MARCIO NOGUEIRA RODRIGUES

**Avaliação do transplante de células tronco do epitélio olfatório de ratos em
coelhos da raça Nova Zelândia submetidos a trauma medular**

São Paulo

2011

MARCIO NOGUEIRA RODRIGUES

Avaliação do transplante de células tronco do epitélio olfatório de ratos em coelhos da raça Nova Zelândia submetidos a trauma medular

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2011

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.2464
FMVZ

Rodrigues, Marcio Nogueira

Avaliação do transplante de células tronco do epitélio olfatório de ratos em coelhos da raça Nova Zelândia submetidos a trauma medular / Marcio Nogueira Rodrigues. -- 2011.

110 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

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

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Terapia celular. 2. Olfatório. 3. Medula. 4. Células-Tronco. I. Título.

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do transplante de células tronco do epitélio olfatório de ratos em coelhos da raça nova Zelândia submetidos a trauma medular", protocolado sob o nº1828/2009, utilizando 05 (cinco) ratas, sob a responsabilidade da Profa Dra Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 25/11/2009.

We certify that the Research "Evaluation of the transplantation of stem cell of the rat olfactory epithelium in rabbits breed New Zealand subject to spinal cord injury", protocol number 1828/2009, utilizing 05 (five) rats, under the responsibility Profa Dra Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 11/25/2009.

São Paulo, 30 de novembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Marcio Nogueira

Título: Avaliação do transplante de células tronco do epitélio olfatório de ratos em coelhos da raça Nova Zelândia submetidos a trauma medular

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/2011.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Dedicatória

A Deus pela dádiva da vida, por ser meu alicerce nos momentos de fraqueza, por dividir meus momentos de alegria ou tristeza, por me escutar nos momentos de solidão e pelos ensinamentos ao longo das minhas caminhadas.

A meu pai Antonio Wilson Rodrigues e minha mãe Maria Devanete Nogueira Rodrigues por todo amor dedicado, pelas palavras que me confortam, por tudo o que passaram e passam para me verem feliz e com meus objetivos cumpridos. A minha irmã Márcia pela amizade, paciência e cumplicidade. A meu irmão Maurício que mesmo na sua inocência de criança sempre me viu como um amigo distante. Amo Vocês!

Aos meus avós e avôs, em especial meu avô João Rodrigues da Silva (in memorian), as minhas tias e tios que me deram suporte na minha empreitada, em especial a Ilanilda, Rita e Paulo. A meus primos que estão comigo em todas as situações e a todos os meus familiares que torcem por mim.

A todos os animais que são frutos da minha existência, o meu estimado obrigado e pedido de perdão.

AGRADECIMENTOS

A meu sempre orientador Moacir Franco de Oliveira que me incentivou a continuar em busca de algo maior e a José Fernando de Albuquerque pela torcida e também pelo incentivo.

A minha orientadora Maria Angélica Miglino que a cada dia nos faz buscar crescer e nos tornar não só bons pesquisadores, mas também boas pessoas. Obrigado pela confiança a mim depositada, pela oportunidade e pela amizade.

A Graciela Pignatari pelos ensinamentos “celulares” e pessoais com seus “puxões de orelha”, a ajuda em tempo incondicional e por me escutar. A Profa. Patrícia Braga pela importante participação no projeto e ajuda nos momentos de dúvida que foram frequentes. A Flávio Ribeiro Alves por me ensinar a trabalhar com a cultura primária e pela força a mim dada a distância. A Janaína Monteiro pela ajuda, conhecimento e disponibilidade.

Aos amigos André Francioli (Bebel), Phelipe Favaron (Phe), Ana Mançaneres (Manças), Marina Brólio (Má), Rafael Cardoso (Rafa), Érika Toledo (Gaúcha), Catarina Tivane e Thais Lessa (Tatá) pela amizade, cumplicidade, ajuda, compreensão e risadas. Obrigado por me escutarem e estarem presente comigo em importantes momentos.

Ao amigo Matheus Levi Tajra, obrigado pela amizade, pela divisão da empreitada, cumplicidade, discussão em prol de realizarmos um bom trabalho e pelos dias dedicados. Ao amigo Greysson Zanata Esper pela ajuda, disponibilidade e risadas.

A Fabiele Baldino Russo e Isabela Fernandes por todo o tempo, disponibilidade, “exploração” e amizade meu muitíssimo obrigado pela ajuda para finalizar os trabalhos com células.

A todos os outros amigos e colegas de pós-graduação: Cláudia Marinovic, Sarmiento, Juliana, João Morini, Dilayla, Naira, Dayane, Elaine, Amanda, Paula, Renata e Cristiane

Wenceslau e aos que esqueci de colocar o nome, obrigado por me suportarem e me ajudarem no meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus velhos amigos que mesmo na distância continuaram a torcer por mim.

A todos que indistintamente me ajudaram para vencer os obstáculos e conseguir terminar meu trabalho em especial as meninas de Pirassununga Juliana Cassals e Anna Carolina e a Thiago Aloia.

Aos professores Antônio Assis Neto (em especial pelos conselhos, amizade e cumplicidade), Carlos Eduardo Ambrósio, José Roberto Kfoury Jr, Paulo Maiorka e Pedro Primo Bombonato pelos ensinamentos, convivência, disponibilidade e confiança.

Aos funcionários da anatomia Maicon, Jaqueline, Rose Eli, Ronaldo, Diogo, Augusto e Fabiana obrigado pela ajuda e atenção em todos os momentos que precisei.

Ao cirurgião Renato e anestesista Juliana (Jú) pela importante ajuda durante a execução do experimento cirúrgico e terapêutico com os coelhos. Obrigado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP) pelo apoio financeiro.

RESUMO

RODRIGUES, M. N. **Avaliação do transplante de células-tronco do epitélio olfatório de ratos em coelhos da raça Nova Zelândia submetidos a trauma medular.** [Evaluation of transplantation of stem cells from rat olfactory epithelium in rabbits subjected to spinal cord injury]. 2011 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As células-tronco do epitélio olfatório possuem a capacidade de diferenciação, regeneração de neurônios olfatórios e atuam no processo de mielinização das fibras nervosas. O objetivo desse trabalho foi verificar o potencial terapêutico de células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar em terapia celular em coelhos submetidos à lesão medular. Foram utilizados ratos com idade de 2 meses e coelhos da raça nova Zelândia obtidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os fragmentos do epitélio olfatório dos ratos foram tratados e colocadas em cultivo em DMEM-F12 suplementado. Foram testadas nos coelhos nova Zelândia 4 tipos de lesão medular, hemiseção dorsal e ventral e secção lateral e total. Foi realizado teste de potencial teratogênico em camundongos NUDE e para terapia foram transplantadas 5×10^5 células em 4 coelhos submetidos a lesão medular ventral. A morfologia predominante das células em cultivo era fibroblastóide. Os ensaios de curva de crescimento e tendência a formação de colônia demonstraram que as condições de cultivo destas células estavam adequadas. Foi encontrada positividade para Vimentina, Oct-4, GFAP, OMP, Nanog, Citoqueratina-18 e Beta tubulina em imunofluorescência. Em citometria de fluxo foi encontrada negatividade para CD 113, CD 117 e Stro-1 e positividade para Vimentina, Nanog e OMP. Em análise por imunohistoquímica verificou-se marcação positiva para Vimentina, OMP, GFAP e Nanog. Verificou-se marcação positiva no material coletado por retrovírus GFP. Houve melhora clínica nos animais avaliados 21 dias após o transplante de células com retorno de alguns reflexos como o de propriocepção consciente e colocação tátil, o mesmo apresentou ainda reflexo de pedalagem. Conclui-se que o melhor modelo para indução da lesão medular em coelhos é a hemiseção ventral da medula e que as células-tronco olfatórias de ratos Wistar possuem grande potencial terapêutico em animais submetidos à lesão medular. Palavras chave: Terapia celular, Olfatório, Medula, Células-Tronco.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. N. **Evaluation of transplantation of stem cells from rat olfactory epithelium in rabbits subjected to spinal cord injury.** [Avaliação do transplante de células-tronco do epitélio olfatório de ratos em coelhos da raça Nova Zelândia submetidos a trauma medular]. 2011 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Stem cells from olfactory epithelium are capable of differentiation, regeneration of olfactory neurons and act in the myelination process of nerve fibers. The aim of this study was to verify the therapeutic potential of stem cells from the olfactory epithelium of Wistar rats in cell therapy in rabbits subjected to spinal cord injury. Rats were aged 2 months and New Zealand rabbits obtained in the bioterio of the Animal Pathology Department, Faculty of Veterinary Medicine, at University of Sao Paulo. Samples of the olfactory epithelium of rats were treated and placed in culture in DMEM-F12 supplemented. Four types of spinal cord injury were tested in New Zealand rabbits: hemisection dorsal and ventral, total and lateral section. The teratogenic potential test was made in NUDE mice. For therapy were transplanted 5×10^5 cells in 4 rabbits subjected to spinal cord injury in the ventral region. The cells showed predominant fibroblastoid morphology. Tests for growth curve and colony formation demonstrated that culture conditions in these cells were suitable for the development of these cells. In the immunofluorescence analyses the cells showed positive reaction for vimentin, Oct-4, GFAP, OMP, Nanog, cytokeratin-18 and beta tubulin. In flow cytometry analyses was found negative reaction for CD 113, CD 117 and Stro-1 and positive reaction for vimentin, Nanog and OMP. In immunohistochemistry analysis were observed positive reaction for vimentin, OMP, GFAP and Nanog. Positive labeling was showed on the collected material for GFP. Clinical improvement occurred in the animals evaluated 21 days after cell transplantation. With some reflections about how the placement of conscious proprioception and tactile, it also presented a reflection of pedaling. After this, we concluded that the better model for induction of spinal cord injury in rabbits is the hemisection ventral and the olfactory stem cells of Wistar rats showed a great therapeutic potential in animals subjected to spinal cord injury.

Key words: Cellular therapy, Olfactory, Spinal Cord, Stem Cell

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto de ratos Wistar utilizados para obtenção do epitélio olfatório para cultura primária de células tronco	40
Figura 2- Procedimentos de coleta do epitélio olfatório de ratos e processamento do material para cultivo celular. a) Cabeça do rato após remoção de pêlo e pele; b) Corte sagital da cabeça do rato para acesso ao epitélio olfatório. A localização do epitélio olfatório é evidenciada (estrelas); c) Cabeça do rato com bulbo olfatório evidenciado (estrela); d) Remoção da lâmina crivosa (estrela) do osso etmóide; e, f) Lavagem dos fragmentos com PBS, como auxílio de pipeta; g) Dissociação mecânica dos fragmentos epiteliais com o auxílio de lâminas de bisturi; h) Incubação dos fragmentos de epitélio olfatórios em estufa a 37°C e 5% de CO ₂	43
Figura 3- Fotomicrografias do cultivo de células-tronco de epitélio olfatório de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento. a) Células de epitélio olfatório de rato não aderidas na placa de Petri; b) Presença de células aderidas e com tendência a formação de colônias. Pode-se observar também a presença de células mortas e debris, fragmentos celulares ou produtos de seu metabolismo; c) Células apresentando grau de confluência de 70%, um indicador da necessidade de repique celular, observar que a maioria apresenta formato fusiforme; 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	62
Figura 4- Gráfico da curva de crescimento das células-tronco olfatórias de rato. No eixo da horizontal verificam-se os dias de contagem das células. É importante ressaltar que a contagem foi iniciada na segunda passagem (P2). Neste gráfico fica evidenciado que as células se proliferam exponencialmente até a sétima passagem, quando ocorre seu pico máximo, entrando em um platô estacionário na décima passagem, onde ocorre o início do declínio de crescimento.....	63
Figura 5- Fotomicrografias de células-tronco do epitélio olfatório de rato, evidenciando sua morfologia fusiforme, semelhante a de fibroblastos. a) Células olfatórias de rato em P2. Observar que as células apresentam tendência de diferenciação. Essa tendência pode ser observada devido à morfologia espalhada de algumas células (estrela); b) Células em P4; c) Células em P5; d) Células em P7, observar que o número de células é maior demonstrando um maior crescimento nessa passagem. Aumento de 10x em a, b e c; 4x em d.....	64

Figura 6- Fotomicrografias de células-tronco do epitélio olfatório de rato obtidas com intervalos de 7 dias para estudo do potencial de formação de colônia desse tipo de células. a) No dia 1, verifica-se que as células ainda não estão aderidas na placa; b) No dia 7, evidencia-se que as células já aderidas mostram uma tendência a formação de colônia; c e d) No dia 14 é possível observar que as células mostram forte tendência a formação de colônias. Aumento de 4x em a, b, c e d.....	65
Figura 7- Fotos de células-tronco do epitélio olfatório de ratos para estudo do potencial de formação de colônias dessas células. a) Foto de placa de Petri evidenciando a presença de colônias de células, após fixação com paraformaldeído 4% e coloração com cristal violeta. b) Fotomicrografia de células-tronco do epitélio olfatório de rato fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com cristal violeta para estudo do seu potencial de formação de colônia, notar agrupamento celular. Aumento de 10x.....	66
Figura 8 – Análise por imunocitoquímica das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar. A,B) expressão GFAP, C,D) Nanog e E,F) OCT-4. A,B, C e E) 10x, D e F 20x.....	68
Figura 9 – Análise por imunocitoquímica das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar. A,B) expressão do OMP, C,D) Vimentina. E) Beta Tubulina e F) Citoqueratina. A e C 10x, B,D,E e F) 20x.....	69
Figura 10: Análise por citometria de fluxo. Notar negatividade para os três marcadores de membrana testados em relação ao controle.....	71
Figura 11: Análise por citometria de fluxo. Notar positividade para os três marcadores testados em relação ao controle.....	72
Figura 12 – Gráfico da análise da proliferação celular das células de epitélio olfatório de ratos Wistar.....	73
Figura 13 - Gráfico da análise da viabilidade celular das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar.....	74
Figura 14 – Fotomicrografia das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar. Em A observar positividade de marcação para Lac-Z. Em B as células estão marcadas com GFP. A e B 10x.....	75
Figura 15 – Análise eletroforética dos produtos de RT-PCR das células do Epitélio Olfatório de Ratos. O cDNA obtido a partir do RNA foi utilizado como fita molde. Os oligonucleotídeos utilizados anelam nos genes, GAPDH, Oct4, Nanog, Vimentina e p75. O gel de agarose 1,5 % foi submetido à corrida eletroforética sob tensão de 100 V/cm ² e corado com brometo de etídeo antes de ser fotografado pelo sistema . M) marcador de peso molecular, PCR marker, 100 bp; 1) GAPDH; 2) Oct4; 3) Nanog; 4) Vimentina; 5) p75.....	77

Figura 16 – Observar que após injeção de células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar no membro pélvico esquerdo não foram observadas formações tumorais.....	78
Figura 17 - Animais experimentais em gaiolas individuais	79
Figura 18 - Fotografias da técnica cirúrgica para hemissecção da medula espinhal em coelhos. A – Animal intubado mantido em anestesia inalatória. B – Incisão na linha dorsal média sobre os processos espinhosos. C – Incisão da musculatura lateral aos processos espinhosos até as facetas articulares das vértebras T11-T12. D – Exposição da medula espinhal, através da retirada dos processos espinhosos e laminectomia. E – Hemissecção medular. F – Tecido adiposo retirado do subcutâneo dos coelhos submetidos à cirurgia, para cobrir a região da laminectomia após a hemissecção. G – Tecido adiposo depositado sobre o local de exposição da medula espinhal. H – Animal se recuperando do procedimento cirúrgico em pós operatório.....	80
Figura 19 – Fotomicrografia de cortes transversais da medula de coelho da raça Nova Zelândia. Em (A) Observar medula intacta. Em (B) Secção lateral (SL). Em (C) Hemisecção Dorsal (HD) e em (D) Hemisecção Ventral da medula, notar que a mesma está bem dividida ao meio. A, B, C e D 4x HE.....	82
Figura 20 – Fotomicrografia do foco da lesão medular induzida em coelhos em corte longitudinal. A – Cavitação (seta preta), edema, focos necróticos (seta amarela) e infiltrados celulares. Aumento em 4x. B – Aumento da região, onde se observa algum tecido necrótico, áreas cavitárias e infiltrado celular (halo). HE.	83
Figura 21 – Fotomicrografia de cortes medulares analisados por imunohistoquímica pós transplante celular nos coelhos. Notar expressão positiva para vimentina (A) seta amarela, OMP (B) seta amarela, GFAP (C) seta amarela e Nanog (D) seta amarela (D). A, B, C e D 20x.....	84
Figura 22 – Fotomicrografia da lesão ventral tratada com células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar. Em (A) coloração de hematoxilina-eosina, verificar ausência de hemácias em torno da lesão (halo amarelo). Em B e C, notar reação por imunofluorescência das células transfectadas com retrovírus GFP. A e C 20x, B 10X.....	85
Figura 23 – Fotografia evidenciando o transplante das células-tronco de epitélio olfatório de ratos Wistar imediatamente após lesão medular ventral induzida em coelhos Nova Zelândia.....	87
Figura 24 – Fotografia evidenciando a coloração da urina caracterizando a lesão vesical secundária a lesão medular em coelhos Nova Zelândia.....	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Anticorpos primários utilizados para a imunocitoquímica	47
Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular por RT-PCR das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Justificativa	18
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 Cultivo de células do epitélio olfatório	23
3.2 Lesão medular	29
3.3 Terapia celular no sistema nervoso	33
4. MATERIAL E MÉTODO	39
4.1 Obtenção e cultivo das células-tronco do epitélio olfatório de ratos	40
4.2 Dissociação enzimática das células aderentes: Repique celular	41
4.3 Expansão celular	44
4.4 Avaliação do crescimento celular: curva de crescimento	44
4.5 Ensaio de unidade formadora de colônia	45
4.6 Congelamento e Descongelamento Celular	45
4.7 Imunocitoquímica	46
4.8 Citometria de fluxo	48
4.9 Ensaio da proliferação celular pelo método colorimétrico MTT	48
4.10 Análise da viabilidade das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar pelo método azul de Trypan	49
4.11 Análise da expressão do gene exógeno LacZ nas células tronco o epitélio olfatório de ratos Wistar	49
4.12 Transdução das células-tronco do epitélio olfatório com Lentvírus carreando o gene GFP	50
4.13 Análise molecular das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar por RT-PCR	51
4.14 Análise do potencial teratogênico das células-tronco do epitélio olfatório de ratos wistar em camundongos NUDE	53
4.15 Amostragem – animais experimentais	53
4.16 Indução da Lesão Experimental em Coelhos e Transplante de Células-Tronco	55
4.17 Cuidados Pós-Operatórios após a Indução da Lesão Medular	56

4.18 Protocolo de Eutanásia	56
4.19 Técnica de Coloração em Hematoxilina e Eosina.....	57
4.20 Análise por imunohistoquímica	57
5. RESULTADOS	59
5.1 Cultivo das células do epitélio olfatório de ratos	60
5.2 Curva de crescimento	63
5.3 Unidade formadora de colônia	64
5.4 Análise por imunocitoquímica das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar	67
5.5 Citometria de fluxo	70
5.6 Ensaio da proliferação celular pelo método colorimétrico MTT	73
5.7 Análise da viabilidade das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar pelo método azul de Trypan	73
5.8 Transução com LACz e GFP	74
5.9 Análise molecular das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar por RT- PCR	76
5.10 Avaliação do potencial teratogênico das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar em camundongos imunossuprimidos NUDES	77
5.11 Indução da Lesão Medular por Hemissecção em Coelhos	78
5.12 Avaliação por Microscopia de Luz e Imunohistoquímica da Medula Espinhal de Coelhos Submetidos a Hemissecção Medular	83
5.13 Avaliação clínica dos coelhos submetidos a terapia celular com células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar.....	85
6. DISCUSSÃO	88
7. CONCLUSÕES	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco podem recompor tecidos danificados e teoricamente tratar um infindável número de problemas, tais como: alguns tipos de câncer, mal de Parkinson e de Alzheimer, doenças degenerativas e cardíacas. Uma vez que as mesmas exibem uma fonte para se diferenciar em várias linhagens de células de origem adipogênica, condrogênica, osteogênica e principalmente neurogênica. Apesar de existirem em tecidos nervosos, estas podem ser suficientemente aptas para restaurar axônios, e conseqüentemente a função nervosa (FAULKNER; KEIRSTEAD, 2005).

