2-fenilindol. Ctrl, controle negativo. Tr, transfectado.

5.5 VESÍCULAS SECRETADAS PELAS CÉLULAS HEI-193 DANIFICAM CÉLULAS COCLEARES

Foi demonstrado que NGE cultivados dissociadamente podem internalizar vesículas e expressar sua carga genética. Testou-se então se essas vesículas secretadas pelas células HEI-193 poderiam afetar as células cocleares em uma cultura *ex-vivo* de cócleas de camundongos. Comparado com cócleas sem tratamento (n=7-8) (Figura 16A-C, painéis à esquerda), as cócleas tratadas com VEs (n=7-8) (Figura 16A-C, painéis à direita) demonstraram mudanças degenerativas, especialmente de fibras e dos corpos celulares dos NGEs. Essas mudanças foram quantificadas pela contagem do número de CCIs (Figura 16D), CCEs (Figura 16E) e fibras por 100 μm (Figura 16F), NGEs por $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (Figura 16G) e área da soma dos NGEs (Figura 16H). Embora não afete o número de CCIs (Figura 16D) e de CCEs (Figura 16E), o tratamento com VEs reduz significativamente o número de fibras (Figura 16F; $p=0,04$), neurônios (Figura 16G; $p=0,04$) e área dos corpos celulares dos NGE (Figura 16H; $p<0,00001$).

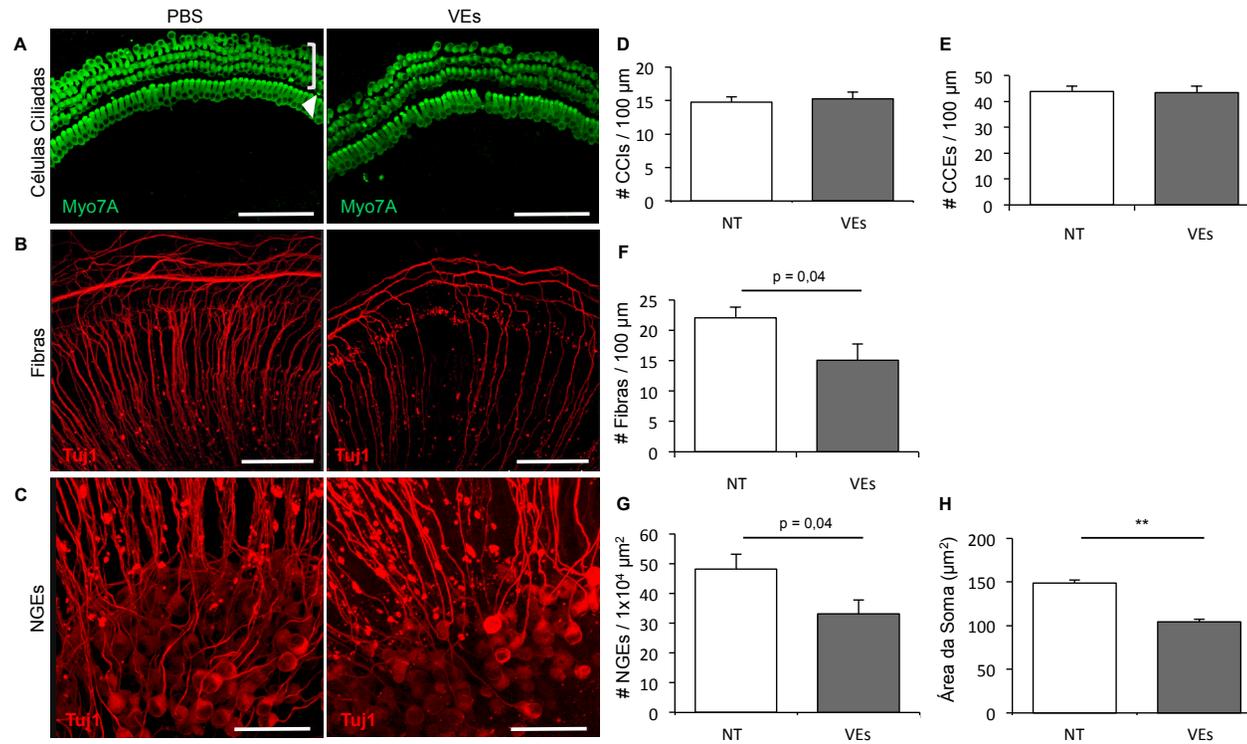


Figura 16 – VEs de células HEI-193 danificam células cocleares em cultura. Imagens de (A) CCI (única fileira, cabeça de seta), CCE (três fileiras, colchete), (B) fibras, e (C) NGEs, expostas a PBS 1X (6 μl) como controle ou VEs (6 μl) derivados de células HEI-193. O número de células foi quantificado, (D) CClIs, (E) CCEs e (F) fibras nervosas por 100 μm , (G) NGEs por $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ e, (H) áreas da soma dos NGEs, para o grupo controle (NT, não-tratadas) e grupo tratado com VEs (média \pm SEM, $n=7-8$ cócleas de diferentes animais para cada grupo, $** p < 0,00001$). Escala: 100 μm (A,B,C). SEM, erro padrão da média.

5.6 DANO NEURAL CAUSADO PELAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CELULAS HEI-193 PODE SER PREVENIDO PELA HEPARINA

Testou-se o efeito dose dependente das VEs sobre as culturas de cócleas: CC (Figura 17A), fibras (Figura 17B), e NGE (Figura 17C). Utilizou-se placas de cultura dupla. No compartimento superior colocou-se células HEI-193, doadoras de VEs, em diferentes concentrações. No compartimento inferior, eram posicionados culturas organotípicas de cócleas de camundongos que serviriam como as receptoras das VEs (Figura 17D). Após 48 horas em cultura, verificou-se que a cultura de células HEI-193 com maior densidade, 4×10^6 células, foram capazes de provocar danos significativos nas CCIs ($p=0,004$) e CCEs ($p=0,02$) quando comparado ao grupo controle (Figura 17A, E e F). Houve uma tendência para a preservação das células ciliadas com o tratamento com heparina (Figura 17A), mas não houve significância estatística ($p>0,05$) (Figura 17E e F). O dano às CCs pode ser devido a outros fatores tóxicos presentes no sobrenadante do meio de culturas das células HEI-193, tais como proteínas secretadas. O dano a essas células ciliadas é menos aparente quando apenas VEs purificadas são aplicadas (Apêndice). Quando se analisou as fibras nervosas, o grupo de 4×10^6 células apresentou um menor número de fibras (Figura 17B), que também poderia ser prevenido com co-tratamento com heparina (Figura 17G), entretanto sem diferença estatística. O tamanho dos NGE foi significativamente reduzido nos grupos com 1×10^6 e 4×10^6 células HEI-193 em comparação ao grupo controle (Figura 17C, I e J-M). Assim como observado nas células ciliadas, apesar de haver preservação da perda de neurônios no grupo tratado com heparina (Figura 17H), essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). Entretanto, a heparina foi capaz de evitar o encolhimento dos corpos celulares dos neurônios do gânglio espiral em relação ao grupo de 4×10^6 células (Figura 17C, I e J-M; $p<0,00001$).

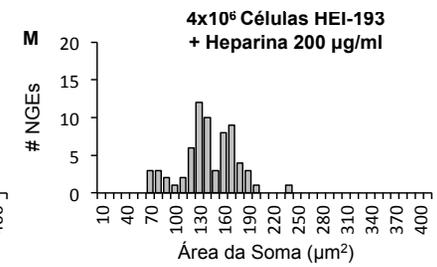
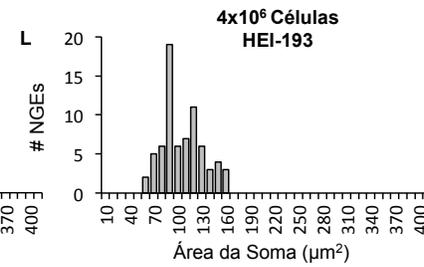
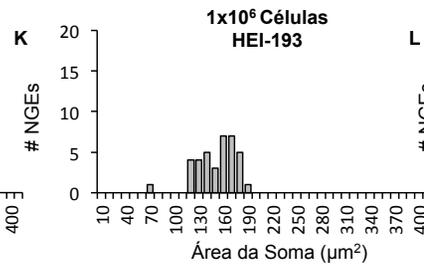
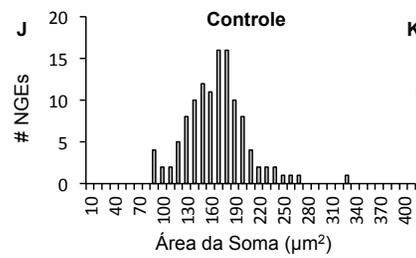
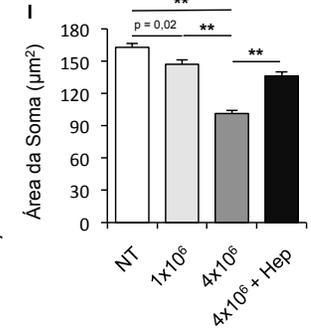
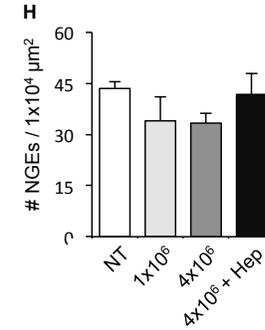
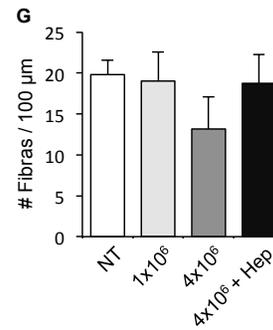
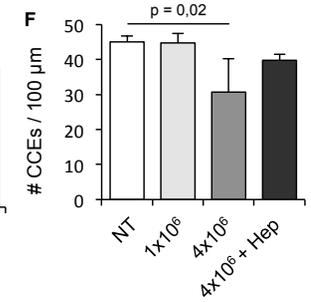
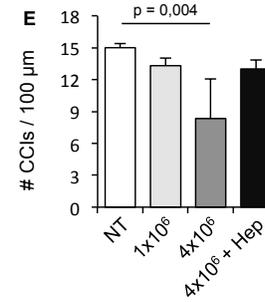
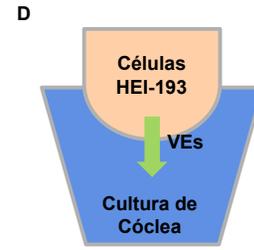
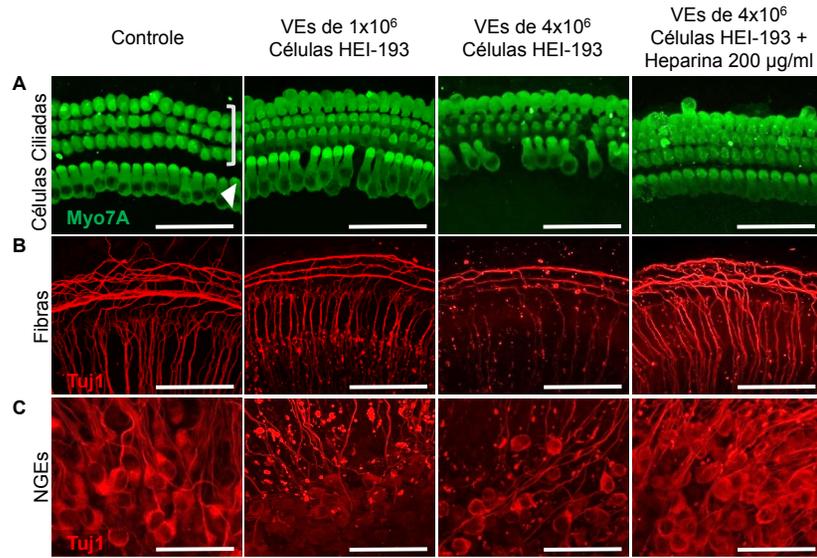


