RAFAEL CARDOSO CARVALHO

Anosmia: recuperação da função olfatória por terapia celular

São Paulo

2014

RAFAEL CARDOSO CARVALHO

Anosmia: recuperação da função olfatória por terapia celular

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3001
FMVZ

Carvalho, Rafael Cardoso
Anosmia: recuperação da função olfatória por terapia celular / Rafael Cardoso Carvalho. -
- 2014.
105 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino.

1. Anosmia. 2. Bulbectomia. 3. Gliose reativa. 4. Terapia celular. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CARVALHO, Rafael Cardoso

Título: Anosmia: recuperação da função olfatória por terapia celular

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Anosmia: recuperação da função olfatória por terapia celular", protocolado sob o nº 2319/2011, utilizando 25 (vinte e cinco) ratos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Anosmia: olfactory function recovery using cellular therapy", protocol number 2319/2011, utilizing 25 (twenty-five) rats, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Dedicatória

À minha filha, **Ana Luísa Baía Carvalho**, por quem procuro diariamente dar o meu melhor e fazer de tudo, possível e impossível para que o melhor da vida e das oportunidades cheguem a você. Com você minha filha, aprendi o que é amar incondicionalmente e como a vida realmente tem sentido e valor. Prometo fazer de tudo para compensar todos esses meses de distância e ausência. Vou fazer valer a pena cada segundo que estivermos um do lado do outro! Eu amo você demais! À você, minha princesinha, dedico todo o meu sucesso e todas as nossas vitórias!

Agradecimentos Especiais

Nunca alcançamos o sucesso e as conquistas em nossas vidas sem que existam pessoas iluminadas e divinamente especiais nos dando todo suporte necessário para que nossos passos cheguem mais longes e em patamares mais elevados. Existe o ditado, “por trás de um grande homem, sempre existe uma grande mulher”. Não que me considere um grande homem, mas por trás de mim existem duas mulheres gigantescas, as quais sem elas, não chegaria a lugar nenhum, e a elas agradecerei todos os dias da minha vida por tudo que fizeram para que eu pudesse conquistar essa vitória. A minha Esposa e minha Mãe...

À **Elissa Baía da Silva Carvalho**, minha esposa, que a cada dia que passa aprendo a admirar muito mais e ser mais grato a Deus por ter te colocado na minha vida. Sabe “Nega”, quando tomamos a decisão do doutorado, imaginei que seria difícil pra nós dois, mas não tanto. Embora tenhamos perdido e ganhado muitas coisas durante estes anos de distância, e você tenha ficado com a parte mais complicada e difícil deste período, a de cuidar e educar do nosso bem mais precioso, e ter tido que mudar sua vida para que isso fosse feito da melhor forma possível, sempre fostes pra mim como um porto seguro e uma rocha inabalável em todos os aspectos, em tudo. E não falo somente em conselhos, mas em compreensão, companheirismo, parceria, carinho e amor. Nega, você é especialmente única! Um exemplo como poucos de filha, mãe, mulher, amiga e profissional! Um espelho a ser observado! E por tudo isso te agradecerei todos os dias. Já te disse várias vezes, mas quero deixar registrado aqui, que de todas as conquistas e vitórias que já tive na vida você é extremamente responsável. Amo muito você! Obrigado Neginha!

À **Tânia Brasil Correa Cardoso**, minha mãe, que é o maior exemplo que existe nesse mundo de dignidade, força e caráter. Mãe, se todos os seres humanos tivessem o seu caráter, dignidade, e o coração tão amoroso e generoso como o seu, com certeza, o mundo seria um lugar mais bonito e mais gostoso de viver. Mãe, obrigado por todo o suporte que tu deste a minha família durante esse tempo todo. Obrigado por toda ajuda, apoio e dedicação que tu me das o tempo todo. Obrigado por sempre acreditar em mim, no meu potencial e me fazer ver muitas coisas que as vezes nem eu percebo, e com isso me fazer crescer e melhorar como ser humano. Obrigado por tudo que tu sempre fazes em prol das nossas vidas e nossas famílias. Somos abençoados por Deus, por você estar entre nós. Mãe, você é incrível! Obrigado meu bem por tudo! Te amo muito!

Agradecimentos Especiais

A minha irmã, **Camila Cardoso Carvalho Soares** e meu cunhado-irmão **Ênio Fernandes Aragão Soares**, pessoas tão importantes na minha vida hoje, que me alegro demais em saber que voltaremos a ter convívio diário com direto a muitos sorrisos, gargalhadas, conselhos, comilanças e desfrutes dos prazeres da vida adulta e da vida em família.... Além de que, a partir de agora poderemos executar nossos grandiosos planos de viagens “around the world”. Vocês são essenciais na minha vida em todos os aspectos! Obrigado por terem me ajudado nesse período. Muitas vezes vocês acabaram me ajudando tanto que vocês não têm ideia. Só o suporte com Ana Luísa e a mudança de rotina que vocês fizeram para ajudar com nossa princesinha, não tem preço e sempre serei grato. Toda mobilização e logística que vocês tiveram e fizeram para ajudar a suprir minha ausência, são impagáveis e eu agradecerei sempre a vocês por isso. Isso se reflete na forma como minha filha os amam e sorri todas as vezes que está próxima a vocês. Vocês me auxiliaram a ter uma boa parte da tranquilidade necessária para que eu pudesse avançar nesse doutoramento. Me orgulho muito de vocês. Me orgulho de fazer parte da vida de vocês e agradeço por vocês sempre me fazerem sentir importante! Amo vocês! Obrigado por tudo!

Agradecimentos

À profa. **Maria Angélica Miglino**, minha orientadora, primeiramente pela oportunidade e confiança. Sabe professora, o aprendizado foi grande e o crescimento pessoal e profissional também. Acreditar no potencial de trabalho e lutar pelo que se acredita estar certo, independentemente das circunstâncias, e até a forma de lidar com situações adversas e o “sanar” de problemas são ensinamentos que levarei comigo, ou seja, sempre estarei atrás de soluções e não de problemas. À senhora, meu respeito, admiração e agradecimento.

As professoras **Alana Lislea de Souza** e **Silvia Renata Gaido Cortopassi**, minhas amigas, eternas orientadoras. Agradeço a Deus diariamente por um dia ter colocado vocês duas na minha vida e além disso, não as terem tirado, fazendo com que nossas vidas sempre estejam entrelaçadas, hoje não só pela ciência ou profissão, mas por uma bonita e grande amizade e por um imenso carinho. Já havia falado isso anteriormente, mas vale sempre a pena ressaltar. Sou produto (embora imperfeito e inacabado) de vocês. Para mim, vocês duas serão sempre exemplos na minha vida. Mulheres fortes, decididas, competentes, justas, atenciosas e independentes que sempre tem algo a ensinar e agregar, além de sempre ter um olhar carinhoso e um ombro amigo para ajudar em qualquer circunstância. Obrigado pela contribuição grandiosa na minha formação, pela grande ajuda nesse trabalho de tese, quer que seja por conselhos voltados a parte de execução, obtenção de material ou até mesmo por uma palavra amiga nos momentos mais difíceis. Obrigado minhas “mãezinhas”. Amo vocês.

Aos professores **Paulo César Maiorka** e **Ana Lúcia Abreu Silva**, pela grande contribuição e ensinamentos transmitidos. A palavra gratidão é bem pequena perto da generosidade que vocês tiveram ao me auxiliarem, ensinarem e até me orientarem em parte desse experimento. O verdadeiro sentido da palavra “mestre” se encaixa perfeitamente no que vocês fizeram por mim durante a execução desse projeto. Fico extremamente envaidecido por ter sido ensinado por vocês dois! Percebi a grande generosidade de vocês todas vezes em que sentaram horas comigo e com toda paciência do mundo desvendaram os segredos da patologia que alavancaram parte desse projeto, sem esperar nada em troca, simplesmente pelo sentido amplo da palavra ensinamento. Levarei essa lição a todos os meus alunos e orientados futuros. Ser melhor, estudar mais, ser referência e transmitir conhecimentos ensinando não importa a quem. Obrigado meus amigos!

À professora **Patricia Beltrao Braga (Paty)** e a Dra. **Graciela Pignatari (Gra)**, primeiramente pela paciência, e em segundo lugar pelos ensinamentos valiosos e generosos. Quando eu iniciei essa etapa da minha vida, ainda muito imaturo a respeito da temática de células tronco, e ainda totalmente inexperiente (hoje estou melhorzinho), vocês, o tempo todo com gentileza e generosidade sempre me

socorreram e me fizeram entender, e até me direcionaram quando foi necessário. Me fizeram ter a curiosidade e vontade de estudar e aprender mais. Literalmente despertaram meu espírito científico acerca de toda essa temática, e sempre através de indagações pertinentes e interessantes dentro da ciência. Por toda generosidade na transmissão do conhecimento, por toda orientação que foi dada, por todo carinho e palavras de amizade e incentivo, e ainda, por toda ajuda que vocês me deram sempre, meu muito obrigado. Tem uma boa mão de vocês duas nesse trabalho! De Coração, muito obrigado.

Ao meu amigo **Marcio Nogueira Rodrigues (Marcito)**, um homem de temperamento forte, sem meias palavras, mas extremamente justo e parceiro. Marcito, um muito obrigado, é insignificante por tudo que eu teria que te agradecer e te falar de bom por tudo que aconteceu durante essa pós-graduação. Você além de ter sido um amigo leal, hoje é um exemplo de profissional, profissionalismo e competência no que tu fazes. Me orgulho muito de tê-lo como amigo e como colega de profissão agora, meu amigo Professor. Espero que tudo que vivemos de bom e ruim juntos aqui em São Paulo ou naquela Oceania, que ficou pequena para nós dois durante 3 meses, fiquem guardados na sua memória e no seu coração para sempre. Que todas aquelas “presepadas” internacionais em língua inglesa sempre te tragam bons sorrisos, como sorriamos de nós mesmos naquela Austrália. E que todo o trabalho dedicado que fizemos aqui e lá sejam sempre lembrados. Que toda experiência tenha se tornado aprendizado e que sempre façamos o nosso melhor. Amigo, obrigado por tudo! Saiba que você hoje tem um amigo no qual você poderá contar para tudo e em tudo, em qualquer situação.

À amiga minha **Erika Toledo da Fonseca (Tchê – Gaúcha)**, agora professora Federal com todo reconhecimento do mérito de competência e perseverança de qual me orgulho por ter feito parte da sua vida. Me lembro como se fosse hoje do dia em que você, durante aquele simpósio de pós-graduação perguntou: “mas de quem é esse trabalho?” E eu respondi: “de um tal de Fonseca e colaboradores” e você gentilmente e com aquele sorriso que faz o mundo ficar mais bonito falou: “prazer, eu sou a Fonseca e se você quiser guri, podemos sentar e eu tentar te ajudar”. A partir daquele momento em que eu estava totalmente perdido, comecei a ver as coisas se encaminharem por causa da sua preciosa ajuda e colaboração, pois não bastava ensinar, ajudou e ajudou muito, se propondo a fazer junto e orientar e doar seu tempo e conhecimento incondicionais para me ajudar a concluir esse experimento. Tchê, sem sua ajuda e a do Marcio, eu nunca conseguiria fazer esse trabalho com a perfeição que ele foi feito. Vocês são extremamente responsáveis pela conclusão do meu trabalho. Obrigado minha amiga! Tu és para mim um grande motivo de orgulho! E de muito orgulho e competência!

A amiga **Adriana Raquel Conceição (Drica)**, minha conterrânea, que quando chegou em São Paulo, na USP, se amedrontava com o tamanho de tudo que acontecia aqui, e hoje vejo que falta muito pouco para tudo caber na palma da sua mão, pois a cada dia que passa, vejo seu crescimento e

amadurecimento profissional e pessoal. Quando você chegou e a Alana me pediu para que eu tomasse conta de você, ela nunca imaginaria que você, nessa fase final de doutoramento, que você tomaria conta de mim. Drika, muito obrigado por toda ajuda, toda atenção e todo carinho. Você foi extremamente generosa e companheira na parte final de execução do meu experimento, onde doou seu tempo para me ajudar a fazer minhas coisas. Tu nunca terás ideia de como você foi amiga nesse meu final de doutorado. E eu tenho certeza que seu futuro profissional será brilhante. Ah e só para deixar registrado: daqui a pouco tempo eu que falarei e comentarei que as tuas aulas são ótimas! Escreve isso! Muito obrigado minha amiga! Que seu coração continue bonito e generoso para sempre!

Ao meu irmão **Renato Carvalho** e sua família, **Mayara Carvalho** e **Lara Carvalho**, por toda ajuda, incentivo e pelo carinho dispensados a mim durante esse doutorado. Obrigado pela torcida e pelas vibrações positivas. Obrigado também pelo carinho e ajuda dispensados a Ana Luísa. Obrigado! Que a vida de vocês fique mais repleta de felicidade com a chegada de Artur. Amo vocês!

Ao meu grande amigo-irmão, **André Luís da Silva Casas (Decão)**, minha amizade mais antiga em São Paulo, que tem um coração tão imenso e bondoso que não cabe dentro do peito. Decão, por muitas vezes nesse doutoramento, você demonstrou o verdadeiro sentido de ser amigo, da amizade. É impossível relembrar de todos os bons momentos que compartilhamos juntos nesses 11 anos de amizade. Quando retornei a São Paulo para o doutorado, você me acolheu novamente em sua casa, e me deu novamente de presente a estrutura familiar que nós nordestinos sempre sentimos falta quando estamos longe. Meu amigo, obrigado por todo incentivo, palavras maduras e conselhos, toda atenção, e toda irmandade que você me deu durante esse período. Você meu amigo, sempre será meu irmaozão e sempre será meu motivo de orgulho, tanto como profissional, como ser humano. Espero que agora nessa sua nova fase de “Federal” nossos caminhos acadêmicos se reencontrem e nossas vidas voltem a cursar caminhos parecidos, pois será extremamente valioso voltar a conviver com você e trabalhar contigo!

Ao amigo **André Luis Francioli (Feioso)**, por toda amizade e companheirismo que você teve durante esses longos anos de convivência. Vivemos experiências acadêmicas, profissionais e pessoais que irei guardar para sempre na minha memória e no meu coração. Muitas das vezes quando as coisas estavam nebulosas e até tortuosas, você foi meu amigo que sempre chorou do meu lado e sempre tinha uma palavra atenciosa. Feioso, você é alguém que eu sempre guardarei no meu coração e sempre estarei torcendo pelo seu crescimento pessoal, profissional e pelo seu sucesso. Obrigado por tudo! Espero que se nossas vidas se cruzarem novamente, possamos sorrir muito ainda das grandes coisas boas que a vida tem para oferecer. Todo sucesso do mundo! Amo você meu amigo!

A **Anita Brasil**, **Francisco das Chagas Carvalho**, **Bernardo de Aquino Leodido**, **Bernardo de Aquino Leódido Filho**, **Paulo Roberto Cardoso**, **Rachel Cristine Cardoso**, **Marcelo Cardoso**, **Enelda Macedo**,

José Adelman Cardoso e **Ada Lauande**, que mesmo a distância sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso e pela concretização de mais esse sonho, de mais essa vitória. Obrigado por tudo e pelo que vocês representam em minha vida. Ter familiares como vocês faz a vida ficar mais bonita de ser vivida!

Aos amigos e colegas de pós-graduação, **Dayane Alcantara**, **Nathia Rigoglio**, **Fernanda Menezes Greyson Esper**, **Valdir Pavanello**, **Fabielle Russo**, **Isabela Fernandes**, **Joao (Joaozão)**, **Phelipe Favaron**, **Rosangela Rodrigues**, **Thais Borges**, **Dilayla Abreu**, **Paulo Ramos**, **Francilusa Dellys (Natal)**, **Amilton César**, **Diego Carvalho**, **Dailiane**, **Bruna**, **Paula Fratine**, **Sonja Lobo**, **Luciano César**, **Carla Miranda**, **Jessika Borguesi**, **Lara Mário**, **Rennan Olio**, por toda amizade e companheirismo dispensados a mim durante essa pós-graduação. O convívio com vocês foi extremamente prazeroso e a amizade que construímos aqui, por mim será cativada para sempre. A presença de vocês na minha vida durante esses quatro anos, deixou São Paulo e a USP bem melhores, podem ter certeza disso. A vocês meus amigos, desejo todo sucesso e realização nessa vida.

Aos Doutores **Rose Eli Rici** e **Thiago Aloya** por toda ajuda e apoio dados nesse final de experimento. Tenham certeza que a contribuição e ajuda dados por vocês, foram cruciais para o sucesso desse projeto. A vocês meu muito obrigado. E saibam que o que vocês precisarem de mim, sempre estarei à disposição para ajudar.

Ao Prof. **Alan Mackay-Sim** pela oportunidade de realização de parte do meu doutorado no exterior, em sua Instituição, Griffith University, Brisbane, Australia. Quando fui aceito para a realização do doutorado sanduíche, nunca teria ideia de quão enriquecedora seria esta experiência de viver em outro País, cultura, Instituição e outra língua. O que eu aprendi e cresci durante esta experiência foi extremamente maravilhoso. Professor, obrigado por todos os ensinamentos que foram transmitidos, além de ter me ensinado uma forma diferente e eficaz de ver a ciência e fazer a ciência. Hoje o senhor é um grande espelho em minha vida no que diz respeito a ser cientista e pesquisador.

Aos amigos **Mitchell Crowb** e **Bernadete Belette**, pela amizade e companheirismo durante a estadia na Austrália. Foi extremamente valioso e prazeroso ter convivido com pessoas tão especiais e competentes como vocês. A experiência profissional e pessoal foi maravilhosa. Obrigado por tudo, meus amigos Australianos. Obrigado pelo carinho, paciência, atenção e parceria. Espero por vocês aqui, no Brasil, pois a amizade que construímos ultrapassa os limites dos oceanos.

A **Vitor Fujimori “Vitinho”**, pelo companheirismo, parceria e todo carinho dispensados a mim durante esse final de doutorado. Sabe Vitinho, você apareceu e entrou na minha vida de uma forma tão inesperada e hoje, tu não tens ideia de quanto você é e sempre será importante na minha vida, de uma maneira grandiosa. Grandiosa como suas atitudes, como seu caráter, como sua competência e como sua forma leve e bonita de ver a vida, que acaba encantando todos os que te rodeiam e te cercam.

Como eu aprendi como você e como você em muitas coisas passou a ser meu espelho. Vitinho, você é um ser humano como poucos, de caráter e personalidade louváveis e de um coração maravilhoso. Espero que todos os momentos que vivemos juntos, sejam guardados para sempre na sua memória e que para sempre nossas vidas e nossos destinos estejam entrelaçados. Porque ter pessoas como você ao meu lado é uma dádiva! Amo você garoto! A você tudo de mais maravilhoso que a vida pode oferecer, pois você merece isso e muito mais!

A **Ernesto Pacheco “Kiko”**, por todo incentivo durante essa minha estadia em São Paulo. Você Kiko, acreditou em mim, muitas vezes mais que eu mesmo. Você foi um companheiro incansável na arte de ajudar, ser amigo, companheiro e muitas vezes emprestou sua família para que eu sempre me sentisse acolhido dentro do ambiente familiar. Você é um ser humano incrível e uma pessoa extremamente importante e especial para mim! A você Kiko, minha gratidão eterna, meu carinho e admiração. Espero você no Maranhão Garoto!

Aos professores **Paula de Carvalho Papa, Jose Roberto Kfoury Júnior, Antonio Assis Neto e Alan Peres** por todos os ensinamentos transmitidos e experiências trocadas. Tenham certeza que vocês contribuíram muito para melhora na minha formação como docente.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Ronaldo Augustinho, Jaqueline Santana, Edinaldo Ribas (Índio), Augusto e Dona Idalina**, que sempre foram solícitos e generosos em me ajudar, e com isso, foram fundamentais para concretização desse trabalho. Muito obrigado!

À **UFMA (Universidade Federal do Maranhão)** e meus colegas e amigos do **CCAA (Centro de Ciências Agrárias e Ambientais)** pelo apoio dado durante esse período de capacitação durante a pós graduação. A liberação para realização desse doutorado e o apoio e incentivo dados a mim pela minha Instituição foram cruciais para o sucesso dessa etapa na minha vida.

À **FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão)** e **CAPES** pelo suporte financeiro dados a minha pesquisa na forma de Bolsa de Doutorado e Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (**PDSE/CAPES**), os quais foram essenciais para a realização desse doutorado e a realização de Estágio de Doutorado no Exterior (Brisbane-Australia) e **INCTC (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Terapia Celular e Células Tronco)** pelo suporte financeiro dado a esta pesquisa.

Uma regra de conduta:
" buscar vencer a mim mesmo (...) e mudar os meus desejos, e não a ordem do mundo."
Descartes.

RESUMO

CARVALHO, R. C. **Anosmia: recuperação da função olfatória por terapia celular.** [Anosmia: recovery of olfactory function using cell therapy]. 2014. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O sistema olfatório desempenha um papel relevante na exploração do ambiente e no reconhecimento social e sexual de mamíferos. Por meio deste sistema os animais podem reconhecer, detectar e discriminar uma grande quantidade de odorantes de estruturas químicas variadas, sinais químicos no ambiente essenciais para a sobrevivência e os ferormônios, que desencadeiam comportamentos sociais e reprodutivos. Algumas doenças e certos tipos de injúrias fisiológicas podem provocar a morte destas células, o que pode levar a perda da sensibilidade olfatória, embora já se saiba que este epitélio apresenta grupos de neurônios capazes de regeneração. A partir deste contexto, a terapia celular acaba sendo uma alternativa para o tratamento de patologias as quais acometem o sistema olfatório, como por exemplo, a anosmia que pode causar problemas graves, desde acidentes com gás ou comida estragada até depressão e distúrbios alimentares, causadas pela perda do paladar. Objetivou-se com este trabalho avaliar a recuperação da função olfatória de ratos anósmicos, bulbectomizados e submetidos a terapia celular com células-tronco provenientes do epitélio olfatório de ratos wistar. Para tanto foram utilizados 21 ratos machos Wistar de sessenta dias de idade, onde três foram utilizados para obtenção das células tronco do epitélio olfatório, dois para o controle cirúrgico, e restante foram divididos em 4 grupos: GI, GII, GIII e GIV – os quais foram transplantados após 3, 7, 14 e 21 dias após a bulbectomia, respectivamente. A técnica cirúrgica foi realizada com incisão de pele, tecido subcutâneo e periósteo, seguida de abertura em janela de formato ovalado e remoção dos bulbos olfatórios mediante aspiração. Para a comprovação da anosmia após a cirurgia, os ratos foram submetidos ao teste comportamental do “odor de gato”, e os do grupo controle após o período experimental foram sacrificados e a área encefálica da lesão causada pela cirurgia foi coletada onde foram realizadas análises histopatológicas. Os animais do GI, GII, GIII e GIV após 3, 7, 14 e 21 dias após bulbectomia foram anestesiados e receberam células tronco (1×10^6) do EOR no mesmo local da realização da bulbectomia, e posteriormente foram submetidos ao teste comportamental do “odor de gato”. Transcorrido o período experimental, foram

eutanasiados e os fragmentos de encéfalo foram coletados para análise histopatológica e imunohistoquímica. Os resultados evidenciam que realização da intervenção cirúrgica demonstrou remoção parcial do BO, com destruição da conexão nervosa entre os bulbos olfatórios e o epitélio olfatório. Ainda, a partir do teste comportamental do “odor de gato”, e pela análise histopatológica das lesões causadas pela cirurgia, que evidenciou extensa área de necrose, com presença de hemossiderina e astrogliose reativa, constatou-se que a técnica empregada para promoção da bulbectomia foi eficaz para promoção da anosmia. A partir da análise comportamental, dos animais submetidos a terapia celular, os animais do GII e GIII apresentaram modificações no comportamento olfativo, com comportamento olfativo positivo ao “odor do gato”, aversão comportamento defensivo, enquanto 100% dos animais do GI e GIV não apresentaram nenhuma modificação no comportamento olfativo. As análises por imunohistoquímica evidenciaram marcação positiva para o GFP, o que indica a presença das células tronco transduzidas com eGFP nos locais das lesões e ainda a expressão positiva do GFAP que evidencia a presença de astrogliose reativa com presença de cicatriz glial nos locais das lesões.