De acordo com Oliveira (2007), relatando sobre pesquisa terapêutica com células-tronco, 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. Em certas condições fisiológicas e experimentais, podem ser introduzidas e tornarem-se células com funções especiais, tais como células contráteis de músculo cardíaco.

Para Herzog et al. (2003) a crescente abordagem das células-tronco na área científica e na mídia tem ocorrido devido característica de plasticidade das células-tronco, que permite a diferenciação destas em células de diversos tecidos, tais como: fígado, sistema nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrointestinal, coração e músculo esquelético.

De acordo com Compston (1994), o grande desafio da neurologia em todos os tempos tem sido vencer a falta de regeneração espontânea do sistema nervoso central (SNC) adulto após a perda de neurônios e/ou a interrupção de seus prolongamentos, os axônios. Poucos recursos cirúrgicos e farmacológicos estão atualmente disponíveis e nenhum é capaz de reverter totalmente os danos da lesão inicial. Para casos de lesões agudas o sistema nervoso utiliza de um meio chamado neuroplasticidade, que reverte parcialmente à lesão, mas em casos de lesões crônicas precisam ser estudados métodos de terapia regenerativa.

Souza e Elias (2005) relatando sobre o potencial das células tronco na reparação de órgãos e tecidos, cita 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

de sua utilização reside na geração de células capazes de serem usadas como terapia substitutiva de células danificadas por doenças, em lugar dos transplantes.

Paula et al. (2005) em estudos sobre o potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso, afirmam que o transplante de células-tronco constitui uma importante ferramenta na reparação de distúrbios do sistema nervoso. Estudos experimentais demonstram que a regeneração e a reconstrução do circuito neuronal é possível através da terapia celular. As células-tronco têm uma capacidade de se diferenciar em neurônios e glia.

Segundo os mesmos autores, alguns resultados clínicos iniciais sugerem que o transplante de células-tronco adultas é tecnicamente fácil e pode ser empregado seguramente. Pouco é conhecido sobre os mecanismos responsáveis pela melhora funcional na terapia com células-tronco havendo a necessidade de maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação celular, regeneração e recuperação funcional em lesões do sistema nervoso.

1.1 Justificativa

Modelos animais são importantes ferramentas para o estudo das patologias associadas com uma doença específica, além de servirem como um sistema no qual podem ser testadas, novas terapias (CAPECCHI, 1989). A possibilidade de restaurar a função de células e tecidos sem a necessidade de utilização de drogas imunossupressoras e sem a preocupação com a compatibilidade tecidual, torna as células-tronco, uma forte promessa para o tratamento de doenças devastadoras (SOUZA et al., 2003).

O sistema nervoso, contrariamente a outros tecidos, possui capacidade limitada de auto-reparação. As células nervosas maduras apresentam-se incapazes para regeneração, e as células-tronco neurais existem, mas tem uma limitada habilidade para gerar neurônios funcionais em resposta a lesões. Grande parte dos tratamentos das lesões neuronais limita-se ao alívio dos sintomas e a prevenção de danos adicionais, o que torna maior o interesse na possibilidade de reparação do sistema nervoso por transplante de células-tronco (D'AQUINO et al., 2008).

Têm-se o conhecimento que muitos mamíferos apresentam em suas cavidades nasais elementos especializados do sistema neural. Essas células estão exercendo um papel

fundamental para o entendimento dos mecanismos de regeneração dentro do neuroepitélio olfatório, e constitui-se de um importante material de estudo já que são capazes de diferenciar-se em outras linhagens de células-tronco. Por este motivo decidiu-se por estudar a ação terapêutica de células de linhagem neuronal do epitélio olfatório de ratos em coelhos da raça Nova Zelândia submetidos à lesão medular, podendo estes serem modelos clínicos para ensaios terapêuticos semelhantes aos traumas medulares humanos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- 1) Obter e cultivar as células-tronco derivadas do epitélio olfatório de ratos.
- 2) Transplantar células-tronco obtidas do epitélio olfatório de ratos em coelhos submetidos a lesão medular.
- 3) Verificar se células-tronco provenientes do epitélio olfatório de ratos são capazes de restaurar células do sistema nervoso de coelhos *in vivo*.
- 4) Realizar avaliação motora em coelhos submetidos a lesão medular e tratados com células tronco do epitélio olfatório de ratos.
- 5) Avaliar imunohistoquimicamente a proliferação ou desenvolvimento de células tronco do epitélio olfatório de ratos em material coletado do local lesionado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cultivo de células do epitélio olfatório

Vassar (1993), em pesquisas realizadas com células do epitélio olfatório de mamíferos, cita que este localiza-se na cavidade nasal e é caracterizado por uma camada de epitélio ciliar colunar pseudoestratificado, composto por células globosas que se encontram distribuídas por todo o trato olfatório. Esse sistema possui características que o torna um tipo de sensor químico que detecta informações ambientais principalmente as ligadas à alimentação, influências sociais e o comportamento sexual (MORRISON; COSTANZO, 1990), além de ser tratar de um sistema extremamente especializado para quimiorrecepção (BUCK e AXEL 1991).

O epitélio olfatório foi definido por Junqueira e Carneiro (2004) como sendo um neuroepitélio colunar pseudo-estratificado. Segundo 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, que são células-tronco (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Segundo Cunningham e Klein (2008) estas células 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 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 caudal da cavidade nasal, 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).

Segundo Mackay-Sim e Kittel (1991) em estudos com receptores neuronais no epitélio olfatório, dentro desse epitélio residem conjuntos de células tronco capazes de dar origem a novos neurônios durante toda a vida, conferindo a esse epitélio a capacidade de neuroregeneração dos receptores olfatórios de neurônios (ORNs) após algum dano.

Assis et al. (2002) em pesquisas com uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais cita que o avanço no cultivo de células permitiu a formulação de uma variedade de meios de cultura, acrescidos de substâncias responsáveis pelo melhor desenvolvimento celular *in vitro*, possibilitando assim o cultivo de células originárias da maioria dos tecidos e órgãos como a medula e outros.

Hind et al. (1984) e Mackey-Sim e Kittel (1990) descrevem que as células do epitélio olfatório exercem um papel fundamental para o entendimento dos mecanismos de degeneração e regeneração dentro do neuroepitélio olfatório, visto que pesquisas recentes descrevem que muitos receptores celulares são observados durante toda vida, e que a contínua neurogênese promove o restabelecimento de células-tronco progenitoras.

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 células, presentes no neuroepitélio olfatório, são pluripotentes e apresentam contínua capacidade de regeneração e reposição de neurônios (ROISEN et al., 2001; DULAC; 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).

Para o cultivo celular são utilizados meios artificiais, preparados mediante a mescla de componentes purificados ou de soluções orgânicas completas, instrumentos que mantêm as condições físico-químicas adequadas e recipientes que isolam as células do meio externo. Por este fato, considera-se que o meio de cultivo é formado por quatro elementos: (1) a natureza do substrato onde as células crescem; (2) a natureza e composição da fase gasosa; (3) as condições físico-químicas e fisiológicas do meio e (4) as condições de incubação, como a temperatura e a umidade (REYNA, 2003).

O neuroepitélio olfatório está diretamente exposto ao ambiente externo e, devido a isso, freqüentemente em contado com impurezas do ar e patógenos. Vincent et al. (2005) propôs a existência de uma possível atividade anti-bacteriana das células-tronco olfatórias e sua atuação como um membro do Sistema Imunológico Inato. Experimentos realizados para elucidação dessas questões provaram que células-tronco olfatórias foram capazes de prevenir a turbidez do meio de cultivo infectado com bactérias atenuadas.

Pesquisas realizadas por Nakamura et al. (1998) relacionaram o envelhecimento dos animais analisados com alterações no potencial de regeneração de suas células progenitoras. Estes autores também afirmaram que a capacidade de regeneração das células receptoras olfatórias depende da capacidade de divisão e diferenciação das células progenitoras.

Utilizando o rato como modelo animal, testando a taxa de divisão e migração das células do epitélio olfatório, estas eram maiores em animais jovens. Esse fato indicou que o processo de diferenciação pode estar relacionado com o envelhecimento. A pesquisa sugeriu que, em condições normais, a apoptose não é afetada pelo envelhecimento (HIGUCHI et al., 2004).

A questão da compatibilidade da célula transplantada com o receptor é destacada por Pereira (2008) como um desafio para as terapias com células-tronco. O transplante autólogo das células-tronco olfatórias da cavidade nasal elimina problemas de rejeição ou imunossupressão (LU; ASHWELL, 2002; MARSHALL et al., 2006).

Segundo Lu e Ashwell (2002), as células-tronco olfatórias dão suporte aos axônios olfatórios da lâmina própria até o bulbo olfatório mielinizando axônios desmielinizados ou em regeneração (KRUEWIG et al., 2006). Os autores revelaram que 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).

As células-tronco nervosas, de uma maneira geral, são excelentes candidatas para transplantes, conforme relatos de Walton e Wolfe (2008) quando afirmaram que estas células demonstram capacidade de repor tecido nervoso, elaborar fatores tróficos para o resgate de disfunção de neurônios endógenos, inibir inflamações e veicular proteínas terapêuticas de uma forma muito disseminada.

Estudos realizados por Murrell et al. (2009) reportaram o uso de células-tronco olfatórias na lesão dos discos intervertebrais. Dulac e Zakhary (2004) e Marshall et al. (2006) publicaram o sucesso de sua utilização em lesões de medula espinhal. 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.

O mecanismo de sinalização positiva das células-tronco olfatórias caninas a forskolina serve para a distinção desse tipo de células das de rato. Células-tronco olfatórias caninas têm morfologia plana e um fenótipo fusiforme quando tratadas com forskolina. Em contraste, células-tronco olfatórias de ratos apresentam formato fusiforme na ausência dessa enzima. O estudo *in vitro* suporta a noção de que células-tronco olfatórias caninas diferem substancialmente das células-tronco olfatórias de ratos, no que envolve mecanismos de sinalização e resposta a enzimas (KRUDEWIG et al., 2006).

A facilidade do cultivo *in vitro* das células-tronco olfatórias foi sugerida por Murrell et al. (2009) devido a possibilidade de poderem ser expandidas a um grande número e congeladas para estocagem, reforçando que esse tipo de células mantém a capacidade de auto-replicação e diferenciação durante muitas linhagens. Apesar dessa capacidade de diferenciação *in vitro*, células-tronco olfatórias podem também sofrer indução do ambiente da lesão, como mostraram estudos de lesão crônica do disco intervertebral (MURRELL et al., 2009).

Células de neuroepitélio olfatório de humanos postas em cultivo permaneceram indiferenciadas quando cultivadas em meio definido ou soro, independentemente da presença de fatores neurotróficos (ZAHNG et al., 2006).

Células de Schawnn presentes no epitélio olfatório são muito similares às encontradas no bulbo olfatório – SNC em relação a sua morfologia e antígenos, de acordo com estudos

realizados por Au e Roskams (2003). Contudo, sua expansão *in vitro* em meio DMEM-F12, sem a adição de fatores de crescimento exógenos, foi diferente das células do sistema nervoso central. A expressão de um grupo de proteínas reguladoras do desenvolvimento proporcionaram a caracterização das células provenientes do epitélio olfatório numa classe exclusiva de células gliais mais facilmente acessíveis (AU; ROSKAMS, 2003).

Várias técnicas experimentais são utilizadas para a detecção de células que se proliferam em resposta a lesões. Análises de linhagens retrovirais e ensaios *in vitro* para teste da capacidade neurogênica de subpopulações de células basais enriquecidas são exemplos de procedimentos para identificação de células-tronco olfatórias (DULAC; ZAKHARY, 2004).

A fluorescência endógena das células do epitélio olfatório, permitida pela ação da proteína fibrilar verde (GFP), promove uma marcação celular que facilita sua identificação quando transplantada em hospedeiros não-transfectados. Essa marcação com GFP oferece um modelo útil para análise do potencial terapêutico dos progenitores de epitélio olfatório em doenças degenerativas e neurotraumas (OTHAMN, 2003).

Graziadei et al. (1977) estudaram a atuação da proteína marcadora olfatória (OMP). O estudo demonstrou que células basais imaturas não são coradas e provavelmente não contém OMP. A proteína pode ser utilizada como indicador do estágio funcional de neurônios olfatórios, sendo expressa apenas com certo grau de maturação neuronal. Em 2005, Skinner et al. comprovaram marcação positiva de neurônios olfatórios com OMP.

Marcação com retrovírus foi utilizada por Caggiano et al. (1994) para estudar as relações entre diferentes tipos celulares no epitélio olfatório de ratos jovens. Os estudos sugeriram que células basais globosas são a maior fonte de neurônios olfatórios receptores.

Análises com microscopia óptica e eletrônica revelaram a existência de uma população celular uniforme de celular-tronco obtidas a partir do bulbo olfatório de ratos neonatos. Essas células apresentaram, em cultivo, características de células relativamente imaturas (forma arredondada, núcleo grande e centralizado e citoplasma levemente eosinofílico com poucas organelas distribuídas de modo uniforme). Apesar do padrão observado na morfologia das células, sugeriram-se análises adicionais de proteínas de superfície para atestar a pureza desta linhagem celular. Se descobertas subpopulações, faz-se necessária a sua separação em grupos celulares distintos no caso do uso em transplantes *in vivo* para regeneração neuronal (AUDISIO et al., 2009).

Apesar de características morfológicas imaturas, descobriu-se que as células-tronco olfatórias expressam principalmente GFAP, S100 e p75NGFR, um marcador glial útil na confirmação da natureza glial dessas células. As células estudadas por Audisio et al. (2009) apresentaram características gliais tanto em condições de basicidade quanto após manipulação *in vitro* por NRG1 (transferência gênica mediada por vírus com NRG1).

Estudos envolvendo análises imunocitoquímicas demonstraram que anticorpos para N-NSE e GFAP apresentam imunoreatividade positiva para astrócitos. S-100 beta e anti-nestina são bons marcadores para células de Schwann. Oligodendrócitos são corados com a utilização de anticorpos para a enzima CNPase, enquanto que anti-N-CAM mostrou-se um excelente marcador para neurônios (PIXLEY, 1996).

Zhang et al. (2004) estudando acerca de células tronco do epitélio olfatório de humanos citam que culturas primárias de epitélio olfatório humano foram estabelecidas em meio mínimo essencial (MEM), (DMEM/F12 associado à 10% de gentamicina) BDNF (DF associado a 1% N2) e B27 (DF associado a 2% de B27). Tais culturas foram obtidas e células foram visualizadas 20 horas após o início do cultivo, com culturas que chegaram até 200 passagens. Os mesmos autores observaram um maior crescimento quando utilizaram o meio DF, mas afirmam que a maior viabilidade celular foi notada com o meio DFN2 e DFb27 em comparação aos cultivos utilizando apenas DF.

Estudos focando as células-tronco do epitélio olfatório especulam sobre o possível potencial de regeneração axonal e cura de doenças demielinizantes (MARSHALL et al., 2006). 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) sugerem que as células-tronco do epitélio olfatório residem no meio das células globais basais. Experimentos *in vitro* realizados por Calof e Lander e 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.

Hayden et al. (1989) em estudos com culturas de células de neuroblastos do epitélio olfatório de ratos 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.

3.2 Lesão medular

Segundo Meyer et al. (2003) os estudos que envolvem lesão medular experimental são fundamentais para a compreensão dos mecanismos secundários de lesão tecidual decorrentes do trauma raquimedular. Existe a necessidade de entender como órgãos e sistemas aparentemente não relacionados a lesão medular são comprometidos e a que nível essas alterações chegam. Dados coletados através de estudos experimentais mostram que distúrbios ocorridos em cobaias podem ser extrapolados a seres humanos se as suas devidas proporções anatômicas, fisiológicas e metabólicas forem respeitadas.

Somente nos Estados Unidos as lesões medulares afetam de 3 a 5 pessoas em cada 100000, com números bastante similares em outros países (OLSON, 2002). São acometidos principalmente adultos jovens em decorrência de acidentes automobilísticos.