Figura 17 – O dano neural causado pelas VEs de células HEI-193 pode ser prevenido pela heparina. Imagens de (A) CCI (única fileira, cabeça de seta), CCEs (três fileiras, colchete), (B) fibras, e (C) NGEs, expostos ao meio de cultura (sem tratamento, controle negativo), VEs de 1×10^6 células HEI-193, VEs de 4×10^6 células HEI-193 e, VEs de 4×10^6 células HEI-193 juntamente com heparina, em uma placa de cultura dupla esquematizado em D. A quantificação do número de (E) CCI por $100 \mu\text{m}$, (F) CCEs por $100 \mu\text{m}$, (G) fibras nervosas por $100 \mu\text{m}$, (H) NGEs por $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ e, (I) áreas da soma dos NGEs, para o grupo controle (NT, não-tratadas, coluna branca), VEs de 1×10^6 células NF2 (coluna cinza claro), VEs de 4×10^6 células NF2 (coluna cinza escuro) e, VEs de 4×10^6 células NF2 juntamente com heparina (coluna preta) (média \pm SEM, $n=11$ cócleas foram utilizados para controle e $n=3$ para os outros experimentos, $** p < 0,00001$). Distribuição da área da soma dos neurônios nas cócleas tratadas com (J) meio de cultura (sem tratamento, controle negativo), (K) VEs de 1×10^6 células HEI-193, (L) VEs de 4×10^6 células HEI-193 e, (M) VEs de 4×10^6 células HEI-193 juntamente com $200 \mu\text{g/ml}$ de heparina. Os dados dos painéis J-M estão representados em I. Escala: $50 \mu\text{m}$ (A,C) e $100 \mu\text{m}$ (B). SEM, erro padrão da média. Hep, heparina.

5.7 VESÍCULAS SECRETADAS PELO SCHWANNOMA VESTIBULAR ASSOCIADO A PERDA DE AUDIÇÃO CAUSAM DANOS ÀS CÉLULAS COCLEARES

Foi estabelecido que VEs derivadas de linhagem celular HEI-193 podem danificar células cocleares em culturas organotípicas (Figuras 16 e 17). Testou-se, então, se as VEs derivadas de células primárias de SV tinham um efeito similar. Foram adicionadas VEs purificadas de meios de cultura de 3 SVs ($6 \mu\text{l}$; $1,9 \times 10^{10} \pm 0,6$ partículas/ μl) de pacientes com BA e de 3 SVs ($6 \mu\text{l}$; $2,8 \times 10^{10} \pm 0,9$ partículas/ μl) de pacientes com PA. A diferença na concentração e na distribuição do tamanho das vesículas oriundas de tumores com BA não têm significância estatística quando comparadas com tumores com PA ($p > 0,05$). Os dados demográficos e auditivos dos pacientes estão resumidos no gráfico 2. Audiogramas individuais de todos os

pacientes estão exibidos na figura 18. Ambos os grupos, BA e PA, foram equivalentes em relação a idade do paciente, sexo e tamanho tumoral.

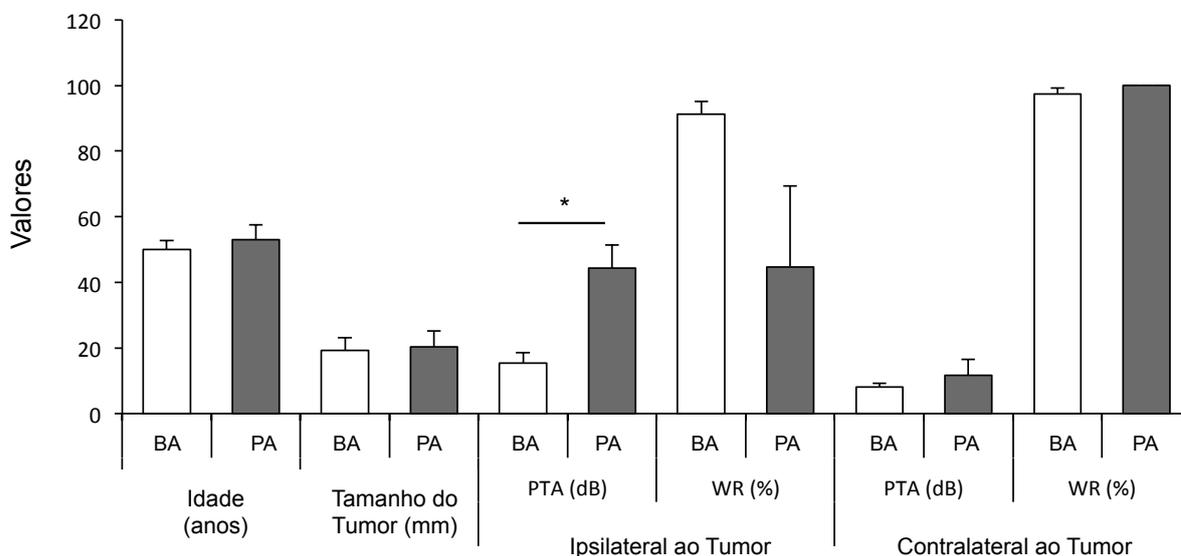


Gráfico 2 – Dados demográficos e audiométricos dos pacientes estratificados pelos limiares de audição. Boa audição (BA, colunas brancas), perda de audição (PA, colunas cinzas). Idade, tamanho do tumor, média tritonal ou *pure tone average* (PTA) e reconhecimento de palavras ou *word recognition* (WR), ipsilateral e contralateral ao tumor, são mostrados. O tamanho tumoral (definido como a maior dimensão paralela ao ápice petroso) foi registrada de imagens de TC e RNM pré-operatórias. Os dados audiométricos refletem o último teste antes da ressecção. A altura da coluna representa a média com as barras de erro representando o erro padrão da média. * $p < 0.05$.

