FLÁVIO RIBEIRO ALVES

**Avaliação da cultura de células-tronco do epitélio olfatório de cães
sem raça definida (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758)**

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

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2009

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.2112
FMVZ

Alves, Flávio Ribeiro

Avaliação da cultura de células-tronco do epitélio olfatório de cães sem raça definida (*Canis familiaris Linnaeus*, 1758) / Flávio Ribeiro Alves. – São Paulo : F. R. Alves, 2009.
138 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Neuroepitélio olfatório.
2. Receptores olfatórios.
3. Imunohistoquímica. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da cultura de células-tronco do epitélio olfatório de cães sem raça definida (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758)", protocolo nº832/2006, utilizando 20 (vinte) cães (cadáveres), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of stem cells culture from neural olfactory epithelium in mongrel dogs (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758)", protocol number 832/2006, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 09 de março de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: **ALVES, Flávio Ribeiro**

Título: **Avaliação da cultura de células-tronco do epitélio olfatório de cães sem raça definida (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758)**

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 Doutorado em Ciências

Data: ____/____/2009.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

A DEUS, presença certa em momentos incertos, meu grande guia por caminhos tortuosos e em quem resguardo toda confiança. Que tudo seja feito em teu nome, pela tua vontade, para tua Honra e Glória!

Aos meus pais, grande benção concedida por Deus em minha vida; exemplo pleno de amor, dedicação e doação. A vocês todo o meu amor e eterna gratidão!

A Jacyara, por um amor que cresce a cada dia na verdade, fidelidade e sinceridade diante de Deus. Construimos nossa casa sobre as rochas e assim seremos muito felizes!

Ao meu primo, Raimundo (Duca), por toda uma lição de vida em meio a grandes batalhas, pelo espelho para construção de um caráter e por acreditar neste grande sonho. Que seja também sua esta vitória!

Ao meu primo, Jucivan, grande exemplo de dedicação, superação e conquistas; por sua grande disposição em ajudar em todos os momentos. Meus sinceros agradecimentos!

Agradecimentos

A professora Maria Angélica Miglino, pela confiança em mim depositada na orientação deste trabalho, conselhos, grandes ensinamentos. Por toda uma lição de vida e acima de tudo pela grande amizade que construímos.

A Professora Irina Kerkis, grande exemplo de pesquisadora e de incentivo. Por toda ajuda oferecida, fundamental para a concretização de mais esta etapa.

Ao Professor Raimundo Alves Barrêto Júnior, mais que professor, um amigo sempre pronto a ajudar nas horas difíceis.

Ao tio Manuel Quinzeiro e a tia Socorro, por toda ajuda e dedicação a esta causa e por a todo instante sempre manifestando palavras de carinho e incentivo, mais do que amigos, mas uma extensão da minha família

Ao meu irmão Talmir Quinzeiro Neto, grande amigo em todos os momentos; companheiro fiel com o qual comecei a sonhar tudo isto, naquela feira de anatomia.

Ao meu irmão Pedro Paulo Machado, grande guerreiro, grande amigo e exemplo de dedicação e força para concretização de um sonho. Que Deus esteja sempre contigo e guie teus passos.

Ao meu grande amigo Carlos Eduardo Cruz Pinto (Cadu), Leonardo Frasson dos Reis (Leo) e Mateus Levi Tajra Feitosa, sempre brincalhões e descontraídos. Pelos anos de convívio, de amizade sincera e prontidão para ajudar.

Aos meus amigos de pós-graduação Carlos Alberto Sarmiento, Ricardo Romão Guerra, Cristiane Valverde, Emerson Ticona Fioreto, Ana Rita, Carla Araújo, Marina Brolio, Margareth, André Francioli, Alex, Tais, Janaína, Guilherme Buzon, Thiago Aloia, Ana Rita e Emerson, pelo companheirismo e por todos os momentos de diversão.

Aos amigos do Instituto Butantan, Nelson, Fernando, Carlo Maranduba, Enrico, Lislely e Vera, sem os quais, seguramente este trabalho não seria possível;

Aos Amigos Diogo, Sandra, Ronaldo e Maiza, primeiramente pela amizade, mas também pela ajuda e experiência, fundamentais para realização deste trabalho.

As minhas alunas de Iniciação Científica Juliana e Christiane, pessoas brilhantes com as quais tive a oportunidade de trabalhar e aprender;

A Jaqueline, Maicon, Graça e as amigas, Rose e Débora, “faíscas”, sempre aptos ajudar quando necessário.

Ao Jefferson, a Claudinha, pela atenção, carinho e doação a cada instante.

A Igreja Evangélica em Cidade Universitária, onde encontrei pessoas abençoadas com quem tenho a oportunidade de compartilhar momentos belíssimos de louvor e adoração ao nosso DEUS.

Ao FAPESP, pelo apoio financeiro a pesquisa.

Confia ao Senhor as tuas obras, e os teus pensamentos serão estabelecidos

Provérbios, 16, 3

RESUMO

ALVES, F. R. **Avaliação da cultura de células-tronco do epitélio olfatório de cães sem raça definida (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758).** [Evaluation of stem cell culture of olfactory epithelium from Mongrel dogs (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758)]. 2009. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As células provenientes do epitélio olfatório apresentam capacidade regenerativa durante toda a vida, embora este mecanismo ainda não esteja completamente elucidado. O potencial de diferenciação de células-tronco provenientes do epitélio olfatório de cães sem raça definida (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) foi avaliado utilizando-se 12 cães adultos e 12 cães com 60 dias de vida intra-uterina, oriundos do Hospital Veterinário da FMVZ-USP. Após coletado, o epitélio olfatório foi submetido a protocolo histológico padrão para hematoxilina-eosina, azul de toluidina e PAS. O material fixado em glutaraldeído 2,5% foi processado para observação sob microscopia eletrônica de transmissão. O índice de proliferação nuclear foi medido para detecção de PCNA e Ki67 nuclear. Células foram expandidas em cultura em meio D-MEM/F-12 acrescido de Soro Fetal Bovino hyclone (CO₂-95% à 37°C) para caracterização e diferenciação celular (osteogênica, adipogênica e neurogênica). O cultivo das células provenientes do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina mostrou maior evolução em cultura quando comparados aos animais adultos, sendo as primeiras utilizadas para execução dos protocolos de caracterização e diferenciação. As células em cultivo apresentaram expressão CD29 positiva e marcação positiva para OCT-4, citoqueratina 18 (Ck18) e vimentina. A diferenciação osteogênica demonstrou, ao final de 21 dias, células com morfologia típica, caracterizadas pela coloração de Alizarin Red e Von Kossa. A diferenciação adipogênica mostrou pouco número de células, apresentando grânulos adipogênicos, corados por Oil Red, contudo sem morfologia típica. A diferenciação neurogênica demonstrou células que expressaram marcação para GFAP, Neurofilamentos, Oligodendrócitos e β tubulina III. As células isoladas a partir do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina evidenciaram populações de células-tronco, determinadas pela expressão de marcadores específicos e diferenciação em outros tipos de tecido, devendo-se considerar este epitélio como uma fonte potencial para aquisição de células, particularmente progenitores neuronais, que possam somar aos estudos e seu uso em terapia celular.

Palavras-chave: Neuroepitélio olfatório. Receptores olfatórios. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

ALVES, F. R. **Evaluation of stem cell culture of olfactory epithelium from Mongrel dogs (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758).** [Avaliação da cultura de células-tronco do epitélio olfatório de cães sem raça definida (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758)]. 2009. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Olfactory cells demonstrate regenerative capacity along life, although, its mechanism is still obscure. We evaluated the differentiation capacity of olfactory stem cell of mongrel dogs (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) in 12 adult dogs and 12 fetuses at term (60 days of pregnancy) from the Veterinary Hospital of FMVZ-USP. Following the sampling, the epithelia were submitted to standard histological process and stained with HE, toluidine blue and PAS. Samples fixed with 2.5% glutaraldehyde solution were processed for transmission electron microscopy. Proliferative index were obtained with the detection of PCNA and Ki67. Cells were kept in culture in D-MEM/F-12 medium supplemented with hyclone bovine fetal serum (CO₂-95% at 37°C) for characterization and cell differentiation (osteogenesis, adipogenesis, and neurogenesis). Cell culture of fetuses at term demonstrated higher evolution in comparison to adult animals, being submitted to the protocols of characterization and differentiation. Cell culture demonstrated positive reaction for CD29, OCT-4, Ck18 (citokeratin) and vimentin. Osteogenic differentiation demonstrated, 21 days, typical morphological cells characterized by Alizarin Red and Von Kossa staining. Adipogenic differentiation demonstrated less number of cells containing granules, stained with Oil Red, although being not typical shape. Neurogenic differentiation demonstrated positive staining for GFAP, Neurofilament, Oligodendrocyte and III β -tubulin. Cells isolated from epithelia of fetuses at term demonstrated population of stem cells determined by the expression of specific-staining and differentiation into other type of cells, which lead us to consider the olfactory epithelia as a source of potential stem cells particularly for neurogenic differentiation to be applied for further studies in cell therapy.

Keywords: Olfactory neuroepithelium. Olfactory receptors. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – (a) Fotografia do corte frontal da cabeça de um cão evidenciando o epitélio olfatório na região das conchas etmoidais. Em (b), corte transversal, no mesmo nível de “a”, onde se observam dobras da mucosa deste epitélio (setas vermelhas), onde são coletadas amostras de material de pesquisa. Barra de 5 cm..... 64
- Figura 2 – (a) Visão panorâmica do epitélio olfatório de cão, em corte transversal, onde se observam grande quantidade de dobras da mucosa olfatória, fazendo referência à região de meatos nasais. (b) Em uma outra vista do epitélio olfatório de cão, observam-se grande quantidade de glândulas mucosas (círculos vermelhas) distribuídas ao longo de toda lâmina basal, com presença de inúmeros vasos sanguíneos (VS), que traduzem a necessidade de vascularização eficiente para este epitélio. Paraplast, HE, (a) Barra de 250 μm ; (b) Barra de 100 μm , Aumento em (b) Barra de 40 μm 66
- Figura 3 – Fotografia de corte da mucosa nasal de cão, caracterizando seu epitélio pseudo-estratificado ciliado (setas amarelas). É notória ainda, a presença de células caliciformes (setas vermelhas) dispostas de modo uniforme ao longo de todo este epitélio e de glândulas mucosas (setas pretas) localizadas ao nível da lâmina própria. Barra de 10 μm , (a) Paraplast, HE; (b) Araldite, Azul de Toluidina..... 68
- Figura 4 – Fotomicrografia de corte da mucosa nasal de cão, caracterizando marcação positiva para PCNA. (a) Marcação com especificidade celular em alguns pontos do epitélio (círculo azul). (b) Detalhe desta marcação celular. (c)-(d) Intensa atividade de proliferação celular basal (setas), local provável de diferenciação e localização das células progenitoras de renovação das estruturas componentes deste epitélio. Barras: (a) 50 μm ; (b) 40 μm ; (c) 25 μm ; (d) 40 μm 70
- Figura 5 – (a) e (b) Eletromicrografia de transmissão demonstrando os tipos celulares componentes do epitélio olfatório de cão. Observa-se a presença de células ciliadas (CC) e basais (circuladas). (c) Células secretoras caliciformes (CS), vistas aqui liberando conteúdo PAS positivo. Barras: (a) – (b) 10 μm ; (c) Coloração PAS, 10 μm 73
- Figura 6 – (a) Eletromicrografia do epitélio olfatório de cão, demonstrando células progenitoras (círculos vermelhos) presentes na lâmina basal promovendo renovação do epitélio, apresentando núcleos com morfologia semelhante à de algumas células colunares (*). Em (b) observa-se que estas células apresentam núcleo que coram mais intensamente por Azul de Toluidina. Barra: (a) 10 μm , (b) 10 μm 75
- Figura 7 – (a) Eletromicrografia do epitélio olfatório de cão, demonstrando a atividade metabólica entre as células basais e colunares, caracterizada pela presença de mitocôndrias dispersas pelo citoplasma dessas células (setas), bem como pelo nível de condensação da cromatina nuclear. Barra: 2 μm 76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 8 – Fotografia da cultura de células do epitélio olfatório de cão. Em (a) observa-se contaminação de origem bacteriana (setas), caracterizada por um meio turvo, onde se visualizam algumas colônias aderidas ao fundo da garrafa. Em (b) e (c) a intensa atividade proliferativa bacteriana observada em aumento maior. (a) Barra de 100 μm ; (b) Barra de 50 μm e (c) Barra: 25 μm 78
- Figura 9 – Fotografia da cultura de células do epitélio olfatório de cão. Em (a) e (b) fragmento (*) de tecido olfatório liberando células para o meio de cultura três dias depois de realizado o explante para o início da cultura. Em (c), após 7 dias de cultura, observam-se as células organizadas em colônias (círculo vermelho). Em (d), aos 13 dias em cultura, já são observadas colônias de células com características definidas. Observam, a princípio, dois tipos celulares distintos (setas azuis e brancas) e células em provável atividade mitótica (círculo azul), prevalecendo as células com morfologia globóide (setas azuis). (a) Barra de 250 μm ; (b), (c) e (d) Barra de 25 μm 80
- Figura 10 – (a) Vista geral do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida e tecido cartilaginoso de sustentação (Tc). Presença de inúmeras ilhas de condrócitos (setas) distribuídas uniformemente. (b) Detalhe do epitélio olfatório pseudo-estratificado ciliado (Ep). Paraplast, HE, (a) Barra de 250 μm ; (b) Barra de 25 μm 83
- Figura 11 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina. (a) e (b) Presença de glândulas exócrinas (Gl) mucosas presentes na lâmina própria desse epitélio, liberando por meio de seus ductos (Dt) conteúdo para a superfície (Ct). Paraplast, HE, (a) e (b) Barra de 40 μm 85
- Figura 12 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina. (a) e (b) Marcação positiva para Ki67 com coloração de fundo hematoxilina. Notar a predileção por grupamentos celulares localizados ao longo da região apical deste epitélio. Paraplast, (a) Barra de 100 μm e (b) Barra de 50 μm 87
- Figura 13 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina. Comparação entre as marcações Ki67 em (a), demarcadas dorsalmente e PNCA em (b), setas azuis. Ao contrário do Paraplast, (a) e (b) Barra de 40 μm 88
- Figura 14 – Eletromicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina evidenciando a morfologia das células dispostas adjacentes a lâmina própria, cuja orientação as das células com marcação positiva pelo método de identificação do PCNA nuclear. CB: Células basais. Barra de 2 μm 89