Palavras chave: Anosmia. Bulbectomia. Gliose Reativa. Terapia Celular

ABSTRACT

CARVALHO, R. C. **Anosmia: recovery of olfactory function using cell therapy** [Anosmia: recuperação da função olfatória por terapia celular]. 2014. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The olfactory system plays an important role in the exploration of the environment and in social and sexual behavior in mammals. Disturbances of the olfactory system such as observed in anosmia has also been related to accidents caused by gas leak and intoxications by food poisoning, in addition to eating disorders due to relation of the olfactory system with the taste. Through the olfactory system, animals recognize, detect and discriminate a large amount of odorants in a variety of chemical products, including pheromones, as well as in the environment which may guarantee their survival. Some diseases and injuries cause death of cells from the olfactory system leading to decrease or loss of the smell sensitivity. It is known that the olfactory epithelium has cells capable of regenerating neurons. Therefore, the utilization of these cells in cell therapy represents an alternative for the treatment of the olfactory system disorders. The objective of this study was to evaluate the regeneration of olfactory function of bulbectomized rats that were subjected to cell therapy with cells isolated from the olfactory epithelium. Twenty one male Wistar rats, sixty days of age were included in this study. Three rats were used for isolation of the olfactory epithelium cells, two for the surgical control and the remaining were divided into 4 groups: GI, GII, GIII and GIV – corresponding to groups where cells were transplanted after 3, 7, 14 and 21 days after bulbectomy, respectively. The surgical technique was performed with skin, subcutaneous and periosteum incisions, followed by craniectomy and the removal of olfactory bulbs upon aspiration. For proof of anosmia, the rats were subjected to behavioral testing know as "cat odor". The animals of the control group were sacrificed and brain, with the lesion area, collected and processed for histopathological analysis. The animals of the experimental groups (GI, GII, GIII and GIV) were anesthetized and received heterologous cells (1×10^6) from olfactory epithelium, thorough the same venue of the bulbectomy. These animals subsequently underwent behavioral "cat odor" testing. After 3, 7, 14 and 21 days of the cell injection, the rats were euthanized and the animal's brains were collected for histopathological and immunohistochemical analyses. The results show that the surgical procedure

promoted partial removal of olfactory bulbs, with destruction of the neural connection between the olfactory bulb and the olfactory epithelium. The behavioral "cat odor" test and the histopathological exams of the lesions, which revealed a large area of necrosis with presence of hemosiderin and reactive astrogliosis, demonstrated that the bulbectomy technique used to promote anosmia was effective. The behavioral test showed that the animals from GII and GIII presented changes in olfactory sensitivity, with positive "cat odor" aversion and defensive reaction. This test did not show change in GI and GIV groups. Immunohistochemistry analysis was positive for GFP, suggesting the presence of eGFP transduced cells at the sites of injury. In addition, the expression of GFAP positive cells demonstrated the presence of reactive astrogliosis with glial scar at the sites of injury.

Key words: Anosmia. Bulbectomy. Gliosis. Cell therapy

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	EPITÉLIO OLFATÓRIO E BULBO OLFATÓRIO	25
2.2	CÉLULAS ORIUNDAS DO EPITÉLIO OLFATÓRIO	27
2.3	VIA OLFATÓRIA	29
2.4	BULBECTOMIA X ANOSMIA	30
2.5	RESPOSTA TECIDUAL A ABLAÇÃO DO BULBO OLFATÓRIO (BULBECTOMIA)	33
2.5.1	Celulas da Glia	33
2.5.2	Celulas da Glia no SNC	35
2.5.2.1	Oligodendrocitos	35
2.5.2.2	Astrócitos	35
2.5.2.3	Microglia	38
2.5.3	Gliose Reativa	39
3	OBJETIVOS	41
3.1	GERAL	41
3.2	ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAL E MÉTODO	42
4.1	ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO CELULAR	42
4.1.1	Obtenção e cultivo das células-tronco EOR	42
4.1.2	Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT	43
4.1.3	Imunocitoquímica EOR	43
4.1.4	Citometria de fluxo	44
4.1.5	Transdução das células-tronco do epitélio olfatório com lentvírus carreando o gene EGFP	44

4.1.6	Análise do potencial tumorigênico das células obtidas a partir do epitélio olfatório de ratos (EOR)	45
4.2	TÉCNICA CIRÚRGICA EXPERIMENTAL DE ABLAÇÃO DO BULBO OLFATÓRIO – BULBECTOMIA	45
4.3	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO OLFATÓRIO: MODELO DO ODOR DE GATO	47
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA LESÃO CAUSADA PELA BULBECTOMIA	49
4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA DOS ANIMAIS BULBECTOMIZADOS SUBMETIDOS A TERAPIA CELULAR	50
4.6	TERAPIA CELULAR DOS ANIMAIS ANÓSMICOS COM CÉLULAS TRONCO DO EOR	51
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5	RESULTADOS	53
5.1	ABLAÇÃO DO BULBO OLFATÓRIO EM RATOS – BULBECTOMIA	53
5.1.1	Análise histológica das lesões causadas pela bulbectomia	56
5.2	CULTIVO DAS CÉLULAS DO EPITÉLIO OLFATÓRIO DE RATOS, ANÁLISE DE ATIVIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT, ANÁLISE POR IMUNOCITOQUÍMICA E CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS EOR E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS TRONCO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO DE RATOS WISTAR EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDO NUDE	58
5.3	TERAPIA CELULAR EM RATOS SUBMETIDOS A BULBECTOMIA E TRATADOS COM CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DO EOR	62
5.3.1	Avaliação da terapia celular em ratos anósmicos submetidos a bulbectomia experimental e transplantados com células tronco do epitélio olfatório pelo modelo de “odor de gato”	62
5.2.2	Avaliação da terapia celular em ratos anósmicos submetidos a bulbectomia experimental e transplantados	

com células tronco do epitélio olfatório por análise
histológica e imunohistoquímica 65

6 DISCUSSÃO 71

7 CONCLUSÃO 89

REFERÊNCIAS..... 90

1 INTRODUÇÃO

O sistema olfatório desempenha funções importantes na fisiologia e comportamento dos animais. É o sistema responsável pela percepção de odorantes e exerce um papel relevante na exploração do ambiente, no reconhecimento social e sexual dos mamíferos. Embriologicamente, o olfato é o primeiro órgão dos sentidos a se desenvolver (NAKAMURA, 2000). Por meio deste sistema os animais podem reconhecer, detectar e discriminar uma grande quantidade de odorantes de estruturas químicas variadas, sinais químicos no ambiente essenciais para a sobrevivência, além dos ferormônios, que influenciam e interferem diretamente nos comportamentos sociais e reprodutivos inatos, tais como o comportamento materno em fêmeas e a agressividade entre machos e acasalamento (BUCK, 2004; CARLETON *et al*, 2002). Além disso, a olfação também exerce influência na regulação do consumo de alimentos (GANDELMAN *et al.*, 1972; LEONARD, 1972; SEEGAL; DENENBERG, 1974; MEGUID *et al.*, 1997; GONZALEZ-MARISCAL *et al.*, 2003).

Em geral, nos mamíferos, este sistema é formado por dois órgãos sensoriais localizados na cavidade nasal (Figura 1): o epitélio olfatório principal, que detecta um amplo e variado repertório de moléculas de odorantes fornecendo informações que permitem o animal explorar o ambiente a sua volta, por exemplo, procurar comida e substâncias venenosas, e o órgão vomeronasal, que é o órgão sensorial que detecta os ferormônios, e também chamado sistema olfatório secundário (BAXI *et al.*, 2006).

O epitélio olfatório é composto por seis tipos celulares característicos: neurônios bipolares; células sustentaculares; células microvilares localizadas na superfície do epitélio; células que envolvem os ductos e glândulas de Bowman e as células globosas horizontais e basais, localizadas no comprimento basal, nos quais muitos outros tipos celulares são originados (MENCO; JACKSON, 1997).

Há especialização dos cílios dos neurônios olfatórios na detecção de odores, pois eles possuem receptores específicos para agentes odoríferos, bem como a maquinaria de transdução necessária à amplificação de sinais sensórios e à geração de potenciais de ação no axônio do neurônio. O muco que banha os cílios é secretado pelas células de suporte do epitélio olfatório e pelas glândulas de Bowman, que ficam sob o epitélio e possuem dutos que se abrem em sua superfície. Acredita-se que o muco forneça o ambiente molecular e iônico apropriado para a detecção de odores. A

resposta normal do neurônio a um agente odorífero consiste na despolarização e na produção de potenciais de ação. O número de neurônios que respondem varia de acordo com a concentração do agente (NETO et al, 2011).

Os receptores do Sistema Olfatório Acessório (SOA) estão localizados no órgão vomeronasal (OVN). Este órgão consiste em estruturas pares em forma de charuto, cuja localização é medial e, em geral, ao longo da porção anterior do septo nasal. O OVN tem uma abertura em um dos lados cuja localização dessa abertura é variável. Por exemplo, em roedores, situa-se dentro da cavidade nasal; em gatos, dentro do canal nasopalatino, o qual conecta as cavidades nasal e oral; em bovinos, abre-se diretamente na cavidade oral. Os receptores do OVN são muito similares àqueles do sistema olfatório principal, com a exceção de que não têm cílios e, ao invés deles, apenas microvilos. Da mesma forma, são neurônios primários que se projetam diretamente para o bulbo olfatório. Contudo, em geral existe uma porção anatomicamente distinta do bulbo olfatório, o bulbo olfatório acessório, que recebe os impulsos provenientes do OVN. O bulbo olfatório acessório também tem glomérulos distintos, onde ocorrem as sinapses dos nervos olfatórios com outras células localizadas dentro da estrutura. Os receptores vomeronasais, assim como os receptores do sistema olfatório principal, regeneram-se constantemente (VANDERLEI et al, 2010).

Algumas doenças e certos tipos de injúrias fisiológicas podem provocar a morte destas células, o que pode levar a perda da sensibilidade olfatória (KOVACS *et al.*, 1999), embora já se saiba que este epitélio apresenta grupos de neurônios capazes de regeneração. Este mecanismo regenerativo desse epitélio é restabelecido através de células-tronco progenitoras (YANG, *et al.*, 2005). Estudos como o de Souza e Elias (2005) relatam o potencial das células-tronco na reparação de órgãos e tecidos, e afirmam que a terapia com células-tronco ainda se encontra em estágio evolutivo. Essa terapia consiste em usar grupos de células-tronco para tratar doenças e lesões através da substituição de tecidos doentes por tecidos formados por células saudáveis. A maior esperança do seu uso reside na geração de células capazes de serem usadas como terapia substitutiva de células danificadas por doenças, em lugar dos transplantes.

Neste contexto, a terapia celular acaba sendo uma alternativa para o tratamento de patologias as quais acometem o sistema olfatório (BARBOZA-JÚNIOR et al., 2008). Atualmente, pesquisas terapêuticas com células-tronco têm sido

realizadas, uma vez que estas células têm três características importantes que as distinguem de outros tipos celulares. São células não-especializadas, que se renovam por meio de divisão celular; são células não-diferenciadas e, portanto, não-especializadas; e, em certas condições fisiológicas e experimentais, podem ser introduzidas e tornarem-se células com funções especiais (OLIVEIRA, 2007).

Sobre as disfunções olfatórias, nas últimas três décadas, os estudos vem crescendo substancialmente, como por exemplo, a anosmia, que se caracteriza pela ausência do olfato, ou seja, o indivíduo anósmico não sente cheiro e tem o paladar comprometido, já que a língua percebe só cinco sabores (doce, salgado, azedo, amargo e unami, mais conhecido como aji-no-moto). Além disso, em humanos a anosmia pode causar problemas graves, que vão de acidentes com gás ou comida estragada até depressão e distúrbios alimentares, causadas pela perda do paladar (GAINES, 2010).

Hummel e Nordim (2005) afirmam que anosmia funcional ocorre com uma frequência de pelo menos 5%. A alta prevalência de transtornos olfatórios torna-se mais evidente quando se analisa a população em estudos baseados na identificação de odor. Em uma investigação desse tipo, 24% dos indivíduos com idade entre 53 e 97 anos, foram diagnosticados com comprometimento da função olfativa, e em outro estudo, 19% dos indivíduos com idade entre 20 e 92 anos foram encontrados. Ainda relatam que queixas relacionadas a problemas olfatórios são comuns, embora às vezes, a perda da sensibilidade olfativa possa passar despercebida. Em alguns casos, como traumatismo craniano, pode ocorrer a perda súbita da sensibilidade olfativa.

Por este motivo objetiva-se com esse trabalho avaliar a ação terapêutica de células de linhagem neuronal do epitélio olfatório de ratos, em animais submetidos à lesão de bulbo olfatório, a partir de técnica cirúrgica experimental de ablação do bulbo olfatório, podendo estes serem modelos clínicos para ensaios terapêuticos semelhantes aos traumas cranianos em humanos, os qual na maioria das vezes, leva o indivíduo a condição de anosmia. Desta forma, poder-se-á estabelecer um modelo terapêutico alternativo para o tratamento da anosmia em humanos, uma vez que os animais anósmicos serão submetidos a terapia celular a partir de células oriundas do epitélio olfatório.

Figura 1- Representação esquemática da cavidade nasal de rato (esquerda) com cavidade nasal em corte sagital mediano (direita)

Fonte: Adaptado de MOMBAERTS (2004).

Legenda: Representação esquemática da cavidade nasal de ratos. VNO – Órgão Vomeronasal; OE – Epitélio Olfatório Principal; MOB – Bulbo Olfatório; AOB – Bulbo Olfatório Acessório.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPITÉLIO OLFATÓRIO E BULBO OLFATÓRIO

Junqueira e Carneiro (2004) definiram o epitélio olfatório um neuroepitélio colunar pseudo-estratificado. Para Kawauchi et al. (2004), esse epitélio é semelhante em morfologia e função ao neuroepitélio embrionário que gera o sistema nervoso. Contudo aquele é mais adequado para os estudos por ser mais simples, produzindo apenas um tipo de neurônio – o neurônio olfatório sensorial.

Três tipos celulares compõem o epitélio olfatório. As células basais, arredondadas e pequenas, situadas entre as células olfatórias e as de sustentação, são células-tronco (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004), pois, segundo Cunningham & Klein (2008), se auto-renovam e possuem um alto potencial proliferativo e de geração de células diferenciadas. São responsáveis pela renovação do epitélio olfatório (SKINNER et al. 2005), reposição de neurônios e células de sustentação (MARSHALL et al. 2006), sendo caracterizadas por intensa atividade mitótica, identificada pela reação positiva ao PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) (ALVES et al, 2007).

As células de sustentação do epitélio olfatório são prismáticas, largas no ápice e mais estreitas na base; apresentam, na sua superfície, microvilosidades que se projetam para dentro da camada de muco que cobre o epitélio. As células olfatórias são neurônios bipolares com núcleos posicionados numa região mais inferior se comparadas com as células de sustentação. Os axônios que nascem nas porções basais desses neurônios sensoriais reúnem-se em pequenos feixes, dirigindo-se para o SNC (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

O epitélio olfatório reveste a área olfatória, uma região situada na parte superior das fossas nasais, responsável pela sensibilidade olfativa. As duas cavidades nasais limitam-se caudalmente com a lâmina crivosa do etmóide e são separadas medianamente pelo septo nasal (KÖNIG, LIEBICH, 2004).

Os bulbos olfatórios são um par de estruturas telencefálicas, altamente laminadas, situadas na face anterior do lobo frontal, imediatamente após a placa crivosa do etmóide. Eles recebem uma grande variedade de informações oriundas de moléculas de odor, captada por receptores da área olfatória do nariz e as redirecionam

para o neocórtex, sendo indispensáveis para a busca de alimentação e reprodução animal (MORI et al., 1999; FUJUSAKI et al., 2004).

Na estrutura histológica do bulbo olfatório há cinco camadas que circundam uma substância central de substância branca, formada pelos axônios das fibras que saem do bulbo olfatório e chegam ao bulbo olfatório a partir de outras regiões do sistema neural central. Os axônios dos nervos olfatórios espalham-se sobre a superfície olfatória ipsilateral e formam a camada neural mais superficial, a camada do nervo olfatório. Essas fibras aferentes primárias terminam em pequenos aglomerados esféricos de neurópila, os glomérulos. Nos glomérulos, os axônios dos nervos olfatórios fazem sinapse tanto com os interneurônios como os principais neurônios retransmissores do bulbo olfatório (células mitrais em tufo) (AVERSI-FERREIRA et al., 2006).

Logo abaixo da camada do nervo olfatório, há a camada glomerular, que contém além dos glomérulos, os corpos celulares das células em tufo externas e pequenos interneurônios, as células periglomerulares (DOETSCH; ALVAREZ-BUYLLA, 1996). A camada plexiforme externa, adjacente a camada glomerular, é uma camada relativamente espessa de neurópila contendo corpos celulares esparsos de células intermediárias em tufo. A camada de células mitrais forma uma lâmina profunda delgada e compacta, contendo os corpos celulares das células mitrais. Abaixo da camada das células mitrais, encontra-se a camada plexiforme interna, ou camada de células granulares, a mais profunda, que possui neurópila densa, contendo os corpos celulares que provem da porção anterior da zona subventricular telencefálica (MARGRIE et al., 2001; PIERRE-MARIE et al., 2004).

Averso-Ferreira et al. (2006), afirmaram em sua pesquisa, que o bulbo olfatório é uma das poucas estruturas do sistema neural de mamíferos em que há contínua geração de neurônios. Essas células originadas da zona ventricular e subventricular dos ventrículos laterais do telencéfalo, migram para o bulbo olfatório através de uma rota tangencial, a rota rostral, cujo mecanismo molecular é pouco conhecido. Para Bedard & Parent (2004) e Gheusi et al. (2000), as consequências funcionais dessa geração permanente e a integração de novos circuitos de neurônios também são desconhecidas. Lee et al. (2003) relataram que essa constante neurogênese dê suporte aos processos de discriminação de odores e mantenha a memória olfativa em ratos. Essa constante adição ou substituição de neurônios no bulbo olfatório adulto pode implicar em uma função olfatória melhorada.

2.2 CÉLULAS ORIUNDAS DO EPITÉLIO OLFATÓRIO

O epitélio olfatório é tido como uma das mais promissoras fontes para obtenção de células tronco de origem neural, possuindo características únicas, devido à proximidade com áreas nobres do SNC, além da facilidade de obtenção em humanos por meio de biopsias através das narinas externas (BIANCO et al., 2004).

Schwab (2002) relataram que após uma lesão, ou durante uma reposição celular fisiológica, novos receptores neuronais olfatórios são gerados por células tronco na camada basal do epitélio olfatório, emitindo prolongamentos axonais que atravessam o platô cribiforme e adentram o bulbo olfatório realizando sinapses com neurônios de segunda ordem na camada glomerular. Doucette (1990) ressaltou em sua pesquisa que essa é uma das raras ocasiões em que os neurônios periféricos são hábeis a adentrar o microambiente do SNC e realizar sinapses, e essa habilidade não usual é atribuída as propriedades especializadas das células tronco do epitélio olfatório.

Segundo Menko & Jackson (1997) o epitélio olfatório apresenta grupos de neurônios capazes de regeneração, bem como elementos de sustentação e gliais. Dentro desse epitélio residem um conjunto de células tronco capazes de dar origem a novos neurônios durante toda a vida, conferindo ao epitélio olfatório a capacidade de repor os receptores olfatórios de neurônios após danos teciduais (MACKAY-SIM; KITTEL, 1991).

Células-tronco olfatórias têm sido amplamente utilizadas em terapias celulares. Seu acesso, na porção superior da cavidade nasal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) é menos invasivo se comparado às cirurgias para obtenção de células-tronco provenientes do bulbo olfatório (OTHMAN et al., 2003; DULAC; ZAKHARY, 2004; SKINNER et al., 2005). Destaca-se que o procedimento para acesso dessas células periféricas não afeta o olfato (LU; ASHWELL, 2002; MARSHALL et al., 2006). Esse tipo de célula, presente no neuroepitélio olfatório, são pluripotentes e apresentam contínua capacidade de regeneração e reposição de neurônios (ROISEN et al. 2001; DULAC e ZAKHARY, 2004; SKINNER et al. 2005). Essa regeneração relaciona-se a presença de progenitores neuronais (OTHMAN et al. 2003). A expansão das células-tronco olfatórias *in vitro* pode gerar populações celulares paciente-específicas para transplantes autólogos, bem como diagnósticos imunológicos, farmacológicos ou genéticos (ROISEN et al. 2001).

As células-tronco olfatórias dão suporte aos axônios olfatórios da lâmina própria até o bulbo olfatório mielinizando axônios desmielinizados ou em regeneração. Essas células fornecem um substrato muito favorável para a regeneração axonal, pois secretam matriz extracelular e fatores neurotróficos. Sua habilidade de migrar pelo tecido lesado ou já recuperado após o transplante é maior se comparada com outros tipos celulares (AUDISIO et al., 2009; KRUDEWIG et al., 2006; LU; ASHWELL, 2002).

O epitélio olfatório também pode ser considerado uma fonte de células tronco neurais. Este epitélio possui uma característica ímpar, pois é a única junção entre o sistema nervoso central e periférico que contém células-tronco neurais (BARBOZA-JUNIOR et al., 2008). Patel et al. (2004), introduziu essas CT neurais em cóclea de ratos e observou que sobreviveram e cresceram nos 3 giros cocleares e nos fluidos peri e endolinfáticos.

Murrell et al. (2009) em seus estudos reportaram o uso de células-tronco olfatórias na lesão dos discos intervertebrais. Dulac & Zakhary (2004) e Marshall et al. (2006) relatam o sucesso de sua utilização em lesões de medula espinhal. Lima et al. (2006) relatam a utilização das células do EO em lesões medulares de humanos. Destaca-se também a possibilidade de utilização dessas células para reparo de lesões cerebrais (DULAC; ZAKHARY, 2004). Zahng et al., (2006) apontaram que além da reposição celular autóloga, as células podem ser empregadas para avaliação de diagnósticos.

Marshall et al., (2006) focaram em seus estudos que as células-tronco do epitélio olfatório especulam sobre o possível potencial de regeneração axonal e cura de doenças demielinizantes. Mackay-Sim et al. (2008), após um ensaio clínico de 3 anos com o transplante autólogo de células-tronco do epitélio olfatório em humanos, constatou não haver nenhuma alteração patológica ou formação de tumores após o transplante, embora também não tenham encontrado melhora clínica relevante nos pacientes tratados. Caggiano, Kauer e Hunter (1994) e Huard et al. (1998) sugeriram que as células-tronco do epitélio olfatório residem no meio das células globais basais. Experimentos in vitro realizados por Calof; Lander & Rim (1998) revelaram a presença de células-tronco neuronais em uma pequena sub-população de células globais basais, indicando que estas células são responsivas a FGF2. Desta forma, o volume de elementos que aparece sustenta a idéia de que, ao menos para aquelas células que foram estabelecidas no epitélio de roedores, as células-tronco neuronais do epitélio olfatório são sub-populações de células globais basais.

Em estudos com culturas de células de neuroblastos do epitélio olfatório de ratos, Hayden et al., (1989) demonstraram que vários tipos celulares, com uma grande variedade de morfologias onde são visualizadas em culturas primárias que a maioria das células apareceram possuem característica de células bipolares. Em meio de cultura DMEM essas células tornam-se confluentes em uma ou duas semanas podendo sobreviver por meses.

2.3 VIA OLFATÓRIA

A via olfatória, embora seja considerada essencialmente visceral por se relacionar intimamente à função alimentar, são condutoras de impulsos provenientes de estímulos do meio ambiente. Segundo Marino & Rasmussen (1968) a descrição da via olfatória em humanos acaba sendo realizada como um suplemento às vias exteroceptivas.

Para Machado (1980), a via olfatória apresenta as seguintes peculiaridades: possui apenas os neurônios I e II; o neurônio I localiza-se em uma mucosa e não em um gânglio; falta um relé talâmico; a área cortical de projeção é do tipo allocórtex e não isocórtex, como nas demais vias.