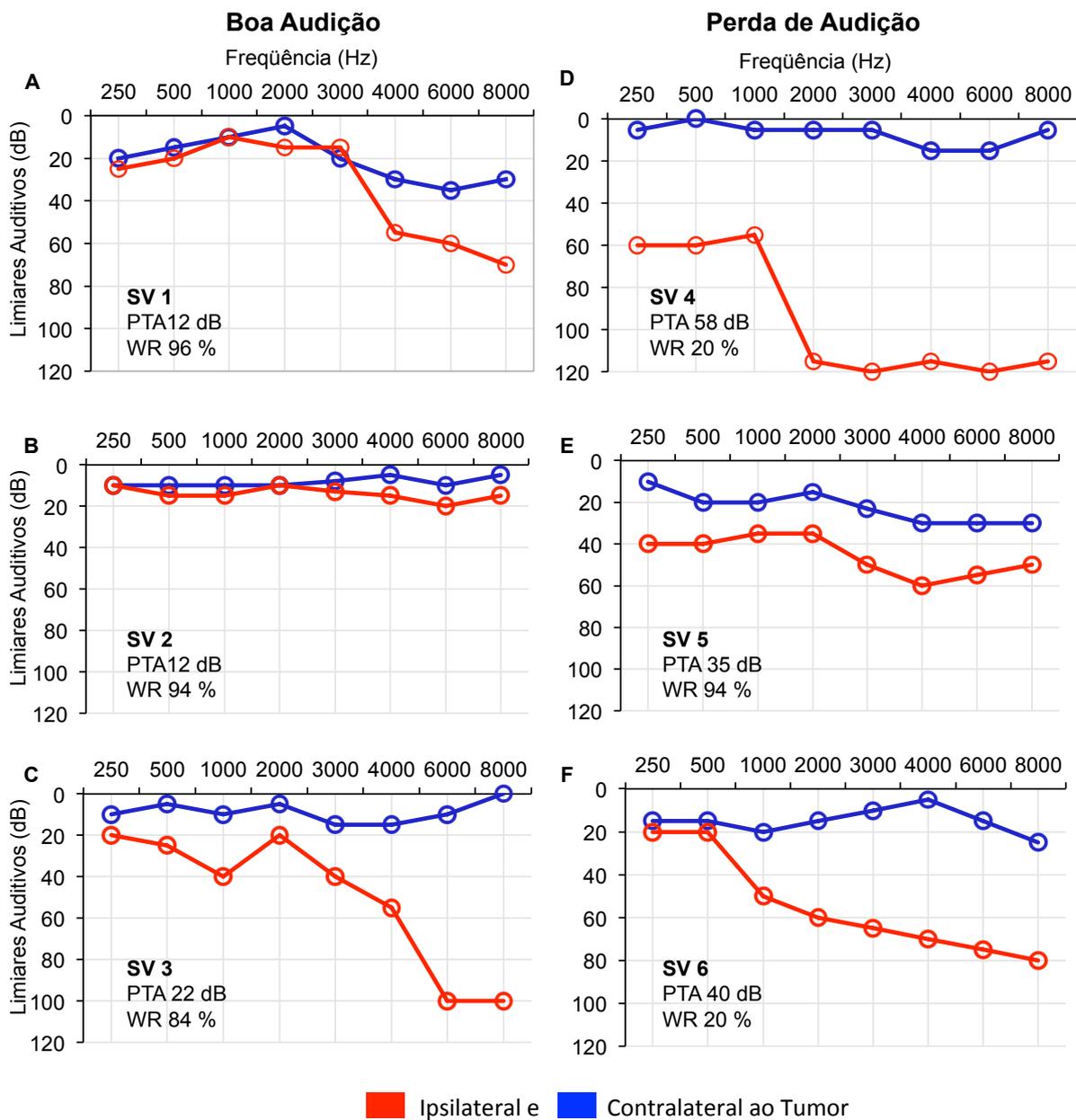


Figura 18 - Dados audiométricos dos pacientes. Indivíduos com boa audição (A-C) (PTA \leq 30 dB e/ou WR > 70%) e (D-F) com perda de audição na orelha ipsilateral ao SV (linha vermelha). Limiares de audição para a orelha contralateral (linha azul). A média tritonal (PTA, dB) e reconhecimento de palavras (WR, %) são mostradas para as orelhas ipsilaterais ao SV.

As vesículas extracelulares das células cultivadas de cada tumor foram aplicadas em 3-4 diferentes culturas cocleares, perfazendo um total de 10 diferentes cócleas tratadas para cada grupo (Figura 19). O grupo controle, no qual foi adicionado 6 µl de PBS 1X (filtrado duas vezes), foi composto também por 10 amostras. Comparado com controles sem tratamento (Figura 19A, painel à esquerda), as cócleas tratadas com VEs de SVs associados com BA (Figura 19A, painel central) e PA (Figura 19A, painel à direita) não apresentaram perdas de CCIs (Figura 19E) ou CCEs (Figura 19F). Entretanto, o número de fibras (Figura 19B e G) e NGE (Figura 19C e H) tão bem como a área da soma dos NGE (Figura 19I) foram significativamente reduzidos nas cócleas tratadas com VEs oriundas de tumores associados a PA ($p=0,01$; $p<0,00001$; e $p<0,00001$, respectivamente) quando comparados com o grupo controle, mas sem significância quando comparado com as cócleas tratadas com VEs oriundas de pacientes com BA. As medidas individuais da Figura 19I são exibidas como histogramas de distribuição da área da soma dos NGEs nas Figuras 19K-M. Percebe-se que o grupo controle e o grupo com BA apresentam uma distribuição deslocada à direita correspondendo a um maior número de neurônios com maior área. Já no grupo com PA percebe-se um deslocamento do gráfico para a esquerda, representando uma maior concentração de neurônios com área menor. Utilizando-se o Poly Caspase Kit para marcar as células apoptóticas com coloração esverdeada (Figura 19D), foi encontrado um maior número de neurônios do gânglio espiral em processo de apoptose nas cócleas tratadas com vesículas provenientes de cultura de tumores provocando perda de audição (28,4%) em relação ao grupo controle (8,72%, $p=0,01$) e em relação ao grupo com audição preservada (8,94%, $p=0,02$; Figura 19J).

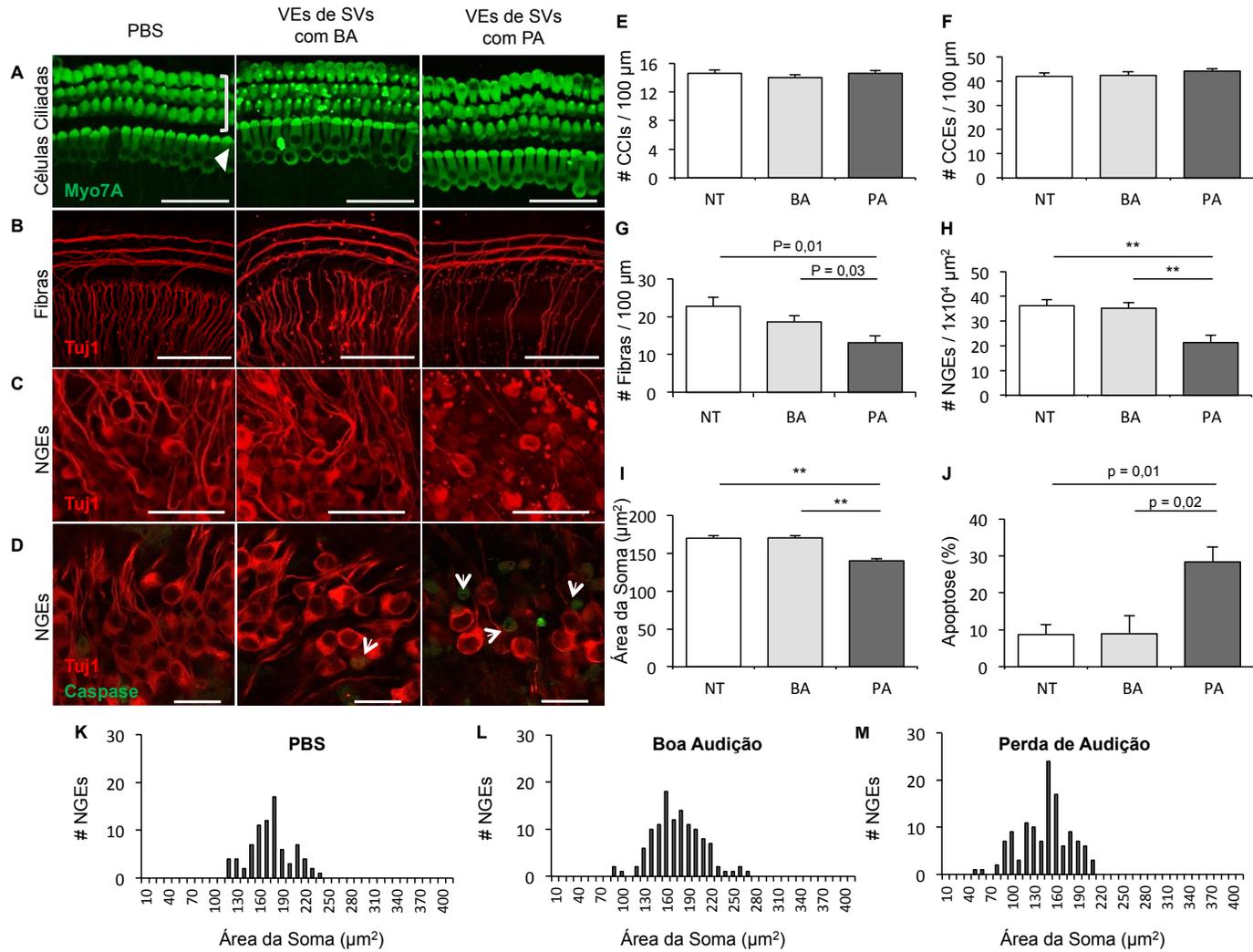


Figura 19 – VEs isoladas de SV associados a PA provocam danos em culturas de cócleas. Microscopia confocal de (A) CClIs (única fileira, cabeça de seta), CCEs (três fileiras, colchete), (B) fibras, (C) NGEs e, (D) NGEs com marcador de apoptose (policaspase; verde). Os três grupos foram (coluna à esquerda) meio de cultura sem adição de VEs (6 μ l de PBS), (coluna do centro) VEs isolados de SVs associados com BA (6 μ L) e, (coluna à direita) VEs isolados de SVs associados com PA (6 μ l). A quantificação do número de (E) CClIs por 100 μ m, (F) CCEs por 100 μ m, (G) fibras nervosas por 100 μ m, (H) NGEs por $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, (I) áreas da soma dos NGEs e, (J) apoptoses de NGEs para o grupo controle (NT, não tratadas, colunas brancas), VEs isolados de SVs associados com BA (coluna cinza claro) e, VEs isolados de SVs associados com PA (coluna cinza escuro) (média \pm SEM, ** $p < 0,00001$). $n=10$ cócleas de diferentes animais foram utilizadas para cada grupo (E-I), exceto para marcação de células apoptóticas (D e J) onde foram utilizadas 3-4 cócleas em cada grupo. (K-M) Distribuição da área da soma dos neurônios nos três grupos do experimento. Os dados dos painéis K-M estão representados em I. Escala: 25 μ m (D), 50 μ m (A,C), e 100 μ m (B). SEM, erro padrão da média.

