MARCIO NOGUEIRA RODRIGUES

**Análise do potencial terapêutico de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos
da raça Nova Zelândia**

São Paulo

2014

MARCIO NOGUEIRA RODRIGUES

**Análise do potencial terapêutico de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos
da raça Nova Zelândia**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Angelica Miglino

De acordo: _____

Orientadora

São Paulo

2014

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.3029
FMVZ

Rodrigues, Marcio Nogueira
Análise do potencial terapêutico de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos
da raça Nova Zelândia / Marcio Nogueira Rodrigues. -- 2014.
81 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profª. Drª. Maria Angelica Miglino.

1. Células-tronco. 2. Órgão vômeronasal. 3. Cavidade nasal. 4. Terapia celular. I.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Potencial terapêutico de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia", protocolado sob o nº 2337/2011, utilizando 8 (oito) coelhos e 3 (três) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/4/2012.

We certify that the Research "Analysis of the therapeutic potential of cells derived from the vomeronasal organ of rabbits New Zealand", protocol number 2337/2011, utilizing 8 (eight) rabbits and 3 (three) mice, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/11/2012.

São Paulo, 12 de abril de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RODRIGUES, Marcio Nogueira

Título: Análise do potencial terapêutico de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

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.

Aos meus pais Antonio Wilson Rodrigues e 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. Aos meus irmãos Márcia e Maurício pela amizade, paciência e cumplicidade. 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 minha orientadora Maria Angélica Miglino que a cada dia nos faz buscar o crescimento. Obrigado pela confiança depositada, pela oportunidade e pela amizade.

Aos meus velhos amigos que mesmo na distância continuaram a torcer por mim. A todos os amigos que fiz durante as caminhadas da vida.

A todos que indistintamente me ajudaram para vencer os obstáculos e conseguir terminar meu trabalho. Aos professores e aos funcionários da FMVZ-USP obrigado pela ajuda e atenção. A Professora Dra. Káterin Elena Bohorquez Grondona pela ajuda durante a execução desta tesa.

A banca por ter aceitado participar da minha defesa.

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

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

RESUMO

RODRIGUES, M. N. **Análise do potencial terapêutico de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia.** [Analysis of therapeutic potential of cells from vomeronasal organ of rabbits New Zealand]. 2014. 81f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O órgão vômeronasal (OVN), é uma estrutura que detecta feromônios, emitindo sinais que modulam o comportamento social e reprodutivo. Possui células-tronco que se dividem e migram para substituir neurônios ao longo da vida. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar as células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia e testar seu potencial terapêutico no tratamento da ablação da via vômeronasal. Utilizou-se 10 coelhos machos com 120 dias, sendo 9 submetidos a ablação do OVN e 1 utilizado para coleta de material para cultivo celular. Foram testados três meios de cultivo DMEM High Glucose, DMEM/F12 e MEM Alfa. No cultivo celular observou-se maior confluência e crescimento quando utilizado o DMEM High Glucose, confirmado pelos ensaios de MTT e Azul de Trypan. Na imunocitoquímica observou-se PCNA⁺, OCT4⁺, Nanog⁺, GFAP⁺, Vimentina⁺, Nestin⁺, Stro-1⁺, B-Tubulina⁺, CK-18⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD117⁻ e CD45⁻. Na citometria de fluxo foi observado PCNA⁺, OCT-3/4⁺, Nanog⁺, GFAP⁺, Vimentina⁺, Nestin⁺, Stro-1⁺, B-Tubulina⁺, CK-18⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻ e CD45⁻. Na análise molecular foi possível observar a expressão de CD73, CD105, Oct-4, Nestina, Vimentina e GAPDH. Funcionalmente as células se diferenciaram em adipócitos, osteócitos e condrócitos e não possuem potencial tumorigênico em camundongos Balb-c^{nu/nu}. A análise hormonal demonstrou que nos animais tratados após 7 e 14 dias não houveram diferenças significativas entre os grupos tratados e controles. No grupo após 21 dias notou-se uma diferença de 50% nos níveis hormonais no grupo tratado em relação ao grupo controle. Na análise da expressão para eGFP observou-se que os animais tratados após 7 dias as células injetadas formavam aglomerados celulares na região subjacente ao epitélio sensitivo. Após 14 dias continuavam a circundar o epitélio neurosensorial e após 21 dias observou-se pouca expressão de células localizadas apenas na região subjacente ao epitélio neurosensorial. A linhagem celular derivada do órgão vômeronasal possui uma população de células progenitoras, que foram visualizadas no foco da lesão, demonstrando sua capacidade de migração, o que a torna uma boa fonte para terapia celular em ablação da via vômeronasal.

Palavras-chaves: Células-tronco. Órgão vômeronasal. Cavidade nasal. Terapia celular.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. N. **Analysis of therapeutic potential of cells from vomeronasal organ of rabbits New Zealand**. [Análise do potencial terapêutico de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia]. 2014. 81f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The vomeronasal organ (VNO) is a structure that detects pheromones, emits signals that modulate social and reproductive behavior. It has stem cells that divide and migrate to replace neurons throughout life. The aim of this study was to isolate and characterize cells derived from the vomeronasal organ from rabbits New Zealand and test their therapeutic potential in the treatment of ablation of the vomeronasal pathway. 10 male rabbits with 120 days were submitted to the ablation of VNO and 2 controls animals used to collect material for cell culture. Three different culture media DMEM High Glucose, Alpha MEM and DMEM/F12 were tested. In cell culture observed greater confluence and growth when used DMEM High Glucose, confirmed by MTT assay and Trypan Blue. In immunocytochemistry observed PCNA + OCT4 +, Nanog +, GFAP + Vimentin +, Nestin +, Stro-1 + B-tubulin +, CK-18 +, CD73 +, CD90 +, CD105 +, CD34-, CD117-and CD45-. In flow cytometry was observed PCNA + OCT-3/4 + Nanog +, GFAP + Vimentin +, Nestin +, Stro-1 + B-tubulin +, CK-18 +, CD73 +, CD90 +, CD105 +, CD34-and CD45-. Molecular analysis was possible to observe the expression of CD73, CD105, Oct-4, Nestin, vimentin and GAPDH. Functionally, the cells differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes have not Balb-cnu/nu tumorigenic potential in mice. Hormonal analysis demonstrated that animals treated after 7 days and 14 days there were no significant differences between treated groups and controls. In group after 21 days noticed a 50% difference in hormone levels in the treated group compared to the control group. In expression analysis for eGFP was observed that the treated animals after 7 the injected cells formed cell clusters in the underlying sensory epithelium region. After 14 days continued to surround the neurosensory epithelium and after 21 days there was little expression in the cells located just behind the neurosensory epithelium region. The cell line derived from the vomeronasal organ has a population of progenitor cells that were visualized in the lesion focus, demonstrating their ability to migrate, which makes it a good source for cell therapy in ablation of the vomeronasal pathway.

Keywords: Stem Cells. Vomeronasal organ. Nasal cavity. Cellular therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema ilustrativo do órgão vômeronasal de mamíferos	14
Figura 2 -	Fotomacrografia da ablação do ducto incisivo.....	42
Figura 3 -	Terapia celular nos animais submetidos a lesão no ducto incisivo.....	43
Figura 4 -	Órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia.....	46
Figura 5 -	Fotomicrografia do órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia.....	47
Figura 6 -	Fotomicrografia da cultura primária de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia.....	49
Figura 7 -	Fotomicrografia eletrônica de varredura das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia.....	50
Figura 8 -	Ensaio da formação de colônias das células derivadas do órgão vômeronasal.....	51
Figura 9 -	Gráfico da análise da atividade celular das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia.....	52
Figura 10-	Gráfico da análise da viabilidade celular das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia.....	53
Figura 11-	Análise das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia por Imunocitoquímica.....	55
Figura 12-	Análise das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia por citometria de fluxo.....	55
Figura 13-	Análise das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia por RT-PCR.....	56
Figura 14-	Análise funcional do pull de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia.....	58
Figura 15-	Camundongo BALB-CNU/NU após injeção de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia.....	60
Figura 16-	Análise da expressão das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da Raça Nova Zelândia transduzidas com retrovírus eGFP.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Anticorpos primários utilizados para a imunocitoquímica.....	35
Quadro 2-	Anticorpos primários utilizados para a citometria de fluxo.....	36
Quadro 3-	Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular por RT-PCR.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentrações séricas de testosterona (ng/mL) em coelhos da raça Nova Zelândia, com 120 dias obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média $\pm$ erro padrão médio).....	62
Tabela 2	Concentrações séricas de androstenediona (ng/mL) em coelhos da raça Nova Zelândia, com 120 dias obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média $\pm$ erro padrão médio).....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	O ÓRGÃO VÔMERONASAL (OVN)	17
2.2	FUNÇÕES DO ÓRGÃO VÔMERONASAL	19
2.3	CÉLULAS-TRONCO ORIUNDAS DAS VIAS OLFATÓRIA E VÔMERONASAL	20
2.4	CULTIVO DE CÉLULAS DA VIA OLFATÓRIA E VÔMERONASAL	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3.2	OBJETIVO GERAL	27
4	HIPÓTESE	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1	ANIMAIS	29
5.2	OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL DE COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA	30
5.3	ANÁLISE DE VIABILIDADE DE CRIOPRESERVAÇÃO	31
5.4	ENSAIO DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA	32
5.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE E VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL	32
5.5.1	Método Colorimétrico MTT	33
5.5.2	Método Azul de Trypan	33
5.6	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL	34
5.6.1	Análise Fenotípica por Imunocitoquímica.....	34
5.6.2	Análise Fenotípica por Citometria de Fluxo.....	36

5.6.3	Análise molecular das células do órgão vômeronasal por RT-PCR ...	37
5.6.4	Avaliação funcional adipogênica, osteogênica e condrogênica das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia	38
<i>5.6.4.1</i>	<i>Diferenciação adipogênica e osteogênica</i>	<i>39</i>
<i>5.6.4.2</i>	<i>Diferenciação condrogênica</i>	<i>40</i>
5.7	ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS OBTIDAS A PARTIR DO ÓRGÃO VÔMERONASAL.....	40
5.8	ANÁLISE DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS OBTIDAS A PARTIR DO ÓRGÃO VÔMERONASAL	41
5.8.1	Protocolo de indução da lesão da via vomeronasal do órgão vômeronasal	41
5.8.2	Transplante celular	43
5.8.3	Avaliação do Tratamento	44
<i>5.8.3.1</i>	<i>Avaliação Clínica</i>	<i>44</i>
<i>5.8.3.2</i>	<i>Avaliação Hormonal</i>	<i>44</i>
<i>5.8.3.3</i>	<i>Imunofluorescência.....</i>	<i>45</i>
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6	RESULTADOS	46
6.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓRGÃO VÔMERONASAL	46
6.2	ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL	48
6.3	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (CFU)	50
6.4	ENSAIO DE ATIVIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT	52
6.5	ANÁLISE DA VIABILIDADE PELO MÉTODO AZUL DE TRYPAN	53
6.6	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA POR IMUNOCITOQUÍMICA.....	54
6.7	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	55

6.8	ANÁLISE MOLECULAR DAS CÉLULAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL POR RT-PCR	56
6.9	AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL DE COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA	57
6.10	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL DE COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS BALB-CNU/NU	59
6.11	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO	61
6.11.1	Comportamento Social – Análise Clínica	61
6.11.2	Análise Hormonal	61
6.11.3	Análise da Expressão do EGFP	62
7	DISCUSSÃO	64
7.1	CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL.....	64
7.2	COMPORTAMENTO SOCIAL E ANÁLISE HORMONAL	68
7.3	EXPRESSÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO OVN.....	69
8	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A olfação está diretamente relacionada ao comportamento e a percepção sensorial do ambiente dos vertebrados, e necessita de uma ação de órgãos especializados que garantam a ligação entre o estímulo externo e a sensação provocada pelos odores (OGURA et al., 2010). Dentro da cavidade nasal existem dois subsistemas que captam os odores, que são: o epitélio olfatório principal (EOP) e o órgão vômeronasal (OVN) (STOWERS; LOGAN, 2010a).

O órgão vômeronasal (OVN) é uma estrutura distintamente quimiosensorial, fechado por uma cápsula óssea ou cartilaginosa que se abre através de um ducto na base da cavidade nasal (SMITH et al., 2014). Este órgão possui formato tubular, formado por um par de divertículos, situados em ambos os antimeros delimitados pelo septo nasal (BARONE, LOMBARD; MORAND, 1966; HARE, 1986; KEVERNE, 1999).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do órgão vômeronasal de mamíferos

Legenda: Notar o órgão vomeronasal bilateralmente na base do septo nasal (halo vermelho).

Fonte: Gray's Anatomy.

Este órgão possui uma conexão com a cavidade oral através do ducto nasopalatino e ainda apresenta células indiferenciadas ao longo da membrana basal (KEVERNE, 1999). Nos mamíferos o OVN é constituinte do sistema olfatório secundário, emite sinais químicos que detectam feromônios e modulam o comportamento social e reprodutivo (STOWERS; LOGAN, 2010b).

Segundo Powers e Winans (1975) o órgão vômeronasal é um dos componentes integrantes da via vômeronasal, a qual se encontra ligada de forma direta à estruturas cerebrais pertencentes ao sistema límbico. Essas são importantes para o desenvolvimento e para a expressão dos comportamentos sexual, agressivo e maternal. Além disso, a via é necessária para a ativação de outras vias neuroendócrinas, as quais estão envolvidas na reprodução.

Doving e Trotier (1998a) relataram que o órgão vômeronasal possui neurônios receptores, portadores de axônios longos, os quais penetram na cavidade encefálica, mediante os forames da lâmina crivosa do osso etmoide, terminando no bulbo olfatório. Seu lúmen é revestido por neurônios receptores, geralmente preenchidos por fluido oriundo das glândulas vomeronasais, as quais apresentam ductos secretórios localizadas nas paredes dorsais e ventrais do lúmen vômeronasal. Lateralmente ao lúmen, são visualizados vasos e seios sanguíneos inervados por fibras do sistema nervoso autônomo. Na sua superfície convexa encontra-se uma fileira de células ciliadas não sensoriais (BARRIOS et al., 2014).

Punta et al. (2002) demonstraram que, a remoção completa do órgão vômeronasal, promove déficits nas respostas sociais e comportamentais tais como: intensa vocalização do macho para as fêmeas, agressão entre machos e agressão materna. Os autores demonstraram que os sistemas vômeronasal e olfatório geralmente interagem para mediar respostas oriundas de sinais odoríferos (JOHNSTON, 1998; BARRIOS et al., 2014).