Em seus estudos, Erhart (1974), relatou que o Neurônio I, são os prolongamentos periféricos das células olfatórias, situadas na mucosa nasal, apresentam nas suas extremidades pequena vesícula, a vesícula olfatória, da qual emergem os cílios olfatórios, que constituem os receptores de estímulos olfatórios. Os impulsos nervosos por eles deflagrados seguem através de prolongamentos centrais dessas mesmas células e atingem os “glomérulos” do bulbo olfatório, os dendritos das células mitrais. Erhart (1974), em seu trabalho de neuroanatomia em humanos, afirmou que os prolongamentos centrais das células olfatórias, que são fibras amielínicas, às vezes reunidas em pequenos feixes, representam em conjunto, o nervo olfatório (I par de nervos cranianos). Para atingir o bulbo olfatório ele passa através dos pequenos orifícios da lâmina crivosa do osso etmóide, onde farão sinapse com o Neurônio II.

Machado (1980) relatou que os Neurônios II são chamados de células mitrais, cujos dendritos muito ramificados fazem sinapse com as extremidades ramificadas dos prolongamentos centrais das células olfatórias (Neurônio I), constituindo os chamados glomérulos olfatórios. Os axônios mielínicos das células mitrais seguem

pelo trato olfatório e ganham as estrias olfatórias lateral e medial. Admite-se que os impulsos olfatórios conscientes cheguem pela estria olfatória lateral e terminam na área cortical de projeção para a sensibilidade olfatória, situada na parte anterior do uncus e do giro parahipocampal. Erhart (1974) ainda ressaltou que os impulsos olfatórios os quais prosseguem em direção central pelo tracto olfatório e alcançam pela estria olfatória lateral a área piriforme, e pela estria olfatória medial, a área subcalosa e o giro paraterminal e que parte dos estímulos olfatórios no seu trajeto pelo tracto olfatório atinge, também, o núcleo olfatório anterior, de onde é retransmitido à área piriforme.

Somente Erhart (1974), afirmou a presença de um Neurônio III a via olfatória, o qual parte da área piriforme os impulsos olfatórios são transmitidos ao hipocampo e ao giro denteado, de onde fibras eferentes os conduzem através do alveus, fimbria e fórnix, aos núcleos mamilares e a formação reticular do tronco encefálico.

Convém acentuar que as formações integrantes da via olfatória constituem em conjunto o rinencéfalo, ou encéfalo olfatório, no sentido restrito em que esse termo tende a ser usado as demais formações incluídas no rinencéfalo, e no seu sentido mais amplo, não se relacionam a sensibilidade olfatória e fazem parte do sistema límbico. Estudos eletrofisiológicos mostraram que esse sistema recebe impulsos originados em quase todos os receptores, inclusive nos olfatórios. Os impulsos olfatórios chegam ao sistema límbico em grande parte através de fibras que a partir da estria olfatória medial terminam na área septal. Estas conexões se relacionam com fenômenos reflexos comportamentais em resposta a impulsos olfatórios inconscientes (MACHADO, 1980).

2.4 BULBECTOMIA X ANOSMIA

A bulbectomia tem sido utilizada amplamente em estudos experimentais em ratos machos com diversas finalidades. A maior parte dos estudos publicados foram realizados nas décadas de 70, 80 e 90, e suas finalidades voltavam-se a estudos comportamentais em ratos, camundongos e coelhos.

Rowe & Eduards (1971) utilizaram a remoção do bulbo olfatório em ratos machos no intuito analisar a influência do olfato no comportamento agressivo de ratos. Para tanto, os mesmos utilizaram ratos da linhagem Swiss-Webster albino. O procedimento cirúrgico foi realizada sob anestesia com éter precedido por injeção

intraperitoneal de sulfato de atropina. Uma vez anestesiados, foi realizada uma incisão na pele sobre o osso frontal. O osso foi diluído com uma broca dental, e depois removido com uma pinça para expor os bulbos olfatórios. Os bulbos então foram aspirados de forma unilateral ou bilateral, seguido de hemostasia da região e fechamento da ferida cirúrgica com suturas.

Edwards et al. (1972) seguindo a mesma linha de pesquisa relacionando a função olfatória com o comportamento de agressividade de ratos. Estes pesquisadores afirmaram que a remoção do bulbo olfatório tem sido a técnica mais praticada para roedores, no intuito da promoção da anosmia nestes animais. Entretanto, relatam que o procedimento é complicado pelo facto de que a anosmia pós-cirúrgica é associado com a destruição de tecido do sistema nervoso central. Assim, estes autores promoveram a anosmia pela aplicação de sulfato de zinco por via intranasal. Com a utilização dessa técnica, após 21 dias, os animais retomam a função olfatória.

Edwards & Roberts (1972) também produziram a anosmia em ratos com o intuito de estudos experimentais de comportamento, neste caso a termorregulação. Em sua pesquisa, os mesmos realizaram a remoção bilateral do bulbo olfatório de ratas. A técnica foi realizada em ratas da linhagem Swiss-Webster, com idade entre 90-100 dias. O procedimento cirúrgico consistiu primeiramente em anestesia dos animais com éter, e em seguida estabilizou-se a cabeça das ratas numa moldura estereotáxica. Uma incisão longitudinal foi então feita na linha média na parte superior do crânio, e a pele e o tecido do músculo sobrejacente aos ossos frontais foi retraída. Realizam então uma perfuração sob cada bulbo olfatório e os mesmos foram removidos por sucção sob um microscópio de dissecação. Raspou-se a placa cribriforme para garantir a interrupção completa das ligações nervosas entre passagens nasais dos bulbos olfatórios. O espaço deixado após a remoção dos bulbos olfatórios foi levemente embalado com Gelfoam e a pele fechada com duas ou três suturas interrompidas.

Thompson & Edwards (1972) realizaram a bulbectomia em ratos e analisaram a lesão causada por este procedimento cirúrgico e os padrões bioquímicos da percepção de odor em uma das camadas glomerulares do bulbo olfatório. A cirurgia foi realizada sob anestesia e um bisturi foi usado para cortar e levantar uma ponta do osso frontal sobrepondo-o. O bulbo olfatório foi aspirado com uma agulha de calibre

22, ligada a uma bomba de vácuo e a pele e ferida cirúrgica foi fechada com uma cola cianoacrílica.

Em suínos, Meese & Baldwin (1975) realizaram bulbectomia utilizando a técnica de Signoret e Mauleon (1962) sob anestesia geral halotano. Foram realizados procedimentos profiláticos com a utilização de antibióticos pré e pós-operatório. A cavidade craniana foi acessada via parede posterior do seio frontal e, após secção, visualizavam-se os pólos frontais do cérebro, os bulbos olfatórios, que eram facilmente visíveis, seguindo de remoção por aspiração. Cuidados com as estruturas adjacentes ao rincencéfalo foram tomados visando diminuir o a outras partes do cérebro. Realizou-se também a raspagem da placa cribriforme, a fim de assegurar que não há nervos olfatórios intactos. As fossas olfatórias foram preenchidas com gelfoam estéril. A recuperação ocorreu sem maiores transtornos e os porcos se recuperaram rapidamente. O sucesso da operação foi determinado por meio de testes simples de olfação.

Evers et al. (1996) correlacionaram a recuperação da capacidade olfatória através da penetração dos nervos olfatórios no bulbo olfatório a partir de lesões oriundas de bulbectomia, correlacionando seus achados com transplantes de bulbo olfatório. Nesta pesquisa os animais receberam a ablação do bulbo olfatório no pós-natal, no dia 13º dia e outra ablação contralateral no período adulto. Estes autores utilizaram como critérios para uma ablação incompleta baseando-se na presença de pequenas células, com uma arquitetura laminar, ou qualquer glomérulo ou estruturas semelhantes presentes na arquitetura do bulbo olfatório.

Hendricks et al. (1994) avaliaram a recuperação da função olfatória em ratos após lesões do bulbo olfatório também utilizaram a bulbectomia como modelo experimental. Sua técnica consistiu em anestesia por inalação (éter) com administração intraperitoneal da associação de cetamina-xilazina (3:1) (cetamina 100 mg/ml e xilazina 20 mg/ml). Os ossos frontais foram expostos por uma incisão na linha média. Utilizou-se broca de dentista para remover o osso sobrejacente. Então um dispositivo de aspiração, foi usado para remover suavemente a todo material do bulbo olfatório. O procedimento foi realizado sob microscópio cirúrgico (Zeiss) com uma ampliação alta para que a lesão poderia ser confirmada visualmente. As ablações foram levadas para o nível do o pedúnculo olfatório e cuidados foram tomados para remover todo o tecido aderente à placa cribriforme, poupando o córtex frontal ipsilateral e todas as estruturas cerebrais contralaterais. A hemostasia foi assegurada

com o preenchimento da cavidade com solução salina e gelfilm. Os ratos bulbectomizados bilateralmente o procedimento de ablação foi imediatamente repetido no bulbo olfatório contralateral. Finalmente, a suprajacente pele foi fechada com fio de seda.

2.5 RESPOSTA TECIDUAL A ABLAÇÃO DO BULBO OLFATÓRIO (BULBECTOMIA)

2.5.1 Celulas da Glia

Graça et al. (2011) relataram que nos dias atuais, a neuroglia (neuro; nervosa, glia; cola) é classificada em macróglia, de origem neuroectodérmica, constituída de oligodendrócitos, astrócitos e endotélio e micróglia de origem mesenquimal. O termo neuroglia foi cunhado por Rudolph Virchow para descrever as células que sustentavam os neurônios e o tecido nervoso. Mais tarde, Ramón y Cajal e del Río-Hortega classificaram a neuroglia da maneira como ela é conhecida nos dias atuais.

Para Jessen (2004), o sistema nervoso central é constituído por dois grupos celulares, os neurônios e as células gliais. Inicialmente, os neurônios por serem células eletricamente excitáveis, foram reconhecidos como elementos celulares responsáveis pela transmissão do impulso elétrico e pelo processamento da informação, enquanto as células gliais, segundo Volterra & Meldolesi (2005) como o suporte para os neurônios. Estas células são classificadas em dois grupos: a macróglia e a micróglia. A micróglia são células fagocíticas envolvidas na resposta inflamatória, enquanto a macróglia é constituída pelos oligodendrócitos, que formam a mielina, pelas células endoteliais, que revestem os ventrículos cerebrais e pelos astrócitos (JESSEN, 2004; PEREA & ARAQUE, 2005). Nave & Scheller (2000) ainda relataram que as células da glia apresentam-se envolvidas por membranas gliais, as quais desempenham papel crítico na determinação das propriedades de sinalização das células. Estas moléculas de sinalização em particular estão localizadas em locais específicos, ou seja, os processos celulares da glia.

Nave & Scheller (2000), expuseram que uma das membranas mais intrigantes do sistema nervoso é a bainha de mielina, que é produzida por células de Schwann e oligodendrócitos, que são aparentemente dois tipos diferentes de células gliais nos vertebrados, as quais expressam uma sobreposição, mas não idênticas conjunto de genes. A função da mielina bem como suas proteínas ligantes tem sido amplamente

estudada, mas exatamente como mielina e as proteínas interagem umas com as outras e, a formação da bainha de mielina, não é bem compreendida.

No sistema nervoso central (SNC) os principais tipos gliais são os astrócitos e os oligodendrócitos. Os astrócitos são mais numerosos e tem muitos processos radiantes que se entrelaçam de formas complexa e íntima entre os corpos celulares neuronais e fibras. Ainda, alguns astrócitos através de prolongamentos entram em contato com as paredes dos vasos sanguíneos podendo controlara barreira hematoencefálica, que protege o sistema nervoso central de substâncias não desejadas na circulação geral. Oligodendrócitos são as células da glia que formam estruturas altamente especializadas, a bainha de mielina, que é responsável pelo isolamento elétrico ao redor do nervo, o que dá a ele a propriedade da rápida transmissão de impulsos elétricos. Ainda no SNC há a presença da microglia.

No sistema nervoso periférico (SNP), células gliais são as células de Schwann. Estas células envolvem os axônios nos nervos periféricos e são encontrados em dois tipos, mielinizadas e não-mielinizadas. As células de Schwann formam bainhas de isolamento em torno dos axônios (bainha de mielina) que são comparáveis na sua estrutura e função aos dos oligodendrócitos no SNC. As células não mielinizantes mostram semelhanças com os astrócitos sendo provável que tenha funções metabólicas e de suporte. Existem evidências de que as células de Schwann são indispensáveis para a sobrevivencia neuronal durante o desenvolvimento e também que estas atuem no processo de restauração e regeneração nervosa durante quando há lesão nervosa periférica.

Jessen (2004) relatou ainda que as células oriundas do epitélio olfatório representam uma categoria especial de células gliais as quais não possuem semelhança com as células de Schwann, e que encontram-se associadas com elementos do SNC e SNP. Ainda, nessa mesma perspectiva, a autora menciona outra categoria importante de células gliais no SNP, a glia entérica. Estas células são encontrados em dos gânglios autonômicos do intestino (Sistema Nervoso Entérico). Ao contrário de outras partes do SNP, as células gliais entéricas possuem interações sinápticas complexas e alta capacidade integrativa, sendo notavelmente semelhantes estruturalmente e bioquimicamente aos astrócitos.

2.5.2 Celulas da Glia no SNC

2.5.2.1 Oligodendrocitos

Os oligodendrócitos são células mielinizantes do sistema nervoso central. Essas células gliais produzem e mantêm os internodos das bainhas de mielina durante toda vida, permitindo a condução saltatória e, portanto a comunicação rápida entre o SNC e o restante do corpo. Essas células também desenvolvem nodos de Ranvier e as Sinapses, juntamente com Astrócitos, e ajudam a manter homeostase, inclusive da atividade elétrica neuronal. Sallis et al. (2011) ressaltam que estudos sistemáticos têm elucidado aspectos de sua origem e as moléculas que influenciam a sua diferenciação, comportamento na homeostasia e na doença e capacidade de regeneração.

Barres & Raff (1993) e Ludwin (1984) relataram que a principal função dos oligodendrócitos é a mielinização. Sallis et al. (2011) corroboraram com estes autores e ressaltaram que embora os oligodendrócitos consistam numa população celular encontrada tanto na substância cinzenta como branca, respectivamente constituindo células satélites de neurônios e interfasciculares mielinizadores, todas as células possuem potencial mielinizante. Ainda, estes mesmos autores afirmaram que entre os fatores que promovem a diferenciação e maturação dos oligodendrócitos, com vistas a mielinização encontram-se o IGF-1 (in vivo e in vitro), PDGF α -R (in vitro), o CNTF a NT3, e o proteoglicano NG2 (in vivo), que agem de modo a garantir a continuidade da função.

2.5.2.2 Astrócitos

Os astrócitos compreendem aproximadamente 50% de toda massa cerebral e são as células gliais mais abundantes no SNC, sendo fundamentais para o microambiente neuronal e constituem as maiores e mais numerosas células gliais do SNC em mamíferos (PRIVAT et al., 1995; RAMOS et al., 2011). Das células microgliais, são os mais variados morfológicamente e versáteis funcionalmente. A morfologia das células de linhagem astrocitária é muito variada e tal diversidade deriva das interações morfológicas e funcionais de cada célula com seu microambiente. (RAMOS et al., 2011)

Baseados na sua morfologia e distribuição no SNC, os astrócitos podem ser classificados em protoplasmáticos, do tipo I e fibrosos, do tipo II. Os do tipo I são grandes, pouco corados, tendo o núcleo ovóide e prolongamentos curtos ramificados e são encontrados na substância cinzenta, enquanto os do tipo II possuem citoplasma escasso, e processos longos e finos, pouco ramificados, com presença mais marcante na substância branca (REICHENBACH; WOLBURG, 2005; SUMMERS; LOWE et al., 1993). Privat et al. (1995), ainda relataram que os astrócitos com prolongamentos radiais compreendem as células de Muller na retina e a glia de Bergmann no cerebelo.

Quanto à função astrocitária, Montgomery (1994), alegou que por possuírem múltiplas interações com outras células e estruturas do SNC, possuem um papel diversificado e vital durante o desenvolvimento e funcionamento do SNC maduro. Para Ramos et al. (2011), o modo eficiente como os com que os astrócitos participam e controlam a homeostase do tecido nervoso reside na existência das junções comunicantes (*gap*) que permitem a constituição de um elaborado sincício celular. A maioria das junções comunicantes dos oligodendrócitos, cerca de 97% é realizada com os astrócitos. Portanto, as junções *gap* que os oligodendrócitos formam com os astrócitos intermedeiam a comunicação entre sucessivos oligodendrócitos e, dessa forma, permitem que os oligodendrócitos distantes participem da comunicação intercelular, formando um sincício panglial abrangente.

Conceitualmente é sabido que os neurônios migram através de processos de células gliais durante o desenvolvimento do SNC. As células gliais que promovem a sustentação para a migração de neurônios pertence a glia radial, constituída por astrócitos imaturos. No encéfalo maduro, essas células perdem a expressão de vimentina e mantêm a expressão de GFAP, assim se diferenciando após a migração de neurônios, sendo os astrócitos importantes para a manutenção da estrutura do encéfalo e medula espinal (BANKS, 1992; MONTGOMERY, 1994; RAMOS et, 2011). Pfrieger (2002) e Slezak & Pfrieger (2003) atribuíram aos astrócitos a função de formação, regulação e manutenção das sinapses. Na fase de maturação do tecido neural, os astrócitos atuam na regulação de aspectos específicos da maturação pré-sináptica e pós-sináptica, incluindo a densidade e a composição das subunidades dos receptores, bem com o a eficácia da liberação dos neurotransmissores. Ramos et al. (2011), acrescentaram a essa descrição que de maneira reversa, as sinapses regulam a diferenciação dos processos astrocíticos que estão ao seu redor. Ainda, provavelmente a eliminação de sinapses é outra função atribuída aos astrócitos, que

podem ocorrer de duas maneiras: pela invasão mecânica da fenda sináptica pelos processos astrocitários ou pela desestabilização de componentes que garantam a manutenção das sinapses, através de enzimas proteolíticas. Além disso, os astrócitos sintetizam a matriz extracelular e moléculas de adesão do SNC. Essas moléculas são importantes para o desenvolvimento e manutenção das relações estruturais e reparo do SNC após dano (MONTGOMERY, 1994).

Os astrócitos têm papel fundamental na sobrevivência neuronal e formação de neuritos. Estes processos são mediados por estas células da glia. Além disso, também são funções atribuídas aos astrócitos, a indução e manutenção da barreira hematoencefálica, a qual existe devido a presença de junções oclusivas entre as células endoteliais e as propriedades de transporte do endotélio encefálico, que possui poucas vesículas pinocíticas. Bauer et al., (2005), Eng Le (2005), Dermitzel (1998) e Montgomery (1994) sugeriram que fatores produzidos pelos astrócitos aumentam a capacidade do sistema de transporte de glicose e aumentam o transporte neuronal de aminoácidos, mediante alterações na polaridade desse sistema. Dessa maneira, os astrócitos contribuem direta e indiretamente para a manutenção da barreira hematoencefálica. Estes mesmos autores ainda relatam que devido à localização dos astrócitos ao redor das sinapses, os mesmos possuem sistemas para controle dos neurotransmissores. Na fenda sináptica, ocorre a captura dos neurotransmissores e esses podem ser reutilizados ou metabolizados. Há receptores para vários peptídeos neuroativos e neurotransmissores, que tem papel importante na comunicação entre astrócitos e neurônios, desempenhando uma função de suporte durante a atividade neuronal. Ramos et al. (2011) acrescentou as funções astrocitárias a manutenção da homeostase tecidual, na regulação do pH pela presença da enzima anidrase carbônica contida nessas células gliais. Além disso, Nagy & Rash (2000) descreveram que os astrócitos são responsáveis por formar barreiras estruturais nas superfícies vasculares, por envolver elementos neuronais e separar regiões de composições iônicas diferentes ou flutuantes, de forma a compartimentalizar fisiológica e metabolicamente grupos de neurônios do SNC.

Constatinescu et al. (2005) afirmaram que existem evidências que os astrócitos funcionam de maneira semelhante aos macrófagos, sendo capazes de atuar como células apresentadoras de antígenos. Como moduladores da função imune, os astrócitos são induzidos a expressar ou secretar certas moléculas que contribuem e facilitam a reação imune. Outro ponto importante que pode ser

ressaltado, segundo Graça et al. (2011), é que devido a ausência de matriz fibrosa no SNC, os astrócitos são encarregados de realizar o reparo tecidual através da cicatriz glial ou o revestimento de cavidades císticas. A cicatriz glial consiste na proliferação de processos astrocitários profusos em GFAP que preenchem o espaço deixado por neurônios desaparecidos (gliose isomórfica). Os astrócitos encontrados nesses locais são chamados de reativos e mostram marcada expansão dos processos.

2.5.2.3 Microglia

A microglia foi descrita primeiramente por Del Rio-Hortega em 1932. Utilizando o método da impregnação pela prata no cérebro em desenvolvimento, foi identificada uma classe de células cujo aspecto morfológico variava de redondo a estrelado, e que foi denominada de microglia, para que fosse diferenciada dos outros componentes da glia. Também propôs para a micróglia uma origem mesodérmica possivelmente derivada de um precursor da medula óssea (BONDAN; SANCHEZ, 2011). Atualmente a maioria dos pesquisadores concorda com a idéia de que a microglia origina-se da medula óssea, a partir de células mononucleares que adentram o parênquima cerebral durante a embriogênese (AUSTYN; GORDON, 1891; FABER; KETTENMANM, 2005).

Streit (1995) ressaltou em sua pesquisa que as células microgлияis podem apresentar três aspectos distintos no cérebro adulto: micróglia em repouso ou ramificada, presente no sistema nervoso central, livre de processos patológicos; ativada ou reativa, com ramificações citoplasmáticas mais espessas e evidentes, encontrada em processos patológicos e não fagocítica; fagocítica ou amebóide, caracterizada por uma forma mais arredondada.

Bondan & Sanchez (2011) afirmaram que essas células são consideradas pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário e retém um número de propriedades semelhantes aos dos macrófagos, tais como fagocitose, expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classes I e II, e produção de ânions superóxido. Além de possuir capacidade citotóxica, a micróglia também pode participar da citotoxicidade anticorpo-dependente via receptores Fc (FcR) e da endocitose mediada por complemento.

Ainda, para autores como Bondan & Sanchez (2011), Giulian (1995), Velder et al., (1994) e Streit (1995), estas células encontram-se associadas a diversos

processos patológicos que incluem as doenças demielinizantes, como a esclerose múltipla, processos degenerativos, como a doença de Alzheimer, traumas, epilepsia e síndrome da imunodeficiência adquirida.

Neste aspecto, as ações da micróglia nos processos lesivos ao sistema nervoso central são amplamente estudadas. Gehrmann & Kreutzberg (2005) e Bondan & Sanchez (2011) mostraram que a microglia responde a injúria antes de qualquer tipo celular, sendo a ativação microglial pode preceder as alterações patológicas ou ocorrer na ausência de alterações neuropáticas evidentes, onde estas células respondem rapidamente mesmo a sutis alterações em seu microambiente.

Para Giulian et al. (1989), os sinais que iniciam a reatividade microglial são discutíveis. A presença de debris neuronais, coágulos sanguíneos e células mortas são os sinais mais potentes para a ocorrência de microgliose reativa. Dias após alguma agressão no SNC, a micróglia ramificada passa a apresentar retração de seus processos, migra para as áreas que possuem debris teciduais e se envolve em um grande processo fagocítico. A densidade de receptores de membrana aumenta rapidamente e constitui uma das primeiras alterações observadas nas células reativas. Durante tal ativação, ocorre, inicialmente, hipertrofia das ramificações citoplasmáticas, embora a micróglia não se torne ainda fagocítica. Posteriormente, a micróglia adquire a forma amebóide, sugerindo retorno a sua forma original durante a vida embrionária.

Nas lesões traumáticas de SNC em que há dano vascular e, portanto, ruptura da barreira hematoencefálica, tanto as células polimorfonucleares como os monócitos são recrutados. A micróglia da região lesada torna-se também bem ativada, assemelhando-se fenotipicamente aos macrófagos. Além disso, ocorre reação positiva (*up regulation*) dos antígenos macrofágicos na micróglia ativada. Além de sua participação na remoção dos debris celulares, a micróglia ativadas e as células inflamatória participam do estabelecimento da homeostase local, particularmente da restauração da barreira hematoencefálica (GRAÇA et al., 2011).