LISTA DE FIGURAS

- Figura 15 – Eletromicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina. (a) Neurônio olfatório (N), células sustentaculares (CS) e ciliadas (CC) em disposição colunar. Chama atenção a intensa atividade metabólica basal dos neurônios, verificada pela presença de numerosas mitocôndrias (M). (b) Vesícula olfatória (VO) disposta por entre as células sustentaculares. É notada a presença de junções comunicantes entre as células nervosas e sustentaculares (setas). (a) Barra de 5 μm ; (b) Barra de 2 μm 91
- Figura 16 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, demonstrando a liberação de células após 24 horas de cultivo celular. (a) Liberação de células (setas) a partir de fragmento (*) aderido ao fundo da garrafa. (b) Início de adesão celular nas proximidades do fragmento (círculos). Barra: (a) 50 μm , (b) 25 μm 94
- Figura 17 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, após 5 dias de cultivo celular. (a) Células aderidas e em distribuição homogênea por todo o fundo das garrafas (setas), verificando-se muitas delas em processo de divisão (círculos). (b) Células demonstrando formação de monocamada e confluência total antes da primeira passagem. Barra: (a) e (b) 250 μm 97
- Figura 18 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, 2 dias após a primeira passagem. (a) Células aderidas ao fundo da garrafa demonstrando formação de monocamada. (b) Interação célula a célula, demonstrando sua forte tendência em formar colônias (Círculo). Barra: (a) e (b) 250 μm 99
- Figura 19 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, 2 dias após a primeira passagem. (a) e (b) Predominância de um tipo celular de morfologia elipsóide, de menor volume e com forte capacidade de divisão. Barra: (a) e (b) 25 μm 100
- Figura 20 – Curva de crescimento de células isoladas do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, demonstrando sua atividade metabólica basal, em fases distintas do desenvolvimento..... 101
- Figura 21 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias intra-uterina de vida, após fase plateau. (a) e (b) verifica-se que células ainda se encontram em processo de divisão, pontos brilhantes em “a” e círculo em “b”. Barra: (a) 25 μm e (b) 100 μm 102
- Figura 22 – Citometria de Fluxo de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina, de (a) à (g) demonstrando expressão inespecífica para HLA-DR, HLA-ABC, CD31, CD90 (Thy-1), CD73 (SH3), CD117 (c-kit), CD105 (SH2)..... 104
- Figura 23 – Citometria de Fluxo de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina demonstrando em (a) a expressão positiva para CD29 e em (b) e (c) uma leve tendência de expressão para CD13 e CD34, respectivamente..... 105

LISTA DE FIGURAS

- Figura 24 – Citometria de Fluxo de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina demonstrando em (a) e (b) expressão negativa para CD44 e CD45, respectivamente..... 106
- Figura 25 – Imunofluorescência para caracterização da população de células-tronco isoladas a partir do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) expressão do OCT-4, específico da região intranuclear. Em (b) verifica-se a expressão da citoqueratina, determinada pela marcação do citoesqueleto celular. Em (c) observa-se a expressão da vimentina, determinando a marcação do citoplasma celular ao redor do núcleo. Em (d) o controle negativo utilizado como comparação. Barra: (a) 50 μ m, (b) à (f) 25 μ m..... 107
- Figura 26 – Segunda semana de diferenciação osteogênica a partir de células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) e (b) visão panorâmica de células em processo de diferenciação. Em (c) maior aumento, demonstrando depósito de cálcio citoplasmático (gotículas vermelhas) Barra: (a) 100 μ m, (b) 50 μ m e (c) 25 μ m. Coloração Alizarin Red..... 110
- Figura 27 – Estágio final de diferenciação osteogênica a partir de células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) e (b) visão panorâmica de osteoblastos diferenciados. Em (c) maior aumento de um osteoblasto típico em cultivo. Em (d) maior aumento de um osteoblasto típico em cultivo intensamente marcado por coloração de Von Kossa. Barra: (a) 100 μ m, (b) 50 μ m, (c) 25 μ m (Coloração Alizarin Red) e (d) 25 μ m..... 111
- Figura 28 – Estágio final de diferenciação adipogênica a partir de células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) e (b) presença de células contendo gotículas de gordura dispersas no seu citoplasma, marcadas por coloração específica. Barra: (a), (b) e (c) 100 μ m. Coloração Oil Red..... 112
- Figura 29 – Diferenciação neurogênica de células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) controle negativo. Em (b) células GFAP positivas, marcador de astrócitos. Em (c), (d) e (e) presença de células marcadas positivamente para neuromarcadores específicos, Neurofilamentos, oligodendrócitos e β tubulina III. Barra: (a) 50 μ m, (b) 25 μ m, (c) e (d) 50 μ m e (e) 25 μ m..... 115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Anticorpos primários utilizados para a imunofluorescência.....	56
Quadro 2- Composição do meio de diferenciação osteogênica.....	58
Quadro 3- Composição de manutenção de diferenciação osteogênica.....	58
Quadro 4- Composição do meio de diferenciação adipogênica.....	59
Quadro 5- Anticorpos primários utilizados para a imunofluorescência (neurogênese).....	60

LISTA DE SÍMBOLOS

β tubulina III: Membro de uma pequena família de proteínas globulares que se ligam ao GTP para a formação dos microtúbulos.

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

BrdU: Bromodesoxiuridina

CD133: Glicoproteína associada a progenitores celulares endoteliais

CD34: Glicoproteína associada à adesão de células-tronco a matriz extracelular

CD45: Proteína que regula o crescimento, diferenciação, ciclo mitótico e transformação oncogênica

CD24: Molécula de adesão celular

DFb27: Meio neurobasal

DMEM-F12: Meio Eagle modificado de Dubelcco

EGF: Fator de crescimento endotelial

FGF2: Fator de crescimento fibroblástico

GALC: Galactosilceramidase

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

HBCs: Células horizontais basais

HCNS-SC: Células-tronco do Sistema Nervoso Central humano

INP: Precursor neuronal imediato

MAP2ab: Proteína associada a microtúbulos

Mash1: Mammalian Achaete Scute Homolog 1

MEM: Meio mínimo essencial

NCAM e NeuN: Molécula de adesão de células neurais

Ngn1: Neurogenina 1

Olig2 e Nkx2.2: Fator de transcrição do desenvolvimento do tubo neural

ORNs: Receptores olfatórios de neurônios

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação nuclear

SCF: Fator de células-tronco

SUS1: Sucrose sintase 1

SUS4: Sucrose sintase 4

TGF α : Fator transformador do Crescimento alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo geral	42
3.2	Objetivo específicos	42
4	MATERIAL E MÉTODO	44
4.1	Fixação e Inclusão do Material	44
4.2	Observação do epitélio olfatório através de Microscopia de Luz	44
4.2.1	Coloração por hematoxilina-eosina	44
4.2.2	Coloração por Azul de Toluidina	45
4.2.3	Coloração por técnica de PAS (Ácido Periódico de Schiff)	46
4.3	Observação da divisão celular no epitélio olfatório por Imunohistoquímica	47
4.4	Observação da divisão celular no epitélio olfatório por Imunohistoquímica por microscopia eletrônica de transmissão	49
4.5	Protocolos de cultivo celular	50
4.5.1	Protocolo proposto inicialmente para cultivo de células do epitélio olfatório de cães sem raça definida adultos e com 60 dias de vida intra-uterina	50
4.5.2	Modificação do protocolo inicial para cultivo de células do epitélio olfatório de cães sem raça definida adultos e com 60 dias de vida intra-uterina	51
4.5.3	Protocolo definitivo para cultivo de células do epitélio olfatório de cães sem raça definida adultos e com 60 dias de vida intra-uterina	52
4.5.4	Concentração e viabilidade celular	53
4.5.5	Congelamento Celular	54
4.6	Caracterização da população de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça com 60 dias de vida intra-uterina	54
4.6.1	Citometria de fluxo	55
4.6.2	Imunofluorescência	56
4.7	Diferenciação celular a partir de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina	57
4.7.1	Diferenciação osteogênica	57
4.7.2	Diferenciação adipogênica	59
4.7.3	Diferenciação neurogênica	59
5	RESULTADOS	62
5.1	Análise morfológica do epitélio nasal de cães sem raça definida adultos	62
5.2	Avaliação do protocolo de cultura proposto inicialmente	77
5.3	Protocolo de cultura de células modificado	79
5.4	Avaliação morfológica a partir do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina	81
5.5	Cultivo celular a partir do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina	92
5.6	Avaliação da caracterização da população de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida adultos e com 60 dias de vida intra-uterina	103
5.6.1	Citometria de Fluxo	103
5.6.2	Imunofluorescência	106

5.7	Avaliação da diferenciação celular a partir de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida adultos e com 60 dias de vida intra-uterina.....	108
5.7.1	Diferenciação osteogênica.....	108
5.7.2	Diferenciação adipogênica.....	112
5.7.3	Diferenciação neurogênica.....	113
6	DISCUSSÃO	117
6.1	Imunomarcagem do epitélio olfatório de cães adultos e com 60 dias de idade através do método de identificação do PCNA e Ki67 nuclear.....	117
6.2	Cultivo de células do neuroepitélio olfatório de cães adultos e com 60 dias de vida intra-uterina.....	120
6.3	Caracterização do cultivo de células-tronco isoladas a partir do epitélio olfatório de cães de 60 dias de vida intra-uterina.....	122
6.3.1	Citometria de fluxo.....	122
6.3.2	Imunofluorescência.....	123
6.4	Diferenciação celular (osteogênica, adipogênica e neurogênica).....	123
7	CONCLUSÃO	127
	REFERÊNCIAS	129

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A função respiratória é essencial para a manutenção da vida, sendo caracterizada por um conjunto de trocas gasosas entre as células do organismo e o meio ambiente (HUARD et al., 1998). Nos mamíferos, depende do perfeito funcionamento de um complexo sistema, responsável pela separação do oxigênio do ar e de sua difusão para o sangue e, ao mesmo tempo, retirada do dióxido de carbono do organismo para a atmosfera (GUYTON, 2002). Esse mecanismo é controlado por um sistema complexo, em função das necessidades metabólicas e da otimização dos gastos energéticos dos músculos respiratórios, mantendo os gases do sangue arterial dentro de limites estreitos, mesmo em circunstâncias fisiológicas extremas (DOTY, 2001).

De acordo com Menco e Jackson (1997), muitos mamíferos terrestres apresentam em suas cavidades nasais receptores ou elementos especializados do sistema neural. Segundo Guyton (2002), de maneira geral, estes receptores apresentam-se envolvidos em mecanismos essenciais de ordem sensorial, tais como odor e, em grande parte, pela sensação de gosto dos alimentos e bebidas. Ainda em referência de Doty (2002), os mesmos são responsáveis pela detecção de elementos químicos nocivos, promovendo a produção de muco ou parada da respiração, visando prevenir ou minimizar injúrias na cavidade nasal ou pulmões.

Em humanos, os receptores sensoriais do sistema olfatório principal encontram-se localizados no recesso superior da cavidade nasal, dentro de um neuroepitélio que envolve a lâmina crivosa, parte superior e média do osso etmóide e septo nasal (HUARD et al., 1998). Em anfíbios, o neuroepitélio é fino e plano, enquanto em roedores, carnívoros e outros mamíferos, encontra-se distribuído sobre

uma superfície caracterizada por um complexo de pregas turbinadas que se originam do osso etmóide (CARR et al., 1991).

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

Em seus estudos, Hinds et al. (1984); Mackey-Sim e Kittel (1990) descreveram essas células exercendo um papel fundamental para o entendimento dos mecanismos de degeneração e regeneração dentro do neuroepitélio olfatório, visto que pesquisas recentes descrevem que muitos receptores celulares são observados durante toda vida, apesar da contínua neurogênese regulada por fatores endógenos e exógenos que promovem a morte e o restabelecimento de células-tronco progenitoras.