6 DISCUSSÃO

Este estudo comprovou o papel das vesículas extracelulares na fisiopatologia da perda auditiva ocasionada pelo schwannoma vestibular. Primeiramente, foi identificado que o schwannoma vestibular produz vesículas extracelulares enriquecidas de RNA, incluindo miRNAs, tanto em cultura de células primárias tumorais quanto em cultura de linhagem celular. Quando as VEs foram adicionadas diretamente em culturas de cócleas de camundongos, essas VEs foram capazes de provocar danos nos neurônios do gânglio espiral. As células ciliadas também foram vulneráveis, mas apenas quando as vesículas extracelulares eram secretadas por células HEI-193 em um sistema de co-cultura. Além disso, as VEs secretadas por SVs associados com perda de audição provocaram apoptose dos NGE, enquanto que as VEs produzidas por SV associados com boa audição não provocaram o mesmo efeito.

As vesículas extracelulares são produzidas por praticamente todos os tipos celulares.(5) Frühbeis et al (118) estudaram VEs derivadas de cultura primária de neurônios e células da glia e seu papel na comunicação neuronal. Bastos-Amador et al (119) isolaram VEs oriundas de uma linhagem celular de linfócitos T humanos. Obregon et al (91) identificaram a importância das VEs derivadas de células dendríticas na imunidade inata e adaptativa. Pegtel et al (120) estudaram a presença de partículas virais em vesículas derivadas de linfócitos B infectados pelo vírus Epstein-Barr. Ekström et al (88) caracterizaram o conteúdo de mRNAs e miRNAs presente no interior das vesículas extracelulares derivadas de mastócitos. Diversos tipos de tumores também são capazes de produzir vesículas. Skog et al (4) comprovaram que vesículas derivadas de glioblastoma são capazes de promover proliferação celular. Chiba et al (121) estudaram vesículas derivadas de linhagem celular de câncer colorretal humano. Karlsson et al (122) avaliaram a relação entre VEs derivadas de câncer de próstata e o desenvolvimento de metástase óssea. Taylor et al (123) identificaram miRNAs presentes em VEs derivadas de câncer de ovário e sua utilização como possíveis biomarcadores. Além disso, as VEs já foram isoladas em diversos fluidos corporais como líquido, líquido ascítico, líquido amniótico, leite materno, saliva, sangue periférico (124-126).

A liberação de vesículas extracelulares por schwannoma vestibular não havia sido reportada até o presente estudo. O primeiro passo foi o isolamento dessas vesículas de uma linhagem celular de um SV humano. Para isso, utilizou-se as células HEI-193. Essa linhagem celular foi desenvolvida a partir de um SV em um paciente com neurofibromatose tipo 2 (subcapítulo 4.1.1).(110) Identificou-se vesículas não só em culturas de linhagem celular de SV, como também, em culturas de células tumorais primárias. Essas vesículas eram secretadas em altas concentrações, não importando a origem dessas vesículas, se de linhagem celular, ou de células primárias de tumores associados a PA ou associados a BA. O tamanho variou de 30 a 630 nm e possuíam um formato arredondado. Essa morfologia é compatível com exossomo e microvesículas, os principais componentes das vesículas extracelulares.(1)

Os exossomos e as microvesículas possuem proteínas e material genético (mRNA e miRNAs) em seu interior. Já é estabelecido na literatura que o RNA presente nas VEs pode ser funcional em uma célula receptora. Os mRNAs podem ser traduzidos em proteínas e/ou pode ocorrer a inibição da tradução pelos miRNAs.(127) Valadi et al (2) estudando mastócitos comprovaram que as VEs eram capazes de transferir RNA para células receptoras e estes poderiam expressar seu RNA e produzir novas proteínas. Skog et al (4) revelaram que o material genético contidos nas VEs está relacionado a diversos processos biológicos como regulação da imunidade celular, transdução de sinal, migração e proliferação celular, dentre outros. As conclusões de Skog et al também foram confirmadas por Ekström et al (88) que estudaram os grupos funcionais dos mRNAs presentes em vesículas extracelulares de mastócitos.

Essa transferência de material genético/proteínas e/ou a ativação das vias de sinalização das vesículas extracelulares podem acontecer de várias formas: internalização das vesículas por fagocitose, fusão das vesículas com a membrana celular das células-alvo, ativação de receptores na membrana das células-alvo.(1) Dessa forma, as vesículas conseguem transmitir suas informações através da transferência de suas proteínas e do seu material genético e, assim, regular os processos biológicos nas células receptoras.(4,92) O presente estudo comprovou que as vesículas extracelulares oriundas do schwannoma vestibular também são capazes de regular a produção de novas proteínas nas células cocleares, incluindo neurônios do gânglio espiral. Com o auxílio de um marcador de membrana, o PKH-

67, foi comprovado que as VEs eram internalizadas pelas células cocleares e, após essa internalização, o conteúdo de RNA presentes nas vesículas era incorporado e expressado pelas células receptoras através da produção de uma nova proteína, a proteína GFP.

A perda de audição está presente em até 95% dos pacientes com schwannoma vestibular.(46,47) Embora seja o principal sintoma, a sua fisiopatologia ainda é desconhecida. Mesmo crescendo nas proximidades do nervo coclear, não existe comprovação que o SV ocasionaria degeneração das fibras neuronais pela compressão tumoral, uma vez que os estudos mostram que os limiares auditivos em pessoas com SV esporádico não se correlacionam com a extensão do tumor no interior do CAI ou com sua dimensão radiográfica. Arriaga et al (128) estudaram 131 pacientes com schwannoma vestibular que foram submetidos à cirurgia. Não encontraram correlação entre os limiares auditivos pré-operatórios e o volume tumoral calculado a partir de imagens de RNM e TC. Bento et al (129) estudam 835 pacientes e também não encontraram correlação entre o tamanho tumoral e os limiares auditivos pré-operatórios. Mahmud et al (74) estudaram 11 ossos temporais de pacientes com SV que não foram submetidos à cirurgia e não encontraram correlação entre os limiares auditivos e o tamanho ou o volume tumoral. Em adição, pacientes com SV podem desenvolver surdez súbita ou perda auditiva progressiva apesar da falta de crescimento tumoral.(13) Além disso, estudos envolvendo ossos temporais mostram que a cóclea do lado acometido pelo schwannoma vestibular apresenta perda das células ciliadas e perda neuronal, o que justificaria a perda da audição nesses pacientes. Roosli et al (14) estudaram 32 ossos temporais de pacientes com SV e utilizaram o lado contralateral como controle. Houve uma maior perda de células ciliadas internas (75% dos espécimes), células ciliadas externas (88%), neurônios do gânglio espiral (85%) e uma maior quantidade de precipitado protéico na orelha interna do lado ipsilateral ao tumor.

As secreções dos SVs podem ser um mecanismo alternativo e complementar para a compressão mecânica do nervo coclear como explicação para a perda de audição provocada pelo SV. Os componentes neurotóxicos e ototóxicos do secretoma do SV poderiam alcançar a cóclea através do fundo do conduto auditivo interno e assim afetar as funções cocleares. O interesse pelo secretoma dos SVs é motivado por observações clínicas que não podem ser explicadas simplesmente pela compressão do nervo coclear. Alguns pacientes podem apresentar um PEATE

normal e a ausência de OEA na presença de perda auditiva documentada, indicando a possibilidade de um dano puramente coclear pelo SV.(81,82) Outros pacientes apresentam uma deterioração auditiva ao longo de anos após serem submetidos à radioterapia ou à ressecção parcial do tumor. Acredita-se que o SV residual permaneceria liberando citocinas ou outras substâncias que alterariam a homeostase coclear e ocasionaria danos as células ciliadas e as neurônios do gânglio espiral.(84) Além disso, foi observado que o nível total de proteínas no fluido coclear de pacientes com SV é 5 a 15 vezes maior que em indivíduos saudáveis.(130,131) Lysaght et al (78) comprovaram que o proteoma do fluido coclear é diferentes em pacientes com SV comparados com indivíduos livres de tumor, identificando proteínas presentes apenas na perilinfa dos indivíduos com SV. Com a descoberta do conteúdo das vesículas extracelulares e da sua função na transmissão de informações, elas poderiam ser esse “fator” secretado pelo tumor que poderia alcançar a cóclea e ocasionar o dano coclear observado nos estudos envolvendo ossos temporais.