2.5.3 Gliose Reativa

Caracteriza-se por resposta hipertrófica e hiperplástica das células a muitos tipos de lesões cerebrais (NEARY et al., 1996). O estudo das lesões do SNC revestese de uma enorme importância clínica, pois em várias doenças ocorre a morte neuronal

e a conseqüente reação glial, como por exemplo doenças degenerativas, como o mal de Alzheimer, as doenças neoplásicas, certos tipos de epilepsia e isquemia, entre outros (LENZA et al., 1997). A gliose reativa parece ter duas funções principais, que são isolar e ocupar o local lesionado e permitir o crescimento e o estabelecimento funcional das sinapses.

Em astrócitos esta reação é caracterizada por um aumento da proliferação das células da astroglia e hipertrofia astrocítica que se caracteriza por estelação e aumento da expressão de GFAP ("glial fibrillary acidic protein"). Além disso, purinas também exercem efeitos tróficos em neurônios e aumentam os efeitos de neurotrofinas e pleiotrofinas (NEARY et al., 1996).

Alguns estudos em astrócitos têm demonstrado que os nucleotídeos e nucleosídeos, juntamente com fatores de crescimento, têm uma função nos mecanismos de reparo cerebral após trauma e isquemia, quando estes compostos são liberados em grandes quantidades pelo tecido lesionado ou morto. Após uma lesão celular, grandes quantidades de ATP podem ser liberadas no espaço extracelular pois a concentração interna do ATP está entre 3–5 mM (ZIMMERMANN, 1994).

Neary et al., (1994) demonstraram que interações sinérgicas entre fatores de crescimento, particularmente bFGF, e ATP extracelular levaram a um aumento da mitose em astrócitos e outras células. Hindley et al., (1994) e Franke et al., (1999), mostraram que a ativação de receptores P2Y induz à estelação em astrócitos, e aumenta o seu conteúdo de GFAP em astrogliose reativa. Também Neary et al., (1996) demonstraram que a adição de ATP, ou análogos do ATP, a culturas de astrócitos reproduziu estas reações de gliose, já que astrócitos reativos são caracterizados pela geração e alongamento de processos astrocíticos pelo aumento do conteúdo de GFAP e em alguns casos pelo aumento da proliferação celular. Como citado acima, o aumento da GFAP é um componente importante na gliose reativa. Segundo Toda et al. (1999), a superexpressão de GFAP em astrocitomas C6 de ratos altera o fenótipo morfológico e superexpressa o crescimento celular. De fato, as culturas de células 9L de glioma de ratos, quando submetidas à lesão mecânica (ferimento por raspagem) e/ou uma lesão química (CdCl₂) manifestam mudanças as quais são características de astrogliose. Tais mudanças incluem hipertrofia celular e aumento em imunomarcagem para os marcadores proteicos de astrócitos, GFAP e

anticorpo J1-31. A mitocôndria também aumenta de tamanho e número, e o retículo endoplasmático expande sua área (RIDET et al., 1997).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar a regeneração do epitélio olfatório, bem como a função olfatória de ratos submetidos a ablação cirúrgica do bulbo olfatório, mediante utilização de terapia celular;

3.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver técnica experimental de bulbectomia em ratos;
- Verificar se células-tronco provenientes do epitélio olfatório de ratos são capazes de restaurar células do tecido nervoso lesionado do bulbo olfatório de ratos *in vivo*;
- Realizar avaliação da função olfatória de ratos submetidos a lesão bulbar e tratados com células tronco do epitélio olfatório;
- Avaliar imunohistoquimicamente a presença de células tronco do epitélio olfatório de ratos em material coletado do local lesionado;
- Contribuir com o estudo da terapia celular com novos elementos para o conhecimento os quais possam ser utilizados e aplicados em modelos animais e humanos.

4 MATERIAL E MÉTODO

Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios de cuidados com animais de laboratório de acordo com a lei nº 6638 da República Federativa do Brasil que trata de normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (BRASIL, 1979), e com as normas da Comissão de Bioética

da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo 2319/2011).

4.1 ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO CELULAR

4.1.1 Obtenção e cultivo das células-tronco EOR

Foram utilizados 03 ratos Wistar com idade de 60 dias de idade oriundos obtidos do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-USP. Os animais foram contidos fisicamente e anestesiados com maleato de midazolam (2mg/kg) e cloridrato de cetamina (50mg/kg) via intraperitoneal (IP). Após anestesia dissociativa os animais foram submetidos à overdose de Tiopental Sódico (IP) na dose de 100mg/ Kg. Em seguida foi realizada excisão da cabeça e remoção de pele e pelos, com higienização em água destilada para remoção de componentes sanguíneos e impurezas, para evitar possíveis contaminações. O protocolo de isolamento e cultivo segue o mesmo protocolo utilizado por Alves et al (2010), para células do EO de cães. Então, no fluxo laminar realizou-se o acesso a região da cavidade nasal e do epitélio olfatório através de corte sagital do crânio. Foram então coletados fragmentos do epitélio olfatório e depositados em placa de Petri, com lavagem sequencial com PBS acrescido de penicilina-estreptomicina a 3% (Invitrogen, Cat. Nº 15140-122) para remoção dos elementos contaminantes durante cinco minutos para cada lavagem. Após este processo, realizaram-se sucessivas lavagens com PBS, e em seguida prosseguiu-se com dissociação química com 1mL de Tripsina Tryple Express (Invitrogen, Cat. No 12604), durante 5 minutos, associada a dissociação mecânica, no intuito de otimizar o processo de liberação das células olfatórias a partir dos fragmentos teciduais. Após esse procedimento de dissociação, o material foi incubado em estufa a 37° C e 5 %CO₂ por 15 minutos. Após, as células foram centrifugadas e incubadas em meio de cultivo (82% de DMEN-F12 (LGC, Cat. No BR-30004-05), 15% de soro fetal bovino (Hyclone, Cat. No SH30070-03), 1% de L-glutamina (Sigma, Cat. No G7513), 1% de Penicilina-Estreptomicina (Hyclone, Cat. No SH40003-12), e 1% de MEN NEAA (Invitrogen, Gibco, Cat. No 11140)).

4.1.2 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT

O ensaio foi realizado a cada 48 horas durante 10 dias para análise da proliferação celular das células do epitélio olfatório (EOR) de ratos Wistar. Foram plaqueadas em placas de 96 wells em um volume de 100µL/poço para cada dia de experimento, aproximadamente 1×10^3 células. O meio de cultura foi removido diariamente e as células foram lavadas com 100µL/poço e adicionou-se 100µl de solução de MTT (1 mL de MTT 5mg/mL em 10 mL meio de cultivo contendo 1% de SFB). Essa solução foi incubada por 3 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período, o formazan foi precipitado a 1000 rpm durante 10 min, solubilizado em 50 µl de DMSO, e em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm. Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

4.1.3 Imunocitoquímica EOR

Foram plaqueadas 1×10^4 células em placas de cultivo de 3mm de diâmetro, as quais continham uma lamínula de vidro. Em seguida, após 48 horas, todo o meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas com PBS por 2 vezes de 5 minutos. Posteriormente, as células foram fixadas com metanol por 5 minutos em freezer. Então, as células foram lavadas em solução de TBS (Tampão Salino de Tris) por 2 vezes, durante 5 minutos para a retirada de todo o metanol. Adicionou-se Triton a 0,1% em uma quantidade que cobrisse toda a superfície da lamínula por 10 minutos, no intuito de permeabilizar a membrana celular. Lavaram-se novamente as células 2 vezes com solução de TBS por 5 minutos. No intuito de evitar reações inespecíficas, utilizou-se solução de BSA durante 30 minutos e após este período, as células foram incubadas “overnight” a 4°C com anticorpo primário, diluídos em PBS na proporção de 1:50. Após esse período, as células foram lavadas durante cinco minutos com TBS por 3 vezes. Então, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com Texas-Red, anti-goat conjugado com FITC e anti-mouse IgG conjugado com FITC (AP308F, Chemicon International, Temecula, CA, USA) na diluição de 1:100 por uma hora em câmara escura. Lavaram-se novamente as células com TBS por 3 vezes durante 5 minutos, seguida de lavagem em água destilada, e montagem posterior com solução de montagem Vectashield com DAPI (ABCYS, Paris

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

4.1.4 Citometria de fluxo

Realizou-se a citometria de fluxo utilizando o FACSCalibur (BD) com um laser azul (488 nm). Para esta etapa, seguiu-se com a tripsinização, centrifugação 400G por 5 minutos e ressuspensão em PBS das células na concentração de 1×10^5 células/mL, e incubação com 1ml dos anticorpos, Vimentina, OMP, Nanog, anti-stro 1, anti CD 133 e anti CD 117, na diluição de 1:100 por 45 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, lavaram-se e incubaram-se novamente células com anticorpo secundário conjugado com FITC DAKO, na diluição de 1:100 por 30 minutos protegidos da luz. Após esse período as células foram lavadas e analisadas pelo citômetro de fluxo.

4.1.5 Transdução das células-tronco do epitélio olfatório com lentvírus carreando o gene EGFP

Uma alíquota de cada extrato viral, produzidos a partir da célula HEK 293T foram descongelados e receberam polibreno. Essa substância foi utilizada para redução da tensão superficial que viabiliza a infecção das células em cultivo com os lentvírus. O meio de cultivo das placas com células tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar foi descartado e adicionado o extrato viral juntamente com 1mL de meio novo em cada placa. A partir de 48h adicionou-se blasticidina, um antibiótico de seleção que é tóxico para células eucariontes visto que inibe sua síntese de proteínas. O vírus possui resistência a blasticidina, de modo que toda célula infectada não foi destruída. Esse tratamento com antibiótico foi realizado por aproximadamente 10 dias com administração da blasticidina de 3 em 3 dias, para eliminação completa de células não infectadas. Ao final do décimo dia o meio de cultivo era trocado e observou-se o início da multiplicação das células transgênicas em cultivo. A análise da expressão do gene exógeno GFP foi realizada mediante a exposição das células em cultivo com um feixe de luz polarizada.

4.1.6 Análise do potencial tumorigênico das células obtidas a partir do epitélio olfatório de ratos (EOR)

Após o estabelecimento das culturas celulares do epitélio olfatório de rato, foi avaliada a capacidade de formação de tumores previamente aos protocolos de terapia celular. Para tanto, aproximadamente 1×10^6 células foram aplicadas pela via intramuscular no membro pélvico esquerdo de três camundongos imunossuprimidos nude. Inicialmente, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas seguindo protocolo de repique celular, seguindo de centrifugação por 5 minutos a 1200 rpm e novamente lavadas com PBS. Essa lavagem foi repetida por 2 vezes com o intuito de remover todos os traços de soro. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensionado em 50 µl de solução fisiológica e aplicado nos camundongos com o auxílio de uma seringa de insulina.

A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada durante seis semanas a doze semanas com verificação semanal da presença de formação tumoral. Ao final deste período, os camundongos foram eutanasiados seguindo as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa da FMVZ-USP e seus órgãos serão submetidos à análise macro e microscópica utilizando protocolos histológicos de rotina.

4.2 TÉCNICA CIRÚRGICA EXPERIMENTAL DE ABLAÇÃO DO BULBO OLFATÓRIO – BULBECTOMIA

Foram utilizados 21 ratos machos, com 60 dias de idade, os quais foram divididos em dois grupos: G1 – controle (cinco animais), e G-2 - animais bulbectomizados, os quais posteriormente foram divididos em quatro grupos experimentais os quais foram transplantados com células tronco do EOR, a saber: GI, tratados após três dias; GII, tratados após sete; GIII, tratados após 14 dias e GIV, tratados após 21 dias após bulbectomia.

A técnica cirúrgica de bulbectomia consistiu em procedimentos pré-operatórios e cirúrgicos, tais como: jejum alimentar de duas horas e pré-anestesia com maleato de midazolam (2mg/kg) e cloridrato de cetamina (50mg/kg) via intraperitoneal (figura 2A) e anestesia geral inalatória com isofluorano (figura 2C). Como terapia profilática antibiótica, administrou-se enrofloxacin (10mg/kg/IM) durante 7 dias e

morfina (2mg/kg/IM) como terapia analgésica. Após os procedimentos anestésicos, tricotomia e procedimentos padrões de antisepsia, os animais foram posicionados em decúbito esternal, e em seguida, a pele, tecido subcutâneo e periósteo foram removidos, em duas incisões, uma vertical, no plano mediano, e outra horizontal, estendendo-se dorsalmente às margens laterais dos olhos, unindo-se as incisões no plano mediano em formato de “T”. Realizou-se então, a craniotomia, com o auxílio de um dril pneumático com uma abertura em janela de formato ovalado. Sequencialmente, os bulbos olfatórios foram removidos mediante aspiração. Esta técnica foi adaptada a técnica proposta por Fonseca et al., (2006) para coelhos.

Os animais do grupo controle foram observados por um período de 30 dias, onde passaram por avaliação clínica diária, tanto para observação dos resultados da técnica cirúrgica e tratamento experimental, quanto para avaliação de dor. Após o pós-operatório, os seguintes parâmetros foram analisados: percepção e repulsa a odores e repulsa ao odor do gato. Ressalta-se que estes animais foram mantidos em gaiolas individuais, onde a estes eram oferecidas a mesma quantidade de ração e água diária. Além disso, sempre após a troca e limpeza das gaiolas, a quantidade restante de ração e o material da cama destes animais era pesado, no intuito de verificarmos a quantidade do consumo de alimentos (ração), assim como a quantidade de excretas para fins de observância de conversão alimentar.

Constatada a anosmia, e seqüencialmente ao período experimental, os mesmos foram eutanasiados, mediante anestesia com 50 mg/kg de cloridrato de quetamina e 2 mg/kg de maleato de midazolam por via intraperitoneal, e após 15 minutos, foi administrada overdose de tiopental sódico (100mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida os animais foram fixados em solução de paraformol a 4%, e após período de 48 horas a cavidade nasal e craniana foram dissecadas, objetivando a análise macroscópica do epitélio olfatório principal e bulbo olfatório, assim como a da lesão causada pela ablação do bulbo olfatório. Consequentemente, realizou-se a colheita de fragmentos do rinencéfalo e das áreas lesionadas pela bulbectomia para a avaliação macroscópica e histopatológica das lesões causadas pela técnica cirúrgica experimental.

4.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO OLFATÓRIO: MODELO DO ODOR DE GATO

O modelo do odor de gato foi utilizado como ferramenta experimental chave para a avaliação das respostas comportamentais em nossos estudos. Este modelo, proposto inicialmente por Blanchard & Blanchard (1989), foi adaptado por Dielenberg et al. (1999).

Os ratos foram expostos a duas condições de odor: de gato ou neutra. Todos os odores empregados neste experimento foram coletados em pedaços de tecidos (18 x 22 cm) retirados de uma mesma toalha de algodão de cor branca. O odor de gato foi obtido esfregando vigorosamente por cinco minutos um pedaço de tecido umedecido contra os pêlos de um gato doméstico (macho, sem raça definida, com cinco anos de idade e 4 kg). Esse procedimento foi realizado uma hora antes da sessão experimental. O tecido impregnado com o odor de gato foi mantido em um saco plástico vedado até o início dos experimentos. Cada tecido com o odor de gato foi utilizado em apenas quatro sessões contínuas de exposição. Para o teste com o odor neutro, também foi utilizado um pedaço de tecido umedecido, só que sem contato com gatos.

Os experimentos foram realizados em uma sala pequena com luz fraca e a exposição ao odor neutro procedeu à exposição ao odor de gato para evitar traços de odor de gato no grupo neutro. Antes da primeira exposição ao odor de gato, o pano impregnado foi deixado por dez minutos na sala teste. Os testes foram realizados sempre entre às 8h00 e 10h00.

Os animais foram expostos individualmente aos odores em gaiolas-moradia, iguais as anteriormente citadas, com uma tampa de acrílico transparente substituindo a tampa metálica, para facilitar a visualização do comportamento animal. Esta tampa possuía furos para permitir a respiração do animal, assim como um compartimento opaco (caixa rasa de polipropileno), no mesmo lado que a alimentação ficava na tampa acrílica (Figura 2). Esse compartimento servia de abrigo para o animal. A altura entre o assoalho e a tampa era de 16 cm. Os animais foram expostos em suas gaiolas-moradia à tampa de acrílico nos dois dias anteriores ao teste, por um período de dez minutos cada, com o intuito de habituá-los ao aparato.

Imediatamente antes da exposição ao odor de gato, dois ratos, um do grupo controle e um do grupo experimental, foram retirados do biotério e carregados em

gaiolas-moradia até a sala do teste. As duas gaiolas-moradia foram então colocadas lado a lado e um tecido com odor de gato foi colocado entre as duas gaiolas, na extremidade oposta aos compartimentos de abrigo. Cada sessão de exposição durou cinco minutos e foi registrada por uma câmera de vídeo localizada no teto da sala experimental. As gravações foram analisadas posteriormente. Para cada rato, foram avaliados o número de vezes que estes entraram em contato com o tecido (contato físico direto ou a partir de uma distância menor ou igual a cinco centímetros do tecido), o tempo gasto em contato com o tecido, o número de vezes que os animais entraram no compartimento de abrigo, e o tempo gasto sob o abrigo.

O comportamento dos animais foi registrado através da observação dos animais bulbectomizados e tratados. Os animais bulbectomizados foram expostos ao teste, no 1º, 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-bulbectomia. Os animais tratados foram observados de acordo com o seu grupo experimental. Os animais do G1 (tratados pós 3º dia de bulbectomia) foram submetidos ao teste nos dias 3, 7, 14 e 21 pós-terapia. A mesma observação, com mesma logística foi realizada nos demais grupos. Durante as análises comportamentais, dois parâmetros do teste foram avaliados: o número de vezes que os animais entram em contato com o tecido impregnado com o odor de gato e o tempo gasto sob o abrigo.

Após a bulbectomia, os animais foram avaliados diariamente, a partir do 2º dia, quanto aos parâmetros comportamentais de agressividade e irritabilidade, locomoção e comportamento exploratório, comportamento alimentar e sono. Ressalta-se que estas avaliações tiveram caráter qualitativo e não quantitativo, uma vez que o objetivo desta avaliação foi de constatar a ausência da função olfativa, o que consequentemente altera aos parâmetros comportamentais das variáveis supracitadas.

Figura 2 – Esquematisação do aparato utilizado para avaliação comportamental mediante teste do odor de gato

Fonte: Adaptado de MONTE (2006).

Legenda: Figura A e C, a observação das aproximações, tempo de aproximação e cruzamentos. Em B e D, no compartimento fechado se o animal fica escondido e o tempo escondido.

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA LESÃO CAUSADA PELA BULBECTOMIA

A técnica de microscopia de luz foi empregada a fim de caracterizar histologicamente as lesões causadas no rinencéfalo e áreas adjacentes a área objeto da bulbectomia.

Após a eutanásia dos animais, os fragmentos do rinencéfalo foram previamente fixados em formol 10% ou paraformaldeído 4%. Após a fixação o material foi lavado em Tampão fosfato ou Água destilada para retirar o fixador, seguido de desidratação em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%), pelo período de 1 hora em cada, diafanizado em xilol, 2 horas e em seguida os cortes foram embebidos em similar de parafina (Histosec[®] - MERCK, lote K91225309) (TOLOSA et al., 2005).

Os blocos foram submetidos a microtomia em micrótomo automático (Leica, RM2165) obtendo-se cortes de 5 μ m. Os cortes foram aderidos em lâminas

histológicas e deixados em estufa a 60°C. Após serem desparafinizados os cortes foram corados seguindo a técnica de Hematoxilina e Eosina – HE (LILLIE and FULMER, 1973; TOLOSA et al., 2005). Em seguida o material foi analisado e as características morfológicas encontradas fotodocumentadas.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA DOS ANIMAIS BULBECTOMIZADOS SUBMETIDOS A TERAPIA CELULAR

Para a identificação da Proteína Verde Fluorescente (GFP) e da expressão de Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) na área encefálica submetida a bulbectomia e tratada com células tronco do EOR, foram utilizados os anticorpos anti-GFP (Living colors GFP Monoclonal Antibody – Clontech, cat.# 632375) e anti-GFAP (Ac monoclonal de cam anti-GFAP clone 6F2, DBS). Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em série decrescente de etanol. Em seguida, foram fervidos em tampão citrato em forno micro-ondas (0,384g de ácido cítrico monohidratado; 2,352g de citrato sódio tribásico diidratado; 1L de água destilada, pH6,0) por 5 minutos para desmascaramento dos antígenos.

O volume foi completado e o processo era repetido por mais três vezes, em seguida, em temperatura ambiente, os cortes eram resfriados por aproximadamente 30 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena fez-se incubação com solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em tampão Tris-HCl 1M, pH 7,5 (TBS, 60,57g de Tris para 500mL de água ultrapura) por 30 minutos, seguida de tripla lavagem em tampão TBS. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com solução soro de cabra a 10% em TBS por 30 minutos. A diluição do anticorpo primário foi de 1:100 em tampão TBS com 1% de soro de cabra, sua incubação foi em câmara úmida e escura em geladeira (4°C) de um dia para o outro. Para cada reação positiva realizou-se duas reações controle, sendo uma utilizando anticorpo anti-IgG de camundongo diluído na proporção 1:100 em TBS acrescido de 1% de soro de cabra e outra utilizando apenas o tampão de diluição do anticorpo.

Após a incubação com o anticorpo primário seguiu-se lavagem tripla com TBS adicionado de 1% de soro de cabra. A incubação do anticorpo secundário (Dako-advance) sob as mesmas condições de incubação anterior e também seguida de lavagem tripla em TBS acrescido de 1% de soro de cabra. Para amplificação do sinal os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-horseadish peroxidase

(Dako-advance) sob as mesmas condições de incubação e lavagem. A revelação foi realizada com DAB por no máximo 1 minuto e foi interrompida com lavagem em água destilada. Para finalizar os cortes foram fracamente corados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados.

4.6 TERAPIA CELULAR DOS ANIMAIS ANÓSMICOS COM CÉLULAS TRONCO DO EOR

Após o período experimental, os animais foram e pré-anestesiados com maleato de midazolam (2mg/kg) e cloridrato de cetamina (50mg/kg) via intraperitoneal e anestesiados (anestesia geral inalatória) com isofluorano. Após os procedimentos anestésicos, tricotomia e procedimentos padrões de antissepsia, os animais foram posicionados em decúbito esternal, e em seguida, a pele, tecido subcutâneo da região frontal, no mesmo local de realização da bulbectomia foram removidos e pela abertura do crânio causada pela cirurgia, as células tronco (1×10^6) oriundas do EOR foram injetadas no local de lesão destes animais (Figura 3).

Figura 3– Terapia celular com células tronco EOR – Transplante celular

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Figura A e B – transplante celular com células tronco do EOR. Aplicação das células em local da lesão experimental após procedimentos cirúrgicos e anestésicos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de tempo de permanência no abrigo (escondido) e número de contato com o tecido impregnado com o odor de gato, que apresentaram distribuição normal foram comparados entre os grupos, pela análise de variância para fator único (one way ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. O nível de significância ($p < 0,001$) foi considerado suficiente para demonstrar diferenças significativas em todos os dados analisados.

5 RESULTADOS

5.1 ABLAÇÃO DO BULBO OLFATÓRIO EM RATOS – BULBECTOMIA

A utilização das órbitas como referência anatômica para a craniotomia transfrontal demonstrou ser adequada para a localização e acesso ao bulbo olfatório (BO). A técnica operatória se mostrou efetiva e de fácil execução, com um tempo cirúrgico que variou de 30 a 40 minutos por animal. A realização da intervenção cirúrgica preliminarmente em seis ratos, para a padronização da técnica, com necropsias realizadas posteriormente, demonstrou que o tecido do BO foi removido pelo procedimento, o que foi suficiente para causar a anosmia nos animais. A remoção do BO resultou em uma cavidade alongada, situada entre a lâmina crivosa do osso etmóide e o encéfalo (Figura 4).

Os BO de ratos possuem forma elíptica a ovalada (definida pela cavidade onde se encontram alojados) e são constituídos de tecido de aspecto gelatinoso, que se fragmenta facilmente ao ser manipulado ou contido por pinças ou outros instrumentais cirúrgicos. Por isso, optou-se pela aspiração do tecido, utilizando-se uma sonda uretral acoplada a um aspirador. Pela utilização da sonda também se evitou efetuar uma abertura maior na caixa craniana, pois além de resultar em trauma menor, facilitou a manipulação e cicatrização pós-cirúrgica. A abertura limitada realizada com a broca sulcada de 3mm de diâmetro, foi suficiente para a introdução da sonda e aspiração do BO.