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de melhor compreender o mecanismo de diferenciação dessas células (TEMPLE, 2001; GAGE et al., 2002; WAGERS; WEISSMAN, 2004). Os primeiros estudos trataram das células-tronco mesenquimais e primeiramente foram descritos por Friedenstein (1974). Estas são precursoras multipotentes capazes de se diferenciar em muitos outros tipos celulares de origem mesodermal, incluindo condrócitos, osteócitos, adipócitos, miócitos e células estromais da medula óssea (COVAS et al., 2005).

Embora, anteriormente fosse pensado que o potencial de diferenciação estivesse restrito apenas a esses tipos celulares, recentemente, tem-se relatado muito sobre a habilidade dessas células em originar tipos celulares de outros órgãos e tecidos, tais como hepático, renal e cardíaco (FORBES et al., 2002).

As células-tronco mesenquimais podem ser obtidas de vários locais no adulto, feto (ANKER et al., 2003), fluido amniótico, placenta ou cordão umbilical (ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000). De outro modo, estudos relataram a presença destas células em outras regiões, tais como a parede da aorta em bovinos, demonstrando grande potencial de diferenciação (TINTUT et al., 2003).

Nesse contexto, a possibilidade de se estudar os processos de diferenciação celular a partir de uma célula pluripotente motivou este estudo, a fim de se verificar a plasticidade das células isoladas a partir do epitélio olfatório, utilizando-se o cão como modelo animal, buscando contribuir para a elucidação das dúvidas ainda existentes na compreensão dos mecanismos de regeneração e produção dessas células.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Sistema Olfatório representa uma das modalidades sensoriais mais antigas na história filogenética dos mamíferos (SHIPLEY; ENNIS, 1996). A olfação é menos desenvolvida nos seres humanos do que na maioria dos animais, como os roedores, por exemplo. Como um sensor químico, este sistema detecta informações ambientais das mais diversas, dentre elas a alimentação, influências sociais e ainda, o comportamento sexual (MORRISON; COSTANZO, 1990).

De acordo com Huard et al. (1998), este sistema inclui todas as estruturas envolvidas no mecanismo da respiração, sendo caracterizado também pelas estruturas anatômicas e histológicas associadas a quimiorreceptores sensíveis e adaptados ao olfato. Segundo Vassar (1993), o epitélio olfatório encontra-se localizado na cavidade nasal, caracterizado por uma camada de epitélio ciliar colunar pseudoestratificado, composto por células globosas que se encontram distribuídas por todo o trato olfatório, com exceção da área quimiosensorial.

Em seus estudos, Buck e Axel (1991) descreveram o epitélio olfatório na parte dorsal das cavidades nasais, onde encontramos as lâminas turbinadas do osso etmóide, recobertas por um epitélio pseudoestratificado colunar alto, que embora com característica ciliada, apresenta-se especializado para quimiorrecepção. Jafek et al. (2002) também o descreveram em humanos como um epitélio pseudoestratificado colunar, que repousa sobre uma suave lâmina própria, contendo glândulas de Bowman, envolvendo as regiões de cartilagem e osso. Este apresenta o maior número de tipos celulares, receptores olfatórios bipolares ciliados, células microvilares, células sustentaculares e células basais. Todas, com exceção das

células basais, projetam-se para superfície. Contudo, em processos degenerativos e inflamatórios, estas podem também ser vistas na superfície.

Maslov et al. (2004) definem células-tronco neuronais como um conjunto de células capazes de gerar tecidos ou são derivadas do sistema nervoso, apresentando alguma capacidade para auto-renovação e podem dar origem a outras células através de divisão assimétrica.

A descoberta das células-tronco neuronais foi rodeada por estudos clássicos sobre hematopoiese e desenvolvimento neural de invertebrados, os quais inspiraram avaliações através de progenitores celulares simples (TEMPLE, 2001).

De acordo com Li e Xie (2005), as células-tronco neuronais são subtipos de células progenitoras no sistema nervoso que promovem auto-regeneração e geração tanto de neurônios quanto de células gliais. Estudos iniciais levaram ao seu isolamento a partir do sistema nervoso central e periférico de embriões de mamíferos.

Desde então estas têm sido isoladas de inúmeras regiões do sistema nervoso, indicando, assim, sua ubiquidade. Além disso, células-tronco neuronais adultas também foram encontradas em duas regiões neurogênicas principais, o hipocampo e a zona sub-ventricular, bem como em algumas regiões não neurogênicas, tais como o cordão espinhal (MARMUR et al., 1998; IWAI, 2003; WAGERS, 2004).

Hall e Hall (1989); Temple (1989); Kirschenbaum (1994) e Gritti et al. (1996) demonstraram em seus estudos a capacidade de auto-renovação destas células, apresentando a propriedade de se definir indefinidamente e o potencial de produzir uma ou mais linhagens progênicas.

O epitélio olfatório apresenta grupos de neurônios capazes de regeneração, bem como alguns elementos de sustentação e gliais. Estas células olfatórias possuem longos cílios modificados que se estendem para o lúmen da cavidade nasal, nos quais carregam superfícies receptoras para estímulos químicos perceptíveis através da olfação (MENCO; JACKSON, 1997). Algumas doenças e certos tipos de injúrias fisiológicas podem provocar a morte dessas células, levando então à perda da sensibilidade olfatória (KOVACS; CAIRNS; LANTOS, 1999).

Os receptores olfatórios de neurônios dão origem a componentes sensoriais do epitélio olfatório, projetando terminações dendríticas apicais terminais em cílios sensoriais para a superfície da mucosa, emitindo um axônio basalmente, através do qual são transmitidos sinais odorantes para o bulbo olfatório (HANSEL et al. 2001).

Consoante às informações de Feron et al. (1999), a ativação dessas células parece ser induzida através de estresse bioquímico ou mecânico, levando subgrupos de células-tronco a se diferenciar em receptores celulares olfatórios maduros e neurônios diferenciados, enviando sinais de retorno que informam as células progenitoras neuronais sobre o número de novos neurônios necessários para manter o equilíbrio da população celular. Holcomb et al. (1995) relatam que a apoptose celular tem sido observada em todos os estágios de regeneração, indicando que a regulação do número de neurônios pode ocorrer em múltiplos estágios da linhagem. Em seus estudos, Weiler e Farbman (1999) demonstram que células mitrais do bulbo podem conter substância atrófica que auxilia na manutenção da sobrevivência dos receptores olfatórios neuronais.

O epitélio olfatório é composto por três tipos celulares principais associados aos órgãos sensoriais. Os neurônios sensoriais, que correspondem a 75 a 80% da população das células epiteliais; as células de suporte ou sustentaculares, que

representam 15 a 17 % dessa população; e as células basais (células globais basais e células horizontais basais), compondo o restante (FARBMAN, 1990).

Dentro desse epitélio, residem conjuntos de células-tronco capazes de dar origem a novos neurônios durante toda a vida, conferindo ao epitélio olfatório a capacidade de repor os receptores olfatórios de neurônios (ORNs) após algum dano (MACKAY-SIM; KITTEL, 1991).

As células neuronais podem ser caracterizadas, de acordo com suas características de capacidade de renovação, diferenciação e habilidade de regenerarem tecidos danificados (RIETZE et al., 2001). Essas características podem ser encontradas em culturas de tecidos embrionários cerebrais de murinos, bem como em tecidos cerebrais humanos tratados através de técnicas de explantes.

Pagano et al. (2000) discutiram sobre a intensa capacidade proliferativa da zona sub-ventricular, servindo como fonte de células-tronco neuronais que migram para o bulbo olfatório. Estes mesmos autores demonstraram a capacidade de multipotencialidade dessas células e sua capacidade de gerar neurônios, oligodendrócitos e astrócitos por imunoreatividade neuronal a β -tubulina III, GALC e GFAP, respectivamente.

Reubinoff et al. (2001) demonstraram que populações altamente enriquecidas com progenitores neuronais podem derivar 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.

Estudos realizados por Graziadei e Graziadei (1979); Calof e Chikaraishi (1989) e Huard et al. (1998) demonstraram que os receptores olfatórios de neurônios encontram-se localizados no compartimento celular basal do epitélio olfatório. De

acordo com DeHamer et al. (1994); Shou et al. (1999) e Mahanthappa e Schwarting (1993), as células globais basais têm sido caracterizadas como precursoras neuronais dos receptores olfatórios de neurônios. Estas células são neurogênicas e sua diferenciação pode ser regulada pela presença de proteína óssea morfogenética e pelo FGF2. Em contraste, suas células vizinhas, as células horizontais basais, caracterizam-se como uma população relativamente quiescente, embora responsivas ao fator de crescimento epidermal (EGF) e ao fator transformador de crescimento (TGF α).

Outros estudos, realizados em ratos, por Calof et al. (2002) demonstraram um mecanismo de diferenciação onde células-tronco dão origem a células progenitoras amplificadoras, que por sua vez expressam um gene pró-neural denominado Mammalian Achaete Scute Homolog 1 (*Mash1*). Este dá origem a um segundo progenitor amplificador transitório, o precursor neuronal imediato (INP), que pode ser distinguido pela expressão do gene proneural neurogenina 1 (*Ngn1*). O precursor neuronal imediato divide-se para dar origem a duas células irmãs que por fim se diferenciam em receptores olfatórios de neurônios.

As células sustentaculares desse epitélio olfatório apresentam-se semelhantes às células gliais do cérebro (FARBMAN, 1992). Cada um desses tipos celulares ocupa posições diferentes dentro do neuroepitélio: as células-tronco e as células amplificadoras transitórias são encontradas no compartimento basal, em íntima relação com a lâmina basal do epitélio, enquanto as células sustentaculares formam a camada apical do epitélio olfatório, adjacente a cavidade nasal. Os receptores olfatórios de neurônios encontram-se localizados na zona intermediária, localizada entre a camada basal e apical. Estruturalmente, o neuroepitélio olfatório assemelha-se ao neuroepitélio embrionário que dá origem ao sistema nervoso

central, contudo muito mais simples que ele, visto que produz um único tipo de neurônio (KAWAUCHI, 2004).

Carter, Macdonald e Roskam (2004) sugeriram que a sub-população de células horizontais basais (HBCs) residem no micro-ambiente remanescente de outros nichos de células-tronco. Isto, combinado com as análises retrospectivas de sua capacidade proliferativa, tem sido utilizado para argumentar que as HBCs representam uma população de células-tronco, embora não pareçam expressar nenhum marcador de progenitores neuronais ou marcadores de células-tronco multipotenciais.

Entretanto, Caggiano, Kauer e Hunter (1994) e Huard et al. (1998) sugerem que as células-tronco do epitélio olfatório residem no meio das células globais basais. Experimentos *in vitro* realizados por Calof e Lander e Rim (1998) revelaram a presença de células-tronco neuronais em uma pequena sub-população de células globais basais, indicando que estas células são responsivas a FGF2. Desta forma, o volume de elementos que aparece sustenta a idéia de que, ao menos para aquelas células que foram estabelecidas no epitélio de roedores, as células-tronco neuronais do epitélio olfatório são sub-populações de células globais basais.

Doetsch, Garcia-Verdugo e Alvarez-Buylla (1997); Chiasson et al. (1999) e Reynolds (2005) sugeriram as HBCs como sendo análogos às células ependimais que envolvem o ventrículo do cérebro de mamíferos no período pós-natal. As HBCs e as células ependimais são similares em muitos aspectos: ambas as células raramente se dividem e são capazes de se propagar e gerar “neurosferas” em cultura, encontrando-se localizadas em aposição íntima com as células progenitoras neuronais.

Lim et al. (2000) consideram que a posição das HBCs dentro do epitélio olfatório é comparável com a localização das células endodimais dentro da zona sub-ventricular e que estas últimas contribuem secretando substâncias reguladoras importantes para neurogênese. É possível que as HBCs também sejam responsáveis em criar um ambiente neurogênico para as camadas adjacentes supra-basais, onde se encontram as verdadeiras células-tronco.

Embora muitas pesquisas venham sendo realizadas, inúmeras dúvidas ainda pairam sobre os mecanismos de diferenciação das células do neuroepitélio olfatório. As células sustentaculares, por exemplo, residem em uma camada simples na superfície apical desse epitélio. Estas possuem finas projeções citoplasmáticas que terminam na lâmina basal (FARBMAN, 1992). Foram verificadas participando do metabolismo de componentes estranhos presentes no ar, sugerindo para elas uma função de detoxicação de substâncias nocivas a que o epitélio olfatório possa ser exposto (SUZUKI; TAKEDA; FARBMAN, 1996). Outra função estaria relacionada com mecanismos de fagocitose de receptores olfatórios de neurônios mortos, tais como as células da glia no cérebro, provavelmente também produzindo suporte estrutural para as ORNs (BEITES et al., 2005).

A utilização de marcadores tem auxiliado na elucidação das dúvidas sobre as células sustentaculares. Alguns anticorpos como SUS1 e o SUS4 marcam a camada de células sustentaculares, mas não marcam as camadas localizadas abaixo dela, sugerindo que os receptores olfatórios de neurônios e as células sustentaculares representam linhagens celulares separadas (GOLDSTEIN; SCHWOB, 1996; HEMPSTEAD; MORGAN, 1983). Outras pesquisas sustentam a idéia de que estas células encontram-se relacionadas às células globais basais e a neurônios, visto que

em alguns experimentos foram observadas compartilhando marcadores comuns com linhagens celulares do neuroepitélio olfatório (MURRAY et al., 2003).