Modelos animais são importantes ferramentas para o estudo de diversas doenças, além de servirem como um sistema no qual podem ser testadas novas terapias para o tratamento dessas doenças (CAPECCHI, 1989). Hamsters, ratazanas, camundongos, ratos, dentre outros, constituem espécies úteis para elucidação de papéis funcionais do sistema vômeronasal. Os hamsters foram os primeiros animais nos quais os déficits do nervo vômeronasal demonstraram afetar seu comportamento (POWERS; WINANS, 1975).

O coelho é um modelo bastante acessível, exigindo mínimo espaço físico e pouca despesa para sua manutenção (ARON, 1979; GAAFAR et al., 1998). Possui o órgão vômeronasal bem desenvolvido e localizado em ambos os antímeros da base do septo nasal,

disposição semelhante à encontrada em outros mamíferos. É revestido por células neuroepiteliais e conectado ao sistema olfatório (ARON, 1979).

As células basais do órgão vômeronasal são células indiferenciadas adultas, que mantêm a capacidade para regenerar novos neurônios ao longo da vida, e que de acordo com a literatura, representa e compõe o epitélio do órgão vômeronasal, sistema especialmente favorável para investigação dessa questão (SCHWARTZ et al., 1991; HUARD; SCHWOB, 1995; HALPERN; MARTÍNEZ-MARCOS, 2003; BRANN; FIRESTEIN, 2010). Além disso, Gaafar et al. (1998) demonstraram em coelhos que, quando realizada a remoção experimental do órgão vômeronasal, a taxa reprodutiva diminui.

A população de células basais dá origem a progenitores e posteriormente a precursores que migram tanto horizontal como verticalmente para tornarem-se neurônios sensoriais (CALOF et al, 2002;. HALPERN e MARTÍNEZ-MARCOS, 2003). Dois tipos de células-tronco foram identificados no órgão vomeronasal: as células encontradas na zona marginal, que são em grande parte responsáveis pelo crescimento, e as células encontradas na zona central que estão associadas com a substituição neuronal (WEILER et al, 1999;. MARTÍNEZ-MARCOS et al.,2000a, b; WEILER, 2005; ROSA-PRIETO et al, 2009; RODRIGUES et al. 2012; BRANN e FIRESTEIN, 2014).

Assim, o órgão vômeronasal surge como uma possível e atraente fonte de células-tronco, diante de sua capacidade neurogênica, podendo ser utilizada com sucesso na Medicina Regenerativa. Não há relatos na literatura de protocolo de obtenção, cultivo e caracterização dessas células para uso em terapia celular. Frente a esta problemática e ao potencial desta estrutura, este trabalho objetivou obter e caracterizar as células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia, bem como testar seu potencial terapêutico na regeneração dessa via após ablação induzida por meio de cirurgia, observando a capacidade de estas células migrarem para as áreas lesionadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir são apresentados tópicos de revisão relacionados com anatomia do órgão vômeronasal, funções, células oriundas das vias olfatória e vômeronasal, e cultivo de células da via olfatória e órgão vômeronasal.

2.1 O ÓRGÃO VÔMERONASAL (OVN)

O anatomista Ludwig Jacobson, em 1813, foi o primeiro a descrever que na cavidade nasal de mamíferos existia um órgão que apresentava função excretora, visto que este possuía glândulas serosas, inervação bilateral e suprimento sanguíneo característico. Jacobson também suspeitou que o órgão vômeronasal (OVN) também pudesse apresentar propriedades sensoriais. No ano de 1895 este órgão foi denominado órgão vômeronasal de Jacobson pela *Der Anatomische Gesellschaft* (DOVING; TROTIER, 1998a).

De acordo com Carlson (2002), Barrios et al. (2014) e Wessels et al. (2014) cães e humanos possuem duas áreas diferenciadas de mucosa dentro da cavidade nasal, ambas com finalidades sensoriais. A mucosa olfatória constitui a primeira e tem sua origem do sistema olfatório principal com posição dorsocaudal na cavidade nasal. O órgão vômeronasal constitui a segunda e forma o sistema olfatório acessório, localizado próximo à abertura da cavidade nasal para o exterior, e segundo os autores, está relacionado a capacidades olfativas específicas.

O OVN consiste em estrutura par com formato de charuto, cuja localização é mediana, situando-se ao longo do septo nasal. Possui uma abertura no ducto incisivo (SMITH et al., 2014). Em roedores, situa-se dentro da cavidade nasal; em gatos, dentro do canal nasopalatino, o qual conecta as cavidades nasal e oral; em bovinos, abre-se diretamente na cavidade oral (VANDERLEI et al., 2010).

Vilela (2005) afirma que o órgão vômeronasal consiste em um par de bolsas rodeadas por receptores sensoriais que se conectam a cavidade nasal por um ducto. Foi demonstrado que esses receptores têm origem neurogênica e estimulam a neurogênese durante a vida (BRANN e FIRESTEIN, 2014). Os sinais químicos detectados pelos receptores deste órgão

são denominados feromônios, os quais estão envolvidos no comportamento sexual das espécies e na demarcação de território. Desta forma afetam a fisiologia e o comportamento de outro indivíduo da mesma espécie ou de outras espécies (DENNIS et al., 2003; BAUM e CHERRY, 2014).

Para Kelliher (2007), o OVN detecta moléculas odoríferas que influenciam o comportamento e consiste em estrutura par possuindo abertura em uma das extremidades e forma de saco cego.

Brennan; Keverne (1997) e Stockhosrt; Pietrowsky (2004) relataram que o órgão sensorial do sistema acessório é o órgão vômeronasal, localizado na base do septo nasal. Além disso, estes autores acrescentaram que o órgão vômeronasal se conecta com o bulbo olfatório acessório através do nervo vômeronasal. O bulbo olfatório envia projeções via amígdala e núcleo da base da estria terminal, para o hipotálamo, a qual tem função de mediar respostas comportamentais e hormonais aos estímulos olfatórios específicos.

Para Keverne (1999) dentro da cavidade nasal em uma cápsula cartilaginosa conectada por terminações nervosas do hipotálamo está localizado o órgão vômeronasal. Este exerce papel importante no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Inicialmente o estímulo é captado pelo órgão e posteriormente o impulso é levado para os nervos vomeronasais até o cérebro, onde o centro neuronal é ativado, desencadeando assim, sensações de prazer. Esse é o sinal de partida para o reconhecimento e relacionamento sexual tornando-se um estímulo para a hipófise, a qual estimula as gônadas através de sinais endócrinos (HAFEZ; HAFEZ, 2004; BAUM e CHERRY, 2014).

Os receptores do OVN são muito similares àqueles do sistema olfatório principal, com a exceção do fato de não possuírem cílios, apenas microvilos. Da mesma forma, são neurônios primários que se projetam diretamente para o bulbo olfatório (VANDERLEI et al., 2010).

Vaccarezza, Speich e Tramezzani (1981) citaram em seus estudos que a margem do epitélio vômeronasal é formada por microvilos originados de dendritos de células bipolares, microvilos de células de sustentação, e micro processos de origem indeterminada. Cada um destes possui uma característica particular.

Garrosa, Gayoso e Esteban (1998) afirmaram que no neuroepitélio do órgão vômeronasal existe um grande número de células indiferenciadas. Alguns neuroblastos presentes no epitélio podem ser diferenciados de precursores de outras células, tais como as células de suporte. Os mesmos autores afirmam que nas expansões distais dos neuroblastos, centríolos e corpos precursores de axonemas também são observados.

2.2 FUNÇÕES DO ÓRGÃO VÔMERONASAL

Segundo Buck (2000) e Hickman, Roberts e Larson (2004) o olfato e o paladar também têm um acesso significativo a circuitos neurais e certas memórias. A quimiorrecepção é a sensação mais antiga e universal do reino animal. As moléculas trazidas pelo ar sinalizam prazer ou perigo e informam sobre alimento e bebida, ou a presença de algo para procurar ou evitar. Também conecta essa percepção com informações sobre o ambiente interno, suas necessidades, e satisfações tais como: fome, sede, sexo e saciedade.

Para Osada, Ichikawa e Costanzo (1995) as células sensoriais do órgão vômeronasal possuem características únicas entre os mamíferos. Estes quimiosensores neuronais continuam sua neurogênese por toda a vida. Os neurônios olfativos localizados no epitélio olfatório ou nasal são responsáveis pela detecção de moléculas de odor, enquanto que os neurônios sensoriais do órgão vômeronasal servem para detectar sinais químicos (SALAZAR et al., 2013). Ambos são bipolares, e possuem um dendrito que se estende até o ambiente externo e um axônio que se estende até o bulbo olfatório. Quando ocorrem lesões desses neurônios, surge a neurogênese e substituição dos mesmos a partir de células precursoras as quais recuperam funcionalmente a via olfativa (BRANN e FIRESTEIN, 2014).

Com o advento das técnicas histológicas no século XIX, a capacidade sensorial do órgão vômeronasal foi demonstrada. Estudos com embriões de cobras evidenciaram sua função quimiorreceptora e demonstraram a semelhança histológica entre os neurônios receptores da mucosa olfatória e os do órgão vômeronasal (DOVING; TROTIER, 1998b).

Segundo Halpern e Martinez-Marcos (2003) desde a década de 1980 é sabido que o OVN está envolvido em respostas quimiosensitivas mediadas por feromônios, ou mesmo por regulação endócrina. Em mamíferos sabe-se que o OVN tem um importante papel no comportamento reprodutivo e sexual (POWERS; WINANS, 1975; WYSOCKI, 1979).

Whitten e Champlin, (1959); Holy, (2003) e Stockhosrt e Pietrowsky (2004), afirmaram que o órgão vômeronasal é estimulado por feromônios, que são substâncias químicas produzidas por um membro de uma espécie que irão gerar respostas em outros membros da mesma espécie. Tais respostas podem ser endócrinas ou comportamentais. Monti-Bloch et al. (1994) cita que em mamíferos, os feromônios estão presentes em secreções de várias origens tais como: pele, esperma, urina e secreções vaginais.

Segundo Romero, Beltramino e Carrer (1990) a remoção do órgão vômeronasal em fêmeas ou mesmo a transecção do nervo olfatório elimina a preferência pelo macho sexualmente ativo. A bulbectomia, com a destruição de um dos componentes do sistema olfatório resulta na diminuição da habilidade desse sistema em detectar odores e reconhecer indivíduos (EDWARDS; PFEIFLE 1990; BAUM e CHERRY, 2014).

Dulac e Torello (2003) afirmam que o órgão vômeronasal está situado na cavidade nasal. Este emite sinais para o bulbo olfatório acessório, que envia as informações para a amígdala e hipotálamo, regiões envolvidas no processamento de emoções e controle neuroendócrino. O sistema olfatório acessório detecta exclusivamente os feromônios, que são captados pelo órgão vômeronasal após contato físico direto com um co-específico. O OVN encontra-se relacionado com áreas do hipotálamo e, por isso, estão relacionados com funções neuroendócrinas e comportamentais (TIRINDELLI et al., 2009).

De acordo com Meredith (1998) o OVN é altamente vascularizado e esta vascularização possui função de bomba, a qual permite o acesso dos estímulos ao lúmen do órgão para serem captados pelo epitélio sensorial. Em hamster, o autor cita que esta bomba funciona por ativação dos nervos simpáticos promovem a contração das paredes dos vasos, em situações especiais que requerem atenção do animal.

Rosa-Prieto et al. (2009) citaram em seus estudos que o órgão vômeronasal é um receptor de estímulos químicos, portador de células sensoriais que sofrem neurogênese durante a vida. Neste órgão as células-tronco adjacentes a lâmina basal se dividem e migram para substituir neurônios sensitivos. Na maioria das vezes, estas células migram localmente ou tornam-se apoptóticas; porém, estas células recém-geradas são bem mais numerosas do que as apoptóticas reconstituindo assim as células sensitivas.

2.3 CÉLULAS-TRONCO ORIUNDAS DAS VIAS OLFATÓRIA E VÔMERONASAL

A via olfatória é tida como uma das mais promissoras fontes para obtenção de células-tronco de origem neural, possuindo características únicas, devido à proximidade e ligação com as áreas mais nobres do sistema nervoso central (SNC), além da possibilidade de serem facilmente obtidas por meio de biópsia pelo acesso facilitado mediante a localização da cavidade nasal (BIANCO et al., 2001, RODRIGUES et al., 2012).

Quando ocorre lesão ou durante a reposição celular fisiológica normal, são gerados novos receptores neuronais olfatórios a partir de células-tronco presentes na camada basal do neuroepitélio olfatório (BRANN e FIRESTEIN, 2014). Este emite prolongamentos de axônios, os quais atravessam o platô criviforme (lâmina crivosa do etimóide) e adentram o bulbo olfatório, realizando sinapses com neurônios de segunda ordem na camada glomerular (SCHWAB, 2002). Este evento constitui uma das raras ocasiões nas quais neurônios periféricos são hábeis a adentrar o ambiente do Sistema Nervoso Central e realizar sinapses. Esta habilidade não usual e é atribuída às propriedades especializadas das células-tronco do neuroepitélio olfatório (DOUCETTE, 1990).

Populações enriquecidas com progenitores neuronais podem ser derivadas a partir de células-tronco embrionárias. Tais progenitores neuronais são capazes de extensivas proliferações *in vitro*, enquanto guardam o potencial para se diferenciar em pelo menos três linhagens neuronais fundamentais do sistema sensorial dos mamíferos (PAGANO et al., 2000).

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

Brann e Firestein (2010, 2014) realizando estudos sobre regeneração de neurônios citam que durante o envelhecimento normal, a capacidade de regeneração e reparação tecidual em tecidos neuronais diminui. No sistema olfatório periférico existem reservatórios de células-tronco que permitem a regeneração entre os neurônios olfatórios e vomeronasais. Mesmo após lesão, um grande número de novos neurônios pode ser regenerado em animais jovens, porém ainda é desconhecida a eventual capacidade de renovação em populações mais velhas.

Mackay-Sim e Kittel (1991) estudando receptores neuronais no neuroepitélio olfatório, afirmaram que nesse epitélio residem conjuntos de células-tronco capazes de dar origem a novos neurônios durante toda a vida, fato que segundo os autores confere a ele a capacidade de neuroregeneração dos receptores olfatórios de neurônios (ORNs) após algum dano ou injúria.