No presente momento, não existe modelos animais adequados para confirmar se as vesículas extracelulares secretadas pelo tumor poderiam atingir a cóclea, uma vez que os schwannomas induzidos em modelos animais são encontrados em outros pares cranianos exceto no nervo vestibular.(3) Dessa forma, optou-se pela cultura *ex-vivo* de cóclea de camundongos. Apesar de não se provar que as vesículas secretadas pelo tumor possam atingir a cóclea através do conduto auditivo interno ou por via hematogênica, foi comprovado que as vesículas extracelulares são capazes de provocar danos nas células cocleares, especialmente os neurônios do gânglio espiral. Não só houve redução no número de fibras e de corpos celulares como também foi encontrado uma redução de área do corpo celular. O dano foi observado tanto na adição direta das VEs nas culturas quanto em um sistema de co-culturas com a presença de células no compartimento superior. Observou-se que quanto maior o número de células maior foi o dano nos neurônios. Mahmud et al (74) não encontraram correlação entre os limiares auditivos e o tamanho ou o volume tumoral, entretanto quando compararam a contagem de neurônios do gânglio espiral e o tamanho ou volume tumoral houve significância estatística. Assim, tumores maiores apresentam uma população reduzida de NGE. Acredita-se que quanto maior o tumor, maior o número de células e conseqüentemente uma maior quantidade de citocinas e/ou vesículas poderiam ser liberadas e assim provocar um

dano coclear mais expressivo. Além disso, observou-se que o dano celular poderia ser prevenido com a adição de heparina que promove a agregação das vesículas impedindo sua internalização. A heparina tem sido importante no estudo das funções da VEs e no desenvolvimento de terapias em doenças em que as VEs estão relacionadas com a patogênese.(93)

Schwannomas vestibulares que causam perda da audição possuem uma carga genética diferente daqueles que não provocam perda da audição. Estudos de microarranjo com cDNA com SV estratificados pelos limiares auditivos reportaram uma diferença na expressão genética entre os SVs que causam e os que não causam perda auditiva. Stankovic et al (18) identificou quadro possíveis genes que podem estar associados a PA foram: *PEX5L*, *RAD54B*, *PSMAL* e *CEA*. Lassaletta et al (132), utilizando também um ensaio de microarranjo com cDNA, reportaram a expressão de fator de crescimento derivado de plaquetas – um gene inversamente correlacionado com PANS em pacientes com SV. Sonam et al (133) reportaram que SV associado com BA secreta elevados níveis de fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 quando comparados com SV associados com PA, independente do tamanho tumoral; enquanto que a maior secreção de fator de necrose tumoral se correlaciona com PA. A aparente intrínseca diferença genética em tumores que causam ou não perda auditiva podem provavelmente se refletir em VEs derivadas desses tumores, desde que VEs podem concentrar uma carga genética específica da sua célula de origem.(86,134) É provável que não só as vesículas quanto as secreções solúveis produzidas por SV modulem a função coclear. Vesículas provenientes de tumores de pacientes com perda de audição poderiam conter uma carga genética diferente e ocasionar danos semelhantes aos encontrados em ossos temporais. Ao introduzir essas vesículas em culturas de cócleas observou-se uma redução no número de fibras e de corpos celulares nas cócleas tratadas com vesículas de pacientes com perda de audição. Além disso, as vesículas oriundas de pacientes com perda de audição foram capazes de induzir apoptose em neurônios do gânglio espiral.

Este estudo estimula futuros trabalhos com objetivo de identificar fatores específicos presentes nessas VEs e responsáveis pelos danos às células cocleares. Análises de identificação como o sequenciamento de “nova geração” de microRNA e proteômica das VEs derivadas de SVs poderiam elucidar as vias moleculares que ocasionam a perda de audição nesses pacientes, identificando possíveis alvos

terapêuticos e prognósticos necessários na prevenção e tratamento da perda auditiva ocasionada pelo SVs.(134)

7 CONCLUSÃO

Este estudo identificou o papel das vesículas extracelulares na fisiopatologia da perda auditiva ocasionada pelo schwannoma vestibular. Comprovou-se que as vesículas extracelulares produzidas pelo SV eram enriquecidas com RNA, incluindo microRNA. As células cocleares, em especial os NGEs, foram capazes de internalizar e expressar o conteúdo de RNA presente nessas vesículas. Quando as VEs foram adicionadas diretamente em culturas de cócleas de camundongos, essas VEs foram capazes de provocar danos nos neurônios do gânglio espiral. As células ciliadas também foram vulneráveis, especialmente quando as vesículas extracelulares eram secretadas por células HEI-193 em co-cultura. Descobriu-se, também, que as VEs secretadas por SVs associados com perda de audição, mas não as VEs secretadas por SV associados com boa audição, produziram danos nos NGE. Identificou-se assim um novo e potencial mecanismo de perda auditiva em pacientes com SV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andaloussi SE, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(5):347-57.
2. Valadi H, Ekstoröm K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):654-9.
3. Mizrak A, Bolukbasi MF, Ozdener GB, Brenner GJ, Madlener S, Erkan EP, et al. Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth. *Mol Ther* 2013;21(1):101-8.
4. Skog J, Würdinger T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470-6.
5. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 2013;113(1):1-11.
6. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Rev Immunol* 2014;14(3):195-208.
7. Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers Dement* 2015 Jun;11(6):600-7.
8. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* 2014;28(4):970-3.

9. Mahaley MS Jr, Mettlin C, Natarajan N, Laws ER Jr, Peace BB. Analysis of patterns of care of brain tumor patients in the United States: A study of the brain tumor section of the AANS and the CNS and the commission on cancer of the ACS. *Clin Neurosurg* 1990;36:347-52.
10. Neff BA, Welling DB, Akhmametyeva E, Chan LS. The molecular biology of vestibular schwannomas: dissecting the pathogenic process at the molecular level. *Otol Neurotol* 2006;27(2):197-208.
11. Rouleau GA, Wertelecki W, Haines JL, Hobbs WJ, Trofatter JA, Seizinger BR, et al. Genetic linkage analysis of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 1987 Sep 17-23;329(6136):246-8.
12. Matthies C, Samii M. Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): clinical presentation. *Neurosurg* 1997;40(1):1-9.
13. Lee JD, Lee BD, Hwang SC. Vestibular schwannoma in patients with sudden sensorineural hearing loss. *Skull Base* 2011;21(2):75-8.
14. Roosli C, Linthicum FH Jr, Cureoglu S, Merchant SN. Dysfunction of the cochlea contributing to hearing loss in acoustic neuromas: an underappreciated entity. *Otol Neurotol* 2012;33(3):473-80.
15. Nadol JB Jr, Diamond PF, Thornton AR. Correlation of hearing loss and radiologic dimensions of vestibular schwannomas (acoustic neuromas). *Am J Otol* 1996;17(2):312-6.
16. Caye-Thomasen P, Dethloff T, Hansen S, Stangerup SE, Thomsen J. Hearing in patients with intracanalicular vestibular schwannomas. *Audiol Neurootol* 2007;12(1):1-12.
17. Asthagiri AR, Vasquez RA, Butman JA, Wu T, Morgan K, Brewer CC, et al. Mechanisms of hearing loss in neurofibromatosis type 2. *PLoS One* 2012;7(9):e46132.

18. Stankovic KM, Mrugala MM, Martuza RL, Silver M, Betensky RA, Nadol JB Jr, et al. Genetic determinants of hearing loss associated with vestibular schwannomas. *Otol Neurotol* 2009 Aug;30(5):661-7.
19. Murray M, Stout AP. Schwann cell versus fibroblast as origin of specific nerve sheath tumor, observations about normal nerve sheaths and neurilemmomas in vitro. *Am J Pathol* 1940;16:41-60.
20. Stewart TJ, Schuknecht HF. Occult schwannomas of the vestibular nerve. *Arch Otolaryngol* 1975;101:91-5
21. Roosli C, Linthicum FH Jr, Cureoglu S, Merchant SN. What is the site of origin of cochleovestibular schwannomas? *Audiol Neuroto* 2012;17:121-5.
22. Ferragut JM, Caldeira EJ, Minatel E, Randi BA, Lourenç EA. Avaliação anatômica do diâmetro do poro acústico interno e suas correlações clínicas. *Perspectivas Médicas* 2008;19:1916-18.
23. Tew J, Warnick R, Andaluz N. Mayfield Clinic, University of Cincinnati, Department of Neurosurgery, Ohio. Acesso em 28 de setembro de 2016. <http://www.mayfieldclinic.com/PE-Acoustic.htm>.
24. Eldridge R, Parry D. Vestibular schwannoma (acoustic neuroma). Consensus development conference. *Neurosurgery* 1992;30(6):962-4.
25. Khrais T, Romano G, Sanna M. Nerve origin of vestibular schwannoma: a prospective study. *J Laryngol Otol* 2008;122(2):128-31.
26. Jacob A, Robinson LL Jr, Bortman JS, Yu L, Dodson EE, Welling DB. Nerve of origin, tumor size, hearing preservation, and facial nerve outcomes in 359 vestibular schwannoma resections at a tertiary care academic center. *Laryngoscope* 2007;117:2087-92

27. Howitz MF, Johansen C, Tos M, charabi S, Olsen JH. Incidence of vestibular schwannoma in Denmark, 1977-1995. *Am J Otol* 2000;21:690-4.
28. Nair S, Baldawa SS, Gopalakrishnan CV, Menon G, Vikas V, Sudhir JB. Surgical outcome in cystic vestibular schwannomas. *Asian J Neurosurg* 2016;11(3):219-25.
29. Guttmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of NF1 and NF2. *JAMA* 1997 Jul;278:51-7.
30. Hoa M, Slattery III WH. Neurofibromatosis 2. *Otolaryngol Clin N Am* 2012;45:315-32.
31. Evans DG, Howard E, Giblin C, Clancy T, Spencer H, Huson SM, et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK Family genetic register service. *Am J Med Genet A* 2010 Feb;152A(2):327-32.
32. MacCollin M, Chiocca EA, Evans DG, Friedman JM, Horvitz R, Jaramillo D, et al. Diagnostic criteria for schwannomatosis. *Neurology* 2005;64(11):1838-45.
33. Vilela S, Cotta AC, Paim JF, Champs APS, Navarro M, Rossi D, et al. Schwannomatose – primeiros casos relatados no Brasil. *Rev Med Minas Gerais* 2013;23(4):462-6.
34. Welling DB, Guida M, Goll F, Pearl DK, Glasscock ME, Pappas DG, et al. Mutational spectrums in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic and familial schwannomas. *Hum Genet* 1996;98:189-93.
35. Mérel P, Hoang-Xuan K, Sanson M, Moreau-Aubry A, Bijlsma EK, Lazaro C, et al. Predominant occurrence of somatic mutations of the NF2 gene in meningiomas and schwannomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995 Jul;13(3):211-6.