Segundo Murray et al. (2003), mais recentemente, pesquisas genéticas e experimentos de transplantação promoveram evidências de que as células sustentaculares e as ORNs compartilham de um progenitor bipotencial comum, onde mesmo interrompendo a via de diferenciação dos INPs e ORNs, ainda assim o epitélio olfatório apresentou células que apresentaram expressão de marcadores moleculares tanto para *Mash1 3' UTR* quanto para células sustentaculares. Em seus estudos Chen, Fang e Schwob (2004) verificaram a presença de células expressando *mash1* entre a população células globais basais, sugerindo também a presença de células-tronco na mesma região. Em experimentos em que células globais basais foram transplantadas para o epitélio olfatório, estas pareceram dar origem tanto a ORNs quanto a células sustentaculares.

A identificação das células componentes de sistema progenitor do epitélio olfatório, responsável pela reposição tecidual do epitélio olfatório, tem sido realizada através de técnicas de marcação de atividade proliferativa. Levey et al. (1991) e Getchell et al. (2000) retrataram o mecanismo de diferenciação basal de células do epitélio olfatório em ratos. Através de técnica de imunohistoquímica, com marcação positiva para citoqueratinas, puderam identificar preferencialmente células horizontais basais (HBC's), que foram observadas povoando uma região paralela e em contato com a lâmina própria. Em seus experimentos, esses mesmos autores observaram marcação pouco significativa para as células globais basais presentes em regiões mais superficiais.

A técnica de imunohistoquímica também foi utilizada por Higuchi et al. (2005) na identificação e caracterização de células-tronco progenitoras das células

receptoras olfatórias. Nesse estudo, através de marcação positiva para BrdU e citoqueratina, observaram que estas células estão freqüentemente em divisão, presentes acima da camada de células basais.

Outros autores como Jim et al. (2002) estudaram através de modelos de isquemia em culturas neuronais que a hipóxia estimulava a incorporação de BrdU dentro de células que co-expressavam marcadores fenotípicos de proliferação celular (SCF e FGF-2) e neurônios imaturos, sugerindo que exista a possibilidade destas células de se diferenciarem em neurônios funcionais maduros.

Através do estudo ultra-estrutural do epitélio olfatório de ratos jovens e adultos, Suzuki et al. (2000) identificaram todos os tipos celulares presentes no epitélio olfatório (células olfatórias, células de suporte, células globais basais e células horizontais basais), por meio de microscopia eletrônica de transmissão, em ratos entre 3 a 10 dias de vida.

De acordo com esses mesmos autores verificaram-se através de imunohistoquímica positiva para BrdU, que entre os 10 e 21 dias de vida, as células olfatórias e as células globais basais haviam desaparecido do epitélio olfatório, sugerindo que este epitélio, composto por células de suporte e globais basais, é gerado a partir de morte apoptótica de células olfatórias e células globais basais durante o desenvolvimento pós-natal, corroborando com os estudos de Legrier et al. (2001), quando avaliaram a neurogênese do epitélio olfatório em ratos com marcações positivas para BrdU e PCNA, onde perceberam que o número de divisões celulares diminuem em ratos de três semanas, quando comparados aos de um mês de idade.

Em um outro estudo ultra-estrutural a partir de tecido olfatório obtido de cadáveres humanos, Roisen et al. (2001) identificaram estas mesmas estruturas,

confirmando a presença de receptores neuronais olfatórios através de técnicas de imunolocalização, pela presença de β - tubulina III e proteínas associadas à microtúbulos-2 (MAP2ab), presentes em seus filamentos. Estes mesmos autores relataram que após 2 a 3 dias de cultura, as células do epitélio olfatório apresentaram-se pobremente aderidas, parecendo crescer em suspensão, tendendo a formar colônias de 20 a 80 células ou muitas vezes dispostas em pares, sugerindo que estas células estariam em telófase tardia ou citocinese.

Pagano et al. (2000) estabeleceram culturas de células do bulbo olfatório humano, utilizando meio de cultura de baixa densidade, a fim de evitar agregamento celular. Associando EGF e FGF, determinaram que para essa cultura apenas 1% das células correspondiam a células-tronco, obtendo aumento significativo de células-tronco do bulbo olfatório após 15 dias *in vitro*, verificando ainda que a proporção de proliferação tornava-se significativamente maior após 20 dias de cultura.

Em estudos realizados através de cultivo celular do bulbo olfatório de ratos, em presença de EGF e β -FGF, Chen et al. (2004) constataram atividade proliferativa dependente a esses dois fatores, contudo de maior significância na presença de EGF. Quando realizada a imunomarcagem para células-tronco neuronais, estes mesmos autores observaram que a capacidade de diferenciação celular é maior em ratos de um dia de vida, quando comparados aos adultos.

Estudos realizados por Zhang et al. (2004) obtiveram células formadoras de neurosféricas a partir de culturas primárias do epitélio olfatório humano estabelecidas em meio mínimo essencial (MEM), (DEMEM/F12 associado à 10% de gentamicina), BDNF (DF associado a 1% N2) e B27 (DF associado a 2% de B27). Tais células foram obtidas 20 horas após o início do cultivo, com culturas que puderam chegar

até 200 passagens. Estes autores observaram um maior crescimento celular quando utilizado DF. Contudo, a maior viabilidade celular foi verificada utilizando-se DFN2 e DFb27, quando comparadas aos cultivos utilizando apenas DF.

Em outro estudo, Uchida et al. (2000) conseguiram isolar células-tronco do sistema nervoso central de humanos (hCNS-SC) usando anticorpos para marcadores de superfície como o CD133⁺, CD34⁻, CD45⁻ e CD24⁻ e células caracterizadas sobre fluorescência. A partir desse experimento, observaram que cultivos celulares de neurosféricas humanas são iniciados a partir de um raro subconjunto de células que expressão as moléculas de superfície CD133⁺, CD34⁻, CD45⁻ e CD24⁻, podendo se diferenciar em neurônios ou células da glia.

Marshall et al. (2005) estabeleceram uma proposta de pesquisa, onde buscaram caracterizar tipos de progenitores derivados do epitélio olfatório humano. Para isso, desenvolveram sub-culturas de células formadoras de neurosféricas (NSFCs), cultivadas por 200 passagens, com um ciclo mitótico de 18 a 20 horas. Estes mesmos autores observaram que os níveis de telomerase e atividade apoptótica permaneceram relativamente constantes em 12 linhagens de NSFC, independentemente da idade do doador ou sexo.

Zhang et al. (2006) avaliaram o potencial de diferenciação de células formadoras de neurosféricas obtidas a partir do neuroepitélio olfatório humano de cadáveres de indivíduos adultos por meio de biópsia endoscópica (NSFCs).

Suas observações demonstraram que, embora as células-tronco neuronais dêem origem a uma variedade de fenótipos neuronais e gliais, estas tendem gradualmente a perder suas características progenitoras, previamente reportado por Gallo e Armstrong (1995), durante este processo de diferenciação e ganhando propriedades de oligodendrócitos maduros. A análise realizada através de dois

fatores de transcrição (Olig2 e Nkx2.2) em NSFCs revelou que apenas a transfecção simultânea destes dois fatores geram sinalização suficiente para determinar a expressão fenotípica de linhagens de oligodendrócitos, incluindo a detecção de proteína mielínica básica.

Em outro estudo, Zhang et al. (2006) demonstraram que durante o tratamento com ácido retinóico, Shh (Sonic hedgehog) e FN (Forskolin), as células NSFCs respondem a sinalização desses fatores neurotróficos expressando antígenos neuronais, incluindo NF (Neurofilamentos), NeuN (Neuronal Nuclei), VACHT (Acetilcolina vesicular), ChAT (Colina acetiltransferase) e fatores de transcrição de motoneurônios (HB9 e Isl1/2), exibindo elevado nível de neuritogênese.

Segundo Diez Del Corral et al. (2003) e Li et al. (2005), a combinação desses sinais induziu uma pequena porcentagem de NSFCs a expressar tiroxina hidroxilase (uma enzima reguladora da síntese de dopamina), sugerindo a interessante possibilidade de seu uso como fonte de células no tratamento de processos degenerativos de ordem neurológica, como a doença de Parkinson.

Em culturas realizadas por mais de 8 meses e mais de 70 passagens, estudos imunohistoquímicos realizados por Viktorov et al. (2006) demonstraram que a maioria das neurosféricas eram compostas por células-tronco neuronais e progenitores celulares que expressavam β -tubulina III, nestina, MAP2ab, NCAM, periferrina (proteína de filamento celular intermediário derivado da crista neural) e marcadores de receptores de tirosinaquinase para neurotrofinas (Trk A, B).

De outro modo, Harley, Futcher e Greider (1990); Yang et al. (2001) e Frankfurt e Krishan (2001) estudaram a atividade de telomerase em cultivos celulares de células-tronco empregando o método ELISA em diferentes linhagens e passagens, através dos níveis de apoptose nestas populações.

A apoptose constitui-se como processo chave pelo qual ocorre a morte celular durante um período específico, de maneira controlada (DEGTEREV; BOYCE; YUAN, 2003). A morte celular programada é evidente em tecidos embrionários, bem como em tecidos em homeostase. A condensação nuclear de DNA (cromatina) e a fragmentação nuclear têm sido consideradas indicadores proeminentes de apoptose (FRANKFURT; KRISHAN, 2001; ROISEN et al., 2001), característica esta que permite a distinção entre apoptose e necrose.

Em cultura, as células-tronco retêm sua capacidade de se dividir por períodos prolongados, permanecendo em um estado indiferenciado, não exibindo atividade apoptótica, como é observado nas células somáticas, que apresentam expectativa de vida limitada (BRAND; VAN-ROESSEL, 2003). Assim sendo, o nível de apoptose também pode indicar populações progenitoras e de células-tronco.

Nesse contexto, Israels e Israels (1999) discorreram sobre as caspases cisteínicas como proteases que desenvolvem um papel crítico no mecanismo de apoptose. Elas regulam a clivagem de proteínas citoesqueléticas, a ruptura da membrana nuclear e a fragmentação do DNA. Deste modo, uma caspase ativa uma segunda, numa cascata proteolítica, ou sofrendo auto-ativação para iniciar a apoptose, servindo também como um indicador adicional de atividade apoptótica.

Objetivos

3 OBJETIVOS

Alcançar novos conhecimentos dentro do estudo de células-tronco oriundas das mais diversas regiões do organismo, sendo necessário lançar mão de ferramentas de estudo morfológicos e biológicos para a aquisição de informações sobre estes elementos e de sua aplicação tanto em modelos animais, quando em humanos.

3.1 Objetivo geral

Avaliar o nível de plasticidade de células-tronco isoladas a partir do epitélio olfatório em cães sem raça definida (*Canis familiaris*), mediante a caracterização e diferenciação dos principais tipos celulares observados em cultura.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os tipos morfológicos celulares componentes do epitélio olfatório de cães sem raça definida.
- Estabelecer um protocolo de isolamento de células-tronco a partir do epitélio olfatório desses animais.
- Estabelecer marcadores moleculares para caracterização da população de células-tronco isoladas do epitélio olfatório.
- Testar protocolos de diferenciação celular para a população de células-tronco isoladas em cultivo.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 24 cães sem raça definida (*Canis familiaris Linnaeus, 1758*) e de ambos os sexos, sendo este número composto por 12 cães adultos, pesando em média 20 kg, com idade variando entre um e três anos e 12 cães com 60 dias de vida intra-uterina. Todos os cães foram provenientes do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-USP.

4.1 Fixação e Inclusão do Material

As amostras foram fixadas em Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) por 24 horas e posteriormente acondicionadas em álcool à 70%. Parte dos fragmentos obtidos também foi armazenado em solução de Glutaraldeído à 2,5%, a fim de serem utilizados para posterior análise sob microscopia de transmissão. Para microscopia de luz, as amostras fixadas em Metacarn foram incluídas em parafina e os cortes histológicos foram obtidos com 5 µm de espessura.

4.2 Observação do epitélio olfatório através de Microscopia de Luz

4.2.1 Coloração por hematoxilina-eosina

Realizou-se procedimento padrão para coloração por Hematoxilina-eosina. Primeiramente procedeu-se a desparafinização através do xilol, passando por concentrações decrescentes de álcoois, desde o 100% até o 50%, na seguinte seqüência:

- Xilol I – 10 minutos

- Xilol II – 10 minutos
- Álcool 100 % I – 3 minutos
- Álcool 100 % II – 3 minutos
- Álcool 95 % – 3 minutos
- Álcool 70 % – 3 minutos
- Álcool 50 % – 3 minutos
- Lavagem em água corrente – 5 minutos
- Hematoxilina de Harris – 3 minutos
- Lavagem em água corrente – 5 minutos
- Eosina – 30 segundos
- Lavagem em água corrente – 5 minutos

Posteriormente, realizou-se a diafanização através do processo inverso, desde álcool até o xilol, utilizando-se as mesmas concentrações e tempos. A montagem das lâminas foi realizada com resina Citoseal.