Hind, Hind e Mcnelly (1984) e Mackay-Sim e Kittel (1990) descrevem que as células do neuroepitélio olfatório exercem um papel fundamental para o entendimento dos mecanismos de degeneração e regeneração neuroepitelial, 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 e CARNEIRO, 2004) é menos invasivo se comparado às demais cirurgias para obtenção de células-tronco provenientes do bulbo olfatório (OTHMAN; KLUEBER; ROISEN, 2003; DULAC; ZAKHARY, 2004; SKINNER et al., 2005; RODRIGUES et al., 2012). O procedimento para acesso dessas células periféricas não afetam o olfato (LU e ASHWELL, 2002; MARSHALL et al., 2006). Os tipos celulares, presentes no neuroepitélio olfatório, são células pluripotentes e apresentam contínua capacidade de regeneração e reposição de neurônios (ROISEN et al., 2001; DULAC; ZAKHARY, 2004; SKINNER et al., 2005). Tal regeneração relaciona-se a presença de progenitores neuronais (OTHMAN; KLUEBER; ROISEN, 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).

O neuroepitélio olfatório está diretamente exposto ao ambiente externo estando em contato frequente com impurezas do ar e patógenos. Vincent, West e Chuan (2005) propôs a existência de uma possível atividade anti-bacteriana das células-tronco olfatórias, bem como 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 (VINCENT; WEST; CHUAN, 2005).

Pesquisas realizadas por Nakamura et al. (1998) relacionaram o envelhecimento dos animais 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.

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).

As células-tronco neuronais, de uma maneira geral, são excelentes candidatas para transplantes, conforme relatos de Walton e Wolfe (2008), os quais 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.

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 achatada e um fenótipo fusiforme quando tratadas com forskolina. Em contraste, células-tronco olfatórias de ratos apresentam formato fusiforme na ausência dessa enzima. Estudos *in vitro* suportam a hipótese de que células-tronco olfatórias caninas diferem substancialmente das células-tronco olfatórias de ratos, no atinente aos mecanismos de sinalização e resposta a enzimas (KRUEWIG; DESCHL; WEWETZER, 2006).

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 em ratos.

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).

Estudos focando as células-tronco do neuroepitélio 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) sugeriram que as células-tronco do epitélio olfatório residem no meio das células globais basais. Experimentos realizados por Calof et al. (2002) 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 ideia 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.

Osada, Ichikawa e Costanzo (1995) demonstraram que a distribuição da nestina nesse órgão é semelhante ao de células-tronco, sugerindo que as células positivas para nestina representam as células que são as precursoras neurais. Estes mesmos autores deixam claro que novos estudos devem ser realizados para confirmar esses dados e reafirmam a importância da nestina como provável marcador para estudos de neurogênese.

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 fluorescente verde (GFP), promove uma marcação celular que facilita sua identificação quando transplantada em hospedeiros não-transduzidos. Essa marcação com GFP oferece um modelo útil para análise do potencial terapêutico dos progenitores de epitélio olfatório em doenças degenerativas e neurotraumas (OTHAMN; KLUEBER; ROISEN, 2003).

De acordo com Othman, Kleuber e Roisen (2003), a fluorescência endógena das células do neuroepitélio olfatório, permitida pela ação da proteína fluorescente verde (eGFP), promove uma marcação celular que facilita sua identificação quando transplantada em hospedeiros não-transduzidos. Essa marcação com GFP oferece um modelo útil para análise do potencial terapêutico dos progenitores de epitélio olfatório em doenças degenerativas e neurotraumas.

Estudos acerca da neurogênese, migração e apoptose de células do órgão vômeronasal (Martinez-Marcos et al., 2005), demonstraram que em mamíferos embora as células-tronco basais não formassem camadas de células distintas, como as que ocorrem no epitélio olfatório, elas existiam e estavam distribuídas, não apenas nas margens, mas em todo o epitélio desse órgão. Segundo os mesmos autores, estas células migravam verticalmente para se tornarem totalmente diferenciadas para renovação de outras células.

O órgão vômeronasal é uma das estruturas que contém células-tronco capazes de gerar neurônios funcionais ao longo da vida do animal. A capacidade regenerativa persistente fornece uma esperança para terapias de substituição neuronal no sistema nervoso envelhecido (BARBER; RAISMAN, 1978; ROSA-PRIETO et al., 2009).

De acordo com Barber e Raisman (1978); Brann e Firestein (2014) o neuroepitélio do órgão vômeronasal, ou epitélio sensorial, é constituído por células de sustentação que ocupam toda a espessura epitelial e ainda por células-tronco que realizam neurogênese por toda a vida do animal, diferenciando-se em novos neurônios sensoriais. Rosa-Pietro et al. (2009) citam que quando ocorre degeneração do neuroepitélio estas células-tronco migram e se diferenciam. Após diferenciação seus axônios se prolongam até o bulbo olfatório acessório, o qual está localizado dorsolateralmente ao bulbo olfatório principal.

2.4 CULTIVO DE CÉLULAS DA VIA OLFATÓRIA E ÓRGÃO VÔMERONASAL

Segundo Reyna (2003), o cultivo das células olfatórias, exige meios artificiais preparados mediante a mistura 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. 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.

A facilidade do cultivo *in vitro* das células-tronco olfatórias foi sugerida por Murrell et al. (2009) devido a possibilidade de expansão e grande capacidade de congelamento para estocagem. Este tipo de células mantém a capacidade de auto-replicação e diferenciação durante muitas passagens. Apesar dessa capacidade de diferenciação *in vitro*, células-tronco olfatórias podem também sofrer indução do ambiente da lesão, como demonstraram estudos de lesões crônicas do disco intervertebral (MURRELL et al., 2009).

Células de neuroepitélio olfatório de humanos 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, em relação a sua morfologia e antígenos (AU; ROSKAMS, 2003). Contudo, sua expansão *in vitro* em meio DMEM-F12, sem a adição de fatores de crescimento exógenos, resultou em tipos celulares distintos das células derivadas 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; RODRIGUES et al., 2012).

A análise das células por microscopia óptica (luz e fluorescência) e eletrônica de transmissão revelaram a existência de uma população celular uniforme de células-tronco obtidas a partir do bulbo olfatório de ratos neonatos. Essas células apresentaram em cultivo características de células relativamente imaturas (formato arredondado, núcleos grandes e centralizados e citoplasmas levemente eosinofílicos com poucas organelas distribuídas de modo uniforme). Apesar do padrão observado quanto à morfologia das células, os autores sugeriram análises adicionais de proteínas de superfície, para atestar a pureza da linhagem celular. A descoberta de subpopulações, sugere a necessidade da sua separação em grupos celulares distintos, no caso da sua utilização em transplantes in vivo para regeneração neuronal (AUDISIO et al., 2009).

Zhang et al. (2004) estudando células-tronco do epitélio olfatório do humano, citam que culturas primárias 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 procedimento 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.

Hayden et al. (2004) em estudos de culturas de células de neuroblastos derivadas do epitélio olfatório de ratos demonstraram vários tipos celulares, com grande variedade de morfologia, onde são visualizadas células com características de neurônios bipolares. Em meio de cultura DMEM, essas células tornam-se confluentes em uma ou duas semanas podendo sobreviver por meses.

3 OBJETIVOS

A seguir estão apresentados os objetivos geral e específicos.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia em um modelo de ablação do órgão vômeronasal no ducto incisivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e cultivar células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia testando diferentes meios de cultivo;

Analisar o potencial de atividade celular e proliferação destas células mediante método colorimétrico de MTT e azul de Trypan;

Caracterizar células obtidas do órgão vômeronasal, molecular e funcionalmente;

Analisar o potencial tumorigênico das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia;

Induzir lesão da via vômeronasal de coelhos da Raça Nova Zelândia para avaliar se as células são capazes de migrar para o foco da lesão;

Injetar as células cultivadas e caracterizadas nos coelhos da raça Nova Zelândia submetidos a lesão na via vômeronasal;

Promover a avaliação clínica e hormonal dos animais submetidos a transplante com as células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia.

4 HIPÓTESE

As células derivadas e caracterizadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia possuem potencial terapêutico para serem utilizadas em terapia celular, em coelhos submetidos à lesão da via vomeronasal.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção expõe em tópicos toda a metodologia, bem como, os materiais utilizados para o melhor entendimento do trabalho realizado.

5.1 ANIMAIS

Aproximadamente 8 coelhos machos, adultos (120 dias), com peso variando entre 3-4kg da raça Nova Zelândia oriundos Da Fazenda Angolana, São Roque – São Paulo, Brasil foram utilizados para esta pesquisa. Os animais foram divididos em grupos de 2 animais, sendo: Grupo 1 (tratamento 7 dias), grupo 2 (tratamento 14 dias), grupo 3 (tratamento 21 dias) e grupo 4 (controle – 1 com e 1 sem ablação). Do animal sem ablação foi coletado material para cultivo celular. O Projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) sob o número de protocolo 2337/2011.

Para avaliação macroscópica os animais foram dissecados e realizado corte sagital na cabeça dos coelhos com o intuito de melhorar a visualização e caracterização do órgão vômeronasal.

Para avaliação histológica o material coletado foi fixado em solução de paraformaldeído 4%. Após o tempo mínimo de 24 horas, os fragmentos foram lavados em solução Tampão Salina Fosfato (PBS), desidratados em uma série crescente de etanóis (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 lâminas foram desparafinizados e corados com Hematoxilina e Eosina – HE e Azul de Toluidina (TOLOSA et al., 2003). O material processado e corado foi analisado em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

5.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL DE COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA

A coleta para cultivo celular foi realizada utilizando os animais do grupo controle. Para isto, os coelhos, foram anestesiados com 30mg/kg de cloridrato de cetamina e 2mg/kg de maleato de midazolam por via intramuscular (IM) no centro de cirúrgico do Canil GRMD-BRAZIL, localizado no setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da (FMVZ-USP). Após 15 minutos da aplicação destas drogas, a veia auricular foi canulada com cateter 24G e os animais eutanasiados com overdose de tiopental sódico (50mg/kg).

Com o auxílio de um costótomo, a cabeça dos coelhos foi desarticulada do restante do corpo na altura do atlas. Após excisão da cabeça e remoção de pele e pêlos, uma cuidadosa higienização em água destilada foi realizada para remoção de componentes sanguíneos e de impurezas com potencial. Em seguida, foram realizados cortes na mandíbula de modo a facilitar o acesso e coleta do órgão vômeronasal. O material coletado foi transportado em solução Tampão Salina Fosfato (PBS) e em gelo ao Laboratório de Células-Tronco e Cultivo Celular do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP.

No fluxo laminar, os fragmentos do órgão vômeronasal foram depositados em placa de Petri 40x10mm e lavados por no mínimo cinco vezes com PBS contendo 3% penicilina-estreptomicina (200mg/mL de estreptomicina e 200mg/mL de penicilina-Invitrogen) durante 5 minutos para remoção de possíveis elementos contaminantes.

Após as lavagens, uma dissociação química com 1mL de Tryple Express (Invitrogen) foi realizada durante 5 minutos. Simultaneamente, foi realizada a dissociação mecânica, com auxílio de lâminas bisturi. Em seguida, o material foi incubado em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 15 minutos.

Passado esse período, o material foi submetido a análise microscópica do desprendimento celular em microscópio de luz invertida NIKON Eclipse-TS 100.

Constatada uma grande quantidade de células liberadas dos fragmentos teciduais, a inativação da tripsina foi realizada com a adição de 2mL de soro fetal bovino (SFB-Hyclone). O material foi transferido para um tubo de polipropileno de 15 mL e centrifugado a 1200xg por 5 minutos.

Posteriormente a centrifugação, as células não aderentes foram descartadas com o sobrenadante e o meio de cultivo trocado. Os fragmentos foram ressuspensos em 2mL de meio de cultura e o material transferido para garrafas de 25cm² (TPP, Switzerland) e mantidos em estufa à 37°C contendo 5% de CO₂. Com o objetivo de testar, e assim selecionar a melhor condição de cultivo destas células, três meios de cultivo diferentes foram testados com base na literatura para cultivo de células da via olfatória (PIXLEY, 1996; ROISEN et al., 2001; ALVES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012).

1) MEM Alfa (LGC Biotecnologia) contendo 15% de Soro Fetal Bovino definido (SFB – Hyclone), 1% de L-glutamina, 1% de Penicilina-Estreptomicina, 1% de MEM NEAA e 10⁻⁴M de β-mercaptoetanol.

2) DMEM/F12 (LGC Biotecnologia) contendo 15% de SFB definido (SFB – Hyclone), 1% de L-Glutamina, 1% de Penicilina-Estreptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA- Invitrogen) e 10⁻⁴M de β-mercaptoetanol.

3) DMEM High Glucose (LGC Biotecnologia) contendo 15% de SFB definido, 1% de L-glutamina, 1% de Penicilina-Estreptomicina, 1% de MEM NEAA e 10⁻⁴M de β-mercaptoetanol.

5.3 ANÁLISE DE VIABILIDADE DE CRIOPRESERVAÇÃO

Para testar a viabilidade de criopreservação, as células oriundas do órgão vômeronasal foram submetidas ao processo de congelamento. Com esta finalidade, as células que atingiram confluência de 80%, foram lavadas com PBS, e tripsinizadas com 1mL de tripsina *Tryple Express* (Invitrogen). Após o descolamento celular, a ação da tripsina foi bloqueada pela adição de meio de cultivo contendo SFB. Em seguida, a suspensão celular obtida foi submetida à centrifugação a 1000xg durante 5 minutos, o precipitado celular obtido foi ressuspensionado em meio de congelamento composto por 90% de SFB definido (Hyclone) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO-Invitrogen) e transferidos para criotubos. Os criotubos foram transferidos para o freezer -80°C onde após 24 horas foram transferidos para tanques de nitrogênio líquido, para armazenamento. Após 30 dias, as células foram submetidas ao

processo de descongelamento com o objetivo de testar a sua habilidade para o processo de criopreservação e submetidas à análise de proliferação e viabilidade celular.

Para o descongelamento, as células foram colocadas rapidamente no banho-maria a 37°C e depois de descongelada, a suspensão celular contida nos criotubos foi transferida para tubos de polipropileno de 15mL contendo meio de cultivo suplementado com SFB. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500xg por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado, e as células ressuspensas em meio de cultivo onde foram mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C para aderirem novamente ao plástico.

5.4 ENSAIO DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA

Para avaliar a capacidade de formar colônia das células do órgão vômeronasal de coelhos da Raça Nova Zelândia, realizou-se o ensaio de Unidade Formadora de Colônia (CFU-f). Para isto, 1×10^3 células em 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, e posteriormente foi realizada a lavagem com água destilada e avaliadas a quantidade de colônias celulares presentes na placa.

5.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE E VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL

Estão descritos abaixo a metodologia empregada para mensuração da atividade celular pelo método calorimétrico MTT e de viabilidade celular pelo método de coloração pelo Azul de Trypan.