36. Petrilli AM, Fernández-Valle C. Role of merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene* 2016 Feb;35(5):537-48.
37. Troffater JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry Dm, et al. A novel moesin-, exrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 1993 Mar;72(5):791-800.
38. Pecina-Slaus N. Merlin, the NF2 gene product. *Pathol Oncol Res* 2013;19:365-73.
39. Lutchman M, Rouleau GA. The neurofibromatosis type 2 gene product, schwannomin, suppresses growth of NIH 3t3 cells. *Cancer Res* 1995;55:2270-4.
40. Tikoo A, Varga M, Ramesh V, Gusella J, Maruta H. An anti-Ras function of neurofibromatosis type 2 gene product (NF2/Merlin). *J Biol Chem* 1994 Sep;269(38):23387-90.
41. Stangerup SE, Caye-Thomasen P. Epidemiology and natural history of VS, *Otolaryngol Clin N Am* 2012;45:257-68.
42. Kshetry VR, Hsieh JK, Ostrom QT, Kruchko C, Bernholtz-Sloan JS. Incidence of vestibular schwannomas in the United States. *J Neurooncol* 2015;124:223-8.
43. Stepanidis K, Kessel M, Caye-Thomasen P, Stangerup SE. Socio-demographic distribution of vestibular schwannomas in Denmark. *Acta Oto-laryngol* 2014;134:551-6.
44. Jeyakumar A, Seth R, Brickman TM, Dutcher P. The prevalence and clinical course of patients with incidental acoustic neuromas. *Acta Oto-laryngol* 2007;127:1051-7.
45. Carlson ML, Lees KA, Patel NS, Lohse CM, Neff BA, Link MJ, et al. The clinical behavior of asymptomatic incidental vestibular schwannomas is similar to that of symptomatic tumors. *Otol Neurotol* 2016 Oct;37(9):1435-41.

46. Selesnick SH, Jackler RK, Pitts LW. The changing clinical presentations of acoustic tumors in the MRI era. *Laryngoscope* 1993;103(4 Pt 1): 431-6.
47. DeLong M, Kaylie D, Kranz PG, Adamson DC. Vestibular schwannomas: Lesson for the neurosurgean. Part I: diagnosis, neuroimaging and audiology. *Contemporary Neurosurgery*. 2011;33(20):1-6.
48. Selesnick SH, Jackler RK. Clinical manifestations and audiologic diagnosis of acoustic neuromas. *Otolaryngol Clin North Am* 1992;25(3):364-70.
49. Roland PS, Glasscock ME 3rd, Bojrab DI, Josey AF. Normal hearing in patients with acoustic neuroma. *South Med J* 1987 Feb;80(2):166-9.
50. Lustig LR, Rifkin S, Jackler RK, Pitts LH. Acoustic neuromas presenting with normal or symmetrical hearing: factors associated with diagnosis and outcome. *Am J Otol* 1998 Mar;19(2):212-8.
51. Edwards CH, Paterson JH. A review of the symptoms and signs of acoustic neurofibromata. *Brain* 1951;74(2):144-90.
52. Stucken EZ, Brown K, Selesnick SH. Clinical and diagnostic evaluation of acoustic neuromas. *Otolaryngol Clin North Am* 2012;45:269-84.
53. Harner SG, Laws ER Jr. Diagnosis of acoustic neurinoma. *Neurosurgery* 1981;9(4):373-9.
54. Cushing H. Tumors of the nervus acusticus and the syndrome of the cerebello-pontine angle. Philadelphia: WB Saunders; 1917.
55. Munhoz MSL, Caovilha HH, Garcia da Silva ML, Ganança MM. *Audiologia Clinica. Série Audiológica*. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 85-101.

56. Hardy DG, Baguley DM. Strategy and benefits of acoustic neuroma searching. *J Laryngol Otol* 1989;103(1):51-9.
57. Schmidt RJ, Sataloff RT, Newman J, Spiegel JR, Myers DL. The sensitivity of auditory brainstem response testing for the diagnosis of acoustic neuromas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001 Jan;127(1):19-22.
58. Zappia JJ, O'Connor CA, Wiet RJ, Dinces EA. Rethinking the use of auditory brainstem response in acoustic neuroma screening. *Laryngoscope* 1997 Oct;107(10):1388-92.
59. Press GA, Hesselink JR. MR imaging of cerebellopontine angle and internal auditory canal lesions at 1.5t. *AJR Am J Roentgenol* 1988;150(6):1371-81.
60. Paldor I, Chen AS, Kaye AH. Growth rate of vestibular schwannoma. *J Clin Neurosci* 2016;32:1-8.
61. Huang X, Caye-Thomasen P, Stangerup SE. Spontaneous tumour shrinkage in 1261 observed patients with sporadic vestibular schwannoma. *J Laryngol Otol* 2013;127(8):739-43.
62. Kanzaki J, Tos M, Sanna M, Moffat DA, Monsell EM, Berliner KI. New and modified reporting systems from the consensus meeting on systems for reporting results in vestibular schwannoma. *Otol Neurotol* 2003 Jul;24(4):642-8.
63. Bakkouri WE, Kania RE, Guichard JP, Lot G, Herman P, Huy PT. Conservative management of 386 cases of unilateral vestibular schwannoma: tumor growth and consequences for treatment. *J Neurosurg* 2009 Apr;110(4):662-9.
64. Godefroy WP, Kaptein AA, Vogel JJ, Van der Mey AG. Conservative treatment of vestibular schwannoma: a follow-up study on clinical and quality-of-life outcome. *Otol Neurotol* 2009 Oct;30(7):968-74.

65. Malhotra PS, Sharma P, Fishman MA, Grumbine FL, Tholey R, Dam VQ, et al. Clinical, radiographic, and audiometric predictors in conservative management of vestibular schwannoma. *Otol Neurotol* 2009 Jun;30(4):507-14.
66. Stangerup SE, Caye-Thomasen P, Tos M, Thomsen J. Change in hearing during 'wait and scan' management of patients with vestibular schwannoma. *J Laryngol Otol* 2008 Jul;122(7):673-81.
67. Samii M, Matthies C. Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): hearing function in 1000 tumor resections. *Neurosurgery* 1997;40(2):248-60.
68. Glasscock ME 3rd, Hays JW, Minor LB, Haynes DS, Carrasco VN. Preservation of hearing in surgery for acoustic neuromas. *J Neurosurg* 1993 Jun;78(6):864-70.
69. Angeli S. Middle fossa approach: indications, technique, and results. *Otolaryngol Clin N Am* 2012;45:417-38.
70. Elhammady MS, Telischi FF, Morcos JJ. Retrosigmoid approach: indications, techniques, and results. *Otolaryngol Clin N Am* 2012;45:375-97.
71. Arriaga MA, Lin J. Translabyrinthine approach: indications, techniques, and results. *Otolaryngol Clin N Am* 2012;45:399-415.
72. Sheth SA, Kwon CS, Barker II FG. The art of management decision making: from intuition to evidence-based medicine. *Otolaryngol Clin N Am* 2012;45:333-51.
73. Hasegawa T, Fujitani S, Kaysumata S, Kita Y, Yoshimoto M, Koike J. Stereotatic radiosurgery for vestibular schwannomas: analysis of 317 patients more than 5 years. *Neurosurgery* 2005 Aug;57(2):257-65.
74. Mahmud MR, Khan AM, Nadol JB Jr. Histopathology of the inner ear in unoperated acoustic neuroma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112:979-86.

75. Eckermeier L, Pirsig W, Mueller D. Histopathology of 30 non-operated acoustic schwannomas. *Arch Otorhinolaryngol* 1979;222:1-9.
76. Suga F, Lindsay JR. Inner ear degeneration in acoustic neurinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976;85:343-58.
77. Silverstein H. Inner ear fluid proteins in acoustic neuroma, Meniere's disease and otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1971;80:27-35.
78. Lysaght AC, Kao SY, Paulo JA, Merchant SN, Steen H, Stankovic KM. Proteome of human perilymph. *J Proteome Res* 2011 Sep;10(9):3845-51.
79. Palva T, Raunio V. Cerebrospinal fluid and acoustic neuroma specific proteins in perilymph. *Acta Otolaryngol* 1982;93:201-3.
80. Welling DB, Lasak JM, Akhmametyeva E, Ghaheri B, Chang LS. cDNA microarray analysis of vestibular schwannomas. *Otol Neurotol* 2002;23:736-48.
81. Telischi FF, Roth J, Stagner BB, Lonsbury-Martin BL, Balkany TJ. Patterns of evoked otoacoustic emissions associated with acoustic neuromas. *Laryngoscope* 1995 Jul;105(7 Pt 1):675-82.
82. Murofushi T, Takehisa M. Vestibular schwannoma with absent vestibular evoked myogenic potentials to clicks but normal ABR, caloric responses and vestibular evoked myogenic potentials to 500 Hz tone bursts. *Acta Otolaryngol* 2010;130:525-8.
83. Adams JC. Clinical implications of inflammatory cytokines in the cochlea: a technical note. *Otol Neurotol* 2002;23:316-22.
84. Roos DE, Potter AE, Brophy BP. Stereotactic radiosurgery for acoustic neuromas: what happens long term? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;82(4):1352-5.