4.2.2 Coloração por Azul de Toluidina

A coloração Azul de Toluidina foi realizada para os cortes semi-finos de 600 nm, em ultra-micrótomo¹, para uma avaliação mais adequada da natureza do epitélio estudado, bem como para a seleção da região a ser observada sob microscopia eletrônica de transmissão. Procedeu-se o processo de desparafinização, segundo protocolo padrão para confecções de cortes semi-finos, na seguinte seqüência:

- Xilol 1 – 5 minutos
- Xilol 2 – 5 minutos
- Álcool 100% – 5 minutos
- Álcool 90% – 5 minutos
- Álcool 70% – 5 minutos
- Água destilada – 15 minutos
- Toluidina – 3 minutos
- Retirou-se o excesso com água destilada
- Água destilada – 15 minutos

¹ Leica Ultracut UCT

- Eosina – 5 minutos
- Retirou-se o excesso com água destilada

Posteriormente, seguiu-se o protocolo para diafanização do material através de passagens rápidas, desde o álcool até o xilol, na sequência que segue:

- Álcool 70% – rápido
- Álcool 90% – rápido
- Álcool 100% – rápido
- Álcool 100% – rápido
- Álcool 100% – rápido
- Xilol 1 – 5 minutos
- Xilol 2 – 5 minutos

A montagem das lâminas foi realizada de modo semelhante àquela feita para as lâminas coradas em técnica de coloração por Hematoxilina-eosina, utilizando-se resina Citoseal.

4.2.3 Coloração por técnica de PAS (Ácido Periódico de Schiff)

Para a verificação quando a presença de glicosaminoglicanos nos produtos de secreção glandular do epitélio olfatório utilizou-se a técnica de PAS, de acordo com protocolo laboratorial padrão, primeiramente procedendo-se a desparafinização, como segue:

- Xilol I – 10 minutos
- Xilol II – 10 minutos
- Álcool 100 % I – 3 minutos
- Álcool 100 % II – 3 minutos
- Álcool 95 % – 3 minutos
- Álcool 70 % – 3 minutos
- Álcool 50 % – 3 minutos
- Ácido Periódico a 1% – 10 minutos

- Água corrente – 5 minutos
- Reagente de Schiff – 60 minutos
- Água sulfurosa – 03 três banhos sucessivos de dois minutos cada
- Água corrente – 15 minutos
- Hematoxilina – 1 minuto
- Água corrente – 5 minutos

A diafanização segue através de passagens rápidas, desde o álcool até o xilol:

- Álcool 70% – rápido
- Álcool 90% – rápido
- Álcool 100% – rápido
- Álcool 100% – rápido
- Álcool 100% – rápido
- Xilol 1 – 5 minutos
- Xilol 2 – 5 minutos

A montagem das lâminas foi realizada de modo semelhante àquela feita para as lâminas coradas para as demais técnicas, utilizando-se resina Citoseal.

4.3 Observação da divisão celular no epitélio olfatório por imunohistoquímica

O epitélio olfatório excisado a partir da parte posterior até a porção superior do septo nasal foi desidratado com álcool, emblocado em parafina e cortado em secções de 5µm.

Os cortes histológicos foram submetidos a um protocolo modificado de desparafinização, adaptado à técnica de imunohistoquímica para detecção do índice de proliferação celular pelo método de PCNA e Ki67, como segue:

- Xilol I – 10 minutos
- Xilol II – 10 minutos

- Álcool 100 % I – 5 minutos
- Álcool 100 % I – 5 minutos
- Álcool 100 % + H₂O₂ a 3% – 20 minutos
- Álcool 95 % I – 5 minutos
- Álcool 70 % I – 5 minutos

Em seguida foram realizadas três lavagens de 5 minutos em água destilada, procedendo-se o desmascaramento do antígeno em Tampão Citrato levado ao microondas em potência máxima, durante 15 minutos, deixando resfriar sob temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse momento, realizaram-se três lavagens sucessivas de 5 minutos em PBS e adicionado Protein Block (Spring Bioscience, Cat. N° DPB-125) para o bloqueio da peroxidase endógena. Daí, procedeu-se a incubação dos cortes com os anticorpos monoclonais PCNA (Santa Cruz Biotechnology, G1607) e Ki67 (DAKOcytation, M7240), na concentração de 1:100 e 1: 30, respectivamente, overnight.

Após três lavagens de cinco minutos cada com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo biotinilado de cabra anti-camundongo (Dako, Cat. K0690), por 45 minutos. Depois, os cortes foram tratados com o complexo estreptavidina-peroxidase por 45 minutos. Seguiram-se três lavagens de cinco minutos cada com PBS, após as quais os cortes foram revelados com diaminobenzidina (2mL de DAB + 1,5µL de H₂O₂), observando-se a reação num intervalo de um a cinco minutos. (acrescentar Kit LSAB).

As lâminas foram submetidas à coloração de fundo pela hematoxilina e montadas com o Bálsamo do Canadá. A observação foi realizada com o microscópio Olympus BX60 do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP) e as imagens capturadas através da câmera de vídeo AXIOcam HRc-Zeiss, com a ajuda do programa Image Proplus, utilizando objetiva de 20x, 40x, 60 e 100x.

4.4 Observação da divisão celular no epitélio olfatório por microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão, o material, previamente coletado em glutaraldeído 2,5%, foi submetido a três passagens de 10 minutos em tampão fosfato 0,1 M, sob agitação contínua. A seguir, lavado em três passagens de 10 minutos em água destilada. Dando continuidade à técnica, adicionou-se uranila, que permaneceu sob agitação por uma hora, em câmara escura. Após esse momento, procederam-se mais três passagens de 10 minutos em água destilada.

Iniciou-se, então, o processo de desidratação do material, através de passagens em concentrações crescentes de álcool, de 50% até 100%, segundo a seqüência abaixo:

- Álcool 50 % – duas passagens de 5 minutos
- Álcool 60 % – duas passagens de 5 minutos
- Álcool 70 % – duas passagens de 5 minutos ou **overnight**
- Álcool 90 % – duas passagens de 5 minutos
- Álcool 95 % – duas passagens de 5 minutos
- Álcool 100 % – duas passagens de 5 minutos

Desidratado, adicionou-se ao material óxido de propileno em três passagens de 5 minutos. Após esse tempo, adicionou-se resina de araldite, submetida à pré-filtração, segundo especificações abaixo:

- (recipiente fechado) Duas partes de propileno – uma parte de resina durante uma hora;
- (recipiente fechado) Uma parte de propileno – uma parte de resina durante 3º minutos;
- (recipiente aberto) Uma parte de propileno – duas partes de resina durante duas horas e meia.

A seguir, adicionou-se resina pura (em estufa a 70°C por um dia), que permaneceu em recipiente aberto e sob agitação durante duas horas ou **overnight**, para que pudesse ocorrer a evaporação do excesso de óxido de propileno.

A resina para inclusão foi submetida ao vácuo por 30 minutos e deixada na estufa a 37 °C por 10 a 15 minutos, antes da inclusão do material. Após a secagem do material, procedeu a confecção das telas para leitura em microscópio eletrônico de transmissão².

4.5 Protocolos de Cultivo celular

Dada a inexistência de protocolos definidos para o cultivo de células animais, especialmente de regiões específicas, como o epitélio olfatório, foram testadas aqui adaptações de protocolos já descritos na literatura e cultivos de células humanas e camundongos.

4.5.1 Protocolo proposto inicialmente para cultivo de células do epitélio olfatório de cães sem raça definida adultos e com 60 dias de vida intra-uterina

Fragmentos do epitélio olfatório foram excisados a partir da parte posterior até a porção dorsal da porção olfatória do epitélio nasal, sobre a lâmina crivosa do osso etmóide. Estes foram lavados três vezes em solução salina a 0,9% e em seguida transportado ao Laboratório de Cultivo Celular do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP em placa de Petri com PBS acrescido de penicilina-estreptomicina a 3% (Invitrogen, Cat. Nº 15140-122). Sob atmosfera estéril, em fluxo laminar, os fragmentos foram

² Philips Morgagni 268 D

lavados três vezes em solução de PBS acrescida de penicilina-estreptomicina a 3%. A seguir, os fragmentos foram submetidos à dissociação mecânica por lâmina de bisturi nº 23 e postos em cultura em garrafas de 25 cm², contendo meio D-MEM High glicose (Invitrogen, 10313-039), suplementado com soro fetal bovino (Invitrogen 10437-077), sob atmosfera contendo CO₂-95% à 37°C, sendo avaliado 24, 48 e 72 horas após início do cultivo.

4.5.2 Modificação do protocolo inicial para cultivo de células do epitélio olfatório de cães sem raça definida adultos e com 60 dias de vida intra-uterina

Os fragmentos do epitélio olfatório foram obtidos do mesmo modo, como proposto em 4.5.1, contudo foram lavados seis vezes em solução salina a 0,9% acrescida de penicilina-estreptomicina a 3% (Invitrogen, Cat. Nº 15140-122). Após isso, os fragmentos foram macerados mecanicamente, embebidos em meio de cultura e submetidos à técnica de cultivo celular denominada “explante”. Esta consistiu na dispersão dos fragmentos de 1 mm³, após maceração no fundo da garrafa de cultura, retirando-se o meio de cultura utilizado para maceração através de micropipeta ou pipeta de Pasteur. Em seguida, a garrafa era invertida (virada de ponta-cabeça) e levada à estufa a 37°C de CO₂ durante 3 horas ou até que houvesse a aderência dos fragmentos ao fundo da garrafa. Após esse tempo, a garrafa era reposicionada e adicionou-se meio suficiente para recobrir os fragmentos, incubando-os por 48 a 72 horas em estufa.

4.5.3 Protocolo definitivo para cultivo de células do epitélio olfatório de cães sem raça definida adultos e com 60 dias de vida intra-uterina

Fragmentos do epitélio olfatório foram excisados a partir da parte posterior até a porção dorsal da porção olfatória do epitélio nasal, sobre a lâmina crivosa do osso etmóide. O material foi lavado seis vezes em solução salina a 0,9% e em seguida transportado ao Laboratório de Cultivo Celular do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP em placa de Petri com PBS acrescido de penicilina-estreptomicina a 3% (Invitrogen, Cat. N° 15140-122).

Em fluxo laminar e sobre condições estéreis seguiu-se o protocolo de isolamento das células do epitélio olfatório. Os fragmentos obtidos foram submetidos a cinco passagens em PBS acrescido de penicilina-estreptomicina a 3%, dois minutos cada, até a completa retirada de fragmentos, células mortas e componentes sanguíneos, visando diminuir o índice de contaminação observado em cultivos celulares que são provenientes de materiais oriundos de ambientes não estéreis.

Posteriormente, os fragmentos foram separados em duas placas de Petri, uma contendo Tripsina-EDTA a 0,25% (Invitrogen, Cat. N° 25200-114) e outra contendo Colagenase I a 0,075% (Invitrogen, Cat. N° 17100-017) para serem submetidas à dissociação química e facilitar a liberação de células pelos fragmentos. A seguir, o conteúdo das placas foi levado à estufa por 30 minutos. Decorrido este tempo, foi inativada a reação enzimática sobre o material utilizando-se 2 mL de meio de cultura D-MEM/F-12 (Invitrogen, Cat. N° 10565-018) acrescido de Soro Fetal Bovino (Invitrogen Corporation, N° 16000-044, 1000 ml). Realizou-se a transferência do conteúdo para tubos tipo falcon com fundo cônico de 10mL, deixando sedimentar os fragmentos e retirando as células suspensas em meio de cultura, sem, no entanto aspirar o sobrenadante. Acrescentou-se 2 mL de meio aos fragmentos. A partir daí, ambos, fragmentos e células suspensas em meio de cultura foram centrifugados durante 5 minutos a 1000 rpm, sob temperatura de 20°C. Foi descartado o sobrenadante e o material foi então ressuspendido em 1 mL de meio de cultura, transferido para garrafas de 25 cm² (TPP, Switzerland) e cultivado em estufa

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

4.5.4 Concentração e viabilidade celular

Após a separação celular, a concentração e viabilidade das amostras foram determinadas através do método de exclusão do Azul de Trypan, conforme previamente descrito por Freshney (2000). Após adição e homogeneização de 20 µl da suspensão celular em 20 µl da solução de Azul de Trypan (50 µl de cloreto de sódio 4,25% em 200 µl de Trypan Blue), uma alíquota de 15 µl foi levada ao hematocítômetro e observada em microscópio óptico (objetiva de 10X).

A concentração celular foi determinada pela contagem das células em 4 campos diagonais, sendo o total de células vivas multiplicado por 2 (diluição do corante) e por 10⁴ (profundidade da câmera e correção por ml), dividindo-se esse valor pelo número de quadrantes contados do hematocítômetro, conforme demonstrado abaixo:

$$\frac{n \times \text{total de contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrantes contados}}$$

A viabilidade da amostra foi determinada pela relação entre a quantidade de células vivas (não coradas) e as quantidades totais de células, descartando-se as suspensões celulares com viabilidade inferior a 34%.

A mesma fórmula foi utilizada para realização da curva de crescimento. Esta consistiu de uma avaliação do crescimento médio de células cultivadas em três garrafas de cultivo, onde foram plaqueadas inicialmente em uma concentração de 1 x 10⁵ células/placa em garrafas de 25 cm². As garrafas foram tripsinizadas a cada três dias, o número de células era contado, voltando-se a mesma quantidade plaqueada inicialmente para garrafas de 25 cm². A curva de crescimento foi

realizada até que o número de células cultivadas caísse a um número inferior ao plaqueado no início da curva de crescimento. Os valores referentes ao número de células foram tabelados para a confecção da curva de crescimento.