5.5.1 Método colorimétrico MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, que 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 1.000xg por 10 minutos e solubilizado em DMSO, é quantificado por espectrofotometria a 550nm.

O experimento foi realizado a cada 48 horas durante 12 dias para análise da proliferação celular, nos três meios de cultivo testados, das células do órgão vômeronasal de coelhos a raça Nova Zelândia. Para tanto, aproximadamente 5×10^3 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 cultivo foi removido e as células lavadas com 100µl de PBS/poço e 100µl de solução de MTT (1mL de MTT- 5mg/mL em 10mL meio de cultivo contendo 1% de SFB) foi adicionado. Essa mistura foi incubada por 3 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período, o formazan foi precipitado a 1000rpm durante 10min e posteriormente solubilizado em 50µl de DMSO. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (M-Quant – Bio Tek Instruments, VT, USA) no comprimento de onda de 550nm.

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

5.5.2 Método azul de Trypan

Para análise da viabilidade das células o precipitado celular foi ressuspenso em 1mL de meio DMEM-High Glucose. Em seguida, 50µl da suspensão celular e 50µl de azul de trypan foram adicionados em um tubo de microcentrífuga. Após gentil homogeneização das células com o corante, aproximadamente 10µl foram colocados na Câmara de Neubauer e submetidos a microscópio de luz para realização da contagem de células mortas e células vivas uma vez que, o corante é incorporado nas células mortas que se tornam azuis. Este

procedimento foi repetido a cada 48 horas por um período de 30 dias. A viabilidade celular foi avaliada com o uso da seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{número de células vivas} \times 100}{\text{Total de células contadas (vivas e mortas)}}$$

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

5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL

Para caracterização morfológica as células obtidas foram fotografadas em microscópio de luz invertida (NIKON Eclipse-TS 100) e por microscopia eletrônica de varredura (microscópio eletrônico ME Leo 435 VP). A caracterização celular realizada através para análise da expressão dos marcadores necessários para a caracterização de células-tronco mesenquimais. Essa caracterização foi realizada através das técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo nas células oriundas do órgão vômeronasal *in vitro*.

5.6.1 Análise Fenotípica por Imunocitoquímica

As células oriundas do órgão vômeronasal foram cultivadas em placas de 24 orifícios sob a lamínula de vidro até atingirem a confluência desejada em torno de 70%. Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada em PBS e fixadas em 4% de paraformaldeído durante 15 minutos. Após fixação, as células foram lavadas novamente com tampão de lavagem contendo 20mM de Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, e 0,05% de Tween-20 por 3 vezes de 5 minutos cada.

Posteriormente, as células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Ao final da permeabilização, as células foram lavadas

novamente com tampão de lavagem com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada lavagem e submetidas ao bloqueio em PBS contendo 5 % de soro albumina bovino (BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários (Quadro1), diluídos 1:200 em câmara úmida *overnight* a 4°C. Após o período de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas por três vezes com tampão de lavagem e anticorpos secundários fluorescentes (Anti-Goat, Anti-Mouse e Anti-Rabbit). De acordo com a indicação do fabricante do anticorpo primário, diluídos 1:200 foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com Vectashield com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A imunoreatividade foi avaliada em microscopia de epifluorescência Eclipse 80i e no programa *NIS Elements* version 3.22 (Nikon).

Quadro 1 - Anticorpos primários utilizados para a imunocitoquímica

Anticorpo	Referência	Diluição	Empresa
PCNA	(PC10): sc-56	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
OCT-4	ab19857	1:200	Abcam, USA
NANOG	(C10): sc-30331	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
GFAP	(2E1): sc-33673	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
Vimentina	(O.N.602): sc- 73259	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
Nestin	(Rat-401): sc-33677	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
STRO-1	(STRO-1): sc-47733	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
β -Tubulina	(7B9): sc-47751	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CK-18	(RGE53): sc-32329	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CD73	(C-20): sc-14684	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CD90/Thy-1	MAN0006806	1:200	Molecular Probes, USA
CD105	(H-300): sc-20632	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CD34	(MEC14.7): sc-18917	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CD117	RB-1518-R7	1:200	Thermo Scientific, UK
CD45	(MEM-28): ab8216	1:200	Abcam, USA

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

5.6.2 Análise Fenotípica por Citometria de Fluxo

As células foram analisadas pela técnica de citometria de fluxo utilizando o FACSCalibur (BD) e marcadores de superfície. Para isso, aproximadamente 1×10^5 células/mL foram incubadas com 1mL dos anticorpos primários (Quadro 2) na diluição de 1:200 por 45 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as células foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo secundário fluorescente (Anti-Goat, Anti-Mouse e Anti-Rabbit), de acordo com a indicação do fabricante do anticorpo primário, na diluição de 1:200 por 30 minutos protegidos da luz. Decorrido esse tempo às células foram lavadas e analisadas. 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.

Quadro 2 - Anticorpos primários utilizados para a citometria de fluxo

Anticorpo	Referência	Diluição	Empresa
PCNA	(PC10): sc-56	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
OCT3/4	(C10): sc:5279	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
NANOG	(C10): sc-30331	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
GFAP	(2E1): sc-33673	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
Vimentina	(O.N.602): sc- 73259	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
Nestin	(Rat-401): sc-33677	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
STRO-1	(STRO-1): sc-47733	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
β -Tubulina	(7B9): sc-47751	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CK-18	(RGE53): sc-32329	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CD73	(C-20): sc-14684	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CD90/Thy-1	MAN0006806	1:200	Molecular Probes
CD105	(H-300): sc-20632	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CD34	(MEC14.7): sc-18917	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
CD45	(MEM-28): ab8216	1:200	Abcam, USA

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

5.6.3 Análise molecular das células do órgão vômeronasal por RT-PCR

Primeiramente as células foram submetidas diretamente a extração de RNA utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo 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, 1mL de Trizol foi adicionado e as células foram homogeneizadas nas placas e transferidas para tubos de microcentrifuga, onde foi adicionado 0,5 mL de clorofórmio. Após cuidadosa homogeneização, as células foram centrifugadas a 12000xg durante 15 minutos a 4°C.

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

Posteriormente, o etanol foi removido e o precipitado secou ao ar livre durante aproximadamente 10 minutos. Após secagem o RNA foi ressuspensionado de acordo com o tamanho de seu precipitado em água DEPC. Dessa forma, o RNA obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% 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 a 65°C durante 5 minutos. Após este procedimento, as amostras foram colocadas no gelo e foi adicionado 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 hora e posteriormente 70°C durante 10 minutos. 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, foi misturado 1µL cDNA, 0,2mM de oligonucleotídeos sense e anti-sense que anelam nos genes de interesse (Quadro 3), 0,2mM dNTPs, MgCl₂ 1,5mM, tampão da enzima

e 1U de Taq DNA Polymerase (5U/ μ l) (Fermentas Life Science) e água deionizada para um volume final de 25 μ l. Esta mistura foi colocada em um termociclador e a reação ocorreu nas seguintes condições: 1 ciclo a 94° C por 4min seguindo 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura: 94°C por 1min para denaturação, 56/58/60° C por 1min para anelamento e 72°C por 1min para polimerização e 1 ciclo extra de 10 min a 72° C para a extensão final.

Aproximadamente 10% do produto desta reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídeo para visualização em transiluminador UV. Marcador de peso molecular, *Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder* foi utilizado para confirmar o tamanho esperado dos fragmentos.

Quadro 3 – Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular por RT-PCR

Gene	Sequência	TA	Produto
CD73(SH3)	S- ACA CGG CAT TAG CTG TTA TT AS- AAG TAT TTG TTC TTT GGG CA	56°C	391pb
CD105(SH2)	S- TCT GGA CCA CTG GAG AAT AC AS- GAG GCA TGA AGT GAG ACA AT	56°C	171pb
Vimentina	S- AAG CAG GAG TCC ACT GAG TAC C AS- GAA GGT GAC GAG CCA TTT CC	60°C	204pb
OCT-4	S- GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG AS- CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC	60°C	120pb
Nestin	S- CTC TGA CCT GTC AGA AGA AT AS- GAC GCT GAC ACT TAC AGA AT	60°C	225pb
GAPDH	S- ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC AS-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	60°C	463pb

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

5.6.4 Avaliação funcional adipogênica, osteogênica e condrogênica das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia

Para análise funcional foram realizados os ensaios de diferenciação celular nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica conforme descrito a seguir.

5.6.4.1 Diferenciação adipogênica e osteogênica

Aproximadamente 1×10^5 células/mL (diferenciação em adipócitos e osteócitos) e 5×10^3 células/mL (controle) foram cultivadas em placas de 24 orifícios. A diferenciação foi iniciada 24 horas após o início do cultivo ou quando as células atingiam confluência em torno de 80%. Nesta ocasião, todo o meio de cultura era removido e adicionados 2 mL de meio de indução (adipócitos ou osteócitos) foi adicionado. O meio DMEM High-Glucose (LGC) acrescido de 7,5% SFB (Invitrogen) foi adicionado no controle. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado 2 vezes por semana, por 21 dias e monitoradas por microscopia de luz invertida.

O meio utilizado para a indução da diferenciação em adipócitos foi o DMEM High-Glucose 15%SBF, suplementado com 10µM de dexametasona (Schering-Plough, SP, Brasil), 10µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 100mM de indometacina (Sigma-Aldrich) e para os osteócitos o DMEM High Glucose 7,5% SBF suplementado com 0,1µM de dexametasona, 100µM de ácido ascórbico e 10mM de β glicerolfosfato (Sigma-Aldrich).

Além da microscopia de contraste de fase ao final, as células (controle e teste) foram submetidas a diferentes colorações de acordo com o tecido padrão esperado.

As células diferenciadas em adipócitos foram coradas com a solução de sudan II-escarlate e Oil Red por 2 a 5 minutos, lavadas em álcool 70% e em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris. O material foi montado em glicerina e fotomicrografado.

As células diferenciadas em osteócitos e os seus controles foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente, e após, lavadas em água destilada e coradas com solução de nitrato de prata a 5%, no escuro por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada, expostas a lâmpada de 100W por 60 minutos (coloração Von Kossa) e então, lavadas rapidamente com tiosulfato de sódio a 5%, contra-coradas com hematoxilina de Harris, submetidas ao processo de diafinização e a seguir, montadas em permout.

5.6.4.2 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi realizada utilizando o kit STEMPRO *Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen).

Primeiramente as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e aproximadamente um milhão de células ressuspensas em 2mL de PBS. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200xg durante 10 minutos e ressuspensas em 2mL do meio de diferenciação do kit STEMPRO (*Chondrogenesis Differentiation Kit*-Invitrogen) preparado seguindo as instruções do fabricante.

As células foram novamente centrifugadas a 800xg durante 5 minutos e o botão celular foi colocado cuidadosamente com tampa semi-aberta na estufa. Metade do meio foi trocado duas vezes por semana durante um período de no mínimo 28 dias.

Passado o período de diferenciação as células foram lavadas com PBS e fixadas em formol tamponado a 10% durante 2h. Em seguida, foram diafanizadas em banhos sucessivos de álcool 50, 70, 90%, seguidos de 3 banhos com álcool absoluto com duração de 10 minutos cada. Ao final, a amostra foi submetida a dois banhos de xilol 100% com duração de 5 a 10 minutos, colocada em banho de paraplast líquida a 60°C em estufa seca por 30 minutos e incluídas em paraplast.

Após inclusão, cortes de 5µM foram realizados em micrótomo e colocados sobre lâminas silanizadas durante aproximadamente 12h com o objetivo de escorrer o excesso de paraplast e assim, fixar o corte. Ao final, as amostras foram coradas com Picrosirius e Tricoma de Masson.

5.7 ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS OBTIDAS A PARTIR DO ÓRGÃO VÔMERONASAL

Após o estabelecimento das culturas celulares de células do órgão vômeronasal, foi testada a capacidade de formação de tumores previamente aos protocolos de terapia celular.

Para tanto, aproximadamente 1×10^6 células foram aplicadas pela via intramuscular no membro pélvico esquerdo e na região dorsal em 2 camundongos imunossuprimidos Balb-

cnu/nu, sendo 1 deles injetado com células transduzidas pelo retrovírus GFP, uma vez que as células transduzidas se modificam geneticamente o que poderia levar a indução de alguma formação neoplásica. 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 com o objetivo de remover todos os traços de soro. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensionado em 50µl de solução fisiológica e aplicado nos camundongos com o auxílio de uma seringa de insulina. A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada durante seis semanas a doze semanas com verificação semanal da presença de formação tumoral. Posteriormente, foram eutanasiados em câmara de CO₂ e fragmentos do músculo esquelético, coração, fígado, pulmão e rins foram coletados e submetidos a processamento para análise histopatológica.

5.8 ANÁLISE DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS OBTIDAS A PARTIR DO ÓRGÃO VÔMERONASAL

As células derivadas do órgão vômeronasal foram injetadas em coelhos submetidos à lesão da via vômeronasal com a finalidade de testar o potencial terapêutico das mesmas.

5.8.1 Protocolo de indução da lesão da via vomeronasal do órgão vômeronasal

A indução da lesão foi baseada em um protocolo já testado com sucesso em ratos pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal da Paraíba da Profa. Dra. Káterin Elena Bohórquez Grondona, cujo protocolo encontra-se em depósito de patente sob o número 014090003721.

Para a indução da lesão foram utilizados 8 coelhos. Estes foram contidos quimicamente com 35mg/kg de cloridrato de quetamina e 2mg/kg de maleato de midazolam por via intramuscular (IM). Posteriormente, os animais foram colocados em posição dorsal e o ducto incisivo localizado (Figura 2A).

Com o auxílio de um bisturi elétrico (cauterizador) foi realizada cauterização no ducto incisivo no palato duro da via vômeronasal (Figura2B). Os animais lesionados passaram por avaliação clínica a cada 7 dias, tanto para observação dos resultados da lesão experimental, quanto para avaliação de dor (Figura2C). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram medicados com antiinflamatório não esteroidal meloxicam (0,1mg/Kg/SID), dipirona sódica (25mg/Kg/TID e cloridrato de tramadol (3mg/Kg/TID), de acordo com a necessidade e gravidade de cada caso. As baias dos animais foram acolchoadas com espuma nos primeiros dias pós-cirurgia.

Figura 2 – Fotomacrografia da ablação do ducto incisivo

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Em A notar presença do ducto (seta). Em B, cauterização do ducto através do eletrocautério. Em C, lesão pós ablação. Em D, esquema demonstrando a localização do Órgão Vômeronasal (OVN), Bulbo Olfatório principal (BO) e Ducto Incisivo (seta).