85. Gonda DD, Akers JC, Kim R, Kalkanis SN, Hochberg FH, Chen C, Carter BS. Neuro-oncologic applications of exosomes microvesicles, and other nano-sized extracellular particles. *Neurosurgery* 2013;72:501-10.
86. Chen C, Skog J, Hsu CH, Lessard RT, Balaj L, Wurdinger T, et al. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip* 2010;10(4):505-11.
87. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(7):940-8.
88. Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Malmhäll C, Bossios A, Eldh M, et al. Characterization of mRNA and microRNA in human mast cell-derived exosomes and their transfer to other mast cells and blood CD34 progenitor cells. *J Extracell Vesicles* 2012 Apr;1.
89. Piper RC, Katzmann DJ. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu. Rev Cell Dev Biol* 2007;23:519-47
90. Marthivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles importante in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73:1907-20.
91. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gerber P, Gehr P, Nicod LP. Active uptake of dendritic cell-derived exovesicles by epithelial cells induces the release of inflammatory mediators through a TNF- α -mediated pathway. *Am J Pathol* 2009;175(2):696-705.
92. Wang G, Dinkins M, He Q, Zhu G, Poirier C, Campbell A, et al. Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide and prostate apoptosis response 4 (PAR-4). *J Bio Chem* 2012;287(25):21384-95.
93. Atai NA, Balaj L, Van Veen H, Breakefield XO, Jarzyna PA, Van Noorden CJF, et al. Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *J Neurooncol* 2013;115(3):343-51.

94. Dilwali S, Landegger LD, Soares VY, Deschler DG, Stankovic KM. Secreted factors from human vestibular schwannomas can cause cochlear damage. *Sci Rep* 2015;5:185-99.
95. Cheng G. Circulating miRNAs: role in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2015 Jan;81:75-93.
96. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004;116(2):281-97.
97. Erkan EP, Breakefield XO, Saydam O. miRNA signature of schwannomas: Possible role(s) of "tumor suppressor" miRNAs in benign tumors. *Oncotarget* 2011 Mar;2(3):265-70.
98. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, De Bruijn E, et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 2005;309:310-1.
99. Sivakumaran TA, Resendes BL, Robertson NG, Giersch AB, Morton CC. Characterization of an abundant COL9A1 transcript in the cochlea with a novel 3'UTR: expression studies and detection of miRNA target sequence. *J Assoc Res Otolaryngol* 2006;7:160-72.
100. Patel M, Hu BH. MicroRNAs in inner ear biology and pathogenesis. *Hear Res* 2012;287:6-14.
101. Cioffi JA, Yue WY, Mendolia-Loffredo S, Hansen KR, Wackym PA, Hansen MR. MicroRNA-21 overexpression contributes to vestibular schwannoma cell proliferation and survival. *Otol Neurotol* 2010;31:1455-62.
102. Friedland DR, Eernisse R, Erbe C, Gupta N, Cioffi JA. Cholesteatoma growth and proliferation: posttranscriptional regulation by microRNA-21. *Otol Neurotol* 2009;30:998-1005.

103. Song JJ, Kwon SK, Cho CG, Park SW, Chae SW. Microarray analysis of microRNA expression in LPS induced inflammation of human middle ear epithelial cells (HMEECs). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011;75:648-51.
104. Rudnicki A, Auraham KB. MicroRNAs: the art of silencing in the ear. *EMBO Mol Med* 2012;4:849-59.
105. Saydam O, Senol O, Würdinger T, Mizrak A, Ozdener GB, Stemmer-Rachamimov AO, et al. miRNA-7 attenuation in Schwannoma tumors stimulates growth by upregulating three oncogenic signaling pathways. *Cancer Res* 2011;71(3):852-61.
106. Bandres E, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, et al. MicroRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009 Apr;15(7):2281-90.
107. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, et al. c-Myc suppression of miR23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 2009 Apr;458(7239):762-5.
108. Pekersky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 2006 Dec;66(24):11590-3.
109. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Oct;104(40):15805-10.
110. Hung G, Li X, Faudoa R, Xeu Z, Kluwe L, Rhim JS, et al. Establishment and characterization of a schwannoma cell line from a patient with neurofibromatosis 2. *Int J Oncol*. 2002 Mar;20(3):475-82.

111. Dilwali S, Patel PB, Roberts DS, Basinsky GM, Harris GJ, Emerick KS, et al. Primary culture of human Schwann and schwannoma cells: improved and simplified protocol. *Hear Res* 2014 Sep;315:25-33.
112. Kao SY, Kempfle JS, Jensen JB, Perez-Fernandez D, Lysaght AC, Edge AS, et al. Loss of osteoprotegerin expression in the inner ear causes degeneration of the cochlear nerve and sensorineural hearing loss. *Neurobiol Dis.* 2013 Aug;56:25-33.
113. Parker M, Brugeaud A, Edge AS. Primary culture and plasmid electroporation of the murine organ of Corti. *J Vis Exp* 2010;36:e1685.
114. Haque KD, Pandey AK, Kelley MW, Puligilla C. Culture of embryonic mouse cochlear explants and gene transfer by electroporation. *J Vis Exp* 2015;95:e52260.
115. Committee on hearing and equilibrium guidelines for the evaluation of hearing preservation in acoustic neuroma (vestibular schwannoma): committee on hearing and equilibrium. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:179-80.
116. Wei L, Ding D, Salvi R. Salicylate-induced degeneration of cochlea spiral ganglion neurons-apoptosis signaling. *Neuroscience* 2010;168(1):288-99.
117. Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
118. Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol* 2013;11(7):e1001604.
119. Bastos-Amador P, Pérez-Cabezas B, Izquierdo-Useros N, Puertas MC, Martinez-Picado J, Pujol-Borrel R, et al. Capture of cell-derived microvesicles (exosomes and apoptotic bodies) by human plasmacytoid dendritic cells. *J Leukocyte Biol* 2012 May;91:751-8.

120. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, Van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(14):6328-33.
121. Chiba M, Kimura M, Asari S. Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human Hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines. *Oncol Reports* 2012;58:1551-8.
122. Karlsson T, Lundholm A, Persson E. Tumor Cell-Derived Exosomes from the Prostate Cancer Cell Line TRAMP-C1 Impair Osteoclast Formation and Differentiation. *PLoS One* 2016 Nov;11(11):e0166284.
123. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008 Jul;110(1):13-21.
124. Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 2011 Jan;9:1-9.
125. Noerholm M, Balaj L, Limperg T, Salehi A, Zhu LD, Hochberg FH. RNA expression. Patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and controls. *BMC Cancer* 2012;12:1-11.
126. Asea A, Jean-Pierre C, Kaur P, Rao P, Linhares IM, Skupski D, et al. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol.* 2008 Oct;79(1):12-7.
127. Zaborowski JP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular vesicles: Composition, biological relevance and methods of study. *BioScience* 2015;65:783-94.

128. Arriaga MA, Long S, Nelson R. Clinical correlates of acoustic neuromas volumes. *Am J Otol* 1993 Sep;14(5):465-8.
129. Bento RF, Pinna MH, Brito Neto RV. Vestibular schwannoma: 825 cases from a 25-year experience. *Int Arch Otorhinolaryngol* 2012;16(4):466-75.
130. Silverstein H. A rapid protein test for acoustic neurinoma. *Arch Otolaryngol* 1972;95(3):202-4.
131. Silverstein H. Labyrinthine tap as a diagnostic test for acoustic neurinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 1973;6(1):229-44.
132. Lassaletta L, Martinez-Glez V, Torres-Martin M, Rey JA, Gavilán J. cDNA microarray expression profile in vestibular schwannoma: correlation with clinical and radiological features. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;194(2):125-7.
133. Dilwali S, Lysaght A, Roberts D, Barker FG 2nd, McKenna MJ, Stankovic KM. Sporadic vestibular schwannomas associated with good hearing secrete higher levels of fibroblast growth factor 2 than those associated with poor hearing irrespective of tumor size. *Otol Neurotol* 2013 Jun;34(4):748-54.
134. Jenjaroenpun P, Kremenska Y, Nair VM, Kremenskoy M, Joseph B, Kurochkin IV. Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. *PeerJ* 2013 Nov;5(1):e201.

APÊNDICE

APÊNDICE: O concentrado sobrenadante de células HEI-193 pode causar danos nas células ciliadas, enquanto as VEs podem causar danos em fibras neurais e NGEs.

De acordo com o exposto no subcapítulo 5.6, o dano as CCs pode ser devido a outros fatores tóxicos presentes no sobrenadante do meio de culturas das células HEI-193, tais como proteínas secretadas. O dano a essas células ciliadas é menos aparente quando apenas VEs purificadas são aplicadas. Para testar o feito do sobrenadante sobre as cultura de cócleas de camundongos, utilizou o sobrenadante concentrado após a ultracentrifugação para isolamento de VEs do subcapítulo 4.2.2. O sobrenadante foi coletado em um filtro (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit com membrana Ultracel-10, EMD Millipore) e centrifugada por 20min a 4°C a 4000g. Esse sobrenadante concentrado foi utilizado no experimento da figura 20.