4.5.5 Congelamento Celular

Para o congelamento das células provenientes do cultivo celular, as células do epitélio olfatório foram primeiramente dissociadas através da Tripsina-EDTA a 0,25% (Invitrogen, Cat. Nº 25200-114), o qual foi igualmente descrito anteriormente.

O “pellet” de células foi ressuspendido, rapidamente em meio de congelação. A concentração do meio utilizado foi 50% de D-MEM High glicose (Invitrogen, 10313-039), suplementado com 40% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen Corporation, Nº 16000-044, 1000 ml), 10% de DMSO (Vetec-cat. Cat. nº 590) e 1% (Invitrogen, Cat. Nº 15140-122).

As células foram acondicionadas em criotubos, sendo posteriormente transferidas em freezer a - 40°C *overnight*, aparelho Mister Froste. Após 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados.

4.6 Caracterização da população de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça com 60 dias de vida intra-uterina

Devido à natureza dos tecidos coletados a partir do epitélio olfatório de cães adultos (maior nível de contaminação), os protocolos de caracterização foram realizados apenas com células adquiridas a partir de cães com 60 dias de vida intra-uterina.

4.6.1 Citometria de fluxo

As células foram submetidas à citometria de fluxo em quarta passagem, a fim de garantir uma população de células suficientemente indiferenciada para sua caracterização analisando a expressão de proteínas de membrana por citometria de fluxo. A citometria de fluxo foi realizada utilizando o Guava EasyCyte System (Guava Technologies) com um laser azul (488 nm). As células foram tripsinizadas, seguida pela centrifugação 1200 x G por 5 minutos e ressuspensas em PBS a concentração de 1×10^5 células/mL. Para cada anticorpo, foram utilizadas 1×10^5 células. Estas foram incubadas no escuro por 45 minutos em temperatura ambiente e a quantidade de anticorpo dependeu das condições descritas pelo fabricante. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS e ressuspensas em 0,20 ml de PBS gelado. Para as amostras incubadas com anticorpos não conjugados foi utilizado o anticorpo secundário anti-mouse PE (Guava Technologies), as amostras foram incubadas por 15 minutos, lavadas 3 vezes com PBS e ressuspensas em 0,20 ml de PBS gelado. A viabilidade celular foi realizada utilizando o corante Iodeto de Propídio (20 µg/ml), que marca células com perda da integridade da membrana plasmática.

O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas. As células foram separadas pelo “forward scatter” para eliminar os debris. Para eliminar uma possível autofluorescência, os parâmetros foram ajustados de maneira a remover qualquer contribuição das células não marcadas. Para cada amostra, foram contados no mínimo 5000 eventos.

Foram analisados os marcadores: HLA-DR-PE, HLA-ABC-FITC, CD13-PE, CD29-PECy5, CD31-PE, CD34-PerCP, CD44-FITC, CD45-FITC, CD73 (SH3), CD90-PE, CD117-PE (BD Pharmingen), CD105 (SH2).

4.6.2 Imunofluorescência

Primeiramente, 3×10^5 células provenientes do cultivo celular primário do epitélio olfatório foram plaqueadas em placas de cultivo de 3mm de diâmetro, as quais continham uma lamínula de vidro. Após 24 horas, todo o meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas com PBS por 2 vezes de 5 minutos, para a retirada de todos debrís celulares; sendo, posteriormente, fixadas com paraformaldeído a 4% por 1 hora.

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

Para evitar reações inespecíficas, foi utilizado solução de BSA por 30 minutos. Após este período, as células foram encubadas “overnight” a 4°C com anticorpo primário, diluídos em PBS na proporção de 1:100, conforme descrito na tabela 1, abaixo:

Quadro 1- Anticorpos primários utilizados para a imunofluorescência

Anticorpo	Empresa	Origem
Vimentin (Type: V9, sc-6260), Dilution- 1:100.	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
Oct-4 (Sc-5279)- 1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
Cytokeratin 18 (RGE53)- 1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
β Tubulina III (TUBB3)- 1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
Integrina β 1(ITGB1)- 1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
ABCG2- 1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
SH2- 1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
SH3- 1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
SH4- 1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.

Passado este período, as células foram lavadas com TBS por 3 vezes por um período de 5 minutos cada. Em seguida, as células foram encubadas com anticorpo secundário anti-gouti conjugado com FITC 1:100 para Oct-4 e anti-mouse IgG (AP308F, Chemicon International, Temecula, CA, USA), conjugado FITC 1:100 por uma hora em câmara escura, para os demais anticorpos primários. As células foram novamente lavadas com TBS por 3 vezes de 5 minutos, seguida por uma lavagem em água destilada, sendo posteriormente montadas com solução de montagem Vectashield mais DAPI (ABCYS, Paris France). As células foram observadas no microscópio de fluorescência LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) em objetivas de 20x e 40x.

4.7 Diferenciação celular a partir de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina

Devido à natureza dos tecidos coletados a partir do epitélio olfatório de cães adultos (maior nível de contaminação), os protocolos de diferenciação foram realizados apenas com células adquiridas a partir de cães com 60 dias de vida intra-uterina.

4.7.1 Diferenciação osteogênica

Para este procedimento, as células previamente cultivadas foram plaqueadas em placas de seis poços em uma densidade inicial de 10^4 em cada poço, como meio de cultura basal (mesmo meio utilizado para o cultivo dessas células). As células plaqueadas permaneceram na estufa “overnight”. Observou-se a expansão celular até que estas cheguem a 70% de confluência. Após esse momento, realizou-se a troca do meio de cultura para o meio que induz a diferenciação, cuja composição é descrita na tabela 2, abaixo:

Quadro 2- Composição do meio de diferenciação osteogênica

Meio de Cultivo
DMEM – Low Glicose (1885-092)
Soro Fetal Bovino (Invitrogen 10437-077)
2-fosfato ácido ascórbico (50µM)
Antibiótico (1%)
Dexametasona (10^{-7} M)

O meio de diferenciação deve ser trocado para o meio de manutenção, cuja composição é descrita na tabela 3, abaixo:

Quadro 3- Composição de manutenção de diferenciação osteogênica

Meio de Cultivo
DMEM – Low Glicose (1885-092)
Soro Fetal Bovino (Invitrogen 10437-077)
2-fosfato ácido ascórbico (50µM)
Antibiótico (1%)

A partir daí, este meio deve ser trocado a cada três a quatro dias, na dependência da quantidade de “debris” na cultura. No décimo dia da diferenciação, um novo meio para a cultura foi preparado com as mesmas concentrações e todos os indutores osteogênicos anteriormente mencionados, contudo, suplementados com 200mM de β -Glicerolfosfato. A troca do meio ocorreu a cada três ou quatro dias e a cultura foi mantida até o vigésimo primeiro dia de diferenciação.

Após os 21 dias de diferenciação osteogênica, a cultura foi fixada em paraformaldeído a 4% e posteriormente submetida a coloração de Alizarin Red (SOTTILE, THOMSON e McWIR, 2003) e Von Kossa (CHENG et al., 1997), para a observação de depósito de cálcio intra-celular e deposição de matriz óssea extra-celular, corados em vermelho e negro, respectivamente.

4.7.2 Diferenciação adipogênica

Para este procedimento, as células previamente cultivadas foram plaqueadas em placas de seis poços em uma densidade inicial de 10^4 em cada poço, como meio de cultura basal (mesmo meio utilizado para o cultivo dessas células). As células plaqueadas permaneceram na estufa “overnight”. Observou-se a expansão celular até que estas cheguem a 70% de confluência. Após esse momento, realiza-se a troca do meio de cultura para o meio que induz a diferenciação, cuja composição é descrita na tabela 4, abaixo:

Quadro 4- Composição do meio de diferenciação adipogênica

Meio de Cultivo
DMEM – Low Glicose (1885-092)
Soro Fetal Bovino (Invitrogen 10437-077)
Dexametasona ($1\mu\text{M}$)
Endometacina ($100\mu\text{M}$)
IBMX ($500\mu\text{M}$)
Insulina ($10\mu\text{g/ml}$)
Antibiótico (1%)

A partir daí, este meio foi trocado a cada três a quatro dias, na dependência da quantidade de “debris” na cultura. Após os 21 dias de diferenciação adipogênica, a cultura foi fixada em paraformaldeído a 4% e posteriormente submetidas à coloração de Oil Red (JAISWAL, 2000), para a observação de depósito de gotículas de gordura coradas em vermelho no citoplasma das células diferenciadas.

4.7.3 Diferenciação neurogênica

Primeiramente, 3×10^5 células provenientes do cultivo celular primário do epitélio olfatório foram plaqueadas em placas de cultivo de seis poços, as quais

continham uma lamínula de vidro. Observando-se a expansão celular até que estas cheguem a 70% de confluência. Após isso, acrescenta-se 0,5 µL monoetilglicerol (3-mercaptop-1, 2-propanediol, M-6145, Sigma) a cada poço. Vinte e quatro horas após, realiza-se a fixação da cultura em paraformaldeído a 4%, procedendo-se protocolo para imunofluorescência, conforme descrito 4.6.2 para os seguintes marcadores de expressão de progenitores neuronais, como é descrito na tabela 5, abaixo:

Quadro 5- Anticorpos primários utilizados para a imunofluorescência (neurogênese)

Anticorpo	Empresa	Origem
SOX1 (ab22572)- 1:100	Abcam	Cambridge, U.S.A.
Neurofilamento- (ab24575): 1:100	Abcam	Cambridge, U.S.A
β Túbilina III (TUBB3)- 1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, California, U.S.A.
Oligodendrócito (ab64547)- 1:100	Abcam	Cambridge, U.S.A
GFAP (ab7260)- 1:100	Abcam	Cambridge, U.S.A

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise morfológica do epitélio olfatório de cães sem raça definida adultos

Os fragmentos de tecido para a análise morfológica foram retirados da porção caudal das conchas nasais e próximo às conchas etmoidais (Figura 1). Uma visão panorâmica desse epitélio pode nos traduzir a idéia do número de dobras da mucosa, uma estratégia para aumento de superfície de contato com partículas e estímulos sensoriais que adentram a cavidade nasal (Figura 2). Através da coloração por hematoxilina-eosina e em corte semi-fino corado por azul de toluidina, observou-se um epitélio tipicamente pseudo-estratificado ciliado, com presença de células caliciformes dispersas. Também puderam ser observadas glândulas exócrinas mucosas na lâmina própria deste epitélio (Figura 3).

O estudo realizado através de técnica de imunohistoquímica demonstrou marcação positiva para PCNA, em núcleos da região basal do epitélio olfatório (Figura 4a, b). Ressalta-se a marcação para agrupamentos celulares específicos, em áreas de maior atividade de proliferação celular basal, local provável de diferenciação e localização de células progenitoras para renovação deste epitélio (Figura 4c, d).

Figura 1 – (a) Fotografia do corte frontal da cabeça de um cão evidenciando o epitélio olfatório na região das conchas etmoidais (setas vermelhas). Em (b), corte transversal, no mesmo nível de “a”, onde se observam dobras da mucosa deste epitélio (setas vermelhas), onde são coletadas amostras de material de pesquisa. Barra de 5 cm

Figura 2 – (a) Visão panorâmica do epitélio olfatório de cão, em corte transversal, onde se observam grande quantidade de dobras da mucosa olfatória, fazendo referência à região de meatos nasais. (b) Em uma outra vista do epitélio olfatório de cão, observam-se grande quantidade de glândulas mucosas (círculos vermelhas) distribuídas ao longo de toda lâmina basal, com presença de inúmeros vasos sanguíneos (VS), que traduzem a necessidade de vascularização eficiente para este epitélio. Paraplast, HE, (a) Barra de 250 μm ; (b) Barra de 100 μm , Aumento em (b) Barra de 40 μm

Figura 3 – Fotografia de corte da mucosa nasal de cão, caracterizando seu epitélio pseudo-estratificado ciliado (setas amarelas). É notória ainda, a presença de células caliciformes (setas vermelhas) dispostas de modo uniforme ao longo de todo este epitélio e de glândulas mucosas (setas pretas) localizadas ao nível da lâmina própria. Barra de 10 μm , (a) Paraplast, HE; (b) Araldite, Azul de Toluidina

Figura 4 – Fotomicrografia de corte da mucosa nasal de cão, caracterizando marcação positiva para PCNA. (a) Marcação com especificidade celular em alguns pontos do epitélio (circulo azul). (b) Detalhe desta marcação celular vista em “a”. (c)-(d) Intensa atividade de proliferação celular basal (setas), local provável de diferenciação e localização das células progenitoras de renovação das estruturas componentes deste epitélio. Barras: (a) 50 μm ; (b) 40 μm ; (c) 25 μm ; (d) 40 μm

A avaliação ultra-estrutural, através de microscopia eletrônica de transmissão, demonstrou a presença de três grupos celulares distintos, dispostos como células colunares e células basais, estas últimas apresentando núcleo mais elétron-densos (Figura 5a). As células caliciformes também foram visualizadas liberando conteúdo rico em glicoproteínas neutras, comprovado por meio de reação PAS positiva sobre a superfície do epitélio (Figura 5b, c).