5.8.2 Transplante celular

Passados 7, 14 e 21 dias após a indução da lesão, os animais foram submetidos ao tratamento com as células obtidas a partir do órgão vômeronasal e previamente caracterizadas, como já descrito anteriormente. Para tanto, 1×10^6 células transduzidas com retrovírus eGFP (Figura 3A) foram transplantadas diretamente no ducto incisivo, direto no foco da lesão. Os animais controle receberam solução fisiológica 0,9% como placebo (Figura 3B). Para transfecção das células, uma alíquota de cada extrato viral, produzidos a partir da célula HEK 293T foram descongelados. O meio de cultivo das placas com as células derivadas do órgão vômeronasal foi descartado e adicionado o extrato viral acrescido de 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. A análise da expressão do gene exógeno GFP foi realizada mediante a exposição das células em cultivo com um feixe de luz polarizada. Após transfecção, as células foram novamente testadas por imunocitoquímica para avaliar se ocorreria modificação quanto a expressão dos marcadores avaliados.

Figura 3 – Terapia celular nos animais submetidos a lesão no ducto incisivo

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Em A, células transduzidas com retrovirus GFP. Em B, transplante das células transduzidas diretamente no foco da lesão, o ducto incisivo.

5.8.3 Avaliação do Tratamento

A avaliação do tratamento foi realizada através do monitoramento clínico do animal, a cada 7 dias, e através da avaliação histológica *pos mortem*, onde o órgão vômeronasal foi removido e submetido ao protocolo de rotina histológica e imunofluorescência após 30 dias da injeção das células.

5.8.3.1 Avaliação Clínica

Exames clínicos foram realizados periodicamente, a cada 7 dias para visualização de possíveis alterações comportamentais (adaptado de PUNTA et al., 2002). Os animais lesionados e posteriormente tratados foram submetidos a avaliação comportamental através da presença de fêmeas em estro e através de exposição destes animais a grupos sociais para observação comportamental, sendo avaliados parâmetros tais como: vocalização e agressividade como: morder uns aos outros, vocalização e ataque com patadas.

5.8.3.2 Análise Hormonal

Decorridos 30 dias após o tratamento, os coelhos foram anestesiados com tiopental sódico (Cristália®) na dose de 10mg/Kg, via intraperitoneal e, após anestesia profunda, foi coletado sangue diretamente do coração de cada animal. O sangue foi centrifugado a 300xg por 10 minutos para separação do soro da porção sólida do sangue. O soro foi colocado em tubos *Eppendorf* devidamente identificados e congelado a -20°C para posteriores avaliações das concentrações de androstenediona e testosterona. As dosagens da androstenediona e testosterona foram realizadas por meio da técnica de radioimunoensaio utilizando *kits* comerciais (Count-ACount da Siemens Medical Solutions Diagnostics.), em triplicata.

Inicialmente foi realizado teste de normalidade e homocedasticidade para avaliar se as variáveis são paramétricas. Todos os dados obtidos são apresentados como média $\pm$ erro

padrão da média (EPM) e foram analisados através de Teste t de Student. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Foi realizado teste de correlação linear simples entre a concentração sérica de testosterona e horário da coleta.

5.8.3.3 Imunofluorescência

Para a imunofluorescência foram utilizadas amostras congeladas do OVN. Estas foram cortadas em criostato (Leica) com aproximadamente $5\mu\text{m}$ e em seguida afixadas em lâminas silanizadas. As amostras foram fixadas com acetona a 100% por 20 minutos e em seguida lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada. Posteriormente, o anticorpo primário eGFP (ab290-abcam®) na diluição de 1:200 foi adicionado sobre os cortes que foram acondicionados em câmara úmida *overnight* na geladeira à 4°C . Após esse tempo foram lavados com PBS por 3 vezes 5 minutos cada e o anticorpo secundário fluorescente anti-rabbit IgG-NL557 (NorthernLights™ - R&d-Systems, Minneapolis, USA) na diluição de 1:200 foi adicionado aos cortes que foram mantidos em câmara escura por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS por 5 vezes 5 minutos cada e montadas em Vectashield com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). As lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados através de Teste t de Student. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Também foi realizado teste de normalidade e homocedasticidade para avaliar se as variáveis eram paramétricas.

6 RESULTADOS

A seguir estão apresentados os resultados contendo a caracterização do órgão vômeronasal, isolamento e cultivo das células derivadas deste órgão, bem como, a caracterização dessas células e o ensaio de terapia celular utilizado na ablação da via vômeronasal.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓRGÃO VÔMERONASAL

O órgão vômeronasal (OVN) foi observado nos coelhos como uma estrutura par, formada por divertículos tubulares cegos, e localizados na base do septo nasal (Figura 4A). Recoberto por uma cápsula cartilaginosa e uma fina cápsula óssea (Figura 4B). Comunicava-se rostralmente com o ducto incisivo localizado na papila incisiva e, se estendia por toda a cavidade nasal até o bulbo olfatório (Figura 4C). O OVN era bem vascularizado com presença de inúmeros vasos sanguíneos.

Figura 4 – Órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Em A fotomacrografia da cabeça em corte transversal em vista rostrocaudal, notar o septo nasal (S), dentes (D), vestibulo oral (V) e órgão vômeronasal (halos). Em B esquema representativo da localização do órgão vômeronasal (setas). Em C fotomacrografia da cabeça em corte sagital mediano após retirada do septo nasal e cápsula cartilaginosa do órgão vômeronasal (halo) que se estende da papila incisiva (seta) até o bulbo olfatório (BO). Notar disposição topográfica do órgão localizado na

cavidade nasal delimitada dorsalmente pelo osso nasal (ON) e ventralmente pelo processo palatino da maxila e palato duro (PD).

Histologicamente foi notado que o OVN estava envolto por uma cápsula de cartilagem hialina, denominada cartilagem vômeronasal, a qual era protegida por uma delgada cápsula óssea (Figura 5A). Entre a porção tubular e a cápsula cartilaginosa observou-se lâmina própria formada por tecido conjuntivo frouxo. No lúmen do OVN foram observados dois tipos epiteliais distintos, sendo eles: o epitélio sensitivo e o epitélio respiratório. O epitélio sensitivo ou neurosensorial era formado por células de suporte, células basais e células sensoriais (neurônios bipolares). O epitélio respiratório era do tipo colunar pseudoestratificado ciliado com células caliciformes.

Foram observadas na região do OVN glândulas túbulo-acinosas com características de glândulas produtoras de muco situadas na porção não tubular. Além disso, foram notados inúmeros vasos sanguíneos subjacentes ao epitélio sensorial em sua porção lateral (Figura 5B).

Figura 5 – Fotomicrografia do órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Em (A) notar o órgão vômeronasal (OVN) bilateralmente na base do septo nasal (SN) que divide a cavidade nasal (CN). Em B detalhe das estruturas do órgão vômeronasal, lúmen (Lu), epitélio respiratório (ER) e epitélio sensitivo (ES) apoiados em uma lâmina própria (Lp), glândulas tubuloacinosas (Gl) e os vasos sanguíneos (Vs). Podem ser visualizadas a cápsula óssea (CO) e cartilaginosa (CC) que envolvem o órgão vômeronasal. A-Hematoxilina-Esoina e B-Azul de Toluidina.

6.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL

Na primeira avaliação, realizada vinte quatro horas após o início do cultivo, não foi notada presença de material contaminante tais como: bactérias, fungos ou leveduras. Foram observadas células de formato arredondado e brilhante contendo demonstrando uma heterogeneidade da cultura que eram removidas a cada troca de meio de cultivo. Também não foi verificado início de adesão celular no plástico. Sucessivas análises foram realizadas, e, após 7 dias de cultivo observou-se início de adesão de células a placa utilizando os três meios de cultivo (Figura 6 - A1, A2 e A3). Notou-se a presença de pequenas colônias de células aderidas após 10 dias de incubação (Figura 6 - B1, B2 e B3). Os fragmentos evidenciaram liberação de células observadas ao redor do mesmo, em todos os pontos da garrafa, onde estes se encontravam aderidos, bem evidenciados aos 13 dias de cultivo (Figura 6 - C1, C2 e C3). Aos 20 dias de cultivo, foram observadas células apresentando múltiplas morfologias nas quais se destacavam células de formato arredondado, células com formato estrelado e inúmeras células de formato fibroblastóide, prevalecendo, a homogeneidade das colônias, a qual em sua maioria, era composta por células de característica morfológica fibroblastóide, subdividindo-se entre células de maior e menor volume (Figura 6 - D1, D2 e D3).

À medida que o cultivo celular era continuado, aos 25 dias de cultivo, foi observada a predominância de um tipo celular específico, composto por células de menor volume e de formato fibroblastóide. Após 25 dias de cultivo, as células atingiram confluência em toda a placa, sendo realizada a primeira passagem das células.

Na análise por microscopia eletrônica de varredura, observou-se que estas células estavam bem aderidas ao plástico, estando distribuídas de forma homogenia em toda a placa (Figura 7A). Possuíam formato fibroblastóide (Figura 7B) e emitiam prolongamentos que garantiam a ligação intercelular entre as mesmas (Figura 7C). Foram observadas ainda células com mais de um núcleo, demonstrando uma possível divisão celular (Figura 7D).

Figura 6 – Fotomicrografia da cultura primária de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Em A cultura após 7 dias de cultivo nos meios Alfa-MEM, DMEM-F12 e High-Glicose, respectivamente (A1, A2 e A3), notar início de adesão de células mais evidentes no meio High-Glicose (A3). Em B cultura após 10 dias notar células em maior confluência nos três meios de cultivo. Em C, células sendo soltas pelo explante já em fase de expansão na placa de cultivo, após 13 dias. Em D, notar confluência da placa nos três meios de cultivo após 20 dias, porém mais evidente no meio High-glicose. Tam 4x.

Figura 7 – Fotomicrografia eletrônica de varredura das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014)

Legenda: Em A, notar confluência na garrafa após 25 dias de cultivo com distribuição uniforme. Em B, observa-se célula com formato fibroblastóide (seta). Em C, notar prolongamentos entre as células, demonstrando a interligação celular entre as mesmas. Em D, notar o núcleo da célula em divisão.

6.3 UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (CFU)

Na primeira análise no dia 1, decorridas 24 horas da incubação, as células não demonstraram estarem aderidas ao fundo da placa. Na segunda análise dia 3, as células já se encontravam aderidas e, no dia 6, notava-se que as células apresentavam uma tendência a formação de colônia onde as mesmas apresentavam-se em um grande número organizando-se de forma radial em fileiras que se fundiam para formar a monocamada confluyente formada

por células de múltiplas morfologias, como as observadas no início do cultivo celular. A análise microscópica no 14^o dia evidenciou a presença de colônias (Figura 8).

Figura 8 – Ensaio da formação de colônias das células derivadas do órgão vômeronasal

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Em A, fotomacrografia da placa de Petri evidenciando a presença de colônias de células (halos), após fixação com paraformaldeído 4% e coloração com cristal violeta. Em B, fotomicrografia do agrupamento celular das colônias das células fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com cristal violeta. Aumento de 10x

6.4 ENSAIO DE ATIVIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT

Foi verificado que as células cultivadas em meio DMEM High Glucose apresentaram crescimento contínuo e progressivo da atividade celular, não apresentando fase de platô ou diminuição durante o tempo de avaliação de 12 dias. No meio de cultivo DMEM/F12 as células diminuíram sua atividade até a terceira leitura, voltando a crescer durante as últimas. Contudo, não evidenciaram diferenças significativas, na atividade celular, entre uma passagem e outra. No meio de cultivo MEM Alfa, as células cresceram entre a primeira e segunda leitura, passando por uma fase de queda entre a segunda e terceira leituras e voltando a aumentar sua atividade progressivamente a partir destas (Figura 9).

Figura 9 – Gráfico da análise da atividade celular das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Notar crescimento exponencial das células cultivadas em meio DMEM High Glucose e diferença significativa de crescimento entre este e o DMEM/F12 e MEM Alfa.

6.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE PELO MÉTODO AZUL DE TRYPAN

Foi verificado que o número de células vivas aumentava com o passar do tempo, enquanto que o de células mortas diminuía. Este resultado soma-se aos dados obtidos nos experimentos de atividade celular pelo método colorimétrico MTT com o meio de cultivo DMEM High Glucose. Foi possível verificar um crescimento exponencial dessas células durante o tempo de observação (Figura 10).

Figura 10 – Gráfico da análise da viabilidade celular das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia.

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Notar crescimento exponencial das células cultivadas em meio DMEM High Glucose

6.6 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA POR IMUNOCITOQUÍMICA

Na análise imunofenotípica foi observado o perfil de expressão para alguns marcadores sendo observada expressão positiva para as proteínas PCNA, OCT-4, Nanog, GFAP, Vimentina, Nestin, Stro-1, β -Tubulina, CK-18, CD73, CD90 e CD105 e negativa para CD34, CD117 e CD45 (Figura 11). O resultado encontra-se dentro do esperado para classificação de células mesenquimais, demonstrando que através da caracterização por imunocitoquímica as células podem ser consideradas células estromais.

Figura 11 – Análise das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia por Imunocitoquímica

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014)

Legenda: Notar positividade para a proteínas PCNA, OCT-4, Nanog, GFAP, Vimentina, Nestin, Stro-1, B-Tubulina, CK-18, CD73, CD90 e CD105 e reações negativas para CD34, CD117 e CD45.

6.7 ANÁLISE FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células isoladas do órgão vômeronasal foram caracterizadas na citometria de fluxo, sendo observada expressão positiva para os marcadores PCNA, OCT-3/4, Nanog, GFAP, Vimentina, Nestin, Stro-1, β -Tubulina, CK-18, CD73, CD90 e CD105 e negativa para os marcadores CD34, e CD45 (Figura 12).

Figura 12 – Análise das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia por citometria de fluxo

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Observar marcação positiva para PCNA, OCT-3/4, Nanog, GFAP, Vimentina, Nestin, Stro-1, B-Tubulina, CK-18, CD73, CD90 e CD105 e negativa para CD34, e CD45

6.8 ANÁLISE MOLECULAR DAS CÉLULAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL POR RT-PCR

O cDNA foi obtido a partir do mRNA como fita molde e os oligonucleotídeos utilizados anelam nos genes CD73, CD105, Vimentina, Oct4, Nestina e GAPDH (Figura 13).