A lesão medular é uma doença devastante, que afeta sobremaneira tanto humanos como os animais, levando a danos tanto físicos quanto psicológicos. Na medicina humana, 3-5 pessoas em cada 100000 pessoas, são acometidas por esse mal, anualmente (OLSON, 2002).

As lesões medulares são freqüentes na medicina veterinária, tanto oriundas de traumas, quando de discopatias (SEIM, 1996).

A lesão da medula espinhal ocorre comumente em cães e gatos devido a causas exógenas ou endógenas. A lesão de origem endógena geralmente decorre de extrusão ou protrusão de disco intervertebral, fraturas patológicas, anormalidades congênitas e instabilidade. Fatores exógenos incluem traumas automobilísticos, projéteis (lesões por armas de fogo), quedas e lesões provocadas por outros animais e por objetos (BAGLEY et al., 1999).

Sabe-se que as maiores causas de morbimortalidade na lesão medular são devidas à perda do controle esfinteriano (vesical e intestinal), perda de sensibilidade com a formação de escaras, processos degenerativos osteoarticulares e fenômenos tromboembólicos. Convém lembrar das alterações no relacionamento psicossocial nos pacientes tetraplégicos, somadas às alterações da função pulmonar e infecção, bem como perda da termorregulação (CIFU et al., 1999; VIALI et al., 1999).

Anatomicamente, a medula espinhal pode ser lesada em quatro distintas situações: maceração, laceração, contusão e lesão sólida. Como os nervos espinhais estão diretamente ligados a estas lesões medulares podem afetar os vários sistemas do organismo, além de impedirem gravemente a função motora e as condições fisiológicas com perda sensorial, dor crônica, perda de controle da bexiga e do intestino, diminuição da capacidade respiratória, desequilíbrio sanguíneo, tromboembolismo, úlceras gástricas e infecção do trato urinário (SADOWSKY et al., 2002; HULSEBOSCH, 2002).

Braund (1993) em estudos com mecanismos de doenças em pequenos animais cita que a lesão e a compressão à medula espinhal levam ao desenvolvimento de eventos vasculares, bioquímicos e inflamatórios que podem provocar danos irreversíveis ao parênquima neuronal. É considerada uma das desordens mais sérias e desafiantes devido ao risco de seqüelas e incapacidade permanente.

Na prática clínica é difícil classificar as lesões, pois elas não ocorrem de forma isolada. Por exemplo, uma extrusão de disco intervertebral pode causar concussão, isquemia transitória e compressão pela presença do material no interior do canal medular. Já quando ocorre uma fratura, a lesão inicial causa lesão do parênquima e concussão, enquanto os fragmentos ósseos ou a instabilidade vertebral e desalinhamento das vértebras podem causar compressão medular, sendo que cada uma dessas lesões favorece a ocorrência e propagação de outras, exacerbando o quadro neurológico (KRAUS, 2000).

Cães apresentam rotineiramente na clínica afecções da medula espinhal toracolombar, causada principalmente por herniação de discos intervertebrais (SEIM, 1996). O canal medular toracolombar dos cães é bastante estreito, e a ocorrência de hérnia tóraco lombar pode levar a paralisia completa dos membros pélvicos com perda de sensibilidade e da função motora (PADILHA FILHO; SELMI, 1999).

A medula pode suportar um certo grau de compressão antes do aparecimento de alterações neurológicas. Esta variação depende da velocidade com que a compressão ocorre e

localização da mesma. A compressão crônica pode decorrer de neoplasias de crescimento lento, protrusão crônica de disco intervertebral, ou de doenças congênicas e degenerativas das vértebras, como por exemplo a espondilomielopatia cervical caudal (OLBY; JEFFERY, 2003).

A lesão medular traumática em cães resulta de trauma endógeno (Hérnia de disco intervertebral) e exógeno (acidentes com carros). Independente da causa, as lesões medulares possuem mecanismos de lesão primário e secundário. Os mecanismos da lesão primária são resultados da injúria física à medula espinhal, resultando em laceração, contusão, compressão, e tração do tecido neural. As mudanças patológicas resultantes dos mecanismos de injúria primários envolvem lesão axonal, dano mecânico direto às células, e vasos sanguíneos rompidos (WEBB et al., 2010).

Os mecanismos de injúria secundários à lesão medular envolvem distúrbios eletrolíticos, perda da regulação da pressão local e sistêmica, redução do fluxo sanguíneo da medula espinhal, quebra da barreira hematoencefálica, produção de radicais livres, desequilíbrio das metaloproteinases ativadas, emissão de neurotransmissores citotóxicos (DEMEDIUK et al., 1990; TATOR et al., 1991; KRASSIOUKOV; CLAYDON, 2006).

Um dos mecanismos fundamentais iniciados pelo trauma do SNC é a interrupção na homeostase celular do Ca^{+2} . Como esse íon possui função fundamental em inúmeras das funções celulares, seu desequilíbrio causa grande distúrbio homeostático e acaba levando à degeneração axonal, produzindo debilidade clínica (TYMIANSKI, 1996).

O processo regenerativo de danos sofridos ao sistema nervoso central (SNC), e em especial a medula espinhal, apresenta alguns fatores limitantes, tais como a capacidade limitada do SNC em repor as células danificadas (JOHANSSON et al., 1999) e a produção de inibidores de crescimento dos axônios associados com mielina e a formação da cicatriz glial (OLSON, 2002).

A cicatriz glial é constituída predominantemente de astrócitos reativos, micróglia/macrófagos e moléculas da matriz extracelular, especialmente de sulfato de condroitina proteoglicana (SCPG) (ROLLS et al., 2009). Os efeitos inibitórios do tecido cicatricial são considerados como o principal empecilho à regeneração do tecido nervoso. Vários trabalhos demonstram a utilização de substâncias e enzimas que eliminam ou reorganizam a cicatriz glial e também com ressecção cirúrgica da cicatriz da glia, onde têm se destacado o uso da condroitinase ABC, uma substância que atua principalmente na eliminação

da cicatriz da glial, em qualquer época da sua formação (JONES et al., 2003; SHIELDS, 2008; RASOULI et al., 2008; ROLLS et al., 2008; TOM; HOULÉ, 2008).

Apesar de apontada como a grande vilã da regeneração das lesões medulares, estudos recentes demonstraram vários efeitos benéficos desta cicatriz nas primeiras duas semanas após a lesão medular (ROLLS et al., 2009). A eliminação dos astrócitos reativos, ou a prevenção da migração dos mesmos após a lesão medular resulta em falhas no processo de recuperação da barreira hemato-encefálica, acompanhada por infiltração celular massiva e aumento da perda de neurônios e oligodendrócitos (OKADA et al., 2006).

A resposta astrocítica pode ser importante para limitar a resposta inflamatória, porém, isso pode ser feito a custa de uma rebrota axonal bastante reduzida. A cicatriz da glia reduz a possibilidade das células enxertadas para migrarem e se integrar. Porém, a maioria dos estudos com terapia celular foram limitados a estudar os efeitos do transplante celular em 1-2 semanas após a lesão (OGAWA et al., 2002). É difícil prever os resultados da terapia celular na lesão medular crônica (OKANO, 2002).

Animais com paralisia dos membros, mas que tenham ainda sensibilidade profunda preservada são candidatos à cirurgia descompressiva (descompressão ventral, hemilaminectomia e facetectomia lateral, laminectomia dorsal) ou a fenestração dos discos intervertebrais. Animais com perda da sensibilidade dolorosa profunda há mais de 48 horas, não são considerados candidatos à cirurgia devido à falta de expectativa de retorno à função locomotora (KNECHT, 1972).

Um grande número de estudos tem sido realizado com células-tronco de diferentes fontes em diferentes modelos animais de lesão medular, e tentativas terapêuticas até mesmo em humanos, apresentando resultados promissores (IWANAMI et al., 2005; LEE et al., 2007; LIM et al., 2007; MACKAY-SIM et al., 2008). Há alguma dificuldade na comparação direta desses trabalhos, devido ao grau variável de caracterização das células transplantadas, diferentes modelos animais e a variação do tempo entre a ocorrência da lesão e o tratamento (BARNABÉ-HEIDEN; FRISÉN, 2008).

De acordo com Vialle et al. (2002), uma das grandes dificuldades na realização de estudos sobre lesão medular em animais é a obtenção de um trauma com energia similar, produzindo lesões padronizadas. Apesar de cuidados técnicos na realização da lesão medular, estudos histológicos mostram certo grau de variabilidade na área lesada, o que requer um método auxiliar de avaliação da lesão medular.

A utilização de modelos roedores em lesões de medula espinhal em humanos é prejudicada, pois a diferença no tamanho da medula espinhal pode reduzir a significância da regeneração axonal. O modelo roedor de lesão no qual as células têm se mostrado eficazes é o de transecções, nas quais a reação inflamatória é menos extensiva que nas lesões do tipo contusões – clinicamente mais comuns (SKINNER et al., 2005).

Molina et al. (2006) cita que uma avaliação do comportamento após o ferimento da medula espinhal é necessária, pois determina a eficácia terapêutica. Medidas resultantes comportamentais bem definidas podem também identificar os mecanismos potenciais de recuperação funcional. Vários investigadores desenvolveram testes para medir a função do reflexo sensorial e locomotor na lesão medular em animais. Tais resultados variaram desde simples descrições qualitativas do ato de andar até a elaboração de combinações de testes com a intenção de detectar manifestações diversas no funcionamento do SNC.

Wrathall et al.(1996) propuseram um protocolo para avaliar o déficit funcional que ocorria após lesão medular produzida em ratos uma vez que a escala de Tarlov não foi reprodutível com confiabilidade em outros laboratórios. Os resultados indicaram diferentes graus de lesão, podendo classificá-las em leve, moderada e grave. Noble e Wrathall (1989) promoveram lesão medular graduada em ratos e utilizaram uma escala de avaliação da função motora que foi modificação do teste de Tarlov. Basso et al. (1995) afirmou que os estudos da recuperação locomotora em ratos que sofreram lesão medular haviam seguido modificações da escala de Tarlov.

3.3 Terapia celular no sistema nervoso

Durante muitos anos, a vulnerabilidade do Sistema Nervoso Central (SNC) a qualquer tipo de lesão foi atribuída à falta de fontes que pudessem repor as células mortas. Muitos pesquisadores mostraram ao longo dos anos que as células tronco neurais, bem como células progenitoras neurais, persistem no organismo de mamíferos adultos, surgindo assim uma nova esperança no tratamento de doenças que afetam o SNC (OHIRI et al., 2004).

O processo regenerativo de danos sofridos ao SNC, e em especial a medula espinhal, apresenta alguns fatores limitantes, tais como a capacidade limitada do SNC em repor as

células danificadas (JOHANSSON et al., 1999) e a produção de inibidores de crescimento dos axônios associados com mielina e a formação de cicatrizes gliais (OLSON, 2002).

O sistema nervoso, diferentemente de muitos outros tecidos, possui uma capacidade limitada de auto-reparação. As células nervosas maduras apresentam-se incapazes para regeneração, e as células-tronco neurais, embora existam, tem uma limitada habilidade para gerar neurônios funcionais em resposta a uma lesão. A maioria dos tratamentos das lesões neuronais limita-se ao alívio dos sintomas e a prevenção de danos adicionais. Por esta razão, há grande interesse na possibilidade de reparação do sistema nervoso por transplante de células-tronco (BJORKLUND; LINDVALL, 2000).

Durante alguns anos, vários estudos estão direcionados para a investigação da utilização de células-tronco como uma alternativa ao tratamento de várias doenças neurodegenerativas. Em alguns desses estudos foram verificados efeitos benéficos da terapia com células-tronco, dentre estes destacam-se estudos pré clínicos para doença de Alzheimer (WU et. al., 2007), Parkinson (WANG et al., 2007), isquemia cerebral (CHEN et al., 2001; CHOPP; LI, 2002; ZHAO et al., 2002; GUZMAN et al., 2008; DHARMASAROJA, 2009).

Mezei et al. (2003) afirmam que após transplantes sistêmicos, as células tronco mesenquimais (CTM) foram encontradas em diversos tecidos, como tecido nervoso, sendo que parte sofreu diferenciação *in vivo*. Petersen et al. (2003) citam que essas células também são capazes de repopular, parcialmente, a medula óssea do receptor, previamente irradiado. Existem outros estudos mostrando que as CTM, quando infundidas no sistema nervoso central (SNC), migram, são integradas e desenvolvem características neurais (MUÑOZ-ELIAS et al., 2004).

O transplante de células-tronco tem sido descrito como uma terapia potencial para o tratamento dos déficits decorrentes do AVC, devido à grande capacidade de diferenciação destas células e a possibilidade de prover suporte trófico para a sobrevivência e o reparo tecidual assim como a recuperação funcional. Dados experimentais evidenciam que transplantes neurais podem se diferenciar e formar conexões com melhora cognitiva e motora em animais submetidos à isquemia cerebral. Estas células migram da corrente sanguínea para a área isquêmica e pequena porcentagem expressa marcadores neurais (WEI et al., 2005).

Estudos com células-tronco (CT) provenientes de medula óssea verificaram atenuação de perdas funcionais em modelos experimentais de isquemia cerebral. Uma das hipóteses atualmente levantadas sugere que as células transplantadas induzem uma liberação de fatores

tróficos e/ou fatores moduladores de fenômenos inflamatórios na região lesada, os quais podem compor um microambiente favorável para a regeneração do tecido lesado. Nesse sentido, as células-tronco podem ser empregadas não apenas visando à reposição de células danificadas, mas também às reposições biofarmacológicas (CHOPP; LI, 2002).

A existência de um sistema regulatório homeostático da população de células olfatórias neurais é sugerida por Nakamura et al. (1998). Estudos realizados por Dulac e Zakhary (2004) concordaram para essa afirmação demonstrando que em transecções de nervos olfatórios houve um aumento inicial da morte das células neuronais e em seguida uma rápida reposição desses neurônios receptores olfatórios pelo aumento de mitose das células basais.

Suter et al. (2004) em estudos com células-tronco da medula óssea cita que atualmente observa-se que as pesquisas relacionadas à fração de células mononucleares contendo células-tronco têm apontado inúmeras possibilidades para a reparação tecidual e melhoria na qualidade dos processos regenerativos quando essas são transplantadas em número igual ou superior a 2×10^6 .

De acordo com Li e Xie (2005) em estudos sobre a estrutura e função das células-tronco, as células-tronco neuronais são consideradas progenitoras no sistema nervoso que promovem auto regeneração e também a geração de neurônios e células gliais.

Kan et al. (2007) e Dharmasoroja (2009) afirmaram que pela dificuldade ainda enfrentada nos dias atuais em se determinar novas estratégias terapêuticas que ainda precisam ser desenvolvidas, a terapia celular surge como uma esperança de tratamento das doenças que acometem o sistema nervoso central.

As células-tronco mesenquimais são capazes de secretar fatores como GDNF (fator neurotrófico derivado de linhagem glial), BDNF (fator neurotrófico derivado de endotélio vascular) e HGF (fator de crescimento de hepatócitos, além de outros, devido ao fato de secretarem fatores neurotróficos as células tronco mesenquimais são uma esperança para o tratamento de várias patologias (CHEN et al., 2002 PAN et al., 2007).

Há relatos consistentes de recuperação funcional em ratos com lesão medular tratados com células-tronco mesenquimais (HOFSTETTER et al., 2002; LEE et al., 2007). Estes tipos celulares “não neurais” apresentam um mecanismo diferente para a recuperação das lesões medulares onde não há a reposição de neurônios ou de células da glia (BARNABÉ-HEIDEN; FRISÉN, 2008). É bem provável que estes tipos de células forneçam suporte trófico,

modulem a resposta inflamatória ou forneçam substratos para o crescimento de axônios, como eixos orientadores para a regeneração medular, promovendo a recuperação funcional (HOFSTETTER et al., 2002).

As células-tronco ideais para a realização de transplantes devem ser imunologicamente inertes, provenientes de fontes de fácil acesso, possuir rápida expansibilidade em cultivo, apresentar capacidade de sobrevivência em longo prazo e de integração no sítio hospedeiro além de serem propícias a transfecção e expressão de genes exógenos (AZIZI et al., 1998).

De acordo com Kwon et al. (2002) as células-tronco neurais podem dar origem a neurônios e células gliais, mas até agora essas células transplantadas em ratos contundidos nos cordões medulares só diferenciaram em astrócitos não sendo notada presença de oligodendrócitos ou neurônios e as mesmas não demonstraram recuperação funcional.

Apesar de haverem muitos trabalhos referentes à terapia celular em modelos animais, pouca informação existe sobre como as células-tronco transplantadas de fato participam do processo regenerativo da lesão, e se de fato as células sobrevivem ao processo de transplante (HASSAN; EL-SHEMEMY, 2004).

A implantação de blocos de tecido do sistema nervoso central fetal nas áreas de tecido nervoso lesadas possibilita o desenvolvimento de meio favorável ao crescimento axonal (JEFFERY; BLAKEMORE, 1999). Células nervosas da bainha olfatória, encontradas no bulbo e nervo olfatórios, local de contínuo crescimento celular, utilizadas com o objetivo de promover regeneração axonal funcionam como uma base de suporte para a mielinização dos axônios, contribuindo assim para recuperação neurológica de pacientes vítimas de lesão medular (JEFFERY et al., 2001).

Mimura et al. (2007) demonstrou em pesquisa sobre regeneração de nervos periféricos em ratos adultos com nervos ciáticos seccionados, um aumento significativo na velocidade de condução e no índice de escala funcional para nervo ciático no grupo transplantado com células-tronco comparado ao grupo controle não transplantado após 6 meses.

Li, Field e Raisman (1998), relatam em pesquisas com regeneração de axônios da região corticoespinhal em ratos adultos, que após três semanas do transplante de células em lesão medular verifica-se reparação funcionalmente eficaz. Os axônios mostravam-se em recuperação podendo-se verificar acumulados de feixes paralelos por toda a extensão da área lesada formando um agregado celular compacto.

Jeffery et al. (2001) afirmaram que células nervosas da bainha olfatória, encontradas no bulbo e nervo olfatórios, local de contínuo crescimento celular, utilizadas com o objetivo de promover regeneração axonal, funcionaram como suporte para a mielinização dos axônios contribuindo assim na recuperação neurológica de pacientes vítimas de lesão medular.