Entre as células colunares identificaram-se células ciliares e células secretoras. As células ciliadas apresentavam cílios no pólo apical característicos, com núcleos esféricos e posicionados na porção média das células, cromatina frouxa e nucléolo evidente. Já as células caliciformes caracterizavam-se pelo citoplasma claro, cujo pólo apical encontrava-se repleto por vesículas secretórias de característica mucosa.

Em meio às células colunares podem ser distinguidas células cujo núcleo apresenta-se semelhante aos das células basais (Figura 6a), reforçando a idéia do mecanismo de proliferação celular (marcado pela imunohistoquímica), responsável pela renovação do epitélio e células de sustentação, que dão origem ao sistema sensorial da região, motivo do nosso estudo. Esta característica pode ser também visualizada através da coloração de azul de toluidina (Figura 6b).

Figura 5 – (a) e (b) Eletromicrografia de transmissão demonstrando os tipos celulares componentes do epitélio olfatório de cão. Observa-se a presença de células ciliadas (CC) e basais (circuladas). (c) Células secretoras caliciformes (CS), vistas aqui liberando conteúdo PAS positivo. Barras: (a) – (b) 10 μm ; (c) Coloração PAS, 10 μm

Figura 6 – (a) Eletromicrografia do epitélio olfatório de cão, demonstrando células progenitoras (círculos vermelhos) presentes na lâmina basal promovendo renovação do epitélio, apresentando núcleos com morfologia semelhante à de algumas células colunares (*). Em (b) observa-se que estas células apresentam núcleo que coram mais intensamente por Azul de Toluidina. Barra: (a) 10 μm , (b) 10 μm

Entre as células basais e colunares, verificou-se intensa atividade metabólica, caracterizada pela presença de mitocôndrias e pelo grau de condensação da cromatina nuclear (Figura 7).

Figura 7 – (a) Eletromicrografia do epitélio olfatório de cão, demonstrando a atividade metabólica entre as células basais e colunares, caracterizada pela presença de mitocôndrias dispersas pelo citoplasma dessas células (setas), bem como pelo nível de condensação da cromatina nuclear. Barra: 2 μ m

5.2 Avaliação do protocolo de cultura proposto inicialmente

Na literatura consultada, vários protocolos são descritos para realização de cultivo celular. Contudo, ainda permanecem as restrições quanto à extração de células progenitoras originadas do epitélio olfatório, como forma de avaliar os diferentes mecanismos de diferenciação para identificação de células nervosas.

Em nossos estudos, a principal dificuldade foi estabelecer o “protocolo base” para o cultivo de células do epitélio olfatório de cães. Nesta espécie, este tecido é sensível e susceptível a alto nível de contaminação, o que, freqüentemente, levou a contaminação das células que foram postas em cultura.

O protocolo inicial era baseado na coleta de material a fresco, logo após a morte do animal. O principal objetivo seria eliminar ou diminuir a taxa de autólise deste tecido, que pela proximidade ao sistema nervoso, constitui-se como um dos primeiros a sofrerem reações degenerativas *pós-mortem*.

As culturas foram realizadas utilizando meio DMEM alta glicose, em garrafas de 25 cm². Posteriormente, os fragmentos coletados eram macerados utilizando-se lâminas de bisturi nº 23, em fluxo laminar. Observou-se que, mesmo utilizando instrumentais cirúrgicos autoclavados e sendo o material coletado submetido a repetidas lavagens em solução fisiológica a 0,9% e PBS, após 24 a 48 horas de cultura ocorriam contaminações bacterianas. Estas contaminações foram caracterizadas pelo aspecto turvo e amarelado do meio de cultura, dado ao alto nível de atividade proliferativa destes microrganismos (Figura 8a). Ao microscópio de luz invertido, puderam ser observadas poucas células viáveis do epitélio olfatório. Contudo, inúmeras colônias bacterianas puderam ser evidenciadas dispersas por campo de observação, inviabilizando assim o prosseguimento da cultura (Figura 8b, c).

Figura 8 – Fotografia da cultura de células do epitélio olfatório de cão. Em (a) observa-se contaminação de origem bacteriana (setas), caracterizada por um meio turvo, onde se visualizam algumas colônias aderidas ao fundo da garrafa. Em (b) e (c) a intensa atividade proliferativa bacteriana observada em aumento maior. (a) Barra de 100 μm ; (b) Barra de 50 μm e (c) Barra: 25 μm

5.3 Protocolo de cultura de células modificado

A primeira modificação de protocolo diz respeito ao método de lavagem do material, que passou a ser realizado utilizando-se solução fisiológica a 0,9% acrescido de antibiótico (estreptomicina) a 0,25%. A lavagem foi realizada repetidas vezes, até a completa remoção de detritos e sangue. Em seguida, os fragmentos do epitélio olfatório excisado foram transportados em placas de petri estéreis, embebidos em PBS resfriado, acrescido de estreptomicina a 0,25% e processados imediatamente em fluxo laminar.

Os fragmentos foram macerados mecanicamente, embebidos em meio de cultura e submetidos à técnica de cultivo celular denominada “explante”. Esta técnica consiste na dispersão dos fragmentos de 1 mm³, após maceração no fundo da garrafa de cultura, retirando-se o meio de cultura utilizado para maceração através de micropipeta ou pipeta de Pasteur. Em seguida, a garrafa era invertida (virada de ponta-cabeça) e levada à estufa a 37°C de CO₂ durante 3 horas ou até que houvesse a aderência dos fragmentos ao fundo da garrafa. Após esse tempo, a garrafa era reposicionada e adicionou-se meio suficiente para recobrir os fragmentos, incubando-os por 48 a 72 horas em estufa.

A segunda modificação realizada diz respeito à suplementação do meio que também foi acrescido de estreptomicina a 0,25%, associado a L-Glutamina, aminoácidos essenciais e soro fetal bovino. Após 72 horas sob cultivo, observaram-se vários fragmentos liberando células para o meio, caracterizando intensa atividade celular (Figura 9a, b). Entretanto, a pesar da liberação substancial de células a partir dos fragmentos cultivados em primeiro momento, não se verificou uma evolução quanto à morfologia dos tipos celulares observados. Apenas foram observadas células de aspecto globóide, arranjadas em colônias, sem, contudo, evoluírem a uma morfologia esperada para células progenitoras originadas a partir do epitélio olfatório. (Figura 9d).

Figura 9 – Fotografia da cultura de células do epitélio olfatório de cão. Em (a) e (b) fragmento (*) de tecido olfatório liberando células para o meio de cultura três dias depois de realizado o explante para o início da cultura. Em (c) e (d) morfologia celular observa em cultivo de células do epitélio olfatório de cães adultos, após 7 dias de cultura. Células de aspecto globóide (setas azuis) organizadas em colônias (círculo vermelho). (a) Barra de 250 μm ; (b), (c) e (d) Barra de 25 μm

A permanência desse aspecto após 10 dias de cultivo, sem alteração de sua morfologia gerou subsídios claros de inviabilidade para o prosseguimento do cultivo.

5.4 Avaliação morfológica a partir do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina

Para estes animais, foram realizados cortes histológicos de fragmentos de tecido olfatório que envolvia a lâmina crivosa do osso etmóide. As observações realizadas em objetiva em aumentos de 10x e 40x caracterizaram um epitélio cuja base de sustentação é composta predominantemente por tecido cartilaginoso, distinguido por suas inúmeras ilhas de condrócitos distribuídas em caráter uniforme. O epitélio era constituído por células localizadas em diversos níveis, mantendo um arranjo complexo, no entanto cabendo ainda a classificação pseudo-estratificado ciliado (Figura 10).

Visualizaram-se glândulas mucosas exócrinas dispersas na lâmina própria, com seus ductos seguindo em direção a superfície, liberando grande quantidade de conteúdo sobre este epitélio (Figura 11).

O estudo do índice de proliferação celular se deu através do método imunohistoquímico para identificação das proteínas de processividade da divisão celular Ki67 e PCNA nuclear. Uma visão panorâmica da reação imunohistoquímica para a marcação do Ki67 pode demonstrar que houve predileção pelo grupamento celular localizado ao longo de toda a região apical do epitélio, com presença de poucas células marcadas nas proximidades da membrana basal (Figuras 12 e 13).

Figura 10 – (a) Vista geral do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida e tecido cartilaginoso de sustentação (Tc). Em (b) a presença de inúmeras ilhas de condrócitos (setas) distribuídas uniformemente. E ainda em “b” detalhe do epitélio olfatório pseudo-estratificado ciliado (Ep). Paraplast, HE, (a) Barra de 250 μm ; (b) Barra de 25 μm

Figura 11 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina. (a) e (b) Presença de glândulas exócrinas (Gl) mucosas presentes na lâmina própria desse epitélio, liberando por meio de seus ductos (Dt) conteúdo para a superfície (Ct). Paraplast, HE, (a) e (b) Barra de 40 μm

Figura 12 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina. (a) e (b) Marcação positiva para Ki67 com coloração de fundo hematoxilina. Notar a predileção por grupamentos celulares localizados ao longo da região apical deste epitélio (setas). Paraplast, (a) Barra de 100 μm e (b) Barra de 50 μm

Quando comparada ao Ki67, a marcação para PCNA pôde denotar uma predominância de células marcadas nas adjacências da lâmina basal deste epitélio, mantendo uma organização de caráter difuso e em regiões específicas (Figura 13).

Figura 13 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina. Comparação entre as marcações em região apical por Ki67 (área destacada) em (a) e PCNA em (b), setas azuis. Paraplast, (a) e (b) Barra de 40 μ m

A avaliação ultra-estrutural através da microscopia eletrônica de transmissão do epitélio olfatório de cães com 60 dias de idade revelou a presença de células cujos citoplasmas mostraram-se mais elétron-densos e dispostas em região adjacente à lâmina própria, em orientação semelhante as das células com marcação positiva pelo método de identificação do PCNA nuclear. Chama atenção a eucromatina nuclear evidente, demonstrando a atividade metabólica vigente por parte dessas células (Figura 14).

Figura 14 – Eletromicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina evidenciando a morfologia das células dispostas adjacentes a lâmina própria, cuja orientação é assemelhante as das células com marcação positiva pelo método de identificação do PCNA nuclear. CB: Células basais. Barra de 2 μ m

O epitélio respiratório pode ser caracterizado por células colunares altas, identificadas pela orientação paralela de seus cílios, apresentando eletrodensidade intermediária, quando comparados as células basais. As células sustentaculares foram observadas residindo entre as células respiratórias, identificadas pela ausência de cílios e menor eletrodensidade citoplasmática. Neurônios olfatórios foram visualizados em íntima relação com as células sustentaculares e emitindo proeminências sensoriais para a superfície do epitélio e por entre as células sustentaculares e as do epitélio respiratório (Figura 15a). Ressalta-se a intensa atividade metabólica neuronal, suportada pela presença de inúmeras mitocôndrias próximas ao núcleo (Figura 15b).

Figura 15 – Eletromicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina. (a) Neurônio olfatório (N), células sustentaculares (CS) e ciliadas (CC) em disposição colunar. Chama atenção a intensa atividade metabólica basal dos neurônios, verificada pela presença de numerosas mitocôndrias (M). (b) Vesícula olfatória (VO) disposta por entre as células sustentaculares. É notada a presença de junções comunicantes entre as células nervosas e sustentaculares (setas). (a) Barra de 5 μm ; (b) Barra de 2 μm

5.5 Cultivo celular a partir do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina

O cultivo celular com base em células isoladas a partir do epitélio olfatório de indivíduos com 60 dias de vida intra-uterina exibiu rápido crescimento sob avaliações sucessivas em cultura. O material foi coletado respeitando o intervalo de tempo de até três horas *pos mortem*. As células isoladas foram postas em cultura após tratamentos diferenciados de desagregação enzimática, utilizando-se Tripsina 0,25% e Colagenase sob concentração de 0,075%. Ambos os tratamentos promoveram desagregação celular eficiente, demonstrando um grande número de células em suspensão quando feita a avaliação em microscópio de luz invertida. Os fragmentos oriundos da dissociação mecânica foram postos em cultura como explantes, sob as mesmas condições das células isoladas.

A primeira avaliação, realizada vinte quatro horas após o início do cultivo, não demonstrou presença de contaminação. Nas garrafas para as quais foi empregado o tratamento com Tripsina a 0,25%, inúmeras células ainda eram vistas em suspensão, associado a isso pequeno número de células mortas. As garrafas com esse mesmo tratamento, cultivadas com os fragmentos, evidenciaram grande liberação de células, observada ao redor do mesmo, em todos os pontos da garrafa onde estes se encontravam aderidos, já sendo possível observar algumas células aderidas ao fundo da garrafa e nas proximidades do fragmento (Figura 16). De modo contrário, as garrafas cujo tratamento aplicado foi a Colagenase 0,075% demonstravam poucas células viáveis, fragmentos com pouca liberação celular.