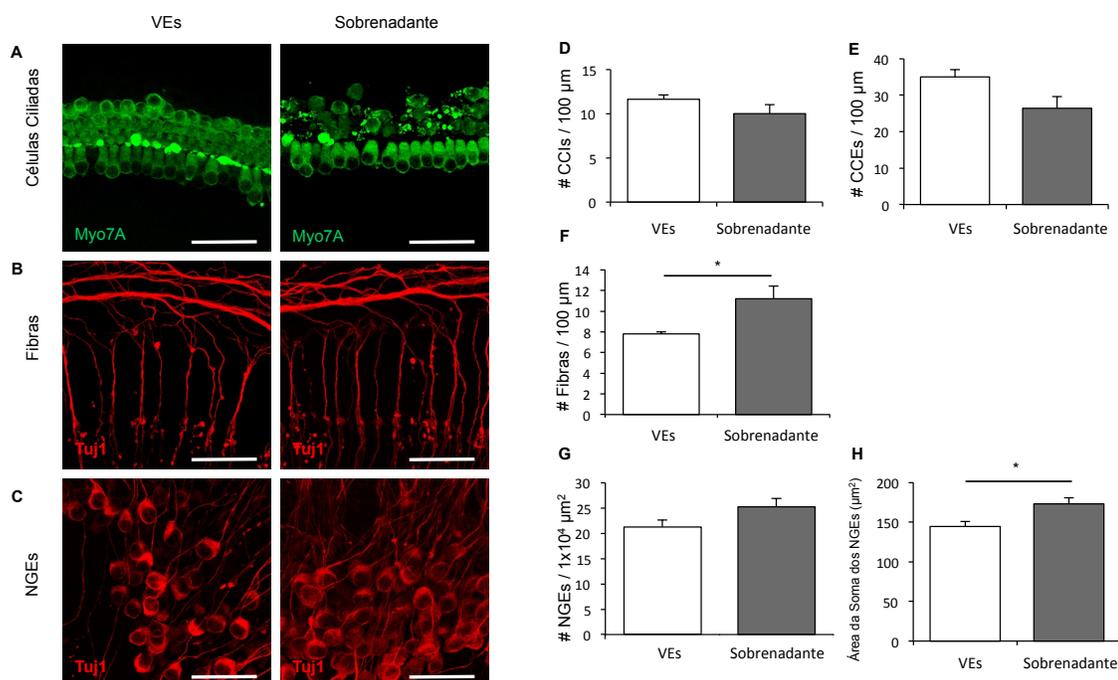


Figura 20 – O concentrado sobrenadante de células HEI-193 pode causar danos nas CCs, enquanto as VEs podem causar danos em fibras neurais e NGEs. Imagens representativas de células ciliadas (A) (única fila de CCIs e três filas de CCEs), fibras neurais (B) e NGEs (C), expostos a VEs derivados de células HEI-193 (6 μ l) ou sobrenadante concentrado de meios de cultura condicionados (6 μ L). O número de células foi quantificado para (D) CCIs por 100 μ m, (E) CCEs por 100 μ m, neurites (F) por 100 μ m, (G) NGEs por $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ e área (H) da soma dos NGEs para o grupo tratados com VEs e o grupo tratado com o sobrenadante (média \pm SEM, n=5 cócleas de diferentes animais para cada grupo, * $p < 0,05$). Escala: 50 μ m (A, B, C).

ANEXOS

ANEXO A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

(Baseado no miRNeasy mini kit manual – Protocolo para a purificação de RNA total, incluído pequenos RNAs)

Preparo das Células

1. As células HEI-193 foram tripsinizadas para descolamento da monocamada, e contadas com auxílio de uma câmara de Neubauer (New Optik). A solução com meio de cultura e células suspensas (1×10^6 células) foi centrifugada a $3.000g$ por 5 minutos para a obtenção do pellet.

Preparo das Vesículas Extracelulares

2. O pellet obtido com a ultracentrifugação de meio de cultura rico em vesículas extracelulares foi inicialmente tratado com 4 μ l de rDNase I (Ambion) e 8 μ l de SUPERase In™ (20 U/ μ l) (Ambion).

Etapa Comum

3. Adicionou-se 700 μ l de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) ao pellet obtido nas etapas anteriores. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e deixada em repouso em temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos;
4. Adicionou-se 140 μ l de clorofórmio no tubo contendo o homogenado e agitou-se o tubo vigorosamente por 15 segundos. Em seguida, deixou-se o tubo repousar em temperatura ambiente por 3 minutos;
5. A mistura foi centrifugada por 15 minutos, $12.000g$, a 4°C. Após a centrifugação, a mistura era dividida em três fases: uma superior, fase aquosa contendo o RNA; uma intermediária, de coloração branca; e uma inferior, de coloração avermelhada, a fase orgânica.
6. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo do tipo Eppendorf de 1,5 ml. Adicionou-se 1,5 volumes de etanol 100% e homogeneizou-se várias vezes com o auxílio de uma pipeta;

7. Pipetou-se 700 μ l da amostra para uma mini coluna RNeasy acoplada a um tubo coletor de 2 ml (fornecidos pelo kit). Fechou-se a tampa da coluna gentilmente e centrifugou-se a 8.000g por 15 segundos em temperatura ambiente. O filtrado presente no tubo coletor após a centrifugação foi descartado;
8. Pipetou-se 700 μ l do tampão RWT para a mini coluna RNeasy. Fechou-se a tampa gentilmente da coluna e centrifugou-se a 8.000g por 15 segundos em temperatura ambiente para lavar a coluna. O filtrado presente no tubo coletor após a centrifugação foi descartado;
9. Pipetou-se 500 μ l do tampão RPE para a mini coluna RNeasy. Fechou-se a tampa gentilmente da coluna e centrifugou-se a 8.000g por 15 segundos em temperatura ambiente para lavar a coluna novamente. O filtrado presente no tubo coletor após a centrifugação foi descartado;
10. Pipetou-se 500 μ l do tampão RPE para a mini coluna RNeasy. Fechou-se a tampa gentilmente da coluna e centrifugou-se a 8.000g por 2 minutos em temperatura ambiente para secar a mini coluna RNeasy e eliminar resíduos de etanol.
11. A mini coluna RNeasy foi acoplada a um novo tubo coletor de 2 ml e centrifugada por 1 minuto em velocidade máxima;
12. Transferiu-se a mini coluna RNeasy para um novo tubo de 1,5 ml do tipo Eppendorf. Adicionou-se 30 μ l de água livre de nucleases (Ambion) diretamente na membrana e centrifugou-se a 8.000g por 1 minutos em temperatura ambiente;
13. O RNA purificado, presente da solução aquosa obtida no tubo de 1,5 ml, foi armazenado a -80°C até a sua utilização.

ANEXO B – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE MICRO RNA

(Baseado no miRNeasy mini kit manual – Protocolo para a purificação de micro RNA, excluindo grandes RNAs ≥ 200 nucleotídeos)

Preparo das Células

1. As células HEI-193 foram tripsinizadas para descolamento da monocamada, e contadas com auxílio de uma câmara de Neubauer (New Optik). A solução com meio de cultura e células suspensas (1×10^6 células) foi centrifugada a 3.000g por 5 minutos para a obtenção do pellet.

Preparo das Vesículas Extracelulares

2. O pellet obtido com a ultracentrifugação de meio de cultura rico em vesículas extracelulares foi inicialmente tratado com 4 μ l de rDNase I (Ambion) e 8 μ l de SUPERase In™ (20 U/ μ l) (Ambion).

Etapa Comum

3. Adicionou-se 700 μ l de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) ao pellet obtido nas etapas anteriores. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e deixada em repouso em temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos;
4. Adicionou-se 140 μ l de clorofórmio no tubo contendo o homogenado e agitou-se o tubo vigorosamente por 15 segundos. Em seguida, deixou-se o tubo repousar em temperatura ambiente por 3 minutos;
5. A mistura foi centrifugada por 15 minutos, 12.000g, a 4°C. Após, a centrifugação a mistura era dividida em três fases: uma superior, fase aquosa contendo o RNA; uma intermediária, de coloração branca; e uma inferior, de coloração avermelhada, a fase orgânica;
6. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo do tipo Eppendorf de 1,5 ml. Adicionou-se 1 volume de etanol 70% e homogeneizou-se com vórtex;

7. Pipetou-se 700 µl da amostra para uma mini coluna RNeasy acoplada a um tubo coletor de 2 ml (fornecidos pelo kit). Fechou-se a tampa da coluna gentilmente e centrifugou-se a 8.000g por 15 segundos em temperatura ambiente;
8. O filtrado presente no tubo coletor continha os microRNAs e foi transferido para um tubo de 1,5 ml do tipo Eppendorf. Adicionou-se 0,65 volumes de etanol 100% nesse filtrado e homogeneizou-se com vórtex;
14. Pipetou-se 700 µl da amostra para uma coluna RNeasy MinElute acoplada a um tubo coletor de 2 ml (fornecidos pelo kit). Fechou-se a tampa da coluna gentilmente e centrifugou-se a 8.000g por 15 segundos em temperatura ambiente. O novo filtrado formado no tubo coletor após a centrifugação foi descartado. Esse passo foi repetido até toda a amostra ter sido pipetada e filtrada pela coluna RNeasy MinElute.
9. Pipetou-se 700 µl do tampão RWT para a coluna RNeasy MinElute. Fechou-se a tampa gentilmente da coluna e centrifugou-se a 8.000g por 15 segundos em temperatura ambiente para lavar a coluna. O filtrado presente no tubo coletor após a centrifugação foi descartado;
10. Pipetou-se 500 µl do tampão RPE para a coluna RNeasy MinElute. Fechou-se a tampa gentilmente da coluna e centrifugou-se a 8.000g por 15 segundos em temperatura ambiente para lavar a coluna novamente. O filtrado presente no tubo coletor após a centrifugação foi descartado;
11. Pipetou-se 500 µl de etanol 80% para a coluna RNeasy MinElute. Fechou-se a tampa gentilmente da coluna e centrifugou-se a 8.000g por 2 minutos em temperatura ambiente para secar a coluna RNeasy MinElute e eliminar resíduos de etanol.
12. A coluna RNeasy MinElute foi acoplada a um novo tubo coletor de 2 ml e centrifugada por 5 minutos a 8.000g;
13. Transferiu-se a coluna RNeasy MinElute para um novo tubo de 1,5 ml do tipo Eppendorf. Adicionou-se 14 µl de água livre de nucleases (Ambion) diretamente na membrana e centrifugou-se a 8.000g por 1 minutos em temperatura ambiente;
14. O microRNA purificado, presente da solução aquosa obtida no tubo de 1,5 ml, foi armazenado a -80°C até a sua utilização.