Em estudos sobre regeneração axonal em ratos adultos com medula espinhal transeccionada N-Cueto et al. (1998), afirmaram que após decorrido seis semanas após a cirurgia e conseqüente transplante das células haviam dois tipos de pontes, uma dentro do canal interno e outra de tecido conjuntivo sobre o canal exterior. Os axônios em regeneração foram capazes de sair dessas pontes, atravessando as cicatrizes gliais e crescer de outra forma, mostrando que transplantes celulares podem ser utilizados no futuro como uma ferramenta para promover regeneração dos axônios no SNC dos mamíferos.

Segundo Lu et al. (2001) em pesquisas com ratos paraplégicos, o transplante de células de tecido olfatório promove uma recuperação funcional significativa, sendo observado penetração de axônios no local da lesão. Imaizumi et al. (1998) estudando o efeito da ação do transplante de células olfatórias para a condução axonal em ratos com lesão medular citaram que em análise histológica axônios remielinizados, estes foram revelados próximos e distantes do local da injeção de células indicando movimentos migratórios das células implantadas exibindo velocidade de condução e sugerindo que o bloqueio de condução foi superada.

Rehermann et al. (2009) em pesquisas com lesões medulares em tartarugas da água doce (*Trachemys dorbignyi*) relataram recuperação funcional e reconexão neuronal em 45% destes animais após total transecção da medula espinhal. Segundo estes autores, nestes animais não foi notada a formação da cicatriz glial comumente encontrada nos mamíferos, e sim a formação de uma matrix celular composta de *brain lipid-binding protein* (BLBP) e *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Os répteis apresentam crescimento axonal contínuo mesmo após o nascimento, diferentemente dos mamíferos, os dados encontrados neste trabalho sugerem que a ausência da cicatriz glial associada ao crescimento axonal contínuo nesta espécie foram determinantes para a completa recuperação de alguns destes animais.

Akiyama et al. (2001) demonstraram que terapia celular com células neurais humanas transplantadas em ratos adultos com lesão medular demonstraram que essas células foram capazes de promover a mielinização dos axônios e a capacidade de condução elétrica em velocidade próxima ao normal confirmando que as células-tronco apresentam alguma recuperação funcional.

Células-tronco do epitélio olfatório humano foram utilizadas em 7 pacientes com idade de 18-32 anos com gradação da American Spinal Injury Association como ASIA A. A via escolhida para injeção das células foi a via local, diretamente no foco da lesão medular. Avaliação por ressonância magnética, eletromiografia, sistema de avaliação neurológico ASIA, e avaliações otorrinolaringologistas foram realizados antes e depois da cirurgia. Dois dos sete pacientes apresentaram melhora no quadro de ASIA A para C, retornando a sensação da bexiga dos dois, e retornando o reflexo de contração do esfíncter anal em um dos pacientes. O estudo demonstrou que o procedimento é factível, relativamente seguro e pode ser potencialmente benéfico (LIMA et al., 2005).

Paul et al. (2009) realizaram estudos de três vias de aplicação das células-tronco mesenquimais: punção lombar (PL), intravenosa (IV) e diretamente no local da lesão medular. Apesar da PL ter sido superior a via IV, a via local é, sem sombra de dúvidas, a via mais eficaz para a enxertia das células-tronco mesenquimais. Desta forma a via local nesse experimento foi utilizada apenas como controle para as demais vias estudadas.

Demais estudos em animais apresentam melhora clínica significativa após a utilização das células-tronco na lesão medular (LIMA et al. 2007; LEE et al., 2008; CAO; FENG et al., 2009).

Mackay-Sim et al. (2009) realizaram estudos em 12 pacientes humanos com lesão medular crônica, fazendo a aplicação de células do epitélio olfatório por via local. Apenas um paciente apresentou alguma melhora clínica, e os autores concluíram que o transplante dessas células na medula espinhal é um procedimento factível e seguro, apesar do “nº” reduzido.

4 MATERIAL E MÉTODO

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). O projeto foi aprovado pela comissão de bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1 Obtenção e cultivo das células-tronco do epitélio olfatório de ratos

Foram utilizados ratos wistar com idade aproximada de 2 meses obtidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-USP. Após contenção física, os ratos foram submetidos à overdose de Tiopental Sódico por via intraperitoneal (IP) com a dose de 100mg/ Kg (Figura. 1).

Figura 1: Foto de ratos Wistar utilizados para obtenção do epitélio olfatório para cultura primária de células tronco

Após excisão da cabeça dos animais e remoção de pele e pêlos (Figura 2a), realizou-se cuidadosa higienização em água destilada para remoção de componentes sanguíneos e impurezas com potencial de contaminação.

Em seguida, o material foi transportado ao Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP. Os procedimentos subseqüentes foram realizados dentro de um fluxo laminar, sobre condições de assepsia.

No fluxo laminar foi realizado acesso a região do epitélio olfatório através de corte sagital do crânio dos animais (Figura 2b, c e d). Posteriormente, foram coletados fragmentos do epitélio olfatório e depositados em placa de Petri e lavados cinco vezes com PBS acrescido de penicilina-estreptomicina a 3% (Invitrogen, Cat. Nº 15140-122) para remoção de possíveis elementos contaminantes, como pêlos ou sangue remanescente. Este procedimento foi repetido durante cinco minutos sendo trocadas de placa a cada lavagem (Figura 2e e 2f).

4.2 Dissociação enzimática das células aderentes: Repique celular

Após o processo de descontaminação, com as sucessivas lavagens com PBS, foi realizada dissociação química com 1mL de Tripsina Triple Express (Invitrogen, Cat. Nº 12604), durante 5 minutos. Para otimizar o processo de liberação das células olfatórias a partir dos fragmentos teciduais, realizou-se simultaneamente a dissociação mecânica, conforme mostra a Figura 2g. Segue-se ao procedimento de dissociação a incubação do material em estufa a 37° C e 5 %CO₂ por 15 minutos (Figura 2h).

Subseqüente análise das células liberadas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico de luz invertida NIKON Eclipse-TS 100 sob objetivas de 4x e 10x. As imagens obtidas foram armazenadas através do sistema de captura ENLTV 8.0.7.

Após constatada uma grande quantidade de células livres dos fragmentos teciduais, realizou-se a inativação da Tripsina com a adição de 2mL do meio de cultivo. Pôde-se observar a sedimentação dos fragmentos coletados após 5 minutos de descanso. O sobrenadante foi separado, ressuspensionado em 3mL de meio de cultivo e transferido para um tubo de polipropileno de 15ml com 5ml de meio de cultivo. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 1000rpm por 5 minutos.

Após centrifugação os fragmentos e células suspensas foram ressuspensionadas em 1mL de meio de cultura e o material transferido para garrafas de 25 cm² (TPP, Switzerland) e

posteriormente colocadas em cultivo em estufa contendo CO₂-95% à 37°C. As imagens das células colocadas em cultivo foram obtidas em microscópio de luz invertida (NIKON Eclipse-TS 100), sob objetivas de 4x, 10x, 20x e 40x e armazenadas através de sistema de captura (MTC Digital Color Camera).

O meio de cultivo utilizado continha 82% de D MEN-F12 (LGC, Cat. N° BR-30004-05), 15% de soro fetal bovino (Hyclone, Cat. N° SH30070-03), 1% de L-glutamina (Sigma, Cat. N° G7513), 1% de Penicilina-Estreptomicina (Hyclone, Cat. N° SH40003-12), e 1% de MEN NEAA (Invitrogen, Gibco, Cat. N° 11140).

Figura 2- Procedimentos de coleta do epitélio olfatório de ratos e processamento do material para cultivo celular. a) Cabeça do rato após remoção de pêlo e pele; **b)** Corte sagital da cabeça do rato para acesso ao epitélio olfatório. A localização do epitélio olfatório é evidenciada (estrelas); **c)** Cabeça do rato com bulbo olfatório evidenciado (estrela); **d)** Remoção da lâmina crivosa (estrela) do osso etmóide; **e, f)** Lavagem dos fragmentos com PBS, como auxílio de pipeta; **g)** Dissociação mecânica dos fragmentos epiteliais com o auxílio de lâminas de bisturi; **h)** Incubação dos fragmentos de epitélio olfatórios em estufa a 37°C e 5% de CO₂

4.3 Expansão celular

Após o isolamento das células progenitoras a partir dos fragmentos do epitélio olfatório de ratos Wistar, o processo de expansão celular foi iniciado para a realização dos ensaios de caracterização morfológica. Alíquotas de 1×10^6 das células progenitoras foram diluídas em 1ml de meio de cultivo, sendo posteriormente transferidas para 2 garrafas de polipropileno de 75 cm² que foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. O cultivo celular foi monitorado sob microscopia óptica e o meio trocado de 2 a 3 dias, de acordo com a necessidade da cultura.

4.4 Avaliação do crescimento celular: curva de crescimento

Com a finalidade de avaliar a capacidade de expansão e replicação celular, realizamos a curva de crescimento. Esta foi avaliada periodicamente com intervalos de 24 horas entre cada repique, a partir do repique inicial, seguindo o calculo descrito abaixo:

$$\frac{\text{número total de células} \times 10^4 \times \text{volume de meio suspensão}}{\text{número de quadrantes contatos}}$$

Depois de realizada a contagem as células eram então divididas de tal modo, que todas as garrafas de cultivo T25 continham a mesma quantidade celular inicial X, isto só é possível com a utilização da regra abaixo relacionada:

$$\frac{\text{numero total de células} \times 10^5}{\text{numero de células desejadas}} = \text{volume de meio ressuspendido} \times X$$

Realizada a contagem, $2,5 \times 10^5$ das células foram transferidas para as garrafas de cultivo de T25 cm² previamente preenchidas com o meio de cultura e posteriormente

acondicionadas na estufa a 37° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.5 Ensaio de unidade formadora de colônia

Para avaliar a capacidade de formar colônia das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar, realizou-se o ensaio de CFU-f. Para isto 1×10^3 células em P2 (segunda passagem) foram plaqueadas em placas de cultivo com área de 90mm de diâmetro (corning).

As células foram mantidas por dez dias em cultivo e o meio foi trocado a cada três dias. Após este período as células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% e coradas com cristal de violeta. O valor considerado para o cálculo da quantificação das CFU-f foi o número total de colônias com mais de 50 células no “10º dia” de cultivo, dividido pelo número total de células progenitoras plaqueadas, adaptado de Tondreau et al. (2004). O contato com o corante foi de 15 minutos, posteriormente foi realizada a lavagem com água destilada e realizada a análise da quantidade de colônias celulares presentes na placa.

4.6 Congelamento e Descongelamento Celular

Alíquotas de 1×10^6 células derivadas do epitélio olfatório de ratos Wistar foram congeladas para realização de experimentos futuros. As células derivadas do epitélio olfatório de ratos Wistar derivadas da digestão através da enzima tripsina a 0,25%, foram ressuspensas em 1,5 ml de meio de congelamento e igualmente distribuídos em criotubos (corning). Os criotubos (corning) foram transferidos para o aparelho Mister Froozen e mantidas em freezer -80°C overnight. Depois 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados. O meio de congelamento utilizado era composto por 45% de DMEM-H, suplementado com 45% de SFB (GIBCO), 10% de DMSO (LGC-Bio)

Quando necessário, as células foram submetidas ao descongelamento rápido no banho maria a 37°C. Depois de descongelada, a suspensão celular contida nos criotubos (corning) foi transferida para tubos de polipropileno de 15ml com meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino Hyclone. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultivo para expansão das células.

4.7 Imunocitoquímica

Primeiramente, 1×10^4 células provenientes do cultivo celular primário do epitélio olfatório foram plaqueadas em placas de cultivo de 3mm de diâmetro, as quais continham uma lamínula de vidro. Após 48 horas, todo o meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas com PBS por 2 vezes de 5 minutos, para a retirada de todos restos celulares. Posteriormente foram fixadas com metanol por 5 minutos em freezer.

As células foram lavadas em solução de TBS por 2 vezes de 5 minutos para a retirada de todo o metanol. Em seguida, foi adicionado Triton a 0,1% até cobrir toda a superfície da lamínula por 10 minutos, para promover a permeabilização da membrana celular. Posteriormente, as células foram novamente lavadas 2 vezes com solução de TBS por 5 minutos.

Para evitar reações inespecíficas, foi utilizado solução de BSA durante 30 minutos. Após este período, as células foram incubadas “overnight” a 4°C com anticorpo primário, diluídos em PBS na proporção de 1:50, conforme descrito no quadro 1, abaixo:

Anticorpo	Empresa	Origem
Vimentin (Type: V9, sc-6260), Dilution- 1:50.	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
Cytokeratin 18 (RGE53)- 1:50	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
β Tubilina III (TUBB3)- 1:50	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
GFAP 1:50	Abcam	ABCAM, EUA
OMP 1:50	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
Oct-4 1:50	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
Nanog 1:50	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.

Quadro 1- Anticorpos primários utilizados para a imunocitoquímica

Passado este período, as células foram lavadas com TBS por 3 vezes por um período de 5 minutos cada. Em seguida, 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. As células foram novamente lavadas com TBS por 3 vezes de 5 minutos, seguida por uma lavagem em água destilada, sendo posteriormente montadas com solução de montagem Vectashield com DAPI (ABCYS, Paris France). As células foram observadas no microscópio de fluorescência LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) em objetivas de 20x e 40x.

4.8 Citometria de fluxo

As células foram analisadas pela técnica de citometria de fluxo em quinta passagem, a fim de garantir uma população de células suficientemente indiferenciada. A citometria de fluxo foi realizada utilizando o FACSCalibur (BD) com um laser azul (488 nm). As células foram tripsinizadas, seguida pela centrifugação 400G por 5 minutos e ressuspensas em PBS a concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas 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 as células foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC DAKO, na diluição de 1:100 por 30 minutos protegidos da luz. Decorrido esse tempo as células foram lavadas e analisadas pelo citômetro de fluxo.

O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas. As células foram separadas pelo “forward scatter” para eliminar os debris. Para eliminar uma possível autofluorescência, os parâmetros foram ajustados de maneira a remover qualquer contribuição das células não marcadas. Para cada amostra, foram contados no mínimo 10000 eventos.

4.9 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, descrito por Carmicheal et al. (1987), consiste na redução do MTT (3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5- diphenyltetrazolium bromide]), composto de coloração amarela, pela enzima desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), presente somente em células viáveis, gerando formazan, composto azul-violeta, que uma vez precipitado a 1.000 rpm por 10 minutos e solubilizado em DMSO, é quantificado por espectrofotometria a 550 nm.

O experimento foi realizado a cada 48 horas durante 10 dias para análise da proliferação celular das células do epitélio olfatório (EOR) de ratos Wistar. Para tanto, aproximadamente 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 orifícios em um volume de 100µL/poço para cada dia de experimento.

Em cada dia de experimento, o meio de cultura foi removido, 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 mistura 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. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm.

Os resultados obtidos neste experimento foram plotados em um gráfico utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

4.10 Análise da viabilidade das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar pelo método azul de Trypan

Para analisar a viabilidade das células o precipitado celular foi ressuspensionado em 1mL de meio. Em seguida, 100µl da suspensão celular foi colocado em um tubo de microcentrífuga, e nele foram adicionados 20 µl de azul de trypan (Invitrogen). Após gentil homogeneização das células com o corante, aproximadamente 10 µl foram colocados na Câmara de Neubauer e submetidos a microscópio óptico para realização da contagem de células mortas e células vivas uma vez que, o corante é incorporado nas células mortas onde se tornam azuis.

Os resultados obtidos neste experimento foram plotados em um gráfico utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

4.11 Análise da expressão do gene exógeno Lacz nas células tronco o epitélio olfatório de ratos Wistar

Para verificar a expressão de β-galactosidase (β-Gal) nas CTPD transduzidas com o vetor pLNpZ, 1×10^6 células foram semeadas em placas de 60 mm e, após 24 horas foram incubadas com uma solução de X-Gal. O protocolo de incubação com o X-Gal foi realizado como segue: o meio de cultura foi removido e a solução de 0,5% de glutaraldeído foi

adicionada sobre as células para a fixação das mesmas. Em seguida, foi realizada a incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. A solução foi removida e as células lavadas por três vezes com PBS em intervalos de 5 minutos cada. A solução de X-gal (X-gal 1 mg/ml, $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM, $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM e $MgCl_2$ 1 mM) foi adicionada às células que foram incubadas a 37°C por 1-6 horas. As células coradas foram visualizadas em microscópio de contraste de fase.

4.12 Transdução das células-tronco do epitélio olfatório com Lentivírus carreando o gene GFP

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 lentivírus. 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.

4.13 Análise molecular das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar por RT-PCR.

Primeiramente as células-tronco provenientes do epitélio olfatório de ratos Wistar foram submetidas a extração de RNA utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) segundo protocolo descrito pelo fabricante. Para tanto, o meio das células foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Após remoção total do PBS, 1 mL de Trizol foi adicionado e as células foram homogeneizadas nas placas e transferidas para tubos de microcentrifuga onde adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio. Após gentil homogeneização, as células foram centrifugadas a 12000 x g durante 15 min a 4 °C.

Em seguida, a fase incolor obtida após a centrifugação foi cuidadosamente retirada e 0,5 mL de álcool isopropílico foram adicionados para a precipitação do RNA. Após homogeneização, o conteúdo foi centrifugado a 12000 x g durante 10 min a 4°C. O precipitado incolor obtido foi lavado com etanol 70 %, preparado em água DEPC para evitar contaminação, e novamente centrifugado a 7500 x g durante 5 min a 4 °C.

Posteriormente, o etanol foi removido e o precipitado secou ao ar livre durante aproximadamente 10 minutos. Após secagem o RNA foi ressuscitado de acordo com o tamanho de seu precipitado em água DEPC. Dessa forma, o RNA obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo para visualização da qualidade do RNA. Em paralelo, o RNA foi dosado por espectrofotometria utilizando o nanofotômetro (Implen, CA, USA) e posteriormente utilizado na síntese do cDNA.