O período pós-operatório decorreu sem maiores ocorrências. Um animal removeu a sutura de pele no terceiro dia de pós-operatório, tendo a cicatrização ocorrida por segunda intenção. Nos animais restantes, a sutura de pele foi removida no décimo dia de pós-operatório. Neste período de pós-operatório, estes animais foram avaliados clinicamente e diariamente. Ressalta-se que terapia analgésica e antiinflamatória ocorreram durante todo esse período. Nenhum animal evidenciou sinal de dor ou desconforto como apatia, inapetência ou hipersensibilidade na ferida cirúrgica; o consumo de ração ficou levemente aumentado, o mesmo sendo observado com relação ao consumo de água. Foram observadas alterações de comportamento como excitabilidade, notado pela hiperestimulação das vibrissas e agressividade, evidenciado pelo comportamento de ameaça, ataques reais ao manipulador e mudança postural do animal. Foi observada alteração de seletividade

alimentar, com os animais bulbecomizados alimentando-se de pedaços de papel, maravalhas e panos cirúrgicos utilizados para forrar as gaiolas. Por essa razão, no presente experimento, evitou-se deixar qualquer material ao acesso dos animais, com exceção do alimento e água.

Figura 4 – Técnica cirúrgica experimental (bulbectomia). Procedimentos pré-cirúrgicos, cirúrgicos e pós-cirúrgicos

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: A - Procedimento Pré-anestésico com administração de cloridrato de ketamina e midazolam via intraperitoneal. B – Tricotomia da região de crânio e face. Observar Incisão horizontal sob a linha mediana entre as margens mediais dos olhos para a realização da ablação do

bulbo olfatório.. C – Remoção da pele e musculatura do crânio e acesso ao periósteo. D – Início da craniotomia. E – Ablação do bulbo olfatório. F - sutura de pele após término da cirurgia. G – administração de solução de glicose 10% VO após término da cirurgia. H – Comportamento do animal após recuperação anestésica pós-cirurgia

5.1.1 Análise histológica das lesões causadas pela bulbectomia

Alterações encontradas nas lesões são caracterizadas pela presença da gliose reativa, a qual se caracteriza pela resposta hipertrófica e hiperplástica das células gliais devido a lesão neuronal, na da área pré-frontal do sistema nervoso central. Essa reação glial ocorre como consequência a morte neuronal, em virtude da necrose causada pela bulbectomia experimental.

Nas lesões observadas pela técnica de bulbectomia em ratos winstar, podem ser evidenciadas as células da glia isolando e ocupando o local lesionado, o que teoricamente teria que permitir o crescimento e o estabelecimento funcional das sinapses. Em todos os animais bulbectomizados, podemos observar a presença de extensas áreas de necrose, e infiltração de células mononucleares, macrófagos impreganos com hemosiderina e a presença marcante de vacúolos nessas áreas. Ainda, em determinadas áreas de lesão experimental, pode-se verificar a presença de cicatriz glial, com formação de áreas de neocavidade (Figura 5).

Figura 5 – Aspecto histológico das Lesões experimentais induzidas pela Bulbectomia (HE)

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Animal 1 - A, B, C e D; Animal 2 - E, F, G e H. Em A e B - Local da lesão experimental, (área prefrontal), onde se observa infiltração de células mononucleares (seta amarela). Notar a presença de áreas de necrose na área periférica a lesão. Em C e D - Observar a presença

de macrófagos carregados de hemosiderina (seta preta). Aumento: 10x, 20x, 40x e 40x, respectivamente. Em E e F – Observar áreas de necrose tecidual (seta). Em F e G, observar a formação de neocavidade (seta vermelha) no tecido lesionado. Em H – presença de macrófagos carregados com hemosiderina (círculo), além de presença de vacuolos na área pré-frontal. Aumento: 10x, 10x, 20x e 40x, respectivamente.

5.2 CULTIVO DAS CÉLULAS DO EPITÉLIO OLFATÓRIO DE RATOS, ANÁLISE DA ATIVIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT, ANÁLISE POR IMUNOCITOQUÍMICA E CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS EOR E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS TRONCO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO DE RATOS WISTAR EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDO NUDE

O material foi coletado respeitando o intervalo de tempo de até três horas pos mortem. As células isoladas foram colocadas em cultura após tratamentos diferenciados de dissociação, uma química com Tripsina e uma mecânica com auxílio de bisturi. Os tratamentos promoveram desagregação celular, uma vez que demonstrou um grande número de células em suspensão quando observado em microscópio de luz invertida. Os fragmentos oriundos da dissociação mecânica foram colocados em cultura como explantes celulares, sob as mesmas condições das células isoladas.

A primeira avaliação realizada vinte quatro horas após o início do cultivo, não se observou material contaminante como bactérias, fungos ou leveduras e também não foi verificado início de adesão celular. Nas garrafas onde foi realizado tratamento com Tripsina a 0,25%, inúmeras células ainda eram vistas em suspensão, associado a isso grande número de células mortas.

As células em cultivo foram analisadas periodicamente, e após oito dias de cultivo, foi observada a presença de pequenas colônias celulares aderidas. Observou-se também que os fragmentos evidenciaram liberação de células em todos os pontos da garrafa, onde estes se encontravam aderidos, já sendo possível observar algumas células aderidas ao fundo da garrafa e nas proximidades do fragmento.

Foram observadas células do epitélio olfatório de múltiplos aspectos morfológicos, que envolvem células arredonadas com rico citoesqueleto e outras células de formato fibroblastóide. Prevaleceu assim a homogeneidade das colônias, as quais em sua maioria, eram predominantemente compostas por células com característica fibroblastóide, subdividindo-se entre células de maior e menor volume

(Figura 6). Após 20 dias de cultivo, já se observava predominância de um tipo celular específico, composto por células de menor volume e de formato fibroblastóide em toda cultura.

As trocas de meio foram realizadas a cada três dias, na dependência da confluência das garrafas, de forma a preservar as características iniciais da cultura primária, evitando-se assim a diferenciação das células. Ao atingirem um grau de confluência de 70% ou superior a esse valor, ou ainda se demonstravam tendência para diferenciação, realizou-se o procedimento de tripsinização para expansão celular.

Figura 6 - Fotomicrografias do cultivo de células-tronco de epitélio olfatório de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Em A – Cultura primária das células de epitélio olfatório de rato com tendência a formação de colônias. B – Cultura de células tronco do epitélio olfatório de ratos em P3; C - Células apresentando grau de confluência superior a 70%, um indicador da necessidade de repique das células; D - Células desprendidas da placa após ação enzimática da Tripsina, durante o procedimento de repique. Aumento de 4x em a, b e c; 10x em d.

Quanto a análise da atividade celular pelo método colorimétrico MTT verificou-se que as células oriundas do epitélio olfatório de ratos possuem um crescimento nos primeiros dias de cultivo e que com o passar dos dias esse crescimento decaia como esperado (Figura 7). A população total de células tronco EOR apresentou crescimento progressivo e não constante até a quinta passagem e entre a sexta e sétima passagem, as células apresentaram um período estacionário. O pico de crescimento celular foi observado na sétima passagem e na décima passagem iniciou-se um processo de declínio acentuado.

Figura 7 - Gráfico da análise da proliferação celular das células de epitélio olfatório de ratos Wistar

FONTE: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Crescimento exponencial até a sétima passagem e declínio acentuado a partir da décima passagem.

A análise por imunocitoquímica demonstrou que as células tronco oriundas do EOR foram caracterizadas pela expressão dos anticorpos de marcação positiva do citoesqueleto celular, como a β -tubulina III, marcação positiva para o citoplasma celular como OMP e GFAP e Vimentina, e marcação positiva para os marcadores nucleares como o OCT-4 e o Nanog. Essa marcação permitiu identificar a morfologia dessa população celular, quando comparados ao controle utilizado na imunomarcação (Figura 6).

Mediante análise por citometria de fluxo, as células tronco oriundas do EOR foram caracterizadas pela expressão do CD113, CD117 e STRO-1 (proteínas de membrana), Vimentina, Nanog e OMP. Através dessa análise foi verificado marcação

negativa para os três primeiros marcadores, enquanto que para a Vimentina, Nanog e OMP foi observada positividade para essas proteínas (Figura 8).

Figura 8 – Análise por imunocitoquímica e citometria de fluxo das células tronco EOR

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: À esquerda: A - GFAP, B - OMP, C - Nanog, D - Vimentina, E - OCT-4 e F - β -tubulina III. À direita: Observar marcação negativa para o CD113, CD117 e Stro-1 e marcação positiva para Nanog, Vimentina e OMP

Quanto a análise do potencial tumorigênico das células do EOR, após injeção de 1×10^6 células no membro pélvico esquerdo em camundongos imunossuprimidos NUDE, os mesmos foram avaliados semanalmente durante 60 dias e depois de decorrido esse tempo não foram observadas formações nodulares ou tumorais no local de aplicação. Ainda, ao analisarmos os órgãos coletados: fígado, pulmão, rim e coração, observamos que não houve crescimento metastático tumoral, mostrando a integridade estrutural característica dos órgãos em questão (Figura 9).

Figura 9 - Fotomicrografias dos órgãos analisados pós injeção de células de epitélio olfatório em camundongo NUDE

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Em A, fígado; em B, pulmão; em C, rim; em D, coração. Coloração HE

5.3 TERAPIA CELULAR EM RATOS SUBMETIDOS A BULBECTOMIA E TRATADOS COM CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DO EOR

5.3.1 Avaliação da terapia celular em ratos anósmicos submetidos a bulbectomia experimental e transplantados com células tronco do epitélio olfatório pelo modelo de “odor de gato”

Após bulbectomia, os ratos apresentaram modificações no comportamento, como aumento da agressividade, a qual pode ser evidenciada durante a manipulação dos mesmos, pela presença do comportamento de ataque ou comportamento de ameaça apresentado pelos animais, assim como, um aumento da atividade sensorial,

com a hiperestimulação das vibrissas. Esta alteração pode ser atribuída à tentativa do animal para a percepção tátil, uma vez que o sentido do olfato está ausente nestes animais.

Na análise do teste de odor de gato os resultados mostraram diferenças comportamentais significativas, no que diz respeito a resposta do teste do odor de gato, como o comportamento defensivo, tempo de esconderijo e número de contato com o tecido impregnado com o odor de gatos, entre os bulbectomizados e os animais transplantados com células tronco EOR nos grupos avaliados.

Na familiarização (odor neutro), não foram observadas diferenças comportamentais entre os diferentes grupos (bulbectomizados e transplantados) em nenhum dos parâmetros avaliados no teste do odor de gato. No teste de odor, foram evidenciadas diferenças comportamentais entre os diferentes grupos (bulbectomizado e transplantados) em relação ao comportamento defensivo (número de contato com o tecido impregnado com o odor de gato e o tempo escondido). A análise demonstrou uma diminuição no número de contato com o tecido, bem como um aumento no tempo escondido em relação aos animais bulbectomizados e os transplantados. Pode-se afirmar que o comportamento dos animais bulbectomizados e tratados após 3 e 21 dias são similares, com aumento no número de contato com o tecido e diminuição do tempo escondido, enquanto dos animais transplantados após 7 e 14 dias apresentaram comportamento diferenciado, com diminuição do número de toques no tecido e aumento do tempo escondido, evidenciado aversão ao odor do predador (Figuras 10 e 11).

Estatisticamente, aos 7 e 14 dias os animais permaneceram tempo superior no abrigo, sendo a diferença significativa em relação aos dados avaliados dos animais bulbectomizados e os animais tratados após 3 e 21 dias ($p < 0,001$). Além disso, os animais tiveram menor número de contato com o tecido impregnado com o odor felino aos 7 e 14 dias, sendo a diferença significativa em relação aos demais momentos avaliados ($p < 0,001$).

Figura 10 – Número de contato com o tecido impregnado com odor de gato.

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Bulbectomizados – animais submetidos a bulbectomia experimental mas não transplantados com células tronco EOR. 3dias T – Animais bulbectomizados e transplantados 3 dias pós bulbectomia. 7dias T - Animais bulbectomizados e transplantados 7 dias pós bulbectomia. 14diasT - Animais bulbectomizados e transplantados 14 dias pós bulbectomia. 21dias T - Animais bulbectomizados e transplantados 21 dias pós bulbectomia. $p < 0,001$ (ANOVA de uma via)

Figura 11 – Tempo gasto sobre o abrigo (tempo escondido)

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Bulbectomizados – animais submetidos a bulbectomia experimental mas não transplantados com células tronco EOR. 3dias T – Animais bulbectomizados e transplantados 3 dias pós bulbectomia. 7dias T - Animais bulbectomizados e transplantados 7 dias pós bulbectomia.

14diasT - Animais bulbectomizados e transplantados 14 dias pós bulbectomia. 21dias T - Animais bulbectomizados e transplantados 21 dias pós bulbectomia. $p < 0,001$ (ANOVA de uma via).

5.2.2 Avaliação da terapia celular em ratos anósmicos submetidos a bulbectomia experimental e transplantados com células tronco do epitélio olfatório por análise histológica e imunohistoquímica

Na análise por imunohistoquímica foi verificada marcação positiva para a proteína de citoplasma GFAP (Figura 12). A marcação positiva dessa proteína elucida a hipótese que o tipo de lesão causada pela técnica cirúrgica experimental é a astrogliose reativa. Esse tipo de marcação positiva, foi bastante evidente nos locais distribuídos próximo as lesões. No material analisado dos animais transplantados com células tronco marcadas com GFP foi possível notar a reação positiva confirmando a presença das células tronco nos locais próximos a lesão (Figura 13).

Figura 12 – Fotomicrografias de cortes da área lesionada pela bulbectomia analisados por Imunohistoquímica para GFAP, após transplante celular com células oriundas do EOR

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Em A e B- animais transplantados após 7 dias. Aumento de 10x e 20X. Em C e D – animais transplantados após 14 dias. Aumentos de 20X e 10X. Em A, B e C, – Notar expressão positiva para o GFAP (marcação marrom na periferia da lesão causada pela bulbectomia, indicando a presença de astrogliose reativa. Em D, controle negativo.

Figura 13 – Fotomicrografias de cortes da área lesionada pela bulbectomia analisados por Imunohistoquímica para GFP, após transplante celular com células oriundas do EOR

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Em A e B- animais transplantados após 7 dias. Aumento de 20x e 40X. Em C e D – animais transplantados após 14 dias. Aumentos de 20X e 10X. Em A, B e C, – Notar expressão positiva citoplasmática para GFP (seta preta), indicando a presença de células tronco oriundas do EOR transduzidas pelo eGFP. Em D, controle negativo.

Na análise dos animais transplantados (tratados) por microscopia de luz não foram evidenciadas diferenças relacionadas a regeneração tecidual da região encefálica, em relação aos animais não tratados. Entretanto, de acordo com o teste comportamental do odor de gato, fica claro que uma possível ponte pode estar sendo iniciada o que demonstra uma possível regeneração. O achado histológico mais comum nos animais transplantados foi a presença marcante de células inflamatórias mononucleares, macrófagos carregados com hemosiderina, gliose reativa intensa e presença de discretos maguitos perivasculares (Figura 14). Ainda, em animais transplantados após 21 dias já é possível evidenciar área de cicatrização bem extensa.

Figura 14 – Aspecto histológico das Lesões experimentais induzidas pela Bulbectomia (HE) nos animais transplantados com células tronco EOR

Fonte: (CARVALHO, R. C., 2014)

Legenda: Em A e B- animais transplantados após 7 dias; em C e D – animais transplantados após 14 dias e em E e F- animais transplantados após 21 dias. Coloração HE. Em A – observar a presença marcante de células inflamatórias mononucleares e macrófagos carregados de hemosiderina (seta preta) Aumento 10x. Em B – Evidencia o trajeto da perfuração do parênquima na lesão tecidual causada pela bulbectomia. Aumento 20x. Em C – Notar gliose intensa. Evidencia também a rede capilar e presença de discretos manguitos perivascularares (seta vermelha) Aumento 10X. Em D – Evidenciação de área de cicatrização e gliose

anismótica. Aumento 20X. Em E e F – Observar a gliose reativa e a presença de manguitos perivasculares (seta vermelha). Aumentos de 10 e 40X respectivamente.

6 DISCUSSÃO

Os estudos relacionados ao cultivo de células-tronco receberam atenção especial, desde que foi verificada a capacidade de seu uso, não apenas na pesquisa neurogênica básica, como também pela possibilidade do tratamento de disfunções neurológicas degenerativas, tal como a doença de Parkinson, descrita por Li & Xi (2005) e Zhang et al. (2006). O cultivo de células-tronco a partir do neuroepitélio olfatório, utilizando modelos animais (KRUEDEWIG et al., 2006; OVERALL; ARNALD, 2007), abre precedentes para viabilizar um protocolo que propicie acesso mais fácil a progenitores celulares, capazes de gerar linhagens de caráter neuronal, sem a necessidade de acesso ao Sistema Nervoso.

Neste contexto, é interessante ressaltar alguns aspectos acerca da obtenção, cultivo e caracterização deste tipo celular. Primeiramente, ressalta-se que o protocolo de isolamento e cultivo utilizado em nossa pesquisa segue o mesmo padronizado por Alves et al (2010), para células do EO de cães. Ainda, podemos afirmar que as células oriundas do EOR crescem em monocamada, as quais secretam uma matriz extracelular e proteínas de ligação que permitem adesão das mesmas a superfície de crescimento. Apresentam-se com múltiplas morfologias, e com o aumento no número de passagens, mostram-se como característica morfológica o formato fusiforme semelhante a fibroblastos, sendo essa morfologia celular típica a mesma apresentada por estas células nos trabalhos de Pagano et al. (2000), Jin et al. (2002), Zhang et al. (2005, 2006) e Krudewig et al. (2006). Outro aspecto interessante que pode ser atribuído a estas células, a semelhança do descrito por Murrell et al. (2009) para células tronco olfatórias, é a capacidade de expansão que as células tronco EOR possuem. Estes mesmos autores, a semelhança dos nossos achados também relatam a capacidade de auto-replicação celular durante muitas linhagens. Entretanto, no nosso experimento, podemos observar que as células oriundas do EOR não apresentam alta viabilidade após um número grande de passagens, como demonstrado pelo ensaio de proliferação por MTT. Murrel et al. (2009) observaram uma curva crescente de crescimento e proliferação celular até passagens superiores observadas em nossa pesquisa.

Quando relatamos a característica do isolamento celular e do meio de cultivo para isolamento destas células do EOR o DMEM-F12 foi o meio no qual as células apresentaram maior crescimento. Na literatura especializada em células da mesma

linhagem autores como Au e Roskams (2003); Zhang et al. (2004), Alves et al. (2010) e Wetzig, et al. (2011) também citam este meio como o meio mais adequado para cultivo destas células. Ainda, é interessante ressaltar que todos esses autores relatam que estas células cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 tornam-se confluentes em até duas semanas. Neste ponto, a semelhança do que observado em nossa pesquisa, podemos relatar que entre o período compreendido entre o 7º e o 10º dia após início da cultura, foi verificada confluência celular. Na literatura consultada para esta pesquisa, o trabalho de Zhang et al. (2004), que cultivaram células olfatórias humanas relata que as culturas foram obtidas e visualizadas 20 horas após o início do cultivo, com observância inicial de confluência celular. Diferentemente desta característica, quando esse aspecto é comparado a esta linhagem celular em cães, Alves et al. (2010), estes autores citam que vistas colônias após 24 horas de cultivo as quais demonstram confluência após 5 dias de cultivo.

Se compararmos o cultivo dessa linhagem celular entre humanos (ZAHNG et al, 2006; MACKAY-SIM, 2010) e ratos, outro aspecto é definitivamente diferente. Em humanos, as células do neuroepitélio olfatório quando cultivadas permanecem indiferenciadas, isso levando-se em consideração o meio de cultivo definido. Em ratos, de acordo com nossa pesquisa, podemos caracterizar diferente. Uma vez que a confluência celular fica superior a 70% as mesmas evidenciam um processo de diferenciação celular, onde pode ser observada as células com citoplasma e citoesqueleto com prolongamentos, onde sua morfologia deixa de ser fibroblastóide e torna-se espalhada. Ressalta-se ainda, que quando as células oriundas do EOR apresentavam baixa confluência, as mesmas também evidenciavam modificações no que diz respeito a sua morfologia. Este último aspecto, reafirma que as desta linhagem em ratos necessitam de contato com as outras adjacentes durante a cultura para expandir-se e continuarem a formar colônias. Ainda, por estas características de formação de colônias, podemos acreditar, uma vez que uma das características das células tronco mesenquimais é formação de colônias a partir de uma única célula, que as células do EOR possuem características de células tronco mesenquimais. Este conceito é citado por Friedenstein et al. (1976), Deans; Moseley, (2000), o que nos leva a concordar e aferir esta característica a essa linhagem celular.

No que concerne a caracterização celular, vários marcadores foram utilizados nesse intuito. Nessa linha de raciocínio, nossos estudos corroboram aos trabalhos realizados por Ivaska et al, (2007). Pixley, (1996); Roisen et al, (2001) e Wetzig,

Mackay-Sim e Muriell, (2011), os quais relataram marcação positiva para Vimentina, a OMP e a GFAP, que marcam células de origem mesenquimal. Ainda, marcação positiva para beta-tubulina que é uma proteína expressada para células neuronais. O mesmo pode ser visualizado com marcação positiva para o OCT-4. Neste mesmo contexto, ao relatarmos a marcação positiva na Citometria de Fluxo, observamos o Nanog, OMP e Vimentina, com marcação positiva e o CD 133, o CD 117 e o Stro-1 com marcação negativa. Embora o Stro-1 seja considerado um marcador de células tronco mesenquimais devemos ressaltar que o mesmo não apresenta característica específica para esse tipo de marcação. Ainda, o Stro-1 é marcador para células de linhagem humana, o que pode ter influenciado para o aspecto de negatividade de marcação nessa situação.

Outro ponto a ser discutido é a bulbectomia. A remoção do bulbo olfatório (bulbectomia) tem sido uma técnica bastante praticada há décadas para a promoção da anosmia e a interpretação dos resultados obtidos mediante utilização dessa técnica tem sido bastante discutidos. Autores como, Alberts & Galef Jr (1970), Amemori & Bures (1988), Eduard et al. (1972), Evers et al (1996) e Rowe & Eduards (1971) em seus trabalhos, tem promovido a anosmia com a utilização de diferentes técnicas, que abrangem a utilização de substâncias químicas como o sulfato de zinco, por exemplo, até procedimentos cirúrgicos como a ablação do bulbo olfatório.

O que nos chama a atenção para estas pesquisas, é o objetivo, o qual é comum a todos os autores supracitados, que é o estudo comportamental dos animais estudados, que abrange características de agressividade, comportamento alimentar e sexual, diferentemente do nosso estudo, que não enfocou aspectos ditos comportamentais, mas sim, aspectos clínicos e terapêuticos da doença, com aplicabilidade a terapia celular e à medicina. Além disso, as metodologias utilizadas na interpretação de resultados produzidos por estas pesquisas são complexas, o que geralmente nos ocasiona dúvidas quanto às conclusões obtidas. A contendo dos nossos estudos, nenhum desses trabalhos mostra uma metodologia a qual a anosmia experimental obtida apresenta caráter irreversível e análises estruturais histológicas do rinencéfalo, como método de comprovação da perda de função.

Ressalta-se que embora o enfoque da nossa pesquisa não seja análise comportamental dos animais, utilizou-se como forma auxiliar de validação dos resultados da técnica cirúrgica experimental – bulbectomia, o teste do odor do gato, teste amplamente difundido, utilizado e discutido para avaliação da função olfatória.

Este teste consiste em avaliação da resposta defensiva de ratos. Tais estudos envolvendo a resposta defensiva de ratos frente ao odor de gato têm ocasionado contradições na literatura. Enquanto alguns pesquisadores demonstram, dentro de uma mesma linhagem, a existência de duas populações distintas em relação à resposta defensiva frente ao odor de gato (FILE et al, 1993; HOOG & FILE, 1994); outros estudos têm relatado que este estímulo é suficientemente potente para causar a mesma resposta defensiva em todos animais, havendo apenas diferenças comportamentais sutis em estudos comparativos envolvendo diferentes linhagens (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001).