Foi possível observar a expressão dos marcadores de células-tronco CD73, CD105, Oct-4 e Nestina. Conferiu-se uma amplificação de 391, 171, 120 e 225 pares de base, respectivamente. Este resultado 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 204pb e a expressão de GAPDH 463pb, enzima envolvida no metabolismo da glicose expressa em todas as células eucaróticas como esperado.

Figura 13 – Análise das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos Nova Zelândia por RT-PCR

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Notar o anelamento nos genes CD73, CD105, Vimentina, Oct4, Nestina e GAPDH com 300, 210, 120, 225, 204 e 463 pares de base, respectivamente.

6.9 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL DE COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA

As células derivadas do órgão vômeronasal foram induzidas a avaliação funcional por meio da indução de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica.

Na diferenciação adipogênica observou-se que após 21 dias de indução as células estavam diferenciadas em adipócitos com presença de vacúolos em seu citoplasma semelhantes a vacúolos de gordura ou lipídios coradas em vermelho (Figura 14A).

A diferenciação osteogênica foi mantida por 21 dias e após este período foi observado à formação de matriz extracelular. As células progenitoras inicialmente continham morfologia fibroblastoide e após a indução com o meio de diferenciação osteogênico, as células adquiriram morfologia poligonal, com grande citoplasma repleto de vacúolos citoplasmáticos. A matrix extracelular com possível deposição de cálcio foi intensamente corada pela técnica de Von Kossa (Figura 14B).

As células induzidas a diferenciação condrogênica formaram uma micromassa celular no cultivo em suspensão após 21 dias de cultivo em meio de indução à diferenciação. Quando processada por técnicas de histologia convencional observou-se a presença de áreas entrepostas semelhantes a lacunas condrocitárias e grande quantidade de fibras colágenas, comprovadas pelas colorações de Tricomio de Masson, onde as fibras encontram-se coradas em azul, e coloração de Picrosiruis onde as fibras encontram-se coradas em vermelho. As áreas de colágeno foram mensuradas através do programa Image J, onde foi notada uma área de 41% (Figura 14C).

Figura 14 – Análise funcional do pull de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Em A1 diferenciação adipogênica corada com Oil Red e A2 corada com Sudam Escarlata, notar a deposição de gotículas lipídicas (setas). Em (B), diferenciação osteogênica corada com Won Kossa, observar deposição de cálcio corados em preto em B1 e B2 (setas). Em C1 diferenciação condrogênica corados por Tricômio de Masson e C2 Picro Sirus, notar deposição de fibras colágenas (setas). Na margem superior direita imagem do controle A2, B2 e C2.

6.10 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL DE COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS BALB-CNU/NU

Nas análises semanais, para avaliar presença ou ausência de formação tumoral/neoplásica nos camundongos BALB-CNU/NU após transplante de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia, não foram observadas formações e nenhum crescimento tecidual durante 60 dias. Depois de decorrido este período não foi notado formação metastática e tumoral no músculo esquelético, coração, fígado, pulmão e rins (Figura 15).

Figura 15 – Camundongo BALB-CNU/NU após injeção de células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Em A indicação do local de aplicação das células do OVN, notar que não ocorreram formações tumorais (Setas). Em B, C, D, E e F, fotomicrografia do músculo esquelético, coração, fígado, pulmão e rins, respectivamente. Notar que não houve alteração na morfologia destas estruturas histologicamente.

6.11 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO

A seguir são apresentados os resultados da avaliação do tratamento realizado após ablação do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia. Os resultados são referentes ao comportamento social, análise hormonal e expressão das células marcadas pelo eGFP.

6.11.1 Comportamento social – Análise Clínica

Na observação do comportamento social dos coelhos foi observado que no grupo tratado após 7 dias não ocorreram alterações comportamentais. Nos animais tratados após 14 dias de lesão observou-se que quando colocados em grupo os mesmos apresentavam sinais de agressividade tais como: mordidas, vocalizando e patadas, o que provocava briga entre os mesmos quando colocados no mesmo ambiente. Outra alteração observada foi que os machos tentavam montar uns nos outros e urinavam. Na presença da fêmea em cio, o grupo tratado com 7 dias apresentou comportamento dócil e tentou montar na mesma. Os grupos tratados após 14 e 21 dias apresentavam-se agressivos e os mesmos brigavam entre si e tentavam montar e morder a fêmea. Os animais do grupo de 14 e 21 dias também apresentavam comportamento de inquietação e agressividade durante o manejo diário.

6.11.2 Análise hormonal

Na análise hormonal observou-se que houve uma diminuição gradativa dos níveis de testosterona e androstenediona nos animais tratados quando comparados ao grupo controle sem ablação. Pôde-se notar que nos animais tratados após 7 e 14 dias não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e controles. No grupo após 21 dias notou-se uma diferença de 50% nos níveis hormonais para mais no grupo tratado em relação ao grupo controle (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Concentrações séricas de testosterona (ng/mL) em coelhos da raça Nova Zelândia, com 120 dias obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média $\pm$ erro padrão médio)

Animais	Média	Amplitude
Adultos controle normal	3,899 $\pm$ 0,153A	3,24-4,98
7d	3,783 $\pm$ 0,189 ^a	3,12-4,35
7d não tratado	3,370 $\pm$ 0,177 ^a	3,0-4,27
14d	1,83 $\pm$ 0,2b	0,81-3,6
14d não tratado	1,68 $\pm$ 0,2b	0,65-2,5
21d	0,579 $\pm$ 0,90a	0,09-0,87
21d não tratado	0,248 $\pm$ 0,087b	0,02-0,79

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Tabela 2. Concentrações séricas de androstenediona (ng/mL) em coelhos da raça Nova Zelândia, com 120 dias obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média $\pm$ erro padrão médio)

Animais	Média	Amplitude
Adultos controle normal	0,09 $\pm$ 0,02A	0,016-0,19
7d	0,12 $\pm$ 0,02A	0,03-0,50
7d não tratado	0,10 $\pm$ 0,02A	0,03-0,40
14d	0,16 $\pm$ 0,03 a	0,03-0,30
14d não tratado	0,14 $\pm$ 0,03 a	0,03-0,30
21d	0,30 $\pm$ 0,10a	0,002-0,76
21d não tratado	0,05 $\pm$ 0,02A	0,03-0,30

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

6.11.3 Análise da expressão do eGFP

Na análise da expressão para eGFP observou-se que nos animais tratados após 7 dias as células injetadas estavam presentes em grande quantidade formando aglomerados celulares na região subjacente ao epitélio sensitivo, bem como, foram observadas células ao longo de

todo seu epitélio (Figura 16A). Nos animais tratados com 14 dias as células continuavam a circundar o epitélio neurosensorial, e ainda o epitélio respiratório, estando menos distribuídas quando comparadas aos animais de 7 dias (Figura 16B). Quando observado grupo tratado após 21 dias observou-se diminuição da expressão de células positivas, que estavam localizadas apenas na região subjacente ao epitélio neurosensorial com menor marcação (Figura 16C). Nos animais do grupo controle não foi observada fluorescência positiva (Figura 16D).

Figura 15 – Análise da expressão das células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da Raça Nova Zelândia transduzidas com retrovírus eGFP

Fonte: (RODRIGUES M. N., 2014).

Legenda: Em A paciente tratado após 7 dias de lesão e avaliado após 30 dias. Notar um alto nível de expressão de células na região do epitélio sensitivo e epitélio respiratório mais marcante (setas) e ainda na lâmina própria. Em B paciente tratado após 14 dias de lesão, notar diminuição da expressão de células no epitélio sensitivo e respiratório (setas) e na lâmina própria quando comparado ao primeiro grupo (A). Em C paciente tratado após 21 dias de lesão, foi visualizada pouca expressão de células limitando-se mais ao epitélio sensitivo (setas). Em D animal controle, onde não são observadas células positivas.

7 DISCUSSÃO

É conhecido que a maior parte das espécies de vertebrados tem um órgão situado na cavidade nasal denominado órgão vômeronasal cuja finalidade está relacionada à captação de ferormônios envolvidos no comportamento sexual e reprodutivo. Os ferormônios distinguem-se dos hormônios, porque estes são liberados internamente e exercem influência sobre o metabolismo do indivíduo, enquanto que os ferormônios são liberados externamente, com atividade sobre indivíduos da mesma espécie.

7.1 CÉLULAS DERIVADAS DO ÓRGÃO VÔMERONASAL

A escolha de meios de cultivo adequados, substâncias e suplementos são um fator determinante para o sucesso do cultivo de células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A principal dificuldade para o estabelecimento das linhagens celulares é obter meios nutritivos adequados, que sejam capazes de reproduzir o meio “natural” tais como: extratos embrionários, hidrolizados de proteínas e soros (FRESHNEY, 2006).

Para a obtenção das células do órgão vômeronasal foram testados três tipos de meio de cultivo, onde os melhores resultados foram obtidos quando utilizamos DMEM High Glucose suplementado com 15% SFB-hyclone, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de L-glutamina e 1 % de antibiótico, contrariamente ao descrito por outros autores que cultivaram células da via olfatória com meio de cultivo DMEM/F12 onde observaram um maior crescimento das células desta via no referido meio (ROISEN et al., 2001; KRUDEWING; DESCHL, WEWETZER, 2006; ZHANG et al., 2006; ALVES et al., 2010; WETZIG; MACKAY-SIM; WAYNE MURREL, 2011; RODRIGUES, 2012). Vale salientar que a composição química dos meios testados foi avaliada e constituintes como: aminoácidos, sais orgânicos e vitaminas são praticamente os mesmos. Contudo, pode-se observar que o meio High Glucose a concentração de aminoácidos é um pouco superior ao dos outros meios, bem como tem na sua composição uma alta concentração de glicose o que pode aumentar o metabolismo celular e assim melhorar a atividade das células, explicando os melhores resultados obtidos quando utilizado este meio de cultivo.

No cultivo de células do órgão vômeronasal com DMEM High Glucose, observou-se que as células foram capazes de aderir ao plástico, possuíam formato predominantemente fibroblastóide e formavam colônias de forma semelhante ao encontrado por Friedenstein, Gorskaja e Kulagina (1976), Murrell et al. (2009) Rodrigues et al. (2012) e Wetzig, Mackay-Sim e Wayne Murrell (2011) em cultivo de células derivadas do epitélio olfatório de ratos e Alves et al. (2010) em cultivo de células derivadas do epitélio olfatório de cães. Quando utilizado o DMEM/F12 e o MEM Alfa, as células apresentaram células com múltiplas morfologias, sendo elas semelhantes às células epiteliais e fibroblastos. Além disso, tornavam-se mais espalhadas no decorrer das passagens.

Javazon, Beggs e Flake (2004) e Nardi e Meirelles (2006) relataram que a capacidade de células formarem colônias é um indicativo que estas possuem uma capacidade proliferativa mais elevada, contudo a quantificação das colônias observadas é devido a grande heterogeneidade relacionada ao potencial de diferenciação observada entre as diferentes espécies e entre diferentes condições de cultivo. Nossos resultados são referentes a quantificação de mais de 50 colônias formadas. Este fato demonstra a capacidade de diferenciação das células derivadas do órgão vômeronasal, semelhante ao encontrado pelos autores supracitados.

De acordo com Olsson et al., (2009), o maior desafio da manipulação celular é a preservação das características funcionais e a manutenção da viabilidade das células. Muitos problemas podem estar relacionados ao processo de isolamento celular, reduzindo assim as taxas de rendimento, bem como a viabilidade das células mononucleares. Os testes de atividade celular e viabilidade, MTT e Azul de Trypan, demonstraram que as células derivadas do OVN foram capazes de proliferar e manter sua integridade celular, pois se a integridade da membrana celular tivesse sido rompida, em um processo de morte celular como exemplo, a viabilidade destas células estaria comprometida alterando os resultados observados (BACSÓ, EVERSON; ELIASON, 2000). Esses métodos de determinação do rendimento e viabilidade celular precisam ser os mais confiáveis possíveis, a fim de refletirem o estado de integridade da membrana, uma vez que o sucesso de um transplante celular depende dessa integridade. Por outro lado, as células devem colonizar a área afetada de uma determinada lesão, interagindo com as demais células do hospedeiro e recuperando o tecido lesado (CURY, 2005).

Para caracterizar as células do OVN, foram realizados ensaios de imunocitoquímica, citometria de fluxo e RT-PCR, além de serem realizados ensaios funcionais para

diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica. A International Society for Cellular Therapy, preconiza que uma célula derivada de algum tecido para que seja considerada célula-tronco necessita ter a propriedade de aderência ao plástico sob condições de cultura padrão, expresse os marcadores de superfície CD29, CD73, CD90 e CD105; e não expresse os marcadores de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, e HLA-DR. Além disso, ela deve ser capaz de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006; KEATING, 2006).

Observou-se marcação positiva na imunocitoquímica para as proteínas PCNA, OCT-4, Nanog, GFAP, Vimentina, Nestin, Stro-1, B-Tubulina, CK-18, CD73, CD90 e CD105 e negativa para CD34, CD117 e CD45. Na análise por citometria de fluxo, o resultado obtido foi semelhante sendo observada marcação positiva para PCNA, OCT-3/4, Nanog, GFAP, Vimentina, Nestin, Stro-1, B-Tubulina, CK-18, CD73, CD90 e CD105 e negativa para CD34, e CD45. Na análise por RT-PCR observou-se expressão para os genes CD73, CD105, Vimentina, Nestin e GAPDH. Tais resultados estão de acordo com o preconizado pela International Society for Cellular Therapy e indicam que as condições de isolamento e cultura empregadas foram adequadas para a caracterização das células do OVN. Outro fator importante relacionado a marcação dessas proteínas está relacionado ao fato de serem expressas positivamente para marcadores de pluripotência como o OCT-4, de células gliais como o GFAP, precursores neuronais como o Nestin e ainda para células mesenquimais estromais como o CD 73, 90 e 105 o que demonstra a heterogeneidade das células obtidas no cultivo.

Segundo Schwindt, Barnabé e Mello (2005), as células-tronco são células indiferenciadas capazes de se diferenciar originando progenitores maduros e células efetoras completamente diferenciadas. Células indiferenciadas são utilizadas para a diferenciação utilizando os meios de cultura específicos enriquecidos com agentes indutores, por um determinado período de tempo (7 a 21 dias) (PITTENGER et al., 1999). Inúmeros protocolos têm sido empregados a fim de se obter a diferenciação de células-tronco dos mais diversos tecidos, para outros tipos celulares, como forma de se verificar sua multipotencialidade e a capacidade de diferenciação (JAISWAL et al., 2000; CHENG et al., 2003; HWANG et al., 2003; WETZIG; MACKAY-SIM; WAYNE MURREL, 2011).