Para a síntese de cDNA, uma solução contendo 1µg de RNA, oligo dT e água foi aquecida durante 65°C durante 5 minutos. Após este procedimento, as amostras foram colocadas no gelo e adicionou-se tampão da enzima, Ribolock RNase, dNTPs e a enzima RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas Life Science, Amherst, NY, EUA) para a síntese do cDNA seguindo as instruções do fabricante. Esta mistura foi então submetida a uma temperatura de 42°C durante 1 h e posteriormente 70°C durante 10 min. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídeo para visualização e posteriormente armazenado em – 20°C até a sua utilização.

Após síntese e análise os cDNAs foram utilizados como fita molde na reação de PCR, para tanto, misturou-se 1 µl cDNA, 0.2 µM de oligonucleotídeos sense e anti-sense que

anelam nos genes de interesse, 0.2 µM dNTPs, MgCl₂ 1,5 mM, tampão da enzima e 1U de Taq DNA Polymerase (5U/µl) (Fermentas Life Science) e água deionizada para um volume final de 25 µl. Esta mistura foi colocada em um termociclador e a reação ocorreu nas seguintes condições: 1 ciclo a 94° C por 4 min seguindo 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura: 94° C por 1 min para denaturação, 56/61° C por 1min para anelamento e 72° C por 1 min para polimerização e 1 ciclo extra de 10 min a 72° C para a extensão final. Em todas as reações, água e células da camada de sustentação, NIH3T3, foram usadas como controle das reações.

Aproximadamente 10 % do produto desta reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % e corado com brometo de etídeo para visualização em transiluminador UV. Marcador de peso molecular, *PCR Marker, 100 bp* foram utilizados para confirmar o tamanho esperado dos fragmentos.

Gene	Sequência	TA	Produto
Oct4	hOct4-S: 5'GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG 3' hOct4AS: 5'CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC 3'	61 °C	120 pb
Nanog	hNANOG-S: 5' CCTATGCCT GTGATTTGT GG 3' hNANOG-AS: 5' CTGGGACCTTGTCTTCCTTT 3'	61 °C	210 pb
Vimentina	hVimentin-S: 5' AAGCAGGAGTCCACTGAGTACC 3' hVimentin-AS: GAA GGTGACGAGCCATTTC 3'	56° C	204 pb
p75	hp75- S – CAA AGG ACG GAT TTC CTG AG hp75-AS - AGC TCC TGG GGA GGA AAA TA	56° C	300 pb
GAPDH	hGAPDH-S: 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' hGAPDH-AS: 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	61° C	463 pb

Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular por RT-PCR das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar

4.14 Análise do potencial teratogênico das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar em camundongos imunossuprimido NUDE

Após a caracterização *in vitro* das células-tronco do epitélio olfatório de ratos wistar, foi avaliado o potencial teratogênico em camundongos nude. Para isto, 1×10^6 células foram aplicadas via intramuscular no membro pélvico esquerdo dos camundongos. Inicialmente, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas seguindo protocolo de repique celular. Em seguida as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1200rpm e novamente lavadas com PBS. Essa lavagem foi repetida por 2 vezes. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensionado em 50 µl de solução fisiológica e aplicado no membro do camundongo com o auxílio de uma seringa de insulina. A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada durante seis semanas e uma vez por semana verificou-se a presença de formação tumoral.

4.15 Amostragem – animais experimentais

Foram utilizados 8 coelhos machos da raça Nova Zelândia oriundos de biotérios da Universidade de São Paulo (USP) pesando entre 3-4 kg, estes foram submetidos a lesões medulares. Foram testadas lesões dorsais, laterais, ventrais e totais para fechamento de protocolo de lesão e posterior terapia celular com aplicação das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar, no grupo teste, e do placebo no grupo controle. Após fechamento de protocolo de lesão foram utilizados 5 coelhos machos para o estudo da terapia celular, sendo transplantadas 5×10^5 células em quatro desses animais e um foi utilizado como controle, sem o uso de células. Exames clínicos foram realizados para avaliar a severidade das lesões provocadas, foi adaptada uma nova escala de avaliação clínica neurológica para este experimento. A seguir, segue escala de avaliação utilizada para avaliação clínica dos animais submetidos a lesões medulares.

Escala de avaliação clínica neurológica

A) Avaliação do nível de consciência

- 1 – Coma
- 2 – Estupor
- 3 – Sonolência
- 4 – Alerta

B) Escala motora: teste de coordenação da função motora.

- 0** – nenhum movimento com o membro pélvico, não suporta o peso do corpo sobre os mesmos e déficit de colocação tátil e visual;
- 1** – escasso movimento percebido nos membros pélvicos não consegue suportar o peso do corpo sobre os membros e déficit de colocação tátil e visual;
- 2** – consegue suportar o peso sobre os membros pélvicos, sem dar nenhum passo e déficit de colocação tátil e visual;
- 3** – consegue suportar o peso sobre os membros pélvicos, podendo dar um ou dois passos e déficit de colocação tátil e visual;
- 4** – suporta todo o peso do corpo, consegue dar passos consistentes usando a porção distal do membro, flexão do quadril mantida e colocação tátil e visual positiva;
- 5** – caminha com leve déficit e colocação tátil e visual positiva;
- 6** – caminha movimentando normalmente.

C) Reflexos medulares: flexor, patelar, tibial cranial, dor superficial, dor profunda, perineal, músculo cutâneo do tronco, sinal de babinski e avaliação do tono muscular

C.1) Flexor ou de retirada

- 0** – nenhuma flexão;
- 1** – mínima flexão;
- 2** – hiperflexão;
- 3** – normal.

C.2) Patelar/Tibial cranial

- 0** – nenhum reflexo;
- 1** – mínimo reflexo;
- 2** – hiper reflexo;
- 3** – normal.

C.3) Dor superficial

- 0** – ausente;
- 1** – mínima;
- 2** – presente.

C.4) Dor profunda

- 0** – ausente;
- 1** – mínima;
- 2** – presente.

C.5) Reflexo perineal

- 0** – ausente;

- 1 – mínima;
- 2 – presente.

C.6) Músculo cutâneo do tronco

- 0 – ausente;
- 1 – mínima;
- 2 – presente.

C.7) Sinal de Babinski

- 0 – presente;
- 1 – ausente.

C.8) Avaliação do tono muscular

- 0 – ausente;
- 1 – mínima;
- 2 – presente.

RODRIGUES, M. N.; ESPER, G. Z.; TAJRA, M. L. (2011)

4.16 Indução da Lesão Experimental em Coelhos e Transplante de Células-Tronco

Os coelhos foram contidos quimicamente com 35 mg/kg de cloridrato de quetamina e 2 mg/kg de maleato de midazolam por via intramuscular (IM). Posteriormente, os animais foram colocados com o pescoço em ventroflexão e intubados com sonda endotraqueal 2,5 sendo mantidos com isoflurano diluído em O₂ a 100%, em sistema aberto do tipo “baraka”. A veia auricular foi canulada nos casos de necessidade de doses de reforço anestésico, bem como a artéria auricular central, para monitoração da pressão arterial média dos animais. Logo após tricotomia e antissepsia de rotina uma incisão media da linha dorsal foi realizada. A lâmina e os processos transversos de T11-T12 foram gentilmente expostos através de afastamento dos músculos paravertebrais. Um afastador auto-estático de Golpi foi utilizado, os processos espinhosos das vertebra T11-12 foram removidos com auxílio de goiva, e com auxílio de *drill* pneumático foi procedida laminectomia dorsal da vértebra T11-12 dando visibilidade à medula espinhal. Um fio de sutura de prolipropileno 7-0 foi trespassado através da medula espinhal para proceder a hemisseção ventral da mesma, após o fechamento do nó cirúrgico. Os debris resultantes da lesão foram sugados delicadamente com aspirador cirúrgico. Músculos e tecidos adjacentes foram aproximados com fio absorvível (Vicryl 3-0).

A pele dos animais foi aproximada com pontos simples separados de Nylon 2-0. Todos os animais experimentais tiveram a lesão medular induzida segundo o protocolo descrito. Para analgesia pós-operatória imediata foi utilizado 1 mg/kg de flunixin meglumine associado a 3 mg/kg de morfina por via IM. O pós-operatório consistiu na terapia com antibiótico cefazolina 30mg/Kg/BID por 7 dias, o antiinflamatório meloxicam 0,1mg/Kg/SID por 3 dias e 3mg/Kg/TID de morfina imediatamente após a cirurgia repetida de 4 em 4 horas por mais dois dias. As células foram injetadas imediatamente após a lesão.

4.17 Cuidados Pós-Operatórios após a Indução da Lesão Medular

Os coelhos utilizados neste experimento foram alojados em baias individuais, com livre acesso a água e alimento durante todo o período experimental. As gaiolas destes animais foram diariamente limpas, e duas vezes os animais que não conseguiam realizar micção de forma espontânea a bexiga era esvaziada por pressão manual ou sondagem uretral. Os animais passaram por avaliação clínica a cada 7 dias, tanto para observação dos resultados do tratamento experimental, quanto para avaliação de dor. Caso fossem notadas alterações do padrão comportamental dos animais, os mesmos eram medicados com antiinflamatório não esteroideal meloxicam (0,1mg/Kg/SID) ou com morfina (3mg/Kg/TID) de acordo com a necessidade e gravidade de cada caso. As baias dos animais eram acolchoadas com espuma, e os animais tiveram sua posição de decúbito modificada duas vezes ao dia, com a finalidade de evitar a formação de escaras. Esses animais foram eutanasiados para colheita de tecido da medula espinhal para posterior análise.

4.18 Protocolo de Eutanásia

Os coelhos foram anestesiados com 30 mg/kg de cloridrato de quetamina e 2 mg/kg de maleato de midazolam por via intramuscular (IM). Após 15 minutos da aplicação destas drogas, os animais tiveram a veia auricular canulada com cateter 24G. Os animais foram

eutanasiados com overdose de tiopental sódico (50 mg/kg) por via intravenosa. As carcaças foram descartadas, e a porção lesionada da medula espinhal foi coletada para avaliação histológica.

4.19 Técnica de Coloração em Hematoxilina e Eosina

Os fragmentos de medula foram fixados em solução de paraformaldeído 4%. Após o tempo mínimo de 24 horas, os fragmentos medulares foram lavados em solução salina de fosfato (PBS) e desidratados em uma série de etanóis em concentração crescentes (de 70 a 100%), diafanizados em xilol, seguido de inclusão em parafina.

Após o processamento e inclusão foram realizados cortes de 5µm de espessura em micrótomo automático (Leica, RM2165). Os cortes contidos nas lamínas foram desparafinizados e corados seguindo a técnica de Hematoxilina e Eosina – HE (TOLOSA et al., 2003). O material processado e corado foi analisado em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

4.20 Análise por imunohistoquímica

Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em série decrescente de etanol. Em seguida, foram fervidos em tampão citrato em forno microondas (0,384g de ácido cítrico monohidratado; 2,352g de citrato de sódio tribásico diidratado; 1L de água destilada, pH 6,0) por 5 minutos para desmascaramento dos antígenos. O volume era completado e o processo repetido por mais três vezes, em seguida ficavam esfriando em temperatura ambiente 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, seguido de lavagem tripla em tampão TBS. O bloqueio de 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 de 1:100 em TBS acrescido de 1% de soro de cabra e outra utilizando apenas o tampão de diluição do anticorpo.

Após incubação com o anticorpo primário seguiu-se lavagem tripla com TBS adicionado de 1% de soro de cabra. A incubação com o anticorpo secundário (Dako-advance) ocorreu por 30 minutos nas mesmas condições da 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-*horseradish* peroxidase (Dako-advance) sob 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.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Cultivo das células do epitélio olfatório de ratos

O material foi coletado respeitando o intervalo de tempo de até três horas *pos mortem*, pois após esse período as células iniciam seu processo de apoptose devido as alterações cadavéricas que começam a ocorrer. As células isoladas foram colocadas em cultura após tratamentos diferenciados de dissociação, uma química com Tripsina e uma mecânica com auxílio de bisturi.

Ambos os tratamentos promoveram desagregação celular eficiente, demonstrando um grande número de células em suspensão quando realizada a avaliação 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 foi notada presença de 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 um grande número de células mortas (Figura 3a). Pôde-se verificar que a maioria das células que ficavam em suspensão acabaram morrendo e o cultivo só se tornava viável quando os explantes ou fragmentos do epitélio olfatório começavam a soltar as células-tronco em meio adequado de cultivo.

As células em cultivo foram analisadas periodicamente e os explantes começavam a soltar células com aproximadamente sete dias de cultivo e notou-se a presença de pequenas colônias celulares aderidas após 10 dias de incubação (Figura 3b). Observou-se que os fragmentos evidenciaram liberação de células observadas ao redor do mesmo 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 de múltiplas morfologias, células de formatos arredondados com rico citoesqueleto e inúmeras células de formato fibroblastóide, prevalecendo, a homogeneidade das colônias, que em sua maioria, eram compostas por células de

característica fibroblastóide, subdividindo-se entre células de maior e menor volume, contudo apresentando a mesma morfologia. À medida que o cultivo celular era continuado, aos 20 dias de cultivo, já se observava predominância de um tipo celular específico, composto por células de menor volume e de formato fibroblastóide.

As trocas de meio de cultivo 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.

Quando as células expandidas em cultivo apresentavam um grau de confluência de 70% ou superior a esse valor (Figura 3c), ou ainda se demonstravam tendência para diferenciação, fez-se necessária a realização do procedimento de tripsinização para expansão celular. Foi verificado que toda vez que as células atingiam um grau de confluência superior a 70% estas entravam em processo de diferenciação, bem como quando estas aderiam em pequena quantidade e não ocorria contato entre as mesmas, demonstrando que para que as células possam aderir estas necessitam estar em íntimo contato.

Figura 3- Fotomicrografias do cultivo de células-tronco de epitélio olfatório de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento. a) Células de epitélio olfatório de rato não aderidas na placa de Petri; **b)** Presença de células aderidas e com tendência a formação de colônias. Pode-se observar também a presença de células mortas e debris, fragmentos celulares ou produtos de seu metabolismo; **c)** Células apresentando grau de confluência de 70%, um indicador da necessidade de repique celular, observar que a maioria apresenta formato fusiforme; **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

5.2 Curva de crescimento

O procedimento de contagem das células foi iniciado a partir da segunda passagem, pois, foi a partir dessa passagem, que se observavam número celular suficiente para iniciar a contagem das células. A população total necessária para o início da curva foi de 2×10^5 . Os valores obtidos foram plotados num gráfico para análise da evolução no desenvolvimento e crescimento das células-tronco (Figura 5).

A população total de células-tronco olfatórias de rato wistar apresentou crescimento progressivo, mas não constante, até a quinta passagem. Entre a sexta e sétima passagem as células permaneceram em um período estacionário. Na sétima passagem ocorreu um pico de crescimento celular que posteriormente manteve-se estacionário até a nona passagem. Na décima passagem iniciou-se um processo de declínio acentuado (Figura 5).

Figura 4- Gráfico da curva de crescimento das células-tronco olfatórias de rato. No eixo da horizontal verificam-se os dias de contagem das células. É importante ressaltar que a contagem foi iniciada na segunda passagem (P2). Neste gráfico fica evidenciado que as células se proliferam exponencialmente até a sétima passagem, quando ocorre seu pico máximo, entrando em um platô estacionário na décima passagem, onde ocorre o início do declínio de crescimento

Figura 5- **Fotomicrografias de células-tronco do epitélio olfatório de rato, evidenciando sua morfologia fusiforme, semelhante a de fibroblastos.** **a)** Células olfatórias de rato em P2. Observar que as células apresentam tendência de diferenciação. Essa tendência pode ser observada devido à morfologia espalhada de algumas células (estrela); **b)** Células em P4; **c)** Células em P5; **d)** Células em P7, observar que o número de células é maior demonstrando um maior crescimento nessa passagem. Aumento de 10x em a, b e c; 4x em d

5.3 Unidade formadora de colônia

Na primeira análise no dia 1, decorridas 24 horas da incubação (Figura 6a), as células não demonstraram estarem aderidas ao fundo da placa. Na segunda análise dia 3, as células já se encontravam aderidas e em processo de meiose celular. No dia 6 notava-se que as células apresentavam uma tendência a formação de colônia (Figura 6b). Na quarta análise, aos 9 dias (Figura 6c e d), pode-se verificar uma forte tendência a formação de colônia.

A análise microscópica no 14^o dia evidenciou a presença de colônias contendo uma quantidade de células superior a 50. Esse é o limiar para a fixação das células em cultivo com a finalidade do estudo do potencial de formação de colônia (Figura 7).

Figura 6- Fotomicrografias de células-tronco do epitélio olfatório de rato obtidas com intervalos de 7 dias para estudo do potencial de formação de colônia desse tipo de células. a) No dia 1, verifica-se que as células ainda não estão aderidas na placa; **b)** No dia 7, evidencia-se que as células já aderidas mostram uma tendência a formação de colônia; **c e d)** No dia 14 é possível observar que as células mostram forte tendência a formação de colônias. Aumento de 4x em a, b, c e d

Figura 7- Fotos de células-tronco do epitélio olfatório de ratos para estudo do potencial de formação de colônias dessas células. a) Foto de placa de Petri evidenciando a presença de colônias de células, após fixação com paraformaldeído 4% e coloração com cristal violeta. **b)** Fotomicrografia de células-tronco do epitélio olfatório de rato fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com cristal violeta para estudo do seu potencial de formação de colônia, notar agrupamento celular. Aumento de 10x

5.4 Análise por imunocitoquímica das células do epitélio olfatório de ratos Wistar

A população celular foi caracterizada pela expressão da Beta tubulina, Citoqueratina 18 (Ck18), Vimentina, OCT-4, OMP, GFAP e Nanog. A beta tubulina e a Ck18 determinaram a marcação do citoesqueleto celular. A Vimentina e o GFAP marcaram o citoplasma, ao redor do núcleo, ambos permitindo identificar a morfologia dessa população celular, quando comparados ao controle utilizado na imunomarcação. O OCT-4, Nanog e OMP marcaram o núcleo das células positivamente Figura 8 e 9.

Figura 8 – Análise por imunocitoquímica das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar. A,B) expressão da GFAP, C,D) Nanog e E,F) OCT-4. A,B,C e E) 10x, D e F 20x

Figura 9 – Análise por imunocitoquímica das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar. A,B) expressão do OMP, C,D) Vimentina. E) Beta-Tubulina III e F) Citoqueratina. A e C 10x, B,D, E e F) 20x.