Nos nossos estudos os resultados mostraram haver diferenças significativas comportamentais entre os animais controle (não bulbectomizados) e bulbectomizados, avaliadas no modelo do odor de gato. Quando comparamos a adequação da técnica utilizada no nosso estudo com as de Dielenberg & McGregor (2001), Zangrossi & File (1992) e Takahashi et al (2005), que utilizaram o teste de odor de gatos, podemos destacar que os mesmos fazem o procedimento de padronização da técnica com benzodiazepínicos e solução salina, antes dos inícios dos testes, o que não ocorreu no nosso experimento. Não utilizamos a padronização pré-teste, uma vez que, a utilização desse fármaco induz uma resposta ansiolítica nos animais, o que poderia ter influenciado a resposta do comportamento de defesa dos animais, disfarçando a eficácia da técnica experimental de ablação do bulbo olfatório. Além disso, a utilização da solução salina na cavidade nasal, como utilizaram McGrigor et al (2004), tem efeito de bloqueio dos receptores olfatórios na cavidade nasal, o que também não era desejado para o nosso experimento. É de grande valia ressaltar que ao observarmos os estudos que relatam a avaliação da atividade olfatória, as diferenças nos procedimentos experimentais entre os laboratórios, bem como a deficiência de uma técnica eficaz para a quantificação do estímulo olfatório, podem estar ocasionando o aparecimento de resultados distintos, o que conduzem os pesquisadores a diferentes conclusões (DIELENBERG & MCGREGOR (2001); MCGREGOR et al (2002); TAKAHASHI et al, 2005). De fato, resultados contraditórios são descritos ainda no que se refere à eficácia as respostas defensivas de ratos expostos ao odor de gato.

A bulbectomia tem sido realizada em várias espécies animais com objetivos diversos. As técnicas cirúrgicas são semelhantes, com pequenas variações em detalhes de execução. Leonard (1972) em sua pesquisa com hamsters

bulbectomizados, Seegal & Denenberg (1974) em ratos bulbectomizados e Beltrão (2000) em coelhos bulbectomizados, observaram o canibalismo, e a alteração de seletividade alimentar, com alguns animais bulbecomizados alimentando-se de pedaços de papel utilizados para forrar as gaiolas. Excetuando-se o canibalismo, as outras características também foram observadas na nossa pesquisa. Fonseca et al (2006) ao bulbectomizar coelhos relatou que somente houve alteração comportamental em relação ao consumo alimentar, ou seja, houve aumento no consumo de alimentos e água.

O sistema olfatório é um excelente sistema para o estudo sobre questões relacionadas com o potencial recuperação funcional depois de uma lesão em nível de sistema nervoso (HENDRICKS et al.,1994). Este sistema é bem caracterizado, como laminar e há uma vasta quantidade de literatura disponíveis nos aspectos anatômicos e perspectivas funcionais (BRUNJES & FRAIZER (1986); CAIN (1988); LEONARD & TUIE (1981); LEON et al. (1987); SWITZER et al. (1985)). Entretanto, existe um número limitado de experimentos publicados os quais tratam do potencial de recuperação da função olfatória causadas por lesão do bulbo olfatório, e seus resultados geralmente apresentam-se de confusos a equivocados. Wright & Harding (1982) em seus trabalhos sugeriram que a recuperação da função olfatória foi mediada pela reconectividade de neurônios do nervo olfatório com neurônios corticais do prosencéfalo. A metodologia utilizada por estes pesquisadores não evidencia métodos histológicos que comprovasse tal hipótese. Zigova et al. (1988) afirmaram que pequenos remanescentes do bulbo olfatório poderia continuar mantendo a função olfatória, o que não ocorreu em nossa pesquisa, uma vez que por tomografia computadorizada foi comprovado que sempre resta resíduos do bulbo olfatório após bulbectomia, o que não mantém, ou reorganiza a função olfatória. Butler et al. (1984) relataram em sua pesquisa que a bulbectomia neonatal resultou em ratos anósmicos. Nesta pesquisa, embora os pesquisadores tenham utilizado métodos histológicos para análise das lesões, os mesmos não utilizaram marcadores específicos para o sistema olfatório, onde os mesmos não determinaram especificamente onde ocorreram as lesões das fibras nervosas. Amemori et al. (1988), relataram recuperação da função olfatória em ratos com lesões bulbo olfatório, e anosmia naqueles os quais foram submetidos aos transplantes de bulbo olfatório. Eles também não utilizaram um marcador específico para o nervo olfatório, e quanto a análise histológica, eles não discriminaram a análise de das lesões parciais e totais do bulbo olfatório.

Ao analisarmos as pesquisas supracitadas e quando comparamos os mesmos aspectos ao nosso trabalho, algumas características podem ser ressaltadas. Em nosso experimento, após a bulbectomia, os animais foram observados durante um período de 60 dias, nos quais, de acordo com a metodologia proposta, foram realizados testes comportamentais, os quais comprovaram que durante todo esse período, não houve recuperação espontânea da função olfatória, ou seja, os animais permaneceram anósmicos. Nesse caso, a teoria proposta por Wright & Harding (1982), acaba não se aplicando. Esse fato pode ter ocorrido pelo grau da lesão causada pela ablação do bulbo olfatório na bulbectomia realizada na nossa pesquisa, o que acabou por não deixar conexões dos nervos olfatórios com a área cerebral responsável pela interpretação dos estímulos. Essa mesma hipótese pode ser utilizada para contrapor os achados de Zigova et al. (1988), uma vez que a nossa técnica cirúrgica não deixou remanescentes do bulbo olfatório, sendo o mesmo aspirado durante o procedimento. Esta afirmação deve-se aos achados macroscópicos observados após o período experimental, os quais mostraram uma cavidade sem preenchimento do tecido nervoso do bulbo olfatório. Ainda, as análises histológicas mostraram que o grau de lesão causado pela bulbectomia, pode ser considerado suficiente para a perda funcional do olfato. Nesse caso, concordamos com Amemori et al. (1988), que afirmaram que a bulbectomia produz a situação de anosmia em animais neonatos.

Quando o aspecto a ser avaliado é a percepção olfativa e o comportamento olfatório dos animais submetidos a bulbectomia, a metodologia escolhida nesta pesquisa foi o teste de odor de gato. Estudos comportamentais envolvendo a resposta defensiva de ratos frente ao odor de gato têm ocasionado contradições na literatura. Enquanto alguns pesquisadores demonstram, dentro de uma mesma linhagem, a existência de duas populações distintas em relação à resposta defensiva frente ao odor de gato (FILE et al, 1993; HOOG & FILE, 1994); outros estudos têm relatado que este estímulo é suficientemente potente para causar a mesma resposta defensiva em todos animais, havendo apenas diferenças comportamentais sutis em estudos comparativos envolvendo diferentes linhagens (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001). O que se tem como consenso é que a relação presa-predador entre roedores e gatos a qual é conhecida há muitos anos e, por sua característica inata, tem proporcionado aos pesquisadores uma excelente oportunidade para compreender os aspectos

neurocomportamentais envolvidos nesta relação, bem como estudar os fármacos que interferem com essa situação aversiva (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001).

Estímulos de predadores, como o odor de gato, podem representar uma ameaça em potencial. Esses estímulos também podem evocar alguns dos comportamentos de defesa, como em presença do próprio predador (HUBBARD et al., 2004). Muitos estudos têm demonstrado que ratos expostos ao odor de predadores mostram alteração de comportamento, além de alguns efeitos endócrinos e neuroquímicos. As respostas comportamentais incluem evitar o estímulo, diminuição da atividade locomotora, vigilância, esconder-se, manter-se cauteloso e manter-se de costas em relação ao estímulo (BLANCHARD et al., 1990 e 1993; DIELENBERG & MCGREGOR, 1999, 2001; ZANGROSSI & FILE, 1992). A especificidade do odor de gato em evocar padrões de resposta defensiva em ratos tem sido relatada em uma série de estudos, utilizando desde coleiras (DIELENBERG & MCGREGOR, 1999) e panos impregnados com o odor de gato (TAKAHASHI et al, 2005), até urina ou fezes destes animais (DICKMAN, 1992; BERDOY et al, 2000). Vale a pena ressaltar que ao aplicarmos este teste em nossa pesquisa, todas as características comportamentais em relação a percepção do estímulo olfatório aversivo, citadas acima, foram observadas o que acaba por corroborar os dados observados por estes autores.

Ao utilizarmos este teste como ferramenta para avaliar o modelo de anosmia proposto, podemos aferir que este foi eficaz, com metodologia bem sucedida, uma vez que os animais do grupo controle (bulbectomizados) e daqueles transplantados foram estatisticamente diferentes, tanto para o número de contatos com o tecido impregnado pelo odor de gato, quanto para o tempo de permanência no esconderijo, embora estatisticamente, os animais transplantados após 3 e 21 dias pós bulbectomia tenham apresentado comportamento diferenciado em relação aos demais grupos tratados. Vale a pena ressaltar, quando analisamos estes resultados, a diferença comportamental e estatística ao compararmos os animais tratados após 7 e 14 dias com os animais tratados após 3 e 21 dias, as quais apresentaram comportamento e resultados analisados estatisticamente divergentes com os animais bulbectomizados. Vários são os fatores os quais podem justificar tal comportamento diferenciado, dentre os quais podemos destacar a resposta inflamatória aguda nos animais tratados após 3 dias da bulbectomia, assim como a formação de uma cicatriz glial mais marcante nos animais tratados após 21 dias. Portanto, os animais tratados após 7 e 14 dias, expostos ao odor de gato, demonstraram medo pelo odor de seu predador. Essa

característica foi observada por Zangrossi & File, (1992), quando em seus experimentos os animais foram expostos ao odor de seu predador. Isso nos leva a intuir nos animais transplantados do GII e GIII que há a percepção olfativa. Ainda, nesta mesma linha de raciocínio, pode ser demonstrado que os animais bulbectomizados, do GI e GIV não encararam o odor do de gato como estímulo aversivo, uma vez que o tempo de esconderijo e o número de contato com o tecido foram maiores e menores, respectivamente, o que nos leva a intuir que a percepção olfativa nestes animais permaneceu ausente.

Nossos dados demonstram que os animais expostos a cirurgia experimental, apresentaram prejuízos a sua capacidade olfativa, além de apresentarem comportamento agressivo, que são caracterizados como resultado de uma ampla variedade de processos fisiológicos nervosos, neuroendócrinos e autônomos periféricos. Ainda, esse comportamento pode ser caracterizado pelo comportamento de ameaça que o animal apresentou durante a manipulação e ainda a mudança postural que o animal apresentou. Além disso, evidenciou-se a hiperrestimulação sensorial das vibrissas, em alguns casos distúrbios alimentares como a não percepção de sabor, além da ausência da demonstração de medo em situações consideradas perigosas (como a presença do odor de seu predador). Estes achados corroboram aos de Blanchard & Blanchard (1989), bem como Dielenberg e colaboradores (1999), que mostraram que uma única exposição de ratos ao odor de gato é capaz de promover um aumento no tempo de permanência dos animais no esconderijo, além de ser uma resposta a ameaça potencial, incerta ou mesmo inconsciente (BRANDÃO, 2004).

Esse conjunto de comportamentos, baseados no conjunto de ações e de sinais, pode ser referido ou relacionado a perda da função olfatória, ou seja a anosmia. Por outro lado, esses animais quando tratados após 7 e 14 dias pós bulbectomia, voltam a apresentar comportamento diferenciado e aversivo ao odor de gato, os quais nos leva a acreditar que os mesmos acabam retomando parte da sua função olfativa. Esse comportamento aversivo é o esperado em animais cujo ocorre a percepção de cheiro, conforme relatam (BLANCHARD et al, 1990; FILE et al, 1993; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001a; TAKAHASHI et al, 2005; FENDT, 2005). Estes dados também corroboram resultados prévios de nosso laboratório que demonstraram que a simples exposição ao odor de gato (5 minutos) é capaz de provocar reações defensivas, em especial, aumento do tempo de permanência no compartimento fechado, e diminuição

do tempo de aproximação da fonte de odor e o número de contato com o tecido impregnado com o odor de gato. Ainda, podemos observar em nossos estudos a semelhança dos trabalhos anteriores, que os animais demonstraram o comportamento aversivo ao contexto no qual foram expostos ao odor de gato (STAPLES et al, 2008; HUBBARD et al, 2004; STAPLES & MCGREGOR, 2006, MONTE, 2006). Assim como o medo inato exibido durante a sessão de condicionamento com odor de gato, o condicionamento aversivo que ocorre através do pareamento odor de gato (estímulo incondicionado) x ambiente (caixa) é de extrema importância para a compreensão dos mecanismos de aprendizado e memória, e dos transtornos relacionados ao medo (JUNG & KIM, 2006; GARAKANI et al, 2006). Basicamente, o medo condicionado baseia-se no aprendizado de que certos estímulos ambientais antecipam eventos aversivos. O estímulo condicionado (caixa), inicialmente neutro e incapaz de provocar reações defensivas, adquire propriedades aversivas após a associação com o odor de gato, passando a provocar respostas de defesa, conforme visualizado nos grupos controle submetidos ao odor de gato. Então, nossos achados mostraram que em nosso experimento, ocorreu um aumento das respostas defensivas nos animais bulbectomizados e transplantados do GII e GIII, tanto na percepção e resposta aversiva ao odor de gato, demonstrando a percepção de odor/cheiro ou percepção olfativa.

Outro ponto de interesse a ser discutido é o tipo de lesão ou injúria causada pela técnica cirúrgica de ablação do bulbo olfatório de ratos. Sabe-se que as lesões no SNC são uma das condições médicas mais catastróficas e devastadoras. Até hoje, segundo Maiese (1997) a degeneração neuronal associada a desordens no SNC como Alzheimer, Parkinson e Isquemia é irreversível. A morte neuronal causada pela isquemia, por exemplo, é desencadeada basicamente por um aumento excessivo nos níveis de cálcio intracelular, causado pela liberação de glutamato durante o insulto isquêmico (BARTUS et al., 1998; KIRINO et al., 2000; BARTH et al., 1996; LAAKE et al., 1999). Em nosso estudo, no que concerne a este ponto, durante a análise histológica dos resultados, podemos afirmar a presença de uma astrogliose reativa.

Neste contexto, sabe-se que até recentemente, as células gliais eram consideradas como elementos estruturais passivos, desempenhando papel pouco relevante para a homeostasia do Sistema Nervoso. Recentes estudos, todavia, indicam que estas células possuem a capacidade de atuar efetivamente durante os eventos de transmissão e plasticidade sináptica (CASTONGUAY et al, 2001;

ARAQUE et al, 1999; ARAQUE e PEREA, 2004; GIMENEZ Y RIBOTTA et al, 2001; SHAO & MCCARTHY, 1994; DEROUICHE et al, 2002). Têm-se dado ênfase ao estudo dos efeitos da astrogliose no processo de plasticidade do SN após lesão, apesar dos mecanismos celulares e moleculares que ocorrem em tais eventos ainda serem pouco conhecidos. O melhor entendimento da astrogliose bem como da função dos astrócitos na neuroplasticidade possibilitarão o desenvolvimento de estratégias que acelerem o processo de regeneração nervosa. Woerly et al, (2004) estudando a reatividade glial após a transecção da medula espinhal observaram que implantes de hidrogel (NeuroGel) constituíram-se num bom substrato para a regeneração axonal. Também, o estudo da astrogliose após a avulsão de raízes ventrais medulares forneceu evidências de que a ativação glial é regulada geneticamente, podendo interferir no grau de neurodegeneração (LUNDBERG et al., 2001).

Segundo Katoh-Semba et al. (1995), Brar et al. (1999), Garrido et al. (1997) e Xi et al. (2006) a presença da astrogliose pode ocorrer em resposta a isquemia, com o aumento da expressão em células gliais, astrócitos neste caso. Estes mesmos autores, tem sugerido que este tipo de reação pode estar envolvida com a resistência celular a diversos tipos de estresse. Em nossa pesquisa, considerando que a técnica experimental de ablação do bulbo olfatório causa uma extensa área de hemorragia, como já demonstrado nos resultados, e que essa área hemorrágica, consequentemente pela desorganização vascular atribuída a lesão causa isquemia celular, podemos com base no demonstrado por estes autores corroborar com os achados dos mesmos, atribuindo a astrogliose como resposta a isquemia originada pela técnica cirúrgica experimental. Ainda, deve ser considerado que os astrócitos podem ser ativados por uma grande variedade de lesões e que a ativação dessas células leva um aumento na capacidade astrocitária de recaptar neurotransmissores, manter o equilíbrio iônico e secretar fatores tróficos que auxiliaram na sobrevivência neuronal as lesões (CULMSEE et al, (1999); LIU et al, (1999). REIER & HOULE (1988)); Fawcett & Asher, (1999) relataram em suas pesquisas que o papel dos astrócitos após o estabelecimento de uma doença, trauma ou axotomia parece ambíguo. Baba (1998); Dong & Benveniste (2001); Gimenez Y Ribotta et al., (2001) afirmaram que nesse sentido, há evidências de que estas células atuam como barreira física ao crescimento dos axônios através da formação da cicatriz glial, porém podem estimular a sua regeneração através da liberação de fatores neurotróficos. Em nossa pesquisa, de acordo com a metodologia utilizada e os resultados encontrados,

podemos corroborar com estes autores, uma vez que foi observado que após estabelecida a lesão, ocorreu a formação da cicatriz glial a partir de uma resposta imunológica carregada pelos astrócitos. Aldskogius et al., (1999); Walz, (1989); Shao & McCarthy, (1994); Araque & Perea, (2004) ainda afirmaram que os astrócitos têm influência direta na estabilização e manutenção dos contatos sinápticos podendo interferir nos processos de plasticidade sináptica após uma lesão.

Em nossa pesquisa, em todos os animais bulbectomizados pode ser observada a presença de astrogliose reativa, além de extensas áreas de necrose, e infiltração de células mononucleares, macrófagos impregnados com hemosiderina e a presença marcante de vacúolos nessas áreas. A semelhança da presença de astrogliose, Miyake et al, (1988) relatou em sua pesquisa com injúrias cerebrais em ratos por estereotaxia, que ao redor do local da lesão cerebral, aparecem muitos astrócitos contendo muitos filamentos gliais e muita proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que são facilmente identificados por imunohistoquímica para GFAP. Essa caracterização por imunohistoquímica também foi evidente em nossa pesquisa. Autores como Ludwin (1985), Mathewson & Berry (1985) e Schifter et al. (1986) em suas pesquisas a respeito da reação astrocitária também relatam situação semelhante. Complementando esta informação, Latov et al, (1979) e Schifter et al. (1986) consideram que os astrócitos tornam-se hiperplásicos e aumentam número em resposta a lesões cerebrais. Segundo eles, a proliferação de astrócitos reativos ocorre através da divisão mitótica e a hiperplasia reativa (aumento no total numérico) de astrócitos, no entanto, parece depender muito da localização do dano. Nesse aspecto, em nosso estudo, não podemos aferir a diferença no que diz respeito a resposta astrocitária nos animais submetidos a bulbectomia, o que nos leva a aluir que as lesões causadas pela ablação do bulbo olfatório acabam por possuir um padrão ou parâmetro que se repete nos animais bulbectomizados, ou seja, se considerarmos que a resposta astrocitária depende do local da lesão, conforme afirmaram estes autores, e que esta modifica-se de acordo com o local da lesão, em nosso estudo, então, podemos afirmar o local de lesão semelhante para todos os animais operados.

É importante ressaltar que a maior parte dos estudos relacionados a astrogliose reativa após lesão ou injúrias de sistema nervoso central são pesquisas realizadas nas décadas de 80 e 90. Os trabalhos deste período contavam com protocolos anestésicos diferenciados dos nossos (o que acaba não interferindo na presença ou caracterização das lesões causadas), e protocolos cirúrgicos também

diferenciados, os quais na maior parte das vezes contavam com cirurgias estereotáxicas. Fawcett & Asher (1999), Hampton et al (2004), Miyake et al, (1988), Mathewson & Berry (1985), Raivich et al (1999), Schifter et al.(1986), Streit et al (1988), em suas pesquisas relataram a presença de astrogliose reativa e marcação positiva para o GFAP. Ressalta-se que nenhum desses autores, relataram ou caracterizaram histologicamente as lesões causadas pelos seus protocolos cirúrgicos. Sendo assim, a presença de áreas de necrose, infiltração de células mononucleares e presença de hemosiderina, não foi citado por nenhum dos trabalhos utilizados como base bibliográfica em nossa pesquisa. Ressalta-se ainda, que para o tipo de lesão causada pela ablação cirúrgica do bulbo olfatório, estes achados histológicos são esperados.

Ainda neste enfoque, ressalta-se que após tratamento (terapia celular), embora os animais tenham apresentado comportamento olfatório diferenciado, o que nos levou a considerar sobre a recuperação da função olfatória (mediante análise comportamental), quando estes animais, após experimento foram sacrificados, e o encéfalo dos animais tratados foram histologicamente analisados, podemos afirmar, a partir deste tipo de análise, que não foram evidenciadas diferenças teciduais entre os animais bulbectomizados e não tratados dos animais bulbectomizados e tratados. Como já relatado anteriormente, não foram observadas diferenças relacionadas a regeneração tecidual da região encefálica, mas a análise comportamental pode sugerir que uma possível ponte pode estar sendo iniciada, o que pode demonstrar uma possível regeneração.

A reprodução de um modelo de anosmia em ratos, como já citado anteriormente, já tem sido estudado há vários anos, e com o advento da terapia celular, e dos estudos acerca das células tronco, esse modelo em nossa pesquisa foi adaptado e reestruturado a partir de modelos existentes, só que neste caso, com enfoque diferenciado dos realizados anteriormente. Esse modelo experimental de anosmia, foi criado no intuito de ser utilizado como ferramenta para o estudo da terapia celular em animais anósmicos e aplicados para tratamento de anosmia em humanos. Toda essa temática pode ser levantada uma vez que sabemos que células-tronco são células capazes de originar células semelhantes a elas (autorrenovação) e também podem dar origem a diferentes tipos celulares (FUCHS & SEGRE, 2000). Essas características de autorrenovação, e pluripotencialidade, fazem com que estas células

sejam consideradas a fonte ideal para terapias celulares que visem a substituição de tecidos perdidos em lesões ou doenças (THOMSON et al., 1998; WEISSMAN 2000).

Segundo Buck & Axel (1991), Doty et al. (2009) e Lin et al. (2009) a deficiência olfativa é uma das doenças mais comuns dos órgãos dos sentidos e está intimamente relacionada com a qualidade de vida, no entanto, a importância de um sentido do olfato é frequentemente ignorada durante a vida. No entanto, o mecanismo patogênico do sentido do olfato ainda não está totalmente esclarecido, e por isso o seu tratamento até os dias atuais é desafiador. Nordin & Bramerson (2008) acrescentam a este relato que a insuficiência olfatória pode ser causada pela degeneração de neurônios receptores olfatórios no nariz e também pela degeneração do bulbo olfatório e do córtex olfatório. As principais etiologias da perda olfativa incluem a inflamação da cavidade nasal e dos seios paranasais, infecção viral das vias respiratórias e de traumatismos craniano na região frontal. Todas as etiologias podem causar a morte neuronal e dos receptores olfatórios, por diferentes mecanismos. Ao longo de toda a vida, os neurônios olfatórios são regularmente regenerados a partir de células-tronco neurais no neuroepitélio olfatório. No entanto, quando a regeneração falhar, o indivíduo sofrerá de disfunção olfativa permanente. Teoricamente, com base neste contexto, a restauração do número de células-tronco neurais no neuroepitélio olfatório ou a sua função pode ser um bom alvo para o tratamento da perda do olfato, mas existem atualmente não é conhecida quase nenhuma droga para esta finalidade. Células-tronco adultas têm sido investigados como um novo método de tratamento para várias doenças, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, lesões medulares, perda auditiva, doenças pancreáticas, hepáticas, entre outras, e as terapias baseadas em células podem ser uma opção promissora, até mesmo para deficiências olfativas.