Nos ensaios de diferenciação, observou-se que as células do OVN foram capazes de se diferenciar nas linhagens, adipogênica, osteogênica e condrogênica, semelhante ao relatado por Rodrigues et al. (2012), Alves et al. (2010) e Wetzig, Mackay-Sim e Wayne Murrel

(2011) em cultivo de células da mucosa olfatória. Pountos e Giannoudis (2005) afirmam que as células-tronco mesenquimais exibem ampla capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares, bem como a aptidão para dar origem e regenerar diversos tipos de tecidos, incluindo ossos, cartilagem, tecido adiposo, tendões e músculos, semelhante ao que ocorreu nas células derivadas do OVN.

Antes da injeção celular nos animais propostos, testes de imunoenaios foram realizados com animais congenitamente imunodeficientes (BALB-CNU/NU). Estes são importantes ferramentas para verificar o potencial tumorigênico de células. Santos (2002) cita que os camundongos BALB-CNU/NU são importantes modelos animais para inúmeras doenças, disfunções ou malformações. De acordo com Kelland (2004), o camundongo Balb-cnu/nu vem sendo empregado em estudos de crescimento de tumor humano, sendo imprescindíveis nas etapas iniciais de estudos pré-clínicos para desenvolvimento de fármacos antitumorais. Furukawa (2003), por sua vez, cita ainda a grande aplicabilidade deste camundongo no estudo de doenças autoimunes.

Após transplante nos camundongos BALB-CNU/NU, as células derivadas do OVN não induziram a formação de taratomas após 60 dias, fato que indica a viabilidade destas células para utilização em transplantes. Associado a isto, considerou-se que estas células imunologicamente inertes, pois não ocorreu formação de teratomas quando injetadas células transduzidas com retrovírus eGFP, uma vez que, existe a preocupação que a eGFP pode desencadear uma resposta imune no hospedeiro. Um exemplo disso, é a eliminação das células T mediada pelos linfócitos geneticamente modificados após transfecção pelo eGFP, que expressam uma proteína de fusão higromicina-timidina quinase, que tem sido observada após transplante de células (RIDDELL et al., 1996).

As células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia podem ser consideradas células-tronco mesenquimais, pois apresentam característica de aderência ao plástico, expressaram as proteínas recomendadas nos ensaios de imunocitoquímica, citometria de fluxo e RT-PCR. Apresentaram-se funcionalmente potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, e não induziram a formação de teratomas quanto realizado transplantes em camundongos imunosuprimidos BALB-CNU/NU.

7.2 COMPORTAMENTO SOCIAL E ANÁLISE HORMONAL

Na análise comportamental dos coelhos submetidos à ablação do ducto incisivo, observou-se que, após decorridos 7 dias de lesão, os animais apresentavam comportamento dócil, enquanto que os animais com 14 e 21 dias mostravam-se agressivos e inquietos. É conhecido que a destruição da via vômeronasal através da cauterização do ducto incisivo pode impedir a percepção de odores pelo OVN, e, conseqüente falta de estímulo do bulbo olfatório acessório e suas conexões com o sistema límbico (Grondona, 2012), uma vez que estas estruturas são responsáveis com respostas comportamentais (TIRINDELLI et al., 2009). Essa interrupção da percepção de odor, pode ter ocorrido nos animais do grupo de 7 dias, o que explica o comportamento dócil deste grupo. A seu turno, Punta et al. (2002) relatam que a remoção completa da função do órgão vômeronasal promove déficits nas respostas sociais e comportamentais caracterizadas pela intensa vocalização na presença da fêmea e agressão entre machos, como as observadas nos animais de 14 e 21 dias pós-tratamento. Barrios et al. (2014) relata em seus estudos que o não reconhecimento dos feromônios entre indivíduos está relacionado a ablação ou destruição da via vomeronasal que, segundo o autor é responsável pela discriminação sexual. Outros estudos também relatam que a destruição da via vomeronasal interfere no reconhecimento entre indivíduos, principalmente relacionada ao reconhecimento do odor de urina e fêmea no estro, como o observado nos animais avaliados em nosso estudo (Martinez-Ricos et al., 2007; Roberts et al., 2012).

É importante ressaltar que, atualmente são descritos na literatura outros pontos de detecção de feromônios, os quais podem estar relacionados diretamente a via olfatória (TIRINDELLI et al., 2009, BARRIOS et al., 2014). O órgão vômeronasal é uma importante estrutura que compõe a via olfatória, contudo vários subsistemas olfatórios estão presentes na cavidade nasal de mamíferos, tais como: o epitélio olfatório principal, o gânglio de Grueneberg e o órgão septal de Maser. Todo esse agregado anatômico vem sendo estudado de forma a explicar o significado funcional em mamíferos (MUNGER et al., 2010; TIRINDELLI et al., 2009; BARRIOS et al., 2014). O comportamento observado nos animais após 14 e 21 dias de tratamento, pode ter sido desencadeado por outros ligantes relacionados a detecção de feromônios da via olfatória (SHI; ZHANG, 2007; YANG et al., 2005; YOUNG; TRASK, 2007) tais como os relacionados acima. Fuss, Omura e Mombaerts (2005) e Brechbuhl, Klaey e Broillet (2008) descrevem que o gânglio de Grueneberg, é constituído por

um acúmulo de neurônios localizados fora do epitélio olfatório principal, o qual pode estar relacionado ao comportamento mediado por feromônios. Tirindelli et al. (2009) descrevem que o órgão septal de Masera, uma pequena ilha de epitélio olfatório situada na mucosa nasal. É funcionalmente especializado para a detecção de moléculas biologicamente relevantes. Os achados observados em nossos estudos sugerem que a detecção de feromonios, bem como a modulação da resposta comportamental, estão ligadas a um circuito olfatório sensorial, semelhante ao previamente descrito por (STOWERS; LOGAN, 2010) e não somente ao órgão vômeronasal isoladamente. Estudos mais detalhados são necessários para entender o real funcionamento deste órgão e seu papel nas diferentes atividades comportamentais (GRONDONA, 2012; BARRIOS et al., 2014). O mapeamento dos neurônios, bem como o mapeamento endócrino relacionado a via vômeronasal necessita ser melhor elucidado para o entendimento da função do OVN no comportamento social e reprodutivo, especialmente na espécie estudada.

Com relação aos níveis hormonais, notou-se que houve uma diminuição gradativa dos níveis hormonais nos grupos de 7 e 14 dias pós-tratamento, havendo uma pequena diferença no grupo tratado após 21 dias. Essa diminuição já era esperada, pois, de acordo com as alterações comportamentais, associadas à diminuição nas concentrações séricas de testosterona e androstenediona, nos animais tratados é evidente que a ablação da via vômeronasal no ducto incisivo acarretou a diminuição da percepção de odores, e, conseqüente falta de estímulos do bulbo olfatório, e diminuição da passagem de estímulo ao sistema límbico, o qual está intimamente relacionado às funções comportamentais (TIRINDELLI et al., 2009). Por outro lado Berger et al. (1982) sugerem que a ativação dos centros nervosos que regulam o comportamento de monta, requerem um longo período de estimulação pela testosterona, a qual modula o comportamento sexual (FUENTES; VILLAGRAN; NAVARRO, 2004).

7.3 EXPRESSÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO OVN

Com o intuito de identificar se as células derivadas do OVN foram capazes de migrar para o foco da lesão e para o próprio OVN, estas foram transfectadas com retrovírus eGFP. A transfecção com eGFP em células e animais transgênicos tornou-se uma ferramenta essencial

a biologia celular moderna (HADJANTONAKIS; NAGY, 2001; HANSON; KOHLER, 2001; VAN ROESSEL; BRAND, 2002), pois a autofluorescência do GFP permite a localização de proteínas específicas em tecidos e células vivas. São descritos na literatura muitos exemplos de imunolocalização de eGFP nos mais variados tecidos (SHIAO et al., 2000; PAUPARD et al., 2001; WARD; MOSS, 2001; THOMSEN et al., 2002). Portanto, vetores retrovirais podem ser utilizados para transduzir uma variedade de células que podem ser facilmente detectadas *in vitro* ou *in vivo* (VAN HENNIK et al., 1998).

As células transplantadas nos coelhos submetidos à ablação da via vomeronasal através da cauterização estavam bem distribuídas e localizadas no grupo tratado após 7 dias de lesão e no grupo tratado após 14 e 21 dias, havia uma progressiva diminuição na distribuição das células positivas, principalmente na região subjacente ao epitélio sensitivo. Este epitélio é responsável pela captação de sinais químicos (OSADA, ICHIKAWA; CONSTANZO, 1995), e, quando ocorre degeneração ou injúria, as células-tronco presentes migram e se diferenciam (BARBER; RAISMAN, 1978; BRANN e FIRESTEIN, 2014). Isso pode explicar a imunolocalização das células nesta região, observadas nesta pesquisa. A seu turno, observou-se que no grupo tratado após 21 dias de lesão, não foi registrada grande expressão de células positivas. Este resultado nos leva a inferir que as células podem ter migrado para outras áreas da via vomeronasal, bem como pode sugerir que estas tenham entrado em apoptose. Para elucidar esta questão seria necessário um mapeamento destas células em outras regiões ligadas a via vomeronasal tais como: o bulbo olfatório.

Este estudo revelou que as células derivadas do órgão vomeronasal de coelhos foram viáveis para utilização em terapia celular, uma vez que, os resultados obtidos após o transplante demonstraram a capacidade de migração ao foco da lesão. Outro importante achado se referiu ao comportamento apresentado pelos animais tratados e não tratados. Notou-se que os animais não tratados apresentavam-se agressivos, enquanto que os animais tratados após 7 dias os mesmos apresentavam-se mais dóceis. Este resultado demonstra que pode ter ocorrido um efeito benéfico das células na recuperação da função do órgão vomeronasal no que concerne ao comportamento social dos animais avaliados.

8 CONCLUSÕES

As células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia foram melhor isoladas no meio de cultivo DMEM High Glucose. Seu potencial de diferenciação, formação de colônias, e expressão de marcadores mesenquimais indicam a existência de uma população de células-tronco. Por não apresentar potencial tumorigênico, tais células podem ser consideradas como uma possível fonte para utilização na medicina regenerativa.

Após transplante, as células-tronco do OVN transduzidas pelo retrovírus eGFP, foram visualizadas no foco da lesão demonstrando potencial de migração para este tipo de injúria.

A capacidade de migração para o foco da lesão tratada com as células derivadas do órgão vômeronasal de coelhos da raça Nova Zelândia, bem como sua capacidade de diferenciação em diferentes tecidos, demonstra o potencial de utilização destas células como uma nova fonte na terapia celular.

REFERÊNCIAS

- ALVES, F. R.; GUERRA, R. R.; FIORETTO, E. T.; DELGADO, J. C.; MACHADO JÚNIOR, A. A. N.; AMBRÓSIO, C. E.; KERKIS, I.; MIGLINO, M. A. Establishment of a protocol for obtention of neuronal stem cells lineages from the dog olfactory epithelium. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 363-372, 2010.
- ARON, C. Mechanisms of control of the reproductive function by olfactory stimuli in female mammals. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 229–284, 1979.
- 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.; ROBECCHI, M. G. G.; PORPORATO, P.; FILIGHEDDU, N.; GRAZIANI, A.; GEUNA, S.; PERROTEAU, I. Morphological and biomolecular characterization of the neonatal olfactory bulb ensheathing cell line. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 185, p. 89–98, 2009.
- BACSÓ, Z.; EVERSON, R. B.; ELIASON, J.F. The DNA of annexin V binding apoptotic cells is highly fragmented. **Cancer Research**, v. 60, n. 16, p. 4623-4628, 2000.
- BARBER, P. C.; RAISMAN, G. Cell division in the vomeronasal organ of the adult mouse. **Brain Research**, v. 141, p. 57-66, 1978.
- BARONE, R.; LOMBARD, M.; MORAND, M. Organe de Jacobson, nerf vomeronasal et nerf terminal du chien. **Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires de Lyon**, v. 68, n. 3, p. 257-270, 1966.
- BARRIOS, A. W.; SÁNCHEZ-QUINTEIRO, P.; SALAZAR, I. Dog and mouse: toward a balanced view of the mammalian olfactory system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, article 106, p. 1-11, 2014.
- BAUM, M. J.; CHERRY, J. A. Processing by the main olfactory system of chemosignals that facilitate mammalian reproduction. **Hormones and Behavior**, article in press, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.003>.
- BERGER, M.; CHAZAUD, J.; JEAN-FAUCHER, C. H.; TURCKEHEIM, M.; VEYSSIERE, G. Developmental patterns of plasma and testicular testosterone in rabbits from birth to 90 days of age. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 561-564, 1982.
- 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.
- BRANN, J. H.; FIRESTEIN, S. J. Regeneration of new neurons is preserved in aged vomeronasal epithelia. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 46, p. 15686-15694, 2010.

BRANN, J. H.; FIRESTEIN, S. J. A life time of neurogenesis in the olfactory system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, article 182, p. 1-11, 2014.

BRECHBUHL, J.; KLAHEY, M.; BROILLET, M. C. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. **Science**, v. 321, p. 1092–1095, 2008.

BRENNAN, P. A.; KEVERNE, E. B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Process in Neurobiology**, v. 51, p. 457-481, 1997.

BUCK, L. B. Smell and taste: the chemical senses. In: KANDEL, E. R: **Principles of neural science**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 625-645.

CAGGIANO, M.; KAUER, J. S.; HUNTER, D. D. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. **Neuron**, v. 13, p. 339-352, 1994.

CALOF, A. L.; BONNIN, A.; CROCKER, C.; KAWAUCHI, S.; MURRAY, R. C.; SHOU, J.; WU, H. H. Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. **Microscopy Research and Technique**, v. 58, p. 176-188, 2002.

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

CARLSON, N. R. **Fisiologia do comportamento**. 7. ed. Barueri: Manole, 2002. p. 236-240.

CHENG, S.; SHAO, J.; CHARLTON-KACHIGIAN, N.; LOEWY, A. P.; TOWLER, D. A. Msx2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45969-45977, 2003

CURY, C. C. **Análise das células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos wistar submetidos á criopreservação**. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica, Curitiba, 2005.

DENNIS, J. C.; ALLGIER, J. G.; DE SOUZA, L. S.; EWARD, W. C.; MORRISON, E. E. Immunohistochemistry of the canine vomeronasal organ. **Journal of Anatomy**, v. 203, p. 329-338, 2003.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, DJ.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOUCETTE, R. Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. **Glia**, v. 3, n. 6, p. 433-449, 1990.