5.5 Citometria de fluxo

As células-tronco isoladas do epitélio olfatório de ratos Wistar com 60 dias de vida foram caracterizadas analisando a expressão de 3 proteínas de membrana (CD113, CD117 e STRO-1. A viabilidade celular encontrada foi de aproximadamente 99% e as amostras analisadas apresentaram marcação negativa para os três marcadores (Figura 10). Na análise por citometria de fluxo para os marcadores Vimentina, Nanog e OMP foi observada positividade para essas proteínas (Figura 11).

Figura 10: Análise por citometria de fluxo. Notar negatividade para os três marcadores de membrana testados em relação ao controle

Figura 11: Análise por citometria de fluxo. Notar positividade para os três marcadores testados em relação ao controle

5.6 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT

Com o objetivo de analisar a proliferação celular das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar, ensaios de MTT foram realizados. Foi observado um perfil semelhante ao encontrado na curva do crescimento. Foi verificado que as células derivadas do epitélio olfatório possuíam um crescimento nos primeiros dias de cultivo e que com o passar dos dias esse crescimento decaía como esperado (Figura 12).

Figura 12 – Gráfico da análise da proliferação celular das células de epitélio olfatório de ratos Wistar

5.7 Análise da viabilidade das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar pelo método azul de trypan

Para comprovar os resultados encontrados no ensaio de MTT, as células-tronco derivadas do epitélio olfatório de ratos Wistar foram submetidas a contagem diária com azul de trypan, corante que cora em azul as células mortas. A figura 13 representa os resultados obtidos. Foi verificado que o número de células vivas diminuía com o passar do tempo. Este resultado soma-se aos dados obtidos nos experimentos de proliferação celular pelo método

colorimétrico MTT. Foi possível verificar um crescimento exponencial dessas células durante o tempo de observação.

Figura 13 - Gráfico da análise da viabilidade celular das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar

5.8 Transdução com LacZ e GFP

Após protocolo de fixação com X-Gal podemos verificar através de microscopia de luz que ocorreu marcação positiva das células do epitélio olfatório de ratos Wistar quando transduzidas com LacZ. Para o GFP também ocorreu positividade quanto à marcação (Figura 12).

Figura 14 – Fotomicrografia das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar. Em A observar positividade de marcação para Lac-Z. Em B as células estão marcadas com GFP. A e B 10x

5.9 Análise molecular das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar por RT-PCR

O cDNA foi obtido a partir do mRNA como fita molde e os oligonucleotídeos utilizados anelam nos genes Oct-4, Nanog, vimentina, p75 e GAPDH (Figura 15).

Infelizmente não foi possível observar a expressão dos marcadores de células-tronco Oct-4 e o Nanog conferiu-se uma amplificação muito baixa (Figura 15, linhas 2 e 3, respectivamente) o que não era esperado uma vez que essas mesmas proteínas foram expressas nos ensaios imunocitoquímicos.

A expressão de vimentina, proteína de filamentos intermediários do citoesqueleto celular pode ser observada através de uma banda de aproximadamente 204 pb (Figura 15 linha 4) e a expressão de GAPDH, enzima envolvida no metabolismo da glicose expressa em todas as células eucaróticas pode ser conferida na figura 15 linha 1.

Já, o marcador de crista neural foi expresso conforme figura 15 linha 5 é possível visualizar uma banda de 300 pb como era esperado.

Figura 15 – Análise eletroforética dos produtos de RT-PCR das células do Epitélio Olfatório de Ratos. O cDNA obtido a partir do RNA foi utilizado como fita molde. Os oligonucleotídeos utilizados anelam nos genes, GAPDH, Oct4, Nanog, vimentina e p75. O gel de agarose 1,5 % foi submetido à corrida eletroforética sob tensão de 100 V/cm² e corado com brometo de etídeo antes de ser fotografado pelo sistema . M) marcador de peso molecular, PCR marker, 100 bp; 1) GAPDH; 2) Oct4; 3) Nanog; 4) Vimentina; 5) p75

5.10 Avaliação do potencial teratogênico das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar em camundongos imunossuprimido NUDE

Após injeção de 1×10^4 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 (Figura 16).

Figura 16 – Observar que após injeção de células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar no membro pélvico esquerdo não foram observadas formações tumorais.

5.11 Indução da Lesão Medular por Hemissecção em Coelhos

O coelho demonstra ser um modelo animal bastante acessível, exigindo mínimo espaço físico e pouca despesa para sua manutenção (Figura 17).

Figura 17 - Animais experimentais em gaiolas individuais

Foi realizado um estudo para avaliar qual dos modelos de hemissecção seria o mais adequado para realizar nos coelhos. Realizou-se a avaliação clínica direta entre os casos, dos efeitos das hemissecções medulares dorsal (HD) e ventral (HV), secção lateral (SL) e secção total (ST), na altura das vértebras torácicas T11-T12, em 6 coelhos experimentais (Figura 18 e 19A).

Figura 18 - Fotografias da técnica cirúrgica para hemisseção da medula espinhal em coelhos. A – Animal intubado mantido em anestesia inalatória. B – Incisão na linha dorsal média sobre os processos espinhosos. C – Incisão da musculatura lateral aos processos espinhosos até as facetas articulares das vértebras T11-T12. D – Exposição da medula espinhal, através da retirada dos processos espinhosos e laminectomia. E – Hemisseção medular. F – Tecido adiposo retirado do subcutâneo dos coelhos submetidos à cirurgia, para cobrir a região da laminectomia após a hemisseção. G – Tecido adiposo depositado sobre o local de exposição da medula espinhal. H – Animal se recuperando do procedimento cirúrgico em pós operatório

Os animais submetidos a secção lateral (SL) de medula (Figura 19B) perderam o reflexo de dor superficial (RDS), embora não tenham perdido o reflexo de dor profunda (RDP). Após 10 dias da lesão já mostravam a recuperação dos RDP, mostrando reflexos de pedalagem. O membro torácico ou pélvico esquerdo desses animais (mesmo antímero onde foi realizado a hemissecção) apresentava reflexos menores quando comparado com o contralateral. Os reflexos de micção espontânea e defecação foram mantidos nesse animal, embora apresentasse disquezia.

Os animais submetidos a HD (Figura 19C) já no pós-operatório imediato demonstravam os RDS e RDP, ausência dos reflexos de micção espontânea, e de defecação, e presença dos reflexos de retirada dos membros, estando com hiperreflexia, bem como foi observado presença de “sinal de Babinski” positivo. Após 12-15 dias do pós operatório os animais já buscavam a posição ventro dorsal, quadrupedal, muito embora com movimentos reduzidos, estes animais já conseguiam movimentar os membros pélvicos. Mesmo após 1 mês os reflexos de micção e defecação permaneceram ausentes.

Os animais submetidos a HV (Figura 19D) perderam completamente os reflexos posturais, e a sensação de dor profunda, e superficial, bem como de todos os outros reflexos medulares, não retornando após 30 dias de observação. Foi observado hiperreflexia do reflexo de retirada e presença de sinal de babinski positivo. Esses animais mantiveram os reflexos de defecação e o reflexo de micção estava afetado.

Os animais submetidos a secção total perderam completamente todos os reflexos e vieram a óbito devido aos problemas secundários ocasionados pela secção total da medula nos outros sistemas. Ao final desse estudo, ficou preconizada a técnica de hemissecção ventral como melhor modelo para estudo de lesão medular e possível terapia celular.

Na hemissecção ventral os principais tratos afetados foram: os tratos motores (rubrospinal, reticulospinal, vestibulospinal lateral, vestibulospinal ventral, tetospinal e corticospinal ventral) e os tratos sensitivos (espirotalâmico, espinocerebelar ventral e propriospinal).

Figura 19 – Fotomicrografia de cortes transversais da medula de coelho da raça Nova Zelândia. Em (A) Observar medula intacta. Em (B) Secção lateral (SL). Em (C) Hemisecção Dorsal (HD) e em (D) Hemisecção Ventral (HV) da medula, notar que a mesma está bem dividida ao meio. A, B, C e D 4x HE.

5.12 Avaliação por Microscopia de Luz e Imunohistoquímica da Medula Espinhal de Coelhos Submetidos a Hemisseção Medular

Foi realizada a coloração de hematoxilina eosina no material colhido dos animais controle e dos animais transplantados. Várias alterações histológicas foram encontradas nos animais controle e, dentre elas: extensa cavitação, edema, necrose e infiltrado celular potencial (Figura 20). Áreas hemorrágicas não foram encontradas. Os animais foram eutanasiados 21 dias após a lesão, portanto as prováveis áreas hemorrágicas foram substituídas por cavidades.

Figura 20 – Fotomicrografia do foco da lesão medular induzida em coelhos em corte longitudinal. A – Cavitação (seta preta), edema, focos necróticos (seta amarela) e infiltrados celulares. Aumento em 4x. B – Aumento da região, onde se observa algum tecido necrótico (seta amarela), áreas cavitárias (setas pretas) e infiltrado celular (halo). HE

Na análise por imunohistoquímica foi verificada marcação positiva para as proteínas de citoplasma como a vimentina, OMP e GFAP e proteína de núcleo como o Nanog. A marcação positiva dessas proteínas deixa claro a hipótese de que as células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar tem quimiotaxia positiva para o local lesionado e encontram-se distribuídas ao redor da lesão do como demonstrado na figura 21. Nas avaliações pós transplante das lesões por microscopia de luz não foram observadas grandes diferenças relacionadas a regeneração tecidual da lesão da medula, mas deixa claro que uma possível ponte pode estar sendo iniciada o que demonstra possível regeneração (Figura 22 A e B). No

material coletado dos animais transplantados com células-tronco marcadas com retrovírus GFP foi possível notar reação fluorescente confirmando os resultados da imunohistoquímica (Figura 22 C e D).

Figura 21 – Fotomicrografia de cortes medulares analisados por imunohistoquímica pós transplante celular em coelhos. Notar expressão positiva para vimentina (A) seta amarela, OMP (B) seta amarela, GFAP (C) seta amarela e Nanog seta amarela (D). A, B, C e D 20x

Figura 22 – Fotomicrografia da lesão ventral tratada com células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar. Em (A) coloração de hematoxilina-eosina, verificar ausência de hemácias em torno da lesão (halo amarelo). Em B e C, notar reação por imunofluorescência das células transfectadas com retrovírus GFP. A e C 20x, B 10X

5.13 Avaliação clínica dos coelhos submetidos a terapia celular com células-tronco do epitélio olfatório de ratos wistar

Foram transplantadas 5×10^5 células imediatamente após a lesão em quatro animais e um animal foi submetido à lesão apenas para controle sem o transplante de células (Figura 23). Durante o ato cirúrgico não ocorreram perdas sanguíneas significativas. Com o decorrer do experimento um dos animais veio a óbito cinco dias após lesão e injeção das células, porém sua causa morte não estava ligada a injeção celular pela necropsia. Após sete dias do ato cirúrgico foram realizados testes de acordo com uma escala de avaliação neurológica a cada sete dias. Esta escala preconiza os seguintes testes para avaliação clínica: nível de consciência, avaliação da postura e locomoção (propriocepção consciente, colocação tátil e colocação visual e propulsão extensora), reflexos medulares (flexor, patelar, tibial cranial, dor

superficial, dor profunda, perineal, músculo cutâneo do tronco, sinal de babinski e avaliação do tono muscular).

Quando foi testado o nível de consciência pós cirúrgico, os animais apresentavam nível de consciência em alerta. Nos testes de propriocepção consciente aos 7 e 14 dias os membros torácicos continuavam sem déficit, mas nos membros pélvicos apresentavam déficit neurológico não retornando a posição plantar. De forma semelhante, ao visualizado na propriocepção, os animais responderam aos testes de colocação tátil e colocação visual com manutenção de reflexos nos membros torácicos e déficit nos membros pélvicos. Para o teste de propulsão extensora também não foram verificados reflexos nos membros pélvicos.

Na análise dos reflexos medulares aos 7 e 14 dias verificou-se que: o reflexo flexor ou de retirada foi realizado pela compressão interdigital nos quatro membros, este se apresentou positivo em todos os membros. Os reflexos patelares e tibiais cranial estavam exacerbados em dois animais e no animal controle, caracterizando uma hiperreflexia de membros pélvicos. Quando analisados os reflexos de dor superficial e profunda observou-se em todos os animais ausência destes estímulos nos membros pélvicos. O reflexo perineal estava presente em todos os animais, inclusive no animal controle. O reflexo do músculo cutâneo do tronco na primeira avaliação estava ausente em todos os animais, porém na segunda avaliação realizada pôde-se observar que este estava presente em dois dos animais transplantados com células-tronco. O “sinal de Babinski” e o tono muscular estavam presentes em todos os animais examinados nos membros pélvicos.

Na última avaliação realizada ao 21º dia notou-se que o reflexo do músculo cutâneo do tronco estava mais evidente e os reflexos de colocação tátil, de propriocepção consciente também estavam presentes embora com déficit. Estes eram bem mais acentuados no membro pélvico direito que no esquerdo. O “sinal de Babinski” e reflexo de retirada ainda eram positivos, porém o animal apresentava movimento de pedalagem e o reflexo do extensor cruzado era presente. Não foi visualizada reposta positiva nos reflexos de dor profunda e superficial.

Durante as avaliações outro fator que pôde ser observado foram as complicações pós lesão medular, sendo os mais significativos a lesão vesical e os distúrbios eletrolíticos apresentados pelos mesmos, dois animais sofreram com a mudança fisiológica da termorregulação (Figura 24). Estes fatores deixaram os animais debilitados e mais

susceptíveis ao surgimento de alterações secundárias como a pneumonia que levou um dos animais a óbito.

Figura 23 – Fotografia evidenciando o transplante das células-tronco de epitélio olfatório de ratos Wisar imediatamente após lesão medular ventral induzida em coelhos Nova Zelândia

Figura 24 – Fotografia evidenciando a coloração da urina caracterizando a lesão vesical secundária a lesão medular em coelhos Nova Zelândia

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Para isolamento de células progenitoras do epitélio olfatório de ratos Wistar (CEO) utilizamos meio de cultivo DMEM-F12 semelhante ao utilizado por Au e Roskams (2003); Zhang et al. (2004) e Alves et al. (2010) quando estudaram células de mesma linhagem. Observamos também que as células apresentavam-se aderidas as placas após um período de 7 a 10 dias de cultivo semelhante com as descrições de Hayden et al. (1989). Estes autores citam que células de ratos cultivadas em meio de cultura DMEM tornam-se confluentes em uma ou duas semanas. Por outro lado Murrel et al. (2005) afirmam que este fenômeno é verificado em um periodo de 7 a 10 dias em ratos. De outra parte Zhang et al. (2004) sugerem em estudo com células olfatórias humanas que as culturas foram obtidas e visualizadas 20 horas após o início do cultivo. Este resultado contraria Alves et al. (2010), estes autores citam que em cães são vistas colônias após 24 horas de cultivo as quais demonstram confluência em 5 dias de cultivo.

As células progenitoras do epitélio olfatório de ratos Wistar, a exemplo de outros tipos celulares de células-tronco crescem em monocamada, secretam uma matriz extracelular e proteínas de ligação que permitem adesão das mesmas a superfície de crescimento. Estas mesmas células apresentaram-se com múltiplas morfologias, mas no decorrer das passagens apresentaram formato fusiforme semelhante a fibroblastos a exemplo do que citam Pagano et al. (2000); Jin et al. (2002); Zhang et al. (2005, 2006) e Krudewig et al. (2006).

No nosso estudo foi possível notar que as células-tronco do epitélio olfatório (CEO) de ratos Wistar são facilmente expandidas e possuem capacidade de expansão, resultado já descrito por Murrell et al. (2009) para células tronco olfatórias. Estes mesmos autores citam que as células olfativas mantêm a capacidade de auto-replicação durante muitas linhagens. Contrariamente a estes autores, observamos que este tipo celular não suporta um grande numero de passagens, fato este demonstrado quando realizamos a curva de crescimento, na qual verificou-se que estas células mantem seu crescimento celular ate a decima passagem, a partir da qual cai em fase de declínio de crescimento e de expansão.

Segundo Zahng et al. (2006) as células-tronco de neuroepitélio olfatório humano, quando colocadas em cultivo permaneceram indiferenciadas, quando foram utilizados meio de cultivo definido. A seu turno, nossos resultados demonstraram que as CEO de ratos Wistar

quando cultivadas não puderam atingir uma confluência maior que 70%. A partir deste estágio iniciam um processo de diferenciação celular, no qual as células demonstraram rico citoplasma e citoesqueleto com inúmeros prolongamentos. É importante ressaltar que este fato também ocorreu quando estas células ficaram em baixa confluência o que demonstra que estas crescem e mantêm sua capacidade de expansão. Outra observação relevante relaciona-se a necessidade destas necessitarem de íntimo contato umas com as outras para estabelecer esta expansão.

As células do epitélio olfatório de ratos Wistar foram capazes de formar colônias quando realizado o ensaio CFU-f (Colony Forming Units-fibroblastic). Esta é uma das características das células tronco mesenquimais. Acredita-se que a partir de uma única célula precursora, a mesma poderia entrar em processo de divisão formando colônias celulares ao seu redor (FRIEDENSTEIN et al., 1976; DEANS; MOSELEY, 2000).

Marcadores celulares foram utilizados para testes de imunofluorescência e citometria de fluxo. Marcadores tais como a Vimentina, GFAP, OMP, Nanog, Citoqueratina e Beta tubulina III foram testados. A Vimentina, a OMP e a GFAP são proteínas de filamento intermediário que marca células de origem mesenquimal. A citoqueratina-18 também é uma proteína do filamento intermediário que marca citoesqueleto. Este último marcador representa a transição entre células epiteliais e mesenquimais. A beta tubulina é uma proteína expressada em células neuronais (IVASKA et al., 2007). Todos os marcadores apresentaram positividade para as células do epitélio olfatório de ratos Wistar, caracterizando as células imunocitoquimicamente.