Ao pesquisarmos a terapia celular com o intuito de reestabelecimento da função olfativa em animais, a literatura especializada é bastante escassa. Apenas uma pesquisa em toda a literatura a qual tivemos acesso, relata como finalidade, a utilização de células tronco para tratamento da anosmia (Lee et al., (2010). E esse fato nos chama bastante atenção, uma vez que os distúrbios olfatórios, segundo Hummel & Nordin (2005), a alta prevalência de distúrbios olfatórios torna-se óbvia quando se observam os estudos populacionais baseados na identificação odor. Nesta investigação, 24% dos indivíduos com idade entre 53 a 97 anos, apresentaram comprometimento da função olfativa, e em outro estudo, 19% dos indivíduos com

idade de 20 a 62 anos, apresentaram deficiências olfativas. Devido esta alta prevalência, acreditamos que os distúrbios olfatórios deveriam ter uma atenção maior, no que diz respeito a terapias alternativas, como a terapia celular.

Outros trabalhos como os de Franceschini et al., (2009) e Kim et al., (2009) também objetivaram a regeneração do epitélio olfatório, mas com enfoques e metodologias bem adversos ao proposto por esta pesquisa. A pesquisa de Franceschini et al., (2009) foi realizada mediante utilização de células tronco CD133 positivo do sangue do cordão humano em camundongos com o intuito de fornecer condições para a regeneração dos neuroepitélio olfatório após dano permanente foi induzida por diclobenil. Já Kim et al., (2009) utilizaram células-tronco derivadas de tecido adiposo e os ratos também receberam injeção de células tronco após secção do nervo olfatório. Nesta análise, Lee et al. (2010), afirmaram que esse modelo de transecção do nervo olfatório é menos provável de ser apropriado para a pesquisa com células-tronco, pois, quando uma via neural eferente a nível do sistema nervoso olfatório é interrompido, conduz à morte celular, especialmente de células neuronais olfativas que diferenciam a partir de células estaminais injetadas.

Nosso estudo teve por objetivo avaliar a eficácia do uso de células-tronco oriundas do EOR para a recuperação do olfato em ratos, a partir de um modelo de anosmia por bulbectomia. Como já relatado anteriormente, a anosmia causada por bulbectomia já é praticada a várias décadas. Ao analisarmos a literatura especializada neste assunto, uma pesquisa nos chama bastante atenção. Lee et al. (2010) também objetivaram em sua pesquisa, o tratamento da anosmia a partir de células tronco. Embora os objetivos entre nossa pesquisa e as de Lee et al. (2010) sejam os mesmos, alguns pontos diferenciam nossos trabalhos. O primeiro, é a fonte celular. Utilizamos células oriundas do EOR e Lee et al. (2010) células oriundas do bulbo olfatório de ratos. O segundo ponto, é o modelo de anosmia. Acreditamos que o modelo proposto por nossa pesquisa acaba refletindo melhor a condição de anosmia que ocorre em humanos a partir de traumatismo craniano, por exemplo, uma vez que ocorre a ablação do bulbo olfatório, com destruição da comunicação entre os neurônios I e II da via olfatória. No modelo proposto por Lee et al. (2010), há a utilização da administração intraperitoneal de 3-methylindole. Essa substância é capaz de gerar a condição de anosmia nestes animais. Além desses fatores, o período experimental que realizamos é maior e o grupo de tratamento é mais amplo. Lee et al. (2010) realizou a terapia um dia após a indução da anosmia, enquanto em nossa pesquisa,

foram avaliados um período experimental de 3, 7, 14 e 21 dias após a indução da anomia. Ainda, os animais em nosso experimento foram transplantados com 1×10^6 (quantidade de células utilizadas em outros estudos pré-clínicos) e o outro grupo 5×10^5 células. Ainda nesse tópico, o transplante realizado em nossa pesquisa ocorreu pelo mesmo acesso cirúrgico da bulbectomia, enquanto os de Lee et al (2010) foi por via transnasal. Pode ser destacado ainda o modelo de avaliação comportamental, que em nossa pesquisa foi utilizado o modelo de odor de gato, enquanto dos outros pesquisadores o teste de percepção de alimento. E por último, a análise tecidual, que em nosso experimento foi analisada por histologia de luz e imunohistoquímica, e no grupo de Chul Hee Lee, apenas a análise por imunohistoquímica.

Com base em toda essa diferenciação metodológica, alguns pontos são bastante coincidentes no que diz respeito aos objetivos propostos em terapias que auxiliem no tratamento de doenças. A própria anosmia pode ser considerada segundo Kim & Velis (2009) e Lee et al (2010) uma das doenças neurodegenerativas que não podem ser tratados pelas atuais técnicas médicas ou cirúrgicas. Neurônios receptores olfatórios são conhecidos pelo potencial de regeneração durante toda a vida, porque algumas células da camada basal do epitélio, desempenham um papel de células-tronco neurais. No entanto, alguns indivíduos sofrem de perda olfativa permanente, apesar do potencial de regeneração do neuroepitélio olfatório, uma vez que existe uma redução significativa da população de células do epitélio.

Um ponto importante que deve ser discutido em relação ao transplante celular é a via de administração. Fischer et al. (2009), Smart & Riley (2008) relatam que os a maior parte dos ensaios de transplante de células foram realizadas através de uma via parentérica, utilizando células estaminais mesenquimais derivadas de tecido. Estes mesmos autores enfatizam a administração sistêmica de células tronco como algo desvantajoso. Segundo eles, uma grande parte das células ficará estacionária no pulmão e, portanto, não atingirão o tecido alvo (neuroepitélio olfatório). Essa teoria nos induz a acreditar que para a terapia celular sistêmica é necessária a administração de um número muito maior de células, as quais serão necessárias para atingir os efeitos terapêuticos. A partir dessas observações, o transplante celular realizado em nosso experimento foi realizado mediante aplicação local, no mesmo local do acesso a bulbectomia, sendo portanto o transplante em nossa pesquisa realizado por via local. Outras vias de administração são referenciadas na literatura. Smart & Riley (2008) em seu experimento, a fim de superar as supostas desvantagens da aplicação

sistêmica, fez a administração (terapia) de células diretamente na cavidade nasal em seu estudo. Entretanto, este estudo objetivou a regeneração do neuroepitélio olfatório, e não a função olfatória. Estes autores relatam que esse tipo de aplicação evita uma perda maciça de células para o pulmão. Outro enfoque pode ser observado na pesquisa de Lee (2010) a qual relatou que o neuroepitélio olfatório pode ser completamente destruído pela administração de intravenosa de 3-mehtylindole, que em sua pesquisa, foi o agente que causou a anosmia nos ratos. Esse modelo pode ser facilmente interpretado como um modelo de anosmia causado por produto químico, a diferença do nosso, que é semelhante ao causado por traumatismo.

Nos estudos que relatam a terapia celular em ratos, um dado que foi observado nos estudos de Lee (2010) que transplantou células do bulbo olfatório em animais anósmicos (anosmia causada pela administração de 3-mehtylindole) os quais não foram observados em nossa pesquisa em relação aos animais transplantados. Eles relataram que em termos de sobrevivência dos ratinhos, os animais transplantados obtiveram um tempo maior de sobrevida que os animais não transplantados, ou seja, para estes autores, o transplante de células-tronco neurais pode ser associado com prolongamento da sobrevida nos ratos transplantados. Esta observação é justificada por Lee e seu grupo por uma característica evolutiva. Eles afirmaram que o sentido do olfato é muito mais importante para a sobrevivência em ratos do que em humanos, e os ratos anósmicos podem ser mais sujeitos à morte do que os ratos com função olfativa normal. Essa observação, tomando-se em base as características evolutivas em relação ao sentido do olfato devem ser consideradas. Embora este padrão não tenha sido avaliado em nosso experimento, essa característica pode ser considerada, uma vez que os animais transplantados, ao analisarmos o comportamento, apresentaram resposta positiva ao estímulo olfatório aumentaram de peso em média 15% mais que os animais sem percepção olfatória. E quanto ao caso da sobrevida, embora possamos aluir sobre essa característica, não podemos afirmar pois nossa análise experimental foi realizada em período limitado a sessenta dias no máximo, o que não nos permite afirmar sobrevida maior em relação aos grupos estudados. Entretanto podemos afirmar que a sociabilidade, irritabilidade e comportamento alimentar nos animais transplantados com comportamento olfatório presente são melhores interpretados que nos animais anósmicos.

Embora estruturalmente não tenha sido evidenciada na análise histológica dos animais transplantados uma neoformação tecidual, principalmente no que diz

respeito a conexão nervosa do epitélio, bulbo olfatório ou rinencéfalo, durante a análise por imunohistoquímica foi possível identificar marcação positiva do eGFP (uma vez que as células foram transduzidas) nos animais tratados, o que nos faz concluir que as células tronco do EOR estavam presentes na área tecidual da bulbectomia. Estes resultados também são semelhantes aos encontrados por outros autores como Lee et al. (2010), Iwai et al. (2008), Tsujigiwa et al. (2005), os quais realizaram transplantes de células neurais, adiposas e de medula óssea marcadas, e após experimento foi encontrada marcação positiva para estas células por imunohistoquímica durante este tipo de análise. Outro dado que pode ser reportado, é que embora o estudo realizado por Lee et al. (2010), estudo semelhante aos nossos em relação ao objetivo, foi a expressão da OMP. Para nossos estudos esse marcador não foi utilizado, uma vez que a anosmia causada em nossa pesquisa não destruía o epitélio olfatório, sendo desta forma desnecessário a identificação de células olfatórias ou do neuroepitélio olfatório, pois as mesmas estariam presentes na nossa amostra. Um dado que pode ser relacionado ainda neste contexto é a presença de apoptose, que pode ser identificada por microscopia de luz nos animais bulbectomizados. Neste caso, não foi possível concluir se a técnica cirúrgica experimental que induzia a apoptose ou se a mesma já estava programada no epitélio olfatório. Toda essa análise morfológica acaba por induzir que embora não tenha sido evidenciada a neoformação tecidual pelo transplante celular, uma nova ponte da via olfatória possa estar sendo formada, uma vez que pela análise comportamental e estatísticas os animais dos grupos II e III apresentam comportamento olfatório presente. Essa análise estatística e comportamento olfatório de animais com comportamento olfatório presente, corroboram com os estudos comportamentais de odor de gato em diversas circunstâncias, como os trabalhos de Alberts & Galef (1971), Anemori et al. (1988), Evers et al. (1996), McGregor et al. (2004), Monte (2006), Wiedenmayer & Barr (1998) que afirmam a presença da percepção olfativa.

O transplante de células tronco do epitélio olfatório pode ser associado com a melhoria da recuperação da função olfativa em quando levamos em consideração o teste do odor de gato. Entretanto mais estudos são necessários, uma vez que aplicando a mesma terapia em animais com mesmo tipo e causa de anosmia, em tempos de tratamentos diferentes, não foi observado o mesmo resultado, a mesma percepção olfativa. Esta situação, como já descritos anteriormente, pode ser atribuída a resposta inflamatória e a evolução da lesão, ou até a própria plasticidade celular ou

resposta individual dos animais. Portanto, mais estudos são necessários para identificar o real papel terapêutico das células tronco do EOR em distúrbios olfatórios como a anosmia, em pesquisas de longa duração, por exemplo e até outros grupos de tratamento. Ainda, nossos resultados acabam por indicar que as células tronco oriundas do EOR podem ser uma das modalidades alternativas para o tratamento da anosmia no futuro.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as análises morfológicas e comportamentais realizadas, a técnica de bulbectomia experimental, realizada por ablação do BO em ratos Wistar, foi eficaz para a promoção da anosmia, sendo este um modelo clínico viável para estudo da doença e tratamento com a utilização de terapia celular. O transplante celular realizado com células-tronco do EOR, neste modelo de anosmia, levou à recuperação funcional do olfato em animais tratados, após 7 e 14 dias após bulbectomia. Embora as análises morfológicas pós-transplantes não evidenciem diferenças relacionadas a regeneração tecidual da região encefálica, é possível que uma “ponte” esteja sendo iniciada, demonstrando uma provável regeneração, quando tomamos como base as análises comportamentais e estatísticas.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, J. R.; GALEF JR., B. G. Acute anosmia in the rat: a behavioral test of a peripherally-induced olfactory deficit. **Physiology & Behavior**, v. 6, p. 619-621, 1971.
- ALDSKOGIUS, H.; LIU, L.; SVENSSON, M. Glial responses to synaptic damage and plasticity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 58, p. 33-41, 1999.
- ALVES, F. R.; SANTOS, T. C.; FREIBERGER, S.; AMBROSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Dinâmica dos precursores celulares do epitélio olfatório de cães sem raça definida: um estudo imunohistoquímico e ultra-estrutural. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 9, p. 388-392, 2007.
- ALVES, F. R.; FIORETTO, E. T.; GUERRA, R. R.; DELGADO, J. C.; FONSECA, C. M. G. T.; MACHADO-JÚNIOR, A. A. N.; CRUZ-PINTO, C. E.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, I.; MIGLINO, M. A. Establishment of a protocol for obtention of neuronal stem cells lineages from the dog olfactory epithelium. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 363-372, 2010.
- AMEMORI, T.; VALOUSKOVA, V.; ZIGOVA, T.; GALIK, J.; RACEKOVA, E.; BURES, J. Functional recovery after olfactory bulbectomy in rats: effect of embryonal brain grafts. **Physiologia Bohemoslovaca**, v. 37, p. 385-394, 1988.
- AMEMORI, T.; BURES, J. Functional ablation of the olfactory bulb by spreading depression: unit activity changes and transient anosmia. **Brain Research Bulletin**, v. 20, p. 421-427, 1988.
- ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIRI, R. P.; HAYDON, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends in Neuroscience**, v. 22, p. 208-215, 1999.
- ARAQUE, P.; PEREA, G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. **Glia**, v. 47, p. 241-248, 2004.
- AU, E.; ROSKAMS, A. J. Olfactory ensheathing cells of the lamina propria "in vivo" and "in vitro". **Glia**, v. 41, p. 224-236, 2003.
- AUDISIO, C.; RAIMONDO, S.; NICOLINO, S.; GAMBAROTTA, G.; DI SCIPIO, F.; MACRI, L.; MONTAROLO, F.; ROBECCHI, M. G. G.; PORPORATO, P.; FILIGHEDDU, N.; GRAZIANI, A.; GEUNA, S.; PERROTEAU, I. Morphological and biomolecular characterization of the neonatal olfactory bulb ensheathing cell line. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 185, p. 89-98, 2009.
- AUSTIN, J. M.; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **European Journal of Immunology**, v. 11, n. 10, p. 805-815, 1981.
- AVERSI-FERREIRA, T. A.; RODRIGUES, H. G.; NERES, A. C.; FONSECA, L. C.; PENHA-SILVA, N. Estudo imunohistoquímico do bulbo olfatório de ratos wistar submetidos a exposição pre-natal aguda com etanol. **Bioscience Journal**, v. 22, p. 99-105, 2006.

BABA, A. Role of endothelin B receptor signals in reactive astrocytes. **Life Science**, v. 62, n. 17/18, p. 1711-1715, 1998.

BANKS, W. L. **Applied veterinary histology**. 3. ed. London: Mosby Year Book, 1992.

BARBOZA-JÚNIOR, L. C. M.; OITICICA, J.; BATISSOCO, A. C. Perspectivas no tratamento da perda auditiva com células-tronco. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 12, n. 1, p. 111-115, 2008.

BARRES, B. A.; RAFF, M. C. Axonal control of oligodendrocyte development. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 6, p. 1123-1128, 1999.

BARTH, A.; BARTH, L. E.; NEWELL, D. W. Combination therapy with MK-801 and α -Pehnil-tert-butyl-nitrone enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures. **Experimental Neurology**, v. 141, p. 330-336, 1996.

BARTUS, R. T.; DEAN, R. L.; MENNERICK, S.; EVELETH, D.; LYNCH, G. Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia. **Brain Research**, v. 790, n. 1-2, p. 1-13, 1998.

BAUER, H.; BAUER, H.-C.; HASELOFF, R. F.; BLASIG, I. E. The role of glia in the formation and function of the blood-brain barrier. In: KETTENMANN, H.; RANSOM, B. R. **Neuroglia**. 2. ed. Oxford: University Press, 2005. p. 325-333.

BAXI, K. N.; DORRIES, K. M.; EISTHEN, H. L. Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones? **Trends in Neuroscience**, v. 29, p. 1-7, 2006.

BÉDARD, A.; PARENT, A.; Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. **Developmental Brain Research**, v. 151, p. 159-168, 2004.

BERDOY, M.; WEBSTER, J. P.; MacDONALD, F. W.; Fatal attraction in rats infected with toxoplasma gondii. **Proceedings B of the Royal Society**, v. 267, p. 1591-1594, 2000.

BELTRÃO, N. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 144-150, 2000.

BIANCO, J. I.; PERRY, C.; HARKIN, D. G.; MACKAY-SIM, A.; FERON, F. Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose. **Glia**, v. 45, n. 2, p. 111-123, 2004.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defense behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, p. 70-82, 1989.

- BONDAN, E. F.; SANCHEZ, M. Microglia. In: GRAÇA, D. L.; BONDAN, E. F.; PEREIRA, L. A. V.; MAIORKA, P. C. **Biologia da desmielinização e remielinização**: a base da esclerose múltipla. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011. p. 61-79.
- BRANDÃO, L. B.; VIANNA, D. M.; MASSON, S.; SANTOS, J.; Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 2, p. 36-41, 2003.
- BRAR, B. K., STEPHANOU, A., WAGSTAFF, M. J. D., COFFIN, R. S., MARBER, M. S., ENGELMANN, G., LARCHMAN, D. S. Heat shock proteins delivered with a vírus vector ca protect cardiac cells against apoptosis as well as against termal or hypoxic stress. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, p. 135-146, 1999.
- BRASIL. Lei Federal n. 6.638. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseccção de animais e determina outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de maio de 1979. p.1.
- BRUNJES, P. C., FRAZIER, L. L. Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. **Brain Research Reviews**, v. 11, p. 1-45, 1986.
- BUCK, L. Olfactory receptors and odor coding in mammals. **Nutrition Reviews**, v. 62, p. 184-188, 2004.
- BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. **Cell**, v. 65, n. 1, p. 175-187. 1991.
- BUTLER, A. B.; GRAZIADEI, P. P. C.; MONTI GRAZIADEI, G. A.; SLOTNICK, B. M. Neonatally bulbectomized rats with new olfactory-neocortical connections are anosmic. **Neuroscience letters**, v. 48, p. 247-254, 1984.
- CAGGIANO, M.; KAUER, J. S.; HUNTER, D. D. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. **Neuron**, v. 13, p. 339-352, 1994.
- CAIN, W.S., Olfaction. In: ATKINSON, R. C.; HERRNSTEIN, R. J.; LINDZEY, G.; LUCE, R. D. (Eds.). **Stevens' handbook of experimental psychology**, 2. nd. New York: Wiley and Sons, 1988, p. 409-459.
- CALOF, A. L.; MUMM, J. S.; RIM, P. C.; SHOU, J. The neuronal stem cell of the olfactory epithelium. **Journal of Neurobiology**, n. 36, p. 190-205, 1998.
- CARLETON, A.; ROCHEFORT, C.; MORANTE-ORIA, J.; DESMAISONS, D. ; VICENT, J. D. ; GHEUSI, G. ; LLEDO, P. M. Making scents of olfactory neurogenesis. **Journal of Physiology**, v. 96, p. 115-122, 2002.
- CASTONGUAY, A.; LÉVESQUE, S.; ROBITAILLE, R. Glial cells as active partners in synaptic functions. **Progress in Brain Research**, v. 132, p. 227-240, 2001.

- CONSTANTINESCU, C. S.; TANI, M.; RANSOHOFF, R. M.; WYSOCKA, M.; HILLIARD, B.; FUJIOKA, T.; MURPHY, S.; TIGHE, P. J.; SARMA, J. D.; TRINCHIERI, G.; ROSTAMI, A. Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, n. 2, p. 331-340, 2005.
- CULMSEE, C.; STRUMM, R. K.; SCHAFER, M. K.; WEIHE, E.; KRIEGLSTEIN, J. Clebuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes and protects rat brain tissue against ischemic damage. **European Journal of Pharmacology**, v. 379, n. 1, p. 33-45, 1999.
- CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 50-51.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.
- DERMIETZEL, R. Gap junction wiring: a new principle in cell-to-cell communication in the nervous system? **Brain Research Reviews**, v. 26, n. 2-3, p. 176-183, 1998.
- DEROUICHE, A.; ANLAUF, E.; AUMANN, G.; MÜHLSTÄDT, B.; LAVIALLE, M. Anatomical aspects of glia-synapse interaction: the perisynaptic glial sheath consists of specialized astrocyte compartment. **Journal of Physiology**, v. 96, p. 177-182, 2002.
- DICKMAN, C.R. Predation and habit shift in the house mouse, *Mus domesticus*. **Ecology**, v. 73, p. 313-322, 1992.
- DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats toward predatory odors: A review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 597-609, 2001.
- DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Habituation of the hide response in predatory odor in rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 113, p. 376-387, 1999.
- DOETSCH, F.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. **Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14895-14900, 1996.
- DONG, Y.; BENVENISTE, E. M. Immune function of astrocytes. **Glia**, v. 36, p. 330-341, 2001.
- DOTY, R. L. The olfactory system and its disorders. **Seminars in Neurology**, v. 29, n. 1, p. 74-81, 2009.
- DOUCETTE, R. Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. **Glia**, v. 3, n. 6, p. 433-449, 1990.
- DULAC, C.; ZAKHARY, L. **Stem cells of the olfactory epithelium**. Handbook of stem cells. London: Elsevier, 2004.

EDWARDS, D. A.; ROBERTS, R. L. Olfactory bulb removal produces a selective deficit in behavioral thermoregulation. **Physiology and Behavior**, v. 9, p. 747-752, 1972.

EDWARDS, D. A.; THOMPSON, M. L.; BURGE, K. G. Olfactory bulb removal and peripheral induced anosmia: differential effects on the aggressive behavior of male mice. **Behavioral Biology**, v. 7, p. 823-828, 1972.

ENGLE, L. Y. Cytoskeletal proteins in astroglia. In: KETTENMANN, H.; RANSOM, B. R. **Neuroglia**. 2. Oxford: University Press, 2005. p. 240-250.

ERHART, E. A. **Neuroanatomia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1974, 420p.

EVERS, S. M.; HENDRICKS, K. R.; KOTT, J. N.; LEE, M. E.; GREGOV, M. E.; WESTRUM, L. E. Recovery of olfactory function in thirteen-day-old rats after olfactory bulb transplantation but not after olfactory bulb ablation. **Brain Research**, v. 724, p. 129-135, 1996.

FABER, K.; KETTENMANN, H. Physiology of microglial cells. **Brain Research Reviews**, v. 48, n. 2, p. 133-143, 2005.

FAWCETT J. W.; ASHER R. A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Research Bulletin**, v. 49, p. 377-391, 1999.

FENDT, M.; ENDRES, T.; LOWRY C.A.; APFELBACH, R.; MCGREGOR, I.S. TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1145-56, 2005.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H.; SANDERS, F. L.; MABBUTT, P. S. Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. **Physiology & Behavior**, v. 54, p. 1109-111, 1993.

FISCHER, U. M.; HARTING, M. T.; JIMENEZ, F.; MONZON-POSADAS, W. O.; XUE, H.; SAVITZ, S. I. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 5, p. 683-92, 2009.

FONSECA, E. T.; DIEL, D. G.; SOUZA, S. F.; MAZZANTI, A.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios em coelhos: modelo para estudo de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 544-549, 2006.

FRANCESCHINI V.; BETTINI, S.; PIFFERI, S.; ROSELLINI, A.; MENINI, A.; SACCARDI, R. Human cord blood CD133+ stem cells transplanted to nod-scid mice provide conditions for regeneration of olfactory neuroepithelium after permanent damage induced by dichlobenil. **Stem Cells**, v. 27, n. 4, p. 825-35, 2009.

FRANKE, H., GEL, U., ILLE, P. P2 Receptor-mediated proliferative effects on astrocytes In Vivo. **Glia**, v. 28, p. 190-200, 1999.

FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R.K., LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinetic**, v. 3, p. 393-403, 1976.

FUCHS, E.; SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 143-55, 2000.