DOVING, K. B.; TROTIER, D. Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals' by Ludvig Jacobson (1813). **Chemical Senses**, v. 23, p. 743-754, 1998a.

DOVING, K. B.; TROTIER, D. Structure and function of the vomeronasal organ. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 2913-2925, 1998b.

DULAC, C.; TORELLO, E. A. T. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 7, p. 551-562. 2003.

DULAC, C.; ZAKHARY, L. Stem cells of the olfactory epithelium. In: LANZA, R. (Ed.). Handbook of stem cells. **Academic Press**, v. 2, p. 233-244, 2004.

EDWARDS, D. A.; PFEIFLE, J. K. Olfactory bulb removal: effects on sexual behavior and partner-preference in male rats. **Physiology & Behavior**, v. 48, p. 447-450, 1990.

FRESHNEY, R. I. **Basic principles of cell culture**. New York: John Wiley & Sons, Cap. 1, p.3-22, 2006.

FRIEDENSTEIN, A. J. Precursor cells of mechanocytes. **International Review of Cytology**, v. 47, p. 327-59, 1976.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, v. 4, n. 5, p. 267-274, 1976.

FUENTES, V. O.; VILLAGRAN, C.; NAVARRO, J. Sexual behavior of male New Zealand white rabbits in an intensive production unit. **Animal reproduction Science**, v. 80, n. 1-2, p. 157-162, 2004.

FURUKAWA, F. Photosensitivity in cutaneous lupus erythematosus: lessons from mice and men. **Journal of Dermatology Science**, v. 33, p. 81-89, 2003.

FUSS, S. H.; OMURA, M.; MOMBAERTS, P. The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 2649-2654, 2005.

GAAFAR, H.; TANTAWY, A.; HAMZA, M.; SHAABAN, M. The effect of ammonia on olfactory epithelium and vomeronasal organ neuroepithelium of rabbits. A histological and histochemical study. **Journal for Otorhinolaryngology**, v. 60, n 2, p. 88-91, 1998.

GARROSA, M.; GAYOSO, M. J.; ESTEBAN, F. J. Prenatal development of the mammalian vomeronasal organ. **Microscopy Research and Technique**, v. 41, p. 456- 479, 1998.

GRONDONA, K. E. B. **Morfometria do órgão vomeronasal e do téticulo, comportamento sexual de coelhos e perfis de testosterona e adrostenediona após cauterização do ducto incisivo**. 2012. 103f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Faculdade de Medicina Veterinária, Viçosa-MG, 2012.

HADJANTONAKIS, A. K.; NAGY, A. The color of mice: in the light of GFP-variant reporters. **Histochemistry Cell Biology**, v. 115, p. 49-58, 2001.

HALPERN, M.; MARTÍNEZ-MARCOS, A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. **Progress in Neurobiology**, v. 70, p. 245–318, 2003.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed., Barueri: Manole, 2004. 513p.

HANSON, M. R.; Kohler, R. H. GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 529–539, 2001.

HARE, W. C. D. Sistema respiratório geral. In: SISSON, S.; GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 111-112.

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.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON A. **Princípios integrados de zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.698-700.

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.

HOLY, T. E. Wake up and smell conspecific! **Trends in Neurosciences**, v. 26, p. 463-465, 2003.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A. the International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HUARD, J. M.; SCHWOB, J. E. Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 17–26, 1995.

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.

HWANG, J. H.; YUK, S. H.; LEE, J. H.; LYOO, W. S.; GHIL, S.; LEE, S. S.; KHANG, I. G.; PAIK, S. Y.; LEE, J. Y. Isolation of muscle derived stem cells from rat and its smooth muscle differentiation. **Molecular Cell**, v.17, n. 1, p. 57-61, 2003.

JAISWAL, R. K.; JAISWAL, N.; BRUDER, S. P.; MBALAVIELE, G.; MARSHAK, D. R.; PITTENGER, M. F. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9645-9652, 2000.

JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 414-425, 2004.

JOHNSTON, R. E. Pheromones, the vomeronasal system, and communication. From hormonal responses to individual recognition. **Annals of the New York Academy Science**, v. 855, p. 333-348, 1998.

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

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, p. 419-425, 2006.

KELLAND, L. R. "Of mice and men": values and liabilities of the athymic Balb-cnu/nu mouse model in anticancer drug development. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 827-836, 2004.

KELLIHER, K. The Combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. **Hormones Behavior**, v. 52, p. 561-570, 2007.

KEVERNE, E. B. The vomeronasal organ. **Science**, v. 286, n. 5440, p. 716-720, 1999.

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.

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.

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

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

MACKAY-SIM, A.; KITTEL, P. W. On the life span of olfactory receptor neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 3, p. 209-215, 1990.

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.

MARTÍNEZ-MARCOS, A.; UBEDA-BANˆOˆN, I.; HALPERN, M. Cell turnover in the vomeronasal epithelium: evidence for differential migration and maturation of subclasses of vomeronasal neurons in the adult opossum. **Journal of Neurobiology**, v. 43, p. 50-63, 2000a.

- MARTINEZ-MARCOS, A.; JIA, C.; QUAN, W.; HALPERN, M. Neurogenesis, migration, and apoptosis in the vomeronasal epithelium of adult mice. **Journal of Neurobiology**, v. 63, p. 173–187, 2005.
- MARTINEZ-RICOS, J.; AGUSTIN-PAVON, C.; LANUZA, E.; MARTINEZ-GARCIA, F. Intraspecific communication through chemical signals in female mice: reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. **Chemical Senses**, v. 32, p. 139–148, 2007.
- MEREDITH, M. Vomeronasal function. **Chemical Senses**, v. 23, p. 463–466, 1998.
- MONTI-BLOCH, L.; JENNINGS-WHITE, C.; BERLIBER, D. L. The human vomeronasal system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, p. 673–686, 1994.
- MUNGER, T.; LEINDERS-ZUFALL, L. M.; MCDUGALL, R. E.; COCKERHAM, A.; SCHMID, P.; WANDERNOTH. An olfactory subsystem that detects carbon disulfide and mediates foodrelated social learning. **Current Biology**, v. 20, n. 16, p. 1438–1444, 2010.
- 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, 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.
- NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. **HEP**, v. 174, p. 249–282, 2006.
- OGURA, T.; KROSNOWSKI, K.; ZHANG, L.; BEKKERMAN, M.; LIN, W. Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. **PloSone**, v. 5, n. 7, p. e11924, 2010.
- OLSSON, D. C.; PIPPI, N. L.; MARTINS, D. B.; TOGNOLI, G. K.; SANTOS JÚNIOR, E. B.; MULLER, D. C.; LOPES, S. T. A.; MARCONATO, F.; MÖRCHBÄCHER, P. D.; TEIXEIRA, L. V. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 141–147, 2009.
- OSADA, T.; ICHIKAWA, M.; COSTANZO, R. M. Is nestin a marker for chemosensory precursor cells? **Brain Research**, v. 683, p. 254–257, 1995.
- OTHMAN, M.; KLUEBER, K. M.; ROISEN F. J. Identification and culture of olfactory neural progenitors from GFP mice. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 78, n. 2, p. 57–70, 2003.
- PAGANO, S. F.; IMPAGNATIELLO, F.; GIRELLI, M.; COVA, L.; GRIONI, E.; ONOFRI, M.; CAVALLARO, M.; ETTERI, S.; VITELLO, F.; GIOMBINI, S.; SOLERO, C. L.; PARATI, E. A. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. **Stem Cells**, v. 18, p. 295–300, 2000.

PAUPARD, M. C.; MILLER, A.; GRANT, B.; HIRSH, D.; HALL, D. H. Immuno-EM localization of GFP-tagged yolk proteins in *C. elegans* using microwave fixation. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v. 49, p. 949–956, 2001

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p.143-147, 1999.

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

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. V. Biology of mesenchymal stem cells. **Injury**, v. 36, n. 3, p. 8-12, 2005.

POWERS, J. B.; WINANS, S. S. Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior in the male hamster. **Science**, v. 187, p. 961-963, 1975.

PUNTA, K. D.; LEINDERS-ZUFALL, T.; RODRIGUEZ, I.; JUKAM, D.; WYSOCKI, C. J.; OGAWA, S.; ZUFALL, F.; MOMBAERTS, P. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. **Nature**, v. 419, p. 70-74, 2002.

REYNA, M. **Técnicas de estudio de líneas celulares**. Universidad de Barcelona, 2003. Disponível: http://www.ub.es/biocel/wbc/técnicas_de_cultivocelular.htm. Acesso em: 30 maio. 2014.

RIDDELL, S. R.; ELLIOTT, M.; LEWINSOHN, D. A.; GILBERT, M. J.; WILSON, L.; MANLEY, S. A.; LUPTON, S. D.; OVERELL, R. W.; REYNOLDS, T. C.; COREY, L.; GREENBERG, P. D. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. **Nature Medicine**, v. 2, p. 216–223, 1996.

ROBERTS, S.A.; DAVIDSON, A.J.; MCLEAN, L.; BEYNON, R. J.; HURST, J.L. Pheromonal induction of spatial learning in mice. **Science**, v. 338, p. 1462–1465, 2012.

RODRIGUES, M. N.; PIGNATARI, G. C.; GRONDONA, K. E. B.; CARVALHO, R. C.; MIGLINO, M. A. The vomeronasal organ as a new source of stem cells for cell therapy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 298-298, 2012.

ROISEN, F. J.; KLUEBERA, K. M.; LUA, C. L.; HATCHERA, L. M.; DOZIERA, A.; SHIELDSA, C. B.; MAGUIRE, S. Adult human olfactory stem cells. **Brain Research**, v. 890, p. 11–22, 2001.

ROMERO, P. R.; BELTRAMINO, C. A.; CARRER, H. F. Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. **Physiology & Behavior**, v. 47, p. 685-690, 1990.

- ROSA-PRIETO, C.; SAIZ-SANCHEZ, D.; UBEDA-BANON, I.; A-PALACIOS, L. A.; GARCIA-MUN, S.; MARTINEZ-MARCOS, A. Fate of Marginal Neuroblasts in the Vomeronasal Epithelium of Adult Mice. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 517, p. 723–736, 2009.
- SALAZAR, I.; CIFUENTES, J.M.; SÁNCHEZ-QUINTEIRO, P. Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. **Anatomical Record**, v. 296, p. 146–155, 2013.
- SANTOS, B. F. Camundongos mutantes mais utilizados. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. a p.139-142.
- SCHWAB, M. E. Repairing the injured spinal cord. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1029-1031, 2002.
- SCHWARTZ, L. M.; CHIKARAISHI, D. M; KAUER, J. S. Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography. **Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 3556-3564, 1991.
- SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p.13-19, 2005.
- SHI, P.; ZHANG, J. Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land. **Genome Research**, v. 17, p. 166–174, 2007.
- SHIAO, Y. H.; RESAU, J. H.; NAGASHIMA, K.; ANDERSON, L. M.; RAMAKRISHNA, G. The von Hippel-Lindau tumor suppressor targets to mitochondria. **Cancer Research**, v. 60, p. 2816–2819, 2000.
- 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.
- SMITH, T.D.; MUCHLINSKI, M. N.; BHATNAGAR, K. P.; DURHAM, E. L.; BONAR, C. J.; BURROWS, A. M. The Vomeronasal Organ of Lemur catta. **American Journal of Primatology**, 2014. doi: 10.1002/ajp.22326.
- STOCKHORST, U.; PIETROWSKY, R. Olfactory perception, communication, and to nose-to-brain pathway **Physiology & Behavior**, v. 83, p. 3-11, 2004.
- STOWERS, L.; LOGAN, D. W. “Olfactory mechanisms of stereotyped behavior: on the scent of specialized circuits.” **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 3, p. 274-80, 2010a.
- STOWERS, L.; LOGAN, D. W. “Sexual dimorphism in olfactory signaling.” **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 6, p.770-775, 2010b.

TIRINDELLI, R.; DIBATTISTA, M.; PIFFERI, S.; MENINI, A. From pheromones to behavior. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 921-956, 2009.

THOMSEN, P.; ROEPSTORFF, K.; STAHLHUT, M.; VAN DEURS, B. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. **Molecular Biology Cell**, v. 13, p. 238-250, 2002.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, A. O.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Manole. 2003. p. 55-70.

TONDREAU, T.; LAGNEAUX, L.; DEJENEFFÉ, M.; DELFORGE, A.; MASSY, M.; MORTIER, C.; BRON, D. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. **Cytotherapy**, v. 6, n. 4, p. 372-379, 2004.

VACCAREZZA, O. L.; SPEICH, L. N.; TRAMEZZANI, J. H. The vomeronasal organ of the rat. **Journal of Anatomy**, v. 132, p. 167-185, 1981.

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

VAN HENNIK, P. B.; VERSTEGEN, M. M. A.; BIERHUIZEN, M. F. A.; LIMÓN, A.; WOGNUM, A. W.; CANCELAS, J. A.; BARQUINERO, J.; PLOEMACHER, R. E.; WAGEMAKER, G. Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical cord blood stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment of immunodeficient mice. **Blood**, v. 92, p. 4013-4022, 1998.

VAN ROESSEL, P.; BRAND, A. H. Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. E15-20, 2002.

VILELA A. L. M. **O olfato**. 2005. Disponível em <http://www.afh.bio.br/sentidos/Sentidos7.asp>. Acesso em >20 abr 2013.

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.

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.

WARD, B. M.; MOSS, B. Visualization of intracellular movement of vaccinia virus virions containing a green fluorescent protein-B5R membrane protein chimera. **Journal of Virology**, v. 75, p. 4802-4813, 2001.

WEILER, E.; MCCULLOCH, M. A; FARBMAN, A. I. Proliferation in the vomeronasal organ of the rat during postnatal development. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 700–711, 1999.

WEILER, E. Postnatal development of the rat vomeronasal organ. **Chemical Senses**, v. 30, p. 127–128, 2005.

WESSELS, Q.; HOOGLAND, P. V. J. M.; VORSTER, W. Anatomical Evidence for an Endocrine Activity of the Vomeronasal Organ in Humans. **Clinical Anatomy**, v. 27, p. 856–860, 2014.

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

WHITTEN, W. K.; CHAMPLIN, A. K. The role of olfaction in mammalian reproduction. In: FIELD, J.; MAGOUN, H. W.; HALL, V. E. (**Handbook of Physiology – Endocrinology II**. Baltimore: Waverly Press, 1959. p. 109-123.

WYSOCKI, C. J. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. **Neuroscience e Biobehavioral Reviews**, v. 3, p. 301-341, 1979.

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

YOUNG, J. M.; TRASK, J. V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. **Trends Genetics**, v. 23, n. 5, p. 212-215, 2007.

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.

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.