Para o teste de Citometria de Fluxo testamos o Nanog, OMP e Vimentina, estes apresentaram positividade, enquanto o CD 133, o CD 117 e o Stro-1 observamos sinal negativo. Kolf et al. (2007) citam em seus estudos que o marcador de superfície celular Stro-1 é considerado o melhor marcador para células tronco mesenquimais porém, não é exclusivo para este tipo celular. Por outro lado sua expressão, segundo os autores, não é mantida durante sucessivas passagens em cultivo, o que justifica a negatividade deste marcador em nossos estudos, já que trabalhamos com células-tronco do epitélio olfatório de ratos. Outro fator que pode ter contribuído para a ausência de marcação com Stro-1 é fato deste marcador ser específico para células de linhagem humana.

Foi realizada transdução com retrovírus GFP e LACz e foi constatado que quando marcadas com o LACz as células mudaram sua morfologia e perderam capacidade de

expansão, fato que inviabilizou sua utilização nesta pesquisa. Entretanto, quando marcadas com retrovírus GFP, as mesmas, apesar de sofrerem com a infecção viral, mantiveram seu potencial de expansão e infecção viral viabilizando sua utilização na terapia celular. Este fato é confirmado por Azizi et al. (1998), quando afirmaram que as células para poderem ser consideradas ideias para transplante devem possuir capacidade de serem transduzidas. Estas células também podem ser consideradas promissoras para terapia celular uma vez que sua coleta pode ser realizada por biópsia nasal do próprio paciente a ser transplantado, tal como já foi citado por (Kato et al., 2002; Murrell et al., 2005; Mackay-Sim et al., 2008). Estes autores também deixam claro a segurança da utilização das células olfativas, semelhante ao citado por Shen et al. (2010) que relatam o potencial terapêutico de células-tronco olfativas para regeneração nervosa.

Antes da injeção celular nos animais propostos testes de imunossaios foram realizados com animais imunossuprimidos (Nudes), para verificar se existia potencial teratogênico destas células. No estudo do potencial teratogênico pudemos observar que não ocorreu formação de taratomas, fato que viabilizou ainda mais a possível utilização destas células para transplantes. Associado a este fato estas células foram também consideradas imunologicamente inertes. Por outro lado segundo os achados de Azizi et al. (1998) as células cultivadas são provenientes de fontes de fácil acesso.

A reprodução de lesões medulares em modelos animais exige a perda total dos reflexos locomotores e de manutenção postural. Segundo Braund (1993), estudos envolvendo mecanismos de doenças medulares em pequenos animais, permitem que as lesões e as compressões medulares espinhais levam ao desenvolvimento de eventos vasculares, bioquímicos e inflamatórios, os quais podem provocar danos irreversíveis ao parênquima neuronal. É considerada uma das desordens mais sérias e desafiantes da medicina veterinária, devido ao risco de seqüelas e incapacidade permanente.

A hemissecção medular é ideal para a produção de modelos animais para estudo de lesão medular induzida, pois nos permite a manutenção de reflexos tais como os de controle de micção e defecação, abolindo os reflexos locomotores, os quais são de interesse no estudo das lesões medulares. No entanto, o mapeamento da substância branca e da substância cinzenta medulares, especialmente consideradas na substância branca o volume e a posição dos tratos e fascículos medulares difere entre as espécies animais. Este fato é relevante para a localização precisa da realização da hemissecção medular.

Assim julgamos poder considerar a avaliação clínica dos nossos pacientes. Embora alguns dados presentes na literatura - Lialka, Orlovsky e Deliagina (2009), referiram-se aos efeitos das hemissecções medulares nos reflexos posturais em coelhos, nossos dados trazem novidades com relação aos reflexos de micção e defecação. Observamos que a melhor forma de reproduzir um modelo ideal para o estudo para terapia celular foi a hemissecção ventral da medula espinhal, na qual são lesados neurônios motores e de associação da substância cinzenta da medula. De outra parte a lesão total secciona as vias aferentes e eferentes, podendo na maioria dos casos levar os animais a morte.

O conhecimento das vias e tratos afetados na cirurgia de coelhos é de grande importância uma vez que os animais foram avaliados apenas clinicamente. Como preconizamos a hemissecção ventral da medula como melhor modelo para estudo de lesão medular induzida em coelhos podemos afirmar que clinicamente esta lesão provocou perda sensitiva e motora. Segundo Chrisman (1985), se o funículo dorsal da medula é afetado, há alterações da propriocepção consciente dos membros, e o animal se mantém em pé, apoiado sobre o dorso das patas. Com uma distorção dos tratos superficiais do funículo ventral e uma alteração de seu suprimento sanguíneo, o animal pode ter dificuldades em suportar seu próprio peso e ficar em pé. Isto é devido a disfunções dos tratos vestibulospinais e reticulospinais. Mesmo que o animal seja incapaz de levantar-se, pode manter alguns movimentos voluntários se os tratos rubrospinal e corticospinal estiverem ainda funcionando. Neste estágio o animal está tetraparético. Com um maior envolvimento dos tratos rubrospinal, corticospinal e outros tratos reticulospinais cessam os movimentos voluntários e o animal fica tetraplégico.

Como citado por Feitosa (2004) os tratos motores são responsáveis pelo movimento voluntário (flexores) e aqueles para postura e sustentação do corpo (extensores). Os tratos sensitivos são responsáveis pela propriocepção inconsciente e impulsos aferentes necessários para a coordenação do movimento muscular, bem como das sensações de dor e temperatura. Levando em consideração esta informação adaptamos uma escala de avaliação clínica neurológica, já que as escalas existentes podem ser simples demais e não permitem analisar todos os aspectos necessários (TATOR, 1997). Por outro lado escalas muito abrangentes tais como a escala de Basso, Beattie e Bresnahan-BBB (1995), preconizada pela *Ohio State University* (OSU) dificulta a interpretação dos resultados. Tal informação é confirmada por Vialle et al. (2002) em estudos com lesões medulares em ratos, quando afirmam que estas

escalas tornam o exame clínico falho. Estes autores também adaptaram uma escala de avaliação, porém esta também é falha uma vez que não levaram em consideração alguns parâmetros importantes do exame clínico neurológico tais como o nível de consciência que é o primeiro parâmetro que deve ser avaliado nesse tipo de exame clínico como descrito por Chrisman (1985); Radostits et al. (2002) e Feitosa (2004). Estes autores afirmam que o nível de consciência é determinado pela resposta do animal a estímulos externos nocivos.

A análise clínica neurológica proposta neste estudo apresentou-se eficaz para a avaliação comportamental dos animais submetidos a lesão medular experimental. Os itens avaliados estão descritos por Chrisman (1985), Radostits (2002) e Feitosa (2004) como sendo os principais parâmetros a serem avaliados em pacientes com alterações neurológicas em medula espinhal. Podemos observar o aparecimento de sinais tais como o de “Babinski” e Reflexo do Extensor Cruzado nos animais submetidos a lesão medular ventral, seguido de terapia com células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar. Estes reflexos estão presentes em pacientes com lesão de neurônio motor superior (Chrisman, 1985; Radostits, 2002; Feitosa, 2004). Isto confirma nossos achados uma vez que a lesão ventral da medula espinhal em coelhos foi realizada entre os segmentos medulares T11-T12 ventralmente. Este fato justifica a presença desse reflexo em todos os animais avaliados, e, no presente estudo concretiza a escolha do modelo de hemiseção ventral da medula, demonstrando que realmente os animais foram lesionados.

Durante as duas primeiras avaliações realizadas no 7º e no 14º dia após transplante não foram observadas alterações significativas relacionadas a melhora clínica dos animais transplantados. Estes resultados não encontram apoio nos dados de Ma et al. (2001) em estudos com lesões medulares em camundongos, pois os autores afirmam que após duas semanas observaram melhora clínica comportamental nesses animais. Entretanto estes autores não fizeram alusão qual porção da medula foi lesionada. De forma semelhante com estes autores na oportunidade em que foram realizadas em coelhos hemiseções dorsal e secção lateral, para aprimoramento de protocolo para o nosso estudo, também observamos que após 15 dias pós lesão os animais apresentaram deambulação normal, fato este também verificado por Vialle et al. (2002) em estudos com ratos submetidos a lesões medulares por contusão. Li, Field e Raisman (1997) também descrevem melhora clínica em animais submetidos a lesões medulares e tratados com células olfativas, porém neste estudo utilizaram lesões medulares unilateral. Ruitenberg et al. (2005) relatam que não observaram melhora clínica

comportamental durante 10 semanas após transplante de células-tronco olfativas em ratos com lesões medulares, porém estes autores afirmam que esse tipo celular possui grande potencial para promover regeneração tecidual.

Aos 21 dias pós transplante pudemos notar início de melhora clínica neurológica em um dos animais analisados, de forma semelhante a Mackay-Sim et al. (2008) em estudos realizados com transplante de células olfativas em humanos paraplégicos. Estes autores relatam melhora clínica neurológica com aumento de sensibilidade pós transplante após 3 anos. Da mesma forma ao citado pelos últimos autores, novas considerações neste tipo de estudo devem ser levadas em conta, como por exemplo aumento de tempo de avaliação. Estes autores também deixam claro o potencial terapêutico deste tipo celular, assim como o observado em coelhos na avaliação por imunohistoquímica. Ao utilizarmos marcadores celulares pudemos comprovar que as células foram direcionadas ao local lesionado e induziram a formação de uma possível ponte para regeneração tecidual, tal como o citado por Ramón-Cueto et al. (1998) em estudo de terapia de lesão medular com células-tronco olfatórias. Liu et al. (2001) que utilizaram como um dos marcadores o GFAP encontraram marcação positiva no local. Por outro lado Leung, Coulombe e Reed (2007) encontraram marcação positiva com o marcador OMP, semelhante ao nosso resultado que ainda demonstrou marcação positiva para as reações protéicas com Vimentina e Nanog. No material coletado dos animais transplantados com células marcadas com retrovírus GFP pode-se observar reação de fluorescência, evidenciando que realmente houve migração das células para o local lesionado. Este resultado soma-se ao de Lu et al. (2002) e Cao et al. (2004) quando realizaram transplantes de células-tronco olfativas em ratos submetidos a lesões medulares. Estes autores também relataram que estas células promoveram melhora clínica nestes animais, no período compreendido entre 4 e 8 semanas pós transplante, respectivamente. Os sinais de melhora neurológica observados foram o de propriocepção consciente, colocação tátil e movimento de pedalagem. Entretanto Chrisman (1985) afirma que o reflexo de extensão e flexão dos membros pode ocorrer em um animal paralisado, e que parece dar alguns passos embora, não seja um movimento voluntário ou percepção consciente. Segundo a autora esta deambulação é caracterizada como andar espinhal, causado pela atividade reflexa espinhal hiperativa, e, pode ser observado mesmo quando a medula espinhal está rompida. Portanto não podemos considerar este reflexo como resposta positiva da terapia celular realizada. Coumans et al. (2001) relatam melhora clínica semelhante a

observada nos coelhos após 4 semanas pós transplante com neurotrofinas em ratos portadores de lesão medular. Nos nossos resultados após 21 dias de avaliação também não foi observada capacidade de suportar o próprio peso, bem como não foram observados reflexos de dor profunda e superficial, semelhantes aos encontrados por Jeffery, Lakatos e Frankilin (2005) em estudo com células-tronco olfativas em cães portadores de lesões medulares. Estes autores citam que após 8 meses pós tratamento os animais começaram a apresentar retorno da percepção de dor demonstrando que um novo estudo com maior tempo de avaliação clínica, deveria ser realizado com coelhos para demonstrar maior capacidade de recuperação. Outro reflexo que podemos verificar durante a avaliação com 21 dias pós tratamento foi o do músculo cutâneo do tronco. Este reflexo pode ser considerado como resposta positiva já que ele está ausente caudalmente a lesão medular (Feitosa, 2004).

Outro fator levado em consideração quando da utilização deste modelo é que o pós operatório é difícil, uma vez que depois de provocada uma lesão aguda vários outros sistemas são danificados o que aumenta o risco de morte do animal apesar de serem utilizadas drogas apropriadas. Esta dificuldade pós operatória é citada por inúmeros autores que realizaram lesões medulares (DEMEDIUK et al., 1990; TATOR et al., 1991; KRASSIOUKOV; CLAYDON, 2006). Durante o estudo observamos que os animais apresentaram alterações secundárias a lesão medular, tais como distúrbio eletrolítico, alterações vesicais e perda de termorregulação semelhante aos resultados de Cifu et al. (1999) e Vialle et al. (1999) quando afirmaram que as maiores causas de mortalidade pós lesões medulares são resultantes da perda de sensibilidade com a formação de escaras, alterações da função pulmonar, infecção e perda da termorregulação.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- 1) O protocolo de cultivo e isolamento de células-tronco a partir do epitélio olfatório de ratos Wistar mostrou-se viável; O meio de cultivo DMEM-F12 demonstrou alto nível de proliferação celular, propiciando confluência pós-plaqueamento;
- 2) As análises morfológicas, transfecção viral, imunocitoquímica, citometria de fluxo e RT-PCR foram suficientes para caracterização das células do epitélio olfatório de ratos como sendo células-tronco;
- 3) Não houve formação de teratoma no ensaio de potencial teratogênico realizado em camundongos NUDE demonstrando potencial das células-tronco do epitélio olfatório de ratos Wistar para terapia celular;
- 4) A técnica de indução de lesão medular por hemiseção ventral da medula foi a que melhor evidenciou resultado promissor a ser utilizada como modelo de estudo em coelhos da raça nova Zelândia;
- 5) O protocolo de avaliação clínica neurológica mostrou-se eficiente para avaliação clínica dos animais submetidos a lesão medular; Houve melhora clínica nos coelhos transplantados demonstrando o potencial terapêutico desse tipo celular em lesões medulares;
- 6) A quantidade de células utilizadas no transplante de células foi suficiente para causar efeito benéfico nos coelhos submetidos a lesão medular, mas novos estudos com novas dosagens, possíveis repetições de transplante e maior tempo de avaliação deverão ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, Y; RADTKE, C; HONMOU, O; KOCSIS, J. D. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. **Glia**, v. 39, p. 229-236, 2002.
- 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.
- AU, E; ROSKAMS, A. J. Olfactory Ensheathing Cells of the lamina própria *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.; ROBECCI, 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.
- AZIZI, S. A.; STOKES, D.; PROCKOP, D. J. Survival, migration and engraftment of bone marrow stromal cells into the striatum of the adult rats. **Experimental Neurology**, v. 153, n. 2, p. 374-375, 1998.
- BAGLEY, R. S.; HARRINGTON, M. L.; SILVER, G. M.; CAMBRIDGE, A. J.; CONNORS, R. L.; MOORE, M. P. Exogenous spinal trauma: clinical assessment and initial management. **Veterinary Neurology**, v. 21, n. 12, p. 1138-1143, 1999.
- BARNABE-HEIDER, F.; FRISEN, J. Stem cells for spinal cord repair. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 1, p. 16-24, 2008.
- BASSO, D. M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testings in rats. **Journal Neurotrauma**, v. 12, p. 1-21, 1995.
- BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P. G. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180-192, 2001.
- BJORKLUND, A; LINDVALL, O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. **Nature Neuroscience**, v. 3, p. 537-44, 2000.
- BRAUND, K. G. Acute spinal cord trauma. In: BOJRAB, M. S. **Diseases mechanisms in small animal surgery**. 2. ed. Lippincott: Williams & Wilkins, cap. 152, p.1140-1157, 1993.
- BRASIL. Lei Federal n.º 6.638. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determina outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.1, 10 de maio de 1979.

BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. **Cell**, n. 65, p. 175-187, 1991.

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**, Vol. 13, 339-352, 1994.

CALOF, A. L.; MUMM, J. S.; RIM, P. C.; SHOU, J. The neuronal stem cell of the olfactory epithelium. **Journal of Neurobiology**, V. 36, p. 190-205, 1998.

CAPECCHI, M. R. The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 70-76, 1989.

CAO, L.; LIU, L.; CHEN, Z.; WANG, L.; YE, J.; QIU, H.; LU, C.; HE1, C. Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair **Brain**, v. 127, p. 535-549, 2004.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J.D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazoliumbased, semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**. v. 47, p. 936-942, 1987.

CIFU, D. X.; HUANG, M. E.; KOLAKOWSKY-HAINER, S. A.; SEEL, R. T. Age, outcome, and rehabilitation costs after paraplegia caused by traumatic injury of the thoracic spinal cord, conus medullaris, and cauda equina. **Journal Neurotrauma**, v. 16, n. 9, p. 805-15, 1999.

COMPSTON, A.: Brain repair: an overview. **Journal Neurology**. v. 241, p. 51-54, 1994.

COUMANS, J. V.; LIN, T. T.; DAI, H. N.; MACARTHUR, L.; MCATEE, M.; NASH, C.; BREGMAN, B. S. Axonal Regeneration and Functional Recovery after Complete Spinal Cord Transection in Rats by Delayed Treatment with Transplants and Neurotrophins. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 23, p. 9334-9344, 2001.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. A célula: Origem do tumor e disseminação do câncer. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 50-51, 2008.

CHEN, X.; LI, Y.; WANG, L.; KATAKOWSKI, M.; ZHANG, L.; CHEN, J.; XU, Y.; GAUTAM, S. C.; CHOPP, M. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. **Neuropathology**, v. 22, p. 275-279, 2002.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurology**. v. 1, n. 2, p. 92-100, 2002.

CHRISMAN, C. L. **Neurologia dos pequenos animais**. São Paulo: Rocca, 1985. 432p.

D'AQUINO, R.; PAPACCIO, G.; LAINO, G.; GRAZIANO, A. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. **Stem Cells Review**, v. 4, n. 1, p. 21-26, 2008.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.

DHARMASOROJA, P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell for the treatment of ischemic stroke. **Journal clinical neuroscience**. v. 16, p. 12-20, 2009

DULAC, C.; ZAKHARY, L. **Stem cells of the olfactory epithelium**. Handbook of Stem Cells.

FAULKNER, J.; KEIRSTEAD, H. S. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors for the treatment of spinal cord injury. **Transplant Immunology**, v. 15, n. 2, p. 131-142, 2005.

FEITOSA, F. L. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**, São Paulo: Rocca, 2004.

FORD, R. W. A reproducible spinal cord injury model in the cat. **Journal Neurosurgery**, v. 59, p. 268-275, 1983.