FUJISAKI, S.; SUGIYAMA, A.; EGUCHI, T.; WATANABE, Y.; HIRAIWA, H.; HONMA, D.; SAITO, T.; YASUE H. Analysis of a full-length cDNA library constructed from swine olfactory bulb for elucidation of expressed genes and their transcription initiation sites. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 66, n. 1, p. 15-23, 2004.

GAINES, A.D. Anosmia and Hyposmia. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 31, n. 3, p. 185-189, 2010.

GANDELMAN, R. ; ZARROW, M. X. ; DENENBERG, V. H. Reproductive and maternal performance in the mouse following removal of the olfactory bulbs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, p. 453- 456, 1972.

GARAKANI, A.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D. S.; Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 73, n. 7, p. 941-949, 2006.

GARRIDO, C.; BRUEY, J. M.; FROMENTIN, A.; HAMMANN, A.; ARRIGO, A. P.; SOLARY, E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 2061-2070, 1997.

GEHRMANN, J.; KREUTZBERG, G. W. Microglia in experimental neuropathology. In: KETTENMANN, H.; RANSOM, B.R. **Neuroglia**. 2. ed. Oxford: University Press, 2005. p. 883-903.

GHEUSI, G.; CREMER, H.; MCLEAN, H.; CHAZAL, G.; VINCENT, J. D.; LLEDO, P. M. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. **Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 1823–1828, 2000.

GIMENEZ Y RIBOTTA, M.; MENET, V.; PRIVAT, A. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. **Progress in Brain Research**, v. 132, p. 587-610, 2001.

GIULIAN, D. Microglial and neuronal dysfunction. In: KETTENMANN, H.; RANSOM, B.R. **Neuroglia**. 2. ed. Oxford: University Press, 2005. p. 671-684.

GONZALEZ-MARISCAL, G. et al. Removal of the accessory olfactory bulbs promotes maternal behavior in virgin rabbits. **Behavior Brain Research**, v. 152, p. 89-95, 2003.

GRAÇA, D. L.; BONDAN, E. F.; PEREIRA, L. A. V.; MAIORKA, P. C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011. 240 p.

HAMPTON, D. W.; RHODESA, K. E.; ZHAOB, C.; FRANKLINB, R. J. M.; FAWCETT, J. W. The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. **Neuroscience**, v. 127, n. 4, p. 813–820, 2004.

HAYDEN G. C.; CURCIO, F.; SAKAGUCHIF, K.; BRANDI, M. L.; SWERDLOW, R. D. Cell cultures of neuroblasts from rat olfactory epithelium that show odorant responses. **Neurobiology**, v. 86, p. 1703-1707, 1989.

HENDRICKS, K. R.; KOTT, J. N.; LEE, M. E.; GOODEN, M. D.; EVERS, S. M.; WESTRUM, L. E. Recovery of olfactory behavior. Recovery after a complete olfactory bulb lesion correlates with patterns of olfactory nerve penetration. **Brain Research**, v. 648, n. 121-133, 1994.

HINDLEY, S.; HERMAN, M. A. R.; RATHBONE, M. P. Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extracellular adenosine diphosphate or an adenosine A2 receptor agonist. **Journal of Neuroscience Research**, v. 4, p. 399–406, 1994.

HOOG, S.; FILE, S. E. Responders and nonresponders to cat odor do not differ in other tests of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 219-222, 1994.

HUARD, J. M. T.; YUONGENTOB, S. L.; GOLDSTEIN, B. J.; LUSKIN, M. B. SCHWOB, J. E. Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give arise to neurons and no-neuronal cells. **Journal of Comparative Neurology**, n. 400, p. 400-469, 1998.

HUBBARD, D.; BLANCHARD, D. C.; YANG, M.; MARKHAM, C. M.; GERVACIO, A.; CHUN-I, L.; BLANCHARD, R. J.; Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 80, n. 4, p. 525-30, 2004.

HUMMEL, T.; NORDIN, S. Olfactory disorders and their consequences for quality of life. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 125, p. 116-121, 2005.

IVASKA, J.; PALLARI, H. M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J. E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration and signaling experimental. **Cell Research**, v. 313, p. 2050-2062, 2007.

IWAI, N.; ZHOU, Z.; ROOP, D. R.; BEHRINGER, R. R. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. **Stem Cells**, v. 26, n. 5, p. 1298-306, 2008.

JESSEN, K. R. Glial cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1861-1867, 2004.

JIN, K.; PEEL, A. L.; MAO, X. O.; XIE, L.; COTTRELL, B. A.; HENSHALL, D. C.; GREENBERG, D. A. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. **Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 343–347, 2004.

JUNG, M. W.; KIM, J. J. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 188-202, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p.339-343.

KATOH-SEMBA, R.; MATUSDA, M.; OOHIRA, A. Chondroitin sulphate proteoglycans in the rat brain: Candidates for axon barriers of sensory neurons and the possible modification by laminin of their actions. **European Journal of Neuroscience**, v. 7, p. 613–621, 1995.

KAWAUCHI, S.; BEITES, C. L.; CROCKER, C. E.; WU, H. H.; BONNIN, A.; MURRAY, R.; CALOF, A. L. Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium. **Developmental Neuroscience**, v. 26, p. 166-180, 2004.

KIM, S. U.; VELLIS, J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 10, p. 2183-200, 2009.

KIM, Y. M.; CHOI, Y. S.; CHOI, J. W.; PARK, Y. H.; KOO, B. S.; ROH, H.J. Effects of systemic transplantation of adipose tissue-derived stem cells on olfactory epithelium regeneration. **Laryngoscope**, v.11, n.5, p. 993-999, 2009.

KIRINO, T. Delayed neuronal death. **Neuropathology**, v. 20, p. 95-97, 2000.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos**. Porto Alegre: Artmed, 2004. v.2, p.81-86.

KOVACKS, T.; CAIRINS, N.J.; LANTOS, P.L. Beta-amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in the olfactory bulb in ageing and Alzheimer's disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 25, n. 6, p. 481-491, 1999.

KRUDEWIG, C.; DESCHL, U.; WEWETZER, K. Purification and in vitro characterization of adult canine olfactory ensheathing cells. **Cell and tissue research**, v. 326, p. 687–696, 2006.

LAAKE, J. H.; HAUG, F. M.; WIELOCH, T.; OTTERSEN, O. P. A simple in vitro modelo f ischemia based on hippocampal slice culture and propidium iodide fluorescence. **Brain Research Protocols**, v. 4, p. 173-184, 1999.

LATOV, N.; NILAVER, G.; ZIMMERMAN, E. A.; JOHNSON, W. G.; SILVERMAN, A. J.; DEFENDINI, R.; COTE, L. Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury. **Developmental Biology**, v. 72, p. 381-384, 1979.

LEE, A. W.; EMSLEY, J. G.; BROWN, R. E.; HAGG, T. Marked differences in olfactory sensitivity and apparent speed of forebrain neuroblast migration in three inbred strains of mice. **Neuroscience**, v. 118, p. 263–270, 2003.

LEE, C. H.; JEON, S.; SEO, B. S.; MO, J.; JEON, E.; CHOI, A.; KIM, J. Transplantation of neural stem cells in anosmic mice. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, vol. 3, n. 2, p. 84-90, 2010.

LEON, M.; COOPERSMITH, R.; LEE, S.; SULLIVAN, R. M.; WILSON, D. A., WOO, C.C. Neural and behavioral plasticity induced by early olfactory learning. In R.W. ASLIN, J. R.; ALBERTS AND M.R. PEDERSEN (Ed.) **Perinatal Development: a Psychobiological Perspective**. Academic Press, New York, 1987, v. 1, p. 145- 167.

LEONARD, B. E.; TUIE, M. Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. **International Review of Neurobiology**, v. 22, p. 251-286, 1981.

LEONARD, C. M. Effects of neonatal (day 10) olfactory bulb lesions on social behaviour of female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Journal of Comparative Physiology**, v. 80, p. 208-215, 1972.

LENZA, G.; MANOZZOA, L.; GOTTARDOA, S.; ACHAVALB, M.; SALBEGOA, C.; RODNIGHTA, R. Temporal profiles of the in vitro phosphorylation rate and immunocontent of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after kainic acid-induced lesions in area CA1 of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. **Brain Research**, v. 1, n. 1–2, p. 188–196, 1997.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annual Review Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 605-631, 2005.

LIN, S. H.; CHU, S.T.; YUAN, B. C.; SHU, C. H. Survey of the frequency of olfactory dysfunction in Taiwan. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 72, n. 2, p. 68-71, 2009.

LIU, D.; SMITH, C. L.; BARONE, F. C.; ELLISON, J. A.; LYSKO, P. G.; LI, K.; SIMPSON, I. A. Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain. **Molecular Brain Research**, v.68, p. 29-41, 1999.

LILLIE, R. D.; FULMER, H. M. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 4. ed. New York: The Blackiston Company, 1973.

LIMA, C.; PRATAS-VITAL, J.; ESCADA, P.; HASSE-FERREIRA, A.; CAPUCHO, C.; PEDUZZI, J. D. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: A pilot clinical study. **Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 29, n. 3, p. 191-203, 2006.

LU, J.; ASHWELL, K. Olfactory ensheathing cells- Their potential use for repairing the injured spinal cord. **Spine**, v. 27, n. 8, p. 887-892, 2002.

LUDWIN, S.K. Reaction of oligodendrocytes and astrocytes to trauma and implantation. A combined autoradiographic and immunohistochemical study, **Laboratory Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 52, p. 20-30, 1985.

LUDWIN, S.K. The function of perineonal satellite oligodendrocytes: an immunohistochemical study. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 10, n. 2, p. 143-149, 1984.

LUNDBERG, C.; LIDMAN, O.; HOLMDAHL, R.; OLSSON, T.; PIEHL, F. Neurodegeneration and glial activation patterns after mechanical nerve injury are differentially regulated by non-MHC genes in congenic inbred rat strains. **Journal of Comparative Neurology**, v. 431, n. 1, p. 75-87, 2001.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1980. 292 p.

MACKAY-SIM, A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 148, p. 47-58, 2010.

MACKAY-SIM, A.; FERON, F.; COCHRANE, J.; BASSINGTHWAIGHTE, L.; BAYLISS, C.; DAVIES, W.; FRONEK, P.; GRAY, C.; KERR, G.; LICINA, P.; NOWITZKE, A.; PERRY, C.; SILBURN, P. A. S.; URQUHART, S.; GERAGHTY, T. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. **Brain**, v. 131, p. 2376 – 2386, 2008.

MACKAY-SIM A.; KITTEL, P. W. Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. **The Journal of Neuroscience**, v. 1, n. 4, p. 979-984, 1991.

MAIESE, K. Neuronal survival: cellular and molecular pathways for protection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 835, p. 255-273, 1997.

MARGRIE, T.W.; SAKMANN, B.; URBAN, N.N. Action potential propagation in mitral cell lateral dendrites is decremental and controls recurrent and lateral inhibition in the mammalian olfactory bulb. **Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America**. v. 324, p. 318-324, 2001.

MARINO, R.; RASMUSSEN, T. Cadeias neuronais aferentes e eferentes. **Neurology**, v. 18, p. 825-835, 1968.

MARSHALL, C. T.; LU, C.; WINSTEAD, W.; ZHANG, X.; XIAO, M.; HARDING, G.; KLUEBER, K. M.; ROISEN, F. J. The therapeutic potential of human olfactory-derived stem cells. **Histology and Histopathology**, v. 21, p. 633-643, 2006.

MATHEWSON, A.J.; BERRY, M. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. **Brain Research**, v. 327, p. 61-69, 1985.

McGREGOR, I.S.; SCHRAMA L.; AMBERMOON, P.; DIELENBERG, R. A.; Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT); fox

odour) elicits specific defensive behaviours in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 129, n. 1-2, p. 1-16, 2002.

McGREGOR, I. S.; HARGREAVES, G. A.; APFELBACH, R.; HUNT, G. E. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 17, p. 4134-4144, 2004.

MEESE, G. B.; BALDWIN, B. A. Effects of olfactory bulb ablation on maternal behaviour in sows. **Applied Animal Ethology**, v. 1, p. 379-386, 1976.

MEGUID, M. M.; MASATO, K.; ZHONG-JIN, Y.; JOHN, G.; ALESSANDRO, L. L. Acute adaptive changes in food intake pattern following olfactory ablation in rats. **Neuroreport**, v. 8, n. 6, p. 1439-1444, 1997.

MENKO, B. P.; JACKSON, J. E. A banded topography in the developing rat's olfactory epithelium surface. **Journal of Comparative Neurology**, n. 388, p. 293-306, 1997.

MIYAKE, T.; HATTORI, T.; FUKUDA, M.; KITAMURA, T.; FUJITA, S. Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex. **Brain Research**, v. 451, p. 133-138, 1988.

MOMBAETS, P. Genes and ligands for odorant vomeronasal and taste receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 263-278, 2004.

MONTE, F. H. M. **Participação do receptor beta-adrenérgico na modulação do comportamento defensivo de gatos expostos ao odor de gatos**. 2006. 121 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

MONTGOMERY, D. L. Astrocytes: form, function, and roles in disease. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 2, p. 145-167, 1994.

MORI, K.; NAGÃO, H.; YOSHIHARA, Y. The olfactory bulb: the coding and processing of odor molecule information. **Science**, v. 286, p. 711-715, 1999.

MURRELL, W.; SANFORD, E.; ANDERBERG, L.; CAVANAGH, B.; MACKAY-SIM, A. Olfactory stem cells can be induced to express chondrogenic phenotype in a rat intervertebral disc injury model. **Spine Journal**, v. 9, n. 7, p. 585-594, 2009.

NAGY, J. I.; RASH, J. E. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. **Brain Research Reviews**, v. 32, n. 1, p. 29-44, 2000.

NAVE, K. A.; SCHELLER, R. H. Neuronal and glial cell biology. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, p. 541-542, 2000.

NAKAMURA, T. Cellular and molecular constituents of olfactory sensation in vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126, n. 1, p. 17-32. 2000.

NEARY, J. T. Trophic actions of extracellular ATP on astrocytes, synergistic interactions with fibroblast growth factors, and underlying signal transduction mechanisms. **Ciba Foundation Symposium**, v. 198, p. 130–141, 1996.

NETO, F. X. P.; TARGINO, M. N.; PEIXOTO, V. S.; ALCÂNTARA, F. B.; JESUS, C. C.; ARAÚJO, D. C.; FAILHO, E. F. L. M. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 15, n. 3, p. 350-358, 2011.

NORDIN, S.; BRAMERSON, A. Complaints of olfactory disorders: epidemiology, assessment and clinical implications. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 8, n. 1, p. 10-15, 2008.

OLIVEIRA, A. C. Considerações constitucionais sobre a pesquisa terapêutica das células-tronco. **Revista de Direito Privado**, v. 30, p. 74-90, 2007.

OTHMAN, M. M.; KLUEBER, K. M.; ROISEN, F. J. Identification and culture of olfactory neural progenitors from GFP mice. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 78, n. 2, p. 57-70. 2003.

OVERALL, K.; ARNOLD, S. Olfactory neuron biopsies in dogs: a feasibility pilot study. **Applied Animal Behavior Science**, v. 105, n. 4, p. 351-357, 2007.

PAGANO, S. F.; IMPAGNATIELLO, F.; GIRELLI, M.; COVA, L.; GRIONI, E.; ONOFRI, M.; CAVALLARO, M.; ETTERI, S.; VITELLO, F.; GIOMBINI, S.; SOLERO, C. L.; PARATI, E. A. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. **Stem Cells**, n. 18, p. 295-300, 2000.

PATEL, N. P.; MHATRE, A. N.; LALWANI, A. K. Biological Therapy for the Inner Ear. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 4, n. 11, p. 1811-1819, 2004.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. **Cell Calcium**, v. 38, p. 375-382, 2005.

PFRIEGER, F. W. Role of glia in synapse development. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 5, p. 486-490, 2002.

PIERRE-MARIE L.; SAGHATELYAN, A.; LEMASSON, M. Inhibitory interneurons in the olfactory bulb: from development to function. **Neuroscientist**, v. 10, p. 292-303, 2004.

PIXLEY, S. K. Characterization of olfactory receptor neurons and other cell types in dissociated rat olfactory cell cultures. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 14, n. 7/8, p. 823-839, 1996.

PRIVAT, A.; GIMENEZ-RIBOTTA, M.; RIDET, J. L. Morphology of astrocytes. In: **Neuroglia**, KETTERMANN, H.; RANSON, B. R. (Eds). New York: Oxford University Press, p.58-84, 1995.

RAIVICH G.; BOHATSCHEK, M.; KLOSS, C. U.; WERNER, A.; JONES, L. L.; KREUTZBERG, G. W. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain Research Reviews**, v. 30, p. 77-105, 1999.

RAMOS, A. T.; VIOTT, A. M.; MACHADO, G. F. Astrócitos. In: GRAÇA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L. A. V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011. p. 35-59.

REICHENBACH, A.; WOLBURG, H. Astrocytes and ependymal glia. **Neuroglia**. 2. ed. Oxford: University Press, 2005. p. 13-35.

REIER, P. J.; HOULE, J. D. The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. **Advances in Neurology**, v. 47, p. 87–138, 1988.

RIDET, J. L.; MALHOTRA, S. K.; PRIVAT, A.; GAGE, F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 570–577, 1997.

ROISEN, F. J.; KLUEBER, K. M.; LU, C. L.; HATCHER, L. M.; DOZIER, A.; SHIELDS, C. B. MAGUIRE, B. A. S. Adult human olfactory stem cells. **Brain Research**, v. 890, p. 11–22, 2001.

ROWE, F. A.; EDWARDS, D. A. Olfactory bulb removal: influences on the aggressive behaviors of male mice. **Physiology Behavior**, v. 7, p. 889-892, 1971.

SALLIS, E. S.; PEREIRA, L. A. V.; GRAÇA, D. L. Oligodendrócitos. In: GRAÇA, D. L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L. A. V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011. p. 23-33.

SCHIFTER, D.; GIORDANA, M. T.; MIGHELI, A.; GIACCONE, G.; PEZZOTTA, S.; MAURO, A. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. **Brain Research**, v. 374, p. 110-118, 1986.

SCHWAB, M. E. Repairing the injured spinal cord. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1029-1031, 2002.

SEEGAL, R. F.; DENENBERG, V. H. Maternal experience prevents pup-killing in mice induced by peripheral hyposmia. **Physiological Behaviour**, v. 13, p. 339-341, 1974.

SHAO, Y.; MCCARTHY, K. Plasticity of astrocytes. **Glia**, v. 11, p. 147-155, 1994.

SIGNORET, J. P.; MAULEON, P. Action de l'ablation des bulbes olfactifs sur le mecanismes de la reproduction chez la truie. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 2, p. 167-174, 1962.

SKINNER, A. P. C.; PACHNICKE, S.; LAKATOS, A.; FRANKLIN, R. J. M.; JEFFERY, N. D. Nasal frontal sinus mucosa of the adult dog contain numerous olfactory sensory neurons and ensheathing glia. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 9-15, 2005.

SLEAK, M.; PFRIEGER, F. W. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 2, p. 146-156, 2004.

SMART, N.; RILEY, P. R. The stem cell movement. **Circulation Research**, v. 102, n. 10, p. 1155-68, 2008.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. As células-tronco e o seu potencial na reparação de órgãos e tecidos. In: ELIAS, D.O. **Manual de instrução programada: princípios de hematologia e hemoterapia**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Educação Continuada em Biomedicina e Biotecnologia. 2005.

STAPLES, L. G.; GLENN, E. H.; VAN NIEUWENHUIJZEN, P.; MCGREGOR, I. S.; Rats discriminate individual cats by their odor: possible involvement of the accessory olfactory system. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, v. 32, p. 1209– 1217, 2008

STAPLES, L. G.; MCGREGOR, I. S.; Defensive responses of Wistar and Sprague-Dawley rats to cat odour and TMT. **Behavioral Brain Research**, v. 172, p. 351–354, 2006.

STREIT, W. J.; KINCAID-COLTON, C. A. The brain's immune system. **Scientific American**, v. 273, n. 5, p. 54-61, 1995.

SUMMERS, A.; LOWE, J. S. **Histology**. London: Mosby, 1993. p. 206-225.

SWITZER, R. C.; DE OLMOS, J.; HEIMER, L. Olfactory system. In G. PAXINOS (ed.). **The rat nervous system, forebrain and midbrain**. Sydney: Academic Press, 1985. v. 1, p. 1-36.

TAKAHASHI, L. K.; NAKASHIMA, B. R.; HONG, H.; WATANABE, K. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1157-1167, 2005.

THOMSON J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V.S. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**. v. 282, n. 5391, p. 1145-7, 1998.

THOMSON, M. L.; EDWARDS, D. A. Olfactory bulb removal impairs the hormonal induction of sexual receptivity in spayed female mice. **Physiology & Behavior**, v. 8, p. 1141-1146, 1972.

TODA, M.; MIURA, M.; ASOU, H.; SUGIYAMA, I.; KAWASE, T.; UYEMURA, K. Suppression of glial tumor growth by expression of glial fibrillary acidic protein. **Neurochemical Research**, v. 24, p. 339–343, 1999.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2005. 331 p.

TSUJIGIWA, H.; NISHIZAKI, K.; TESHIMA, T.; TAKEDA, Y.; YOSHINOBU, J.; TAKEUCHI, A. The engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the olfactory epithelium. **Brain Research**, v. 1052, n. 1, p. 10-15, 2005.

VANDERLEI, S. R. S.; AMORIM, M. J. A. A. L.; OLIVEIRA, J. M. R. P. B.; SILVA, A. C. J.; SILVA, L. T. R.; COSTA, E. F.; CIDRAL, A. H.; ROLIM, V. P.; BARRETTO, M. L. M.; FERREIRA, L. R. Neuroanatomia funcional do paladar e do olfato nos animais domésticos. In: Jornada de Pesquisa e Extensão, 10., 2010, Recife. **Anais...**, Recife: UFRPE, 2010.

VELDER, C.; ULVESTAD, E.; GRUNDT, I.; CONTI, G.; NYLAND, H.; MATRE, R.; PLEASURE, D. Fc receptor for IgG (FcR) on rat microglia. **Journal of Neuroimmunology**, v. 49, n. 1-2, p. 19-24, 1994.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nature**, v. 6, p. 626-640, 2005.

WALZ, W. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. **Progress in Neurobiology**, v. 33, n. 4, p. 309-333, 1989.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 157-68, 2000.

WETZIG, A., MACKAY-SIM, A., MURRELL, W. Characterization of olfactory stem cells. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 11-12, p. 1673-1691, 2011.

WIEDENMAYER, C. P.; BARR, G. A.; Ontogeny of defensive behavior and analgesia in rat pups exposed to an adult male rat. **Physiology Behavior**, v. 63, p. 261-269, 1998.

WOERLY, S.; DOAN, V. D.; SOSA, N.; DE VELLIS, J.; ESPINOSA-JEFFREY, A. Prevention of gliotic scar formation by neurogel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. **Journal of Neuroscience Research**, v. 75, n. 2, p. 262-272, 2004.

WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. Recovery of olfactory function after bilateral bulbectomy, **Science**, v. 216, p. 322-324, 1982.

XI, G.; KEEP, R. F.; HOFF, J. T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. **Lancet Neurology**, p. 53-63, 2006.

YANG, H.; SHI, P.; ZHANG, Y. P.; ZHANG, J. Composition and evolution of the V2r vomeronasal receptor gene repertoire in mice and rats. **Genomics**, v. 86, n. 3, p. 306-315, 2005.

ZANGROSSI, H. J.; FILE, S. E. Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 43, p. 1195-1200, 1992.

ZHANG, X.; KLUERER, K. M.; GUO, Z.; CAI, J.; LU, C.; WINSTEAD, W. I.; QIU, M.; ROISEN, F. J. Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. **Brain Research**, v.1073-1074, p. 109-119, 2006.

ZIGOVA, T.; AMEMORI, T.; RACEKOVA, E.; MARSALA, J. Atypical glomerulisation in the remnants of the olfactory bulb after bulbectomy, a light microscopic study, **Journal für Hirnforschung**, v. 29, p. 217-220, 1988.

ZIMMERMANN, D. R.; DOURS-ZIMMERMANN, M. T.; SCHUBERT, M.; BRUCKNER-TUDERMAN, L. Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. **Journal of Cell Biology**, v. 124, p. 804- 817, 1994.