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, 1970.

FUKUDA, S.; NAKAMURA, T.; KISHIGAMI, Y.; ENDO, K.; AZUMA, T.; FUJIKAWA, T.; TSUTSUMI, S.; SHIMIZU, Y. New canine spinal cord injury model free from laminectomy. **Brain Research Protocols**, v. 14, n. 3, p. 171-180, 2005.

GRAZIADEI, G. A. M.; MARGOLIS, F. L.; HARDING, J. W.; GRAZIADEI, P. P. C. Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 25, n. 12, p. 1311-1316, 1977.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

GRUNER, J. A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. **Journal of neurotrauma**, v. 9, p. 123-126, 1992.

GUZMAN, R.; VOGT, C.; KORF, H. W.; DEHGHANI, F. Interleukin-1 α exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. **European Journal Neuroscience**, v. 21, p. 2347-2360, 2008.

HAYDEN, G.; COON, F. C.; KAZUSHIGE, S.; BRANDI, M. L.; SWERDLOW, R. D. Cell cultures of neuroblasts from rat olfactory epithelium that show odorant responses. **Neurobiology**, v. 86 p. 233-244. 2004.

HIGUCHI, Y.; NAKAMURA, H.; KAWASAKI, M.; TAKAHASHI, S. The dynamics of precursor cells in the olfactory epithelium of juvenile and adult guinea pigs. **European Archives Otorhinolaryngology**, v. 262, p. 64–68, 2005.

HANNOUCHE, D.; RAOULD, A.; NIZARD, R. S.; SEDEL, L.; PETITE, H.. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: A suitable method for tracking LacZ mesenchymal stem cells in skeletal tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 55, p. 255-262, 2007.

HASSAN, H. T.; EL-SHEEMY, M. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 97, p. 465-471, 2004.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, 2003.

HIND, J. P.; HIND, P. L.; MCNELLY N. A. An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium: evidence for long-lived receptors. **Anatomy Research**, v. 210, p. 375-383, 1984.

HOFSTETTER, C. P.; SCHWARZ, E. J.; HESS, D.; WIDENFALK, J.; EL MANIRA, A.; PROCKOP, D. J.; OLSON, L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 4, p. 2199-2204, 2002.

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**, v. 400, p. 400-469, 1998.

HULSEBOSCH, C. E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. **Adv Physiology Education**. v. 26, p. 238-255, 2002.

IMAIZUMI, T.; LANKFORD, K. L.; WAXMAN, S. G.; GREER, C. A.; KOCSIS, J. D. Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 16, p. 6176–6185, 1998.

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.

IWANAMI, A.; KANEKO, S.; NAKAMURA, M.; KANEMURA, Y.; MORI, H.; KOBAYASHI, S.; YAMASAKI, M.; MOMOSHIMA, S.; ISHII, H.; ANDO, K.; TANIOKA, Y.; TAMAOKI, N.; NOMURA, T.; TOYAMA, Y.; OKANO, H. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. **Journal of Neuroscience Research**, v. 80, n. 2, p. 182-190, 2005.

JOHANSSON, C. B.; MOMMA, S.; CLARKE, D. L.; RISLING, M.; LENDAHL, U.; FRISEN, J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. **Cell**, v. 96, n. 1, p. 25-34, 1999.

JEFFERY, N. D.; BLAKEMORE, W. F. Spinal cord injury in small animals. 2. Current and future options for therapy. **Veterinary Record**, v.145, n.7, p.183-190, 1999.

JEFFERY, N.; PENDERIS, J.; SMITH, P.M.; FRANKLIN, R.J. Bridging the divide: spinal cord repair by cellular transplantation-from research laboratory to therapeutic application. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.42, p.428-432, 2001.

JEFFERY, N. D.; LAKATOS, A.; FRANKLIN, R. J. M. Autologous Olfactory Glial Cell Transplantation Is Reliable and Safe in Naturally Occurring Canine Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, n. 11, p. 1282–1293, 2005.

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

KAJI, E. H.; LEIDEN, J. M. Gene and stem cell therapies. **JAMA**. v. 285, p. 545-50, 2001.

KAN, I. ; MELAMD, E.; OFFEN, D. Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. **Handbook Experimental Pharmacology**, v. 180, p. 219-242, 2007.

KATO, T.; HONMOU, O.; UEDE, T.; HASHI, K.; OCSIS, J. D. Transplantation of Human Olfactory Ensheathing Cells Elicits Remyelination of Demyelinated Rat Spinal Cord. **Glia**, v. 30, n. 3, p. 209–218, 2000.

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.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research Therapy**, v. 9, p. .204, 2007.

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

KNECHT, C. D. Results of surgical treatment for thoracolumbar disc protrusion. **Journal Small Animal Practice**. v. 13, n. 8, p. 449-53, 1972.

KWON, B. K.; LIU, J.; MESSERER, C.; KABAYASHI, N. R.; MCGRAW, J.; OSCHIPOK, L.; TETZLAFF, W. Survival and regeneration of rubrospinal neurons one year after spinal cord injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 3246-3251, 2002.

KRAUS, K. H. **Medical management of acute spinal cord disease.** In: KIRK, R. W. Current veterinary therapy XIII:small animal practice. Philadelphia: Saunders, 2000. p.186-190.

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

LEE, K. H.; SUH-KIM, H.; CHOI, J. S.; JEUN, S. S.; KIM, E. J.; KIM, S. S.; YOON, D. H.; LEE, B. H. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 67, n. 1, p. 13-22, 2007.

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

LI, Y.; FIELD, P. M.; RAISMAN, G. Repair of Adult Rat Corticospinal Tract by Transplants of Olfactory Ensheathing Cells. **Science**, v. 277, p. 2000-2002, 1997.

LI, Y.; FIELD, P. M.; RAISMAN, G. Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 24, p. 10514–10524, 1998.

LIM, J. H.; BYEON, Y. E.; RYU, H. H.; JEONG, Y. H.; LEE, Y. W.; KIM, W. H.; KANG, K. S.; KWEON, O. K. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 3, p. 275-282, 2007.

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.

LEITE, R. S.; DOHMANN, H. F. Uso de células-tronco aplicado à cardiologia. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 03, p. 1-5, 2004.

LEUNG, C. T.; COULOMBE, P. A.; REED, R. R. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. **Nature Neuroscience** v. 10, n. 6, p. , 2007.

LIU, S.; QU, Y.; STEWART, T. J.; HOWARD, M. J.; CHAKRABORTTY, S.; HOLEKAMP, T. F.; MCDONALD, J. W. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. **PNAS**, v. 97, n. 11, p. 6126–6131, 2001.

LU, J.; FERON, F.; STEPHEN, M. H.; MACKAY-SIM, H.; WAITE, P. M. E. Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. **Brain Research**, v. 889 p. 344–357, 2001.

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.

LU, J.; FÉRON, F.; MACKAY-SIM, A.; WAITE, P. M. E. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. **Brain**, v. 125, p. 14-21, 2002.

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. On the life span of olfactory receptor neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 3, p. 209-215, 1990.

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.

MANHONG, M.; BASSO, D. M.;†WALTERS, P. STOKES, B. T.; JAKEMAN, L. B. Behavioral and Histological Outcomes Following Graded Spinal Cord Contusion Injury in the C57Bl/6 Mouse. **Experimental Neurology**, v. 169, p. 239-254, 2001.

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.

MARSHALL, G. P.; LAYWELL, E. D.; ZHENG, T.; STEINDLER, D. A.; SCOTT, E. W. In vitro-derived "neural stem cells" function as neural progenitors without the capacity for self-renewal. **Stem Cells**, v. 24, n. 3, p. 731-738, 2006.

MEHTA, T.; FERROZ, A.; THAKKAR, U.; VANIKAR, A.; SHAH, V.; TRIVEDI, H. Subarachnoid placement of stem cells in neurological disorders. In: CONFERENCE NAME, 2007, Asarwa, INDIA: **Anais**, v. 02, p. 1145-1147, 2007.

MEZEY E, KEY S, VOGELSANG G, SZALAYOVA I, LANGE GD, CRAIN B: Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 1364-9, 2003

MEYER, F.; VIALLE, L. R.; VIALLE, E. M.; BLEGGI-TORRES, L. F.; RASERA, E.; LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>. Acesso em: 27/11/10.

MIMURA, T.; DEZAWA, M.; KANNO, H.; SAWADA, H.; YAMAMOTO, I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. **Journal of Neurosurgery**, v. 101, p. 806-12, 2004.

MOLINA, A. I.; CRISTANTE, A. F.; BARROS FILHO, T. E. P. Comparative Analysis of Functional Evaluation performed in medullary injury in animals. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 12, p. 1, 2004.

MORRISON, E. E.; CONSTANZO, R. M. Morphology of the olfactory epithelium. **Journal of Comparative Neurology**, v. 1, n. 297, p. 1-13, 1990.

MUÑOZ-ELIAS, G.; MARCUS, A. J.; COYNE, T. M.; WOODBURY, D.; BLACK, I. B. Adult Bone Marrow Stromal Cells in the Embryonic Brain: Engraftment, Migration, Differentiation, and Long-Term Survival. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 4585-95, 2004.

MURRELL, W.; FERON, F.; WETZIG, A.; CAMERON, N.; SPLATT, K.; BELLETTE, B. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Developmental Dynea*, v. 233, p. 496-515, 2005.

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. **The Spine Journal**, v.9, n.7, p.585-594, jul. 2009.

NAKAMURA, H.; FUJIWARA, M.; KAWASAKI, M.; NONOMURA, N.; TAKAHASHI, S. Age-related changes in dividing cells of the olfactory epithelium of the maturing guinea pig. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 255, n. 6, p. 289-292, 1998.

N-CUETO, A. R.; PLANT, G. W.; AVILA, J.; BUNGE, M. B. Long-Distance Axonal Regeneration in the Transected Adult Rat Spinal Cord Is Promoted by Olfactory Ensheathing Glia Transplants. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 3803-3815, 1998.

NOBLE, J. R.; WRATHALL, J. R. Correlative analyses of lesion development and functional status after graded spinal cord contusive injuries in the rat. **Experimental Neurology**, v. 103, p. 34-40, 1989.

NOSRAT, I. V.; WIDENFALK, J.; OLSON, L.; NOSRAT, C. A. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury (vol 238, pg 120, 2001). **Developmental Biology**, v. 239, n. 1, p. 176-176, 2001.

OHIRI, T.; YAMAMOTO, S.; NAGAO, M.; SUGIMORI, M.; YAMAAMOTO, N.; NAKAMURA, K.; NAKAFUKU, M. Growth factor and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured spinal Cord. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 11948-11960, 2006.

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

OLBY, N.; JEFERRY, N. Pathogenesis of diseases of the central nervous system. In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2003. cap. 77, p. 1132-1147.

OLBY, N. J.; DE RISIO, L.; MUNANA, K. R.; WOSAR, M. A.; SKEEN, T. M.; SHARP, N. J. H.; KEENE, B. W. Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 10, p. 1624-1628, 2001.

OLSON, L. Medicine: Clearing a path for nerve growth. **Nature**, v. 416, n. 6881, p. 589-590, 2002.

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.

PADILHA FILHO, J. G.; SELMI, A. L. Discopatia cervical no cão. Tratamento cirúrgico através de fenestração ventral. Estudo retrospectivo (1986 – 1997). **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 29, n. 1, p. 75-78, 1999.

PAN, H. C.; CHENG, C. J.; LAI, S. Z.; LEE, C. W.; YANG, D. Y.; CHANG, M. H.; HO, P. S. Post injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by aminiotic fluid mesenchymal stem cell. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 14, p. 1089-1098, 2007.

PAULA, S.; PEDROSO, M. F.; DALBEM, A.; COSTA, Z. S. M.; VITOLA, A.; BAES, C. V. W.; SILVA, J. B.; FRIEDRICH, M. A. G.; COSTA, J. C. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, 2005.

PEREIRA, L.V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 7-14.

PETERSEN, B. E.; BOWEN, W. C.; PATRENE, K. D.; MARS, W. M.; SULLIVAN, A. K.; MURASE, N.; BOGGS, S. S.; GREENBERGER, J. S.; GOFF, J. P. Bone marrow as a source of hepatic oval cells. **Science**, v. 284, p. 1168-1170, 1999.

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

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G.; HOUSTON, D. M. **Exame clínico em diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000

RAMON-CUETO, A.; PLANT, G. W.; AVILA, J.; BUNGE, M. B. Long-Distance Axonal Regeneration in the Transected Adult Rat Spinal Cord Is Promoted by Olfactory Ensheathing Glia Transplants. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 3803–3815, 1998.

REYNA, M. **Técnicas de estudio de líneas celulares**. Universidad de Barcelona, 2003. Disponível: http://www.ub.es/biocel/wbc/técnicas_de_cultivo_celular.htm. Acesso em: 30 ago. 2010

REHERMANN, M. I.; MARICHAL, N.; RUSSO, R. E.; TRUJILLO-CENOZ, O. Neural Reconnection in the Transected Spinal Cord of the Freshwater Turtle *Trachemys dorbignyi*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 515, n. 2, p. 197-214, 2009.

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

RUITENBERG, M. J.; LEVISON, D. B.; LEE, S. V.; VERHAAGEN, J. HARVEY, L. R.; PLANT, G. W. NT-3 expression from engineered olfactory ensheathing glia promotes spinal sparing and regeneration. **Brain**, v. 128, p. 839–853, 2005.

SADOWSKY, C.; VOLSHTEYN, O.; SCHULTZ, L.; MCDONALD, J. W. Spinal cord injury. **Disability and Rehabilitation**, v. 24, p. 680-687, 2002.

SCADDEN, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. **NATURE**. V. 441, p. 1075-1079, 2006. doi:10.1038/nature04957

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. As Células-Tronco e o seu Potencial na Reparação de Órgãos e Tecidos. In: **Manual de Instrução Programada: Princípios de Hematologia e Hemoterapia – 2º ed, Rio de Janeiro**. Centro de Estudos Alfa Rio - Perfusion Line – Educação Continuada em Biomedicina e Biotecnologia, 2005.

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.

SOUZA, V. F.; LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. RAMALHO, L. M. P.; SANTOS, J. M. Células-tronco: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 251-256, 2003.

SEIM, H.B. Conditions of the thoracolumbar spine. **Seminars in Veterinary Medicine Surgery (Small Animals)**, V. 4, p 235-253, 1996.

SHARP, J.; KEIRSTEAD, H. S. Therapeutic applications of oligodendrocyte precursors derived from human embryonic stem cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 434-440, 2007.

SHEN, Y.; QIAN, Y.; ZHANG, H.; ZUO, B.; LU, Z.; FAN, Z.; ZHANG, P.; ZHANG, F.; ZHOU, C. Guidance of Olfactory Ensheathing Cell Growth and Migration on Electrospun Silk Fibroin Scaffolds. **Cell Transplantation**, v. 19, p. 147–157, 2010.

WALTON, R. M.; WOLFE, J. H. In vitro growth and differentiation of canine olfactory bulb-derived neural progenitor cells under variable culture conditions. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, p. 158-167, 2008.

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, p. 53-68, 2007.

WANG, Y.; CHENG, S.; YANG, D.; LE, W. D. Stem cell transplantation: a promising therapy for Parkinson's disease. **Journal Neuroimmune Pharmacology**. v. 2, p. 243-250, 2007.

WEBB, A. A.; JEFFERY, N. D.; OLBY, N. J.; MUIR, G. D. Behavioural analysis of the efficacy of treatments for injuries to the spinal cord in animals. **Veterinary Record**, v. 155, n. 8, p. 225-230, 2004.

WEI, L.; KEOGH, C. L.; WHITAKER, V. R.; TEUS, M. H.; SHANG, P. Y. Angiogenesis and stem cell transplantation as potential treatments of cerebral ischemic stroke. **Pathophysiology**, V. 12, p. 47-62, 2005.

WRATHALL, J. R.; TENG, Y. D.; CHOINIERE, D. Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-Nmethyl-D-aspartate receptors. **Experimental Neurology**, v. 137, p. 119-126, 1996.

WU, Q. Y.; LI, J. FENG, Z. T.; WANG, T. H. Bone marrow stromal cells of transgenic mice can improve the cognitive ability of an Alzheimer disease rat model. **Neuroscience Letters**, v. 417, p. 281-285, 2007.

TATOR, C. H.; KOYANAGI, I. Vascular mechanism in the pathophysiology of human spinal cord injury. **J Neurosurgery**, v. 86, p. 483-492, 1997.

TOLOSA, E. M.C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ed. São Paulo: Manole, 2003. 331p.

UEBLACKER, P.; WAGNER, B.; VOGT, S.; SALZMANN, G.; WEXEL, G.; KRUEGER, A.; PLANK, C.; BRILL, T.; SPECHT, K.; HENNIG, T.; SCHILLINGER, U.; IMHOFF, A. B.; MARTINEK, V.; GANSBACHER, B. In vivo analysis of retroviral gene transfer to chondrocytes within collagen scaffolds for the treatment of osteochondral defects. **Biomaterials**, v. 28, p. 4480-4487, 2007.

VASSAR, R.; NGAL, J.; AXEL, R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. **Cell**, v. 74, p. 309-318, 1993.

VIALLE, E.; VIALLE, L. R. G.; RASERA, E.; CECHINEL, C.; LEONEL, I.; SEYBOTH, C. Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos a lesão medular experimental. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 37, n 3, p. 83-88, 2002

VIAL, L. R. G.; FISCHER, S.; MARCON, J. C.; VIALLE, E.; LUZZI, R.; BLEGGI-TORRES, L. F. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 34, n 2, p. 85-89, 1999.

VINCENT, A. J.; WEST, A. K.; CHUAH, M. I. Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. **Journal of Neurocytology** v. 34, p. 65-80, 2005.

ZHANG, X.; KLUEBER, K. M.; GUO, Z.; LU, C.; ROISEN, F. J. Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium. **Experimental Neurology**, v. 186, p. 112-123, 2004.

ZHANG, X.; KLUEBER, 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. 1074, p. 109-119, 2006.

ZHAO, L. R.; DUAN, W. M.; REYES, M.; KEENE, C. D.; VERFAILLIE, C. M.; LOW, W. C. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into ischemic brain of rats. **Experimental Neurology**, v. 174, p. 11-20, 2002.