Figura 16 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, demonstrando a liberação de células após 24 horas de cultivo celular. (a) Liberação de células (setas) a partir de fragmento (*) aderido ao fundo da garrafa. (b) Início de adesão celular nas proximidades do fragmento (círculos). Barra: (a) 50 μm , (b) 25 μm

Após cinco dias de cultivo, foi realizada a troca do meio de cultura, quando se observou que as garrafas tratadas com Tripsina 0,25% apresentavam um contingente de células aderidas e em distribuição homogênea por todo o fundo das garrafas, muitas delas em processo de divisão, revelando assim o seu potencial para confluência celular em poucos dias (Figura 17a). A avaliação paralela das garrafas tratadas com Colagenase 0,075% demonstrou declínio do número de células viáveis. À observação sob microscópio, este cultivo era composto em sua maioria por células mortas, sedimentadas no fundo das garrafas. Considerando a quantidade de fatores liberados durante o mecanismo de morte celular, tais como os fatores NK, optou-se por não levar este cultivo adiante.

À avaliação realizada aos 10 dias de cultivo celular, evidenciou-se que as células encontravam-se em estado de confluência, verificando-se assim a necessidade de realização da primeira passagem desta cultura (Figura 17b). Apenas 2 dias após a primeira passagem, as células já se encontravam uniformemente aderidas ao fundo da garrafa (Figura 18a). Verificou-se ainda uma forte tendência das células do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina em formar colônias a pequena distância uma da outra, antes que se iniciasse o processo de confluência até a completa formação da monocamada (Figura 18b).

Figura 17 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, após 5 dias de cultivo celular. (a) Células aderidas e em distribuição homogênea por todo o fundo das garrafas (setas), verificando-se muitas delas em processo de divisão (círculos). (b) Células demonstrando formação de monocamada e confluência total antes da primeira passagem. Barra: (a) e (b) 250 μm

Figura 18 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, 2 dias após a primeira passagem. (a) Células aderidas ao fundo da garrafa demonstrando formação de monocamada. (b) Interação célula a célula, demonstrando sua forte tendência em formar colônias (Círculo). Barra: (a) e (b) 250 μm

Foram observados poucos tipos celulares, prevalecendo assim a homogeneidade das colônias, que em sua maioria, eram compostas por células de característica fibroblástica, subdividindo-se entre células de maior e menor volume, contudo apresentando a mesma morfologia. À medida que foi dada continuidade ao cultivo celular, aos 20 dias de cultivo, já se observava predominância de um tipo celular específico, composto por células de menor volume (Figura 19a, b).

Figura 19 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, 20 dias de cultivo. (a) e (b) Predominância de um tipo celular de morfologia fibroblástica. Barra: (a) e (b) 25 μ m

As trocas de meio foram realizadas a cada dois a três dias, na dependência da confluência das garrafas, de forma a preservar as características iniciais da cultura primária, evitando-se assim a diferenciação das células.

O crescimento celular foi monitorado através de uma curva de crescimento (Figura 20), onde se verificou uma queda de crescimento celular evidente a partir dos 15 dias de cultivo. Após esse período, as células continuaram a crescer, embora em menor velocidade. Considerou-se nesse experimento a fase LAG, seguindo-se até próximo dos cinco dias de cultura a partir de onde se observou o início da confluência das colônias.

Figura 20 – Curva de crescimento de células isoladas do epitélio olfatório de cão com 60 dias de vida intra-uterina, demonstrando sua atividade metabólica basal, em fases distintas do desenvolvimento

É importante observar que mesmo a fase plateau (até os dez dias de cultivo) seguiu ainda com certo nível de crescimento até a completa estabilização da cultura, observando-se nessa fase células em processo de divisão (Figura 21). O tipo de crescimento e o nível de homogeneidade dessas células geram indícios valiosos para identificação das progenitoras, capazes de gerar linhagens neuronais.

Figura 21 – Fotomicrografia do epitélio olfatório de cão com 60 dias intra-uterina de vida, após fase plateau. (a) e (b) verifica-se que células ainda se encontram em processo de divisão, pontos brilhantes em “a” e círculo em “b”. Barra: (a) 25 μm e (b) 100 μm

5.6 Avaliação da caracterização da população de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina

5.6.1 Citometria de Fluxo

As células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina foram caracterizadas analisando a expressão de 12 proteínas de membrana (HLA-DR, HLA-ABC, CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73 (SH3), CD90, CD105 (SH2) e CD117 por Citometria de fluxo. A viabilidade celular encontrada foi de aproximadamente 96%.

As células-tronco do epitélio olfatório submetidas à citometria de fluxo em passagem 4, demonstraram expressão inespecífica para HLA-DR, HLA-ABC, CD31, CD90 (Thy-1), CD73 (SH3), CD117 (c-kit), CD105 (SH2), como é demonstrado na figura 22.

Figura 22 – Citometria de Fluxo de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina, de (a) à (g) demonstrando expressão inespecífica para HLA-DR, HLA-ABC, CD31, CD90 (Thy-1), CD73 (SH3), CD117 (c-kit), CD105 (SH2)

Para as amostras estudadas, observou-se expressão positiva apenas do CD29 (integrina $\beta 1$) e uma leve tendência à expressão observada para o CD13 e CD34 (Figura 23).

Figura 23 – Citometria de Fluxo de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina demonstrando em (a) a expressão positiva para CD29 e em (b) e (c) uma leve tendência de expressão para CD13 e CD34, respectivamente

De modo contrário, outros marcadores como o CD44 e CD45 estavam ausentes nas amostras analisadas (Figura 24).

Figura 24 – Citometria de Fluxo de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina demonstrando em (a) e (b) expressão negativa para CD44 e CD45, respectivamente

5.6.2 Imunofluorescência

A utilização de imunomarcadores para caracterização da população de células-tronco isoladas a partir do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina demonstrou a expressão do OCT-4 intranuclear, conjugado ao FITC, evidenciado pela marcação em verde do núcleo dessas células. Esta população celular também foi caracterizada pela expressão da citoqueratina 18 (Ck18) e vimentina, de igual modo conjugados ao FITC, onde a Ck18 determinou a marcação do citoesqueleto celular, enquanto a vimentina marcou o citoplasma, ao redor do núcleo, ambos permitindo identificar a morfologia dessa população celular, quando comparados ao controle utilizado na imunomarcação (Figura 25). Os demais marcadores não demonstram marcação, quando observados ao microscópio de fluorescência.

Figura 25 – Imunofluorescência para caracterização da população de células-tronco isoladas a partir do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) expressão do OCT-4, específico da região intranuclear. Em (b) verifica-se a expressão da citoqueratina, determinada pela marcação do citoesqueleto celular. Em (c) observa-se a expressão da vimentina, determinando a marcação do citoplasma celular ao redor do núcleo. Em (d) o controle negativo utilizado como comparação. Barra: (a) 50 μm , (b) à (f) 25 μm

5.7 Avaliação da diferenciação celular a partir de células isoladas do epitélio olfatório de cães sem raça definida com 60 dias de vida intra-uterina

5.7.1 Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica seguiu um protocolo de cultivo de 21 dias, realizando-se sucessivas trocas de meio de cultura (meio de diferenciação e meio de manutenção) a cada três dias. Na primeira semana de cultivo, apenas observou-se o crescimento das células previamente plaqueadas em placas de seis poços, sem, no entanto, a observação da mudança de sua morfologia. A partir da segunda semana de diferenciação, verificou-se a parada de crescimento das células em cultivo, com início de modificação de sua morfologia e discreta deposição de matriz óssea extracelular. Passados os 19 dias, verificou-se exacerbada morte celular, com deposição de matriz evidente e o aparecimento de inúmeros osteoblastos dispersos em cada poço de cultivo.

A coloração Alizarin Red, utilizada para demonstrar a diferenciação celular, evidenciou a presença de depósitos de cálcio citoplasmático e a deposição de matriz óssea extracelular. Essa deposição foi observada tanto em estágios iniciais de diferenciação osteogênica, a partir da segunda semana (Figura 26), como no estágio final (próximo dos 21 dias de cultivo), onde foram observados osteoblastos intensamente marcados e dispersos (figura 27a, b e c). Para a fase final de diferenciação, a coloração de Von Kossa também foi utilizada para demonstração da presença de osteoblastos diferenciados (Figura 27d).

Figura 26 – Segunda semana de diferenciação osteogênica a partir de células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) e (b) visão panorâmica de células em processo de diferenciação. Em (c) maior aumento, demonstrando depósito de cálcio citoplasmático (gotículas vermelhas) Barra: (a) 100 μm , (b) 50 μm e (c) 25 μm . Coloração Alizarin Red

Figura 27 – Estágio final de diferenciação osteogênica a partir de células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) e (b) visão panorâmica de osteoblastos diferenciados. Em (c) e (d) maior aumento de um osteoblasto típico em cultivo intensamente marcado por coloração de Alizarin Red e Von Kossa, respectivamente. Barra: (a) 100 µm, (b) 50 µm, (c) 25 µm (Coloração Alizarin Red) e (d) 25 µm

5.7.2 Diferenciação adipogênica

A diferenciação osteogênica seguiu um protocolo semelhante ao utilizado para a diferenciação osteogênica, durante um período de 21 dias, realizando-se sucessivas trocas de meio de cultura (meio de diferenciação) a cada três dias.

As células apresentaram crescimento lento ao longo da primeira semana de cultivo. A partir da segunda semana, verificou-se um aumento exacerbado de morte celular, iniciando-se nesse momento a modificação da morfologia inicial das células. Seguindo-se a terceira semana de cultivo, observavam-se células com morfologia “espraiada” apresentando citoplasma contendo grânulos birrefringentes de gordura, contudo, paralelamente, a maior parte das células mostravam diferenciação com morfologia semelhante a células de tecido ósseo. Essa situação se manteve até o fim dos 21 dias de diferenciação, quando as culturas foram fixadas em paraformaldeído a 4%, a fim de serem submetidas posteriormente à coloração específica para determinação de gordura.

As células submetidas à coloração de Oil Red demonstraram marcação de aglomerados de gordura (gotículas) preenchendo o citoplasma das células que foram submetidas ao processo de diferenciação adipogênica, muito embora tais células, nesse momento, não apresentassem morfologia de células de gordura típicas (Figura 28).

Figura 28 – Estágio final de diferenciação adipogênica a partir de células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) e (b) presença de células contendo gotículas de gordura dispersas no seu citoplasma, marcadas por coloração específica. Barra: (a), (b) e (c) 100µm. Coloração Oil Red

5.7.3 Diferenciação neurogênica

A plasticidade observada no cultivo de células-tronco a partir do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina deu origem a progenitores neuronais 24 horas após a adição do agente indutor de diferenciação neurogênica monoetilglicerol. Foram verificadas quatro populações específicas de células expressando marcação positiva para progenitores neuronais.

As células diferenciadas foram submetidas ao mesmo protocolo de imunofluorescência utilizado para a caracterização das células indiferenciadas.

Deste modo, verificou-se a expressão do GFAP (conjugado à rodamina-marcação em vermelho), caracterizando células de morfologia “espraiada”, semelhante à astrócitos, agrupadas e de núcleo localizado centralmente (marcação DAPI-azul) (Figura 29).

A marcação de neurofilamentos (conjugado ao FITC-marcação em verde ao redor do núcleo), um marcador específico de neurônios e diferenciação de células neuronais, foi caracterizada por um conjunto de células fusiformes de núcleo central que fazem inúmeras comunicações entre si (Figura 29).

Verificou-se ainda forte marcação para outros marcadores específicos e células neuronais tais como Oligodendrócitos e β tubulina III. Chama a atenção a marcação perinuclear e a morfologia das células β tubulina III positivas, bem como a interação existente entre essa população de células (Figura 29).

Figura 29 – Diferenciação neurogênica de células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Em (a) controle negativo. Em (b) células GFAP positivas, marcador de astrócitos. Em (c), (d) e (e) presença de células marcadas positivamente para neuromarcadores específicos: Neurofilamentos, oligodendrócitos e β tubulina III, respectivamente. Barra: (a) 50 μ m, (b) 25 μ m, (c) e (d) 50 μ m e (e) 25 μ m

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Imunomarcacão do epitélio olfatório de cães adultos e com 60 dias de idade através do método de identificação do PCNA e Ki67 nuclear

A expressão do PCNA pôde ser vista em grande parte do ciclo celular, a exceção, apenas da fase M. O estudo imunohistoquímico foi realizado utilizando técnica para marcação do antígeno de proliferação celular (PCNA) e Ki67 que possibilitaram a observação desse mecanismo para as células do epitélio olfatório, corroborando com as citações de Tsuji et al. (1992) e Pendleton et al. (1993) em humanos, para os quais a técnica de imunohistoquímica lança mão de marcadores de proteínas expressas em sua maior parte no ciclo celular.

Embora autores como Legrier et al. (2001) tenham demonstrado, através de marcações positivas para BrdU e PCNA em células do epitélio olfatório de camundongos, que o mecanismo de proliferação celular pode diminuir de 10 a 15 vezes desde o nascimento até os três primeiros meses de idade, ao realizarmos um estudo cego da marcação através de PCNA do epitélio olfatório de cães adultos, não foi verificada diferença quantitativa de marcação entre os indivíduos adultos estudados ou entre os sexos. Resultados que corroboram com os encontrados por Roisen et al. (2001) quando estudou o epitélio olfatório através de biópsias em humanos de diferentes sexos e idades. Contudo, no grupo de animais com 60 dias de idade, foi observada uma forte tendência de marcação através do método para identificação do Ki67 de células localizadas na região apical do epitélio desses animais, quando comparado ao protocolo aplicado para identificação do PCNA, que mostrou marcação positiva semelhante à observada nos indivíduos na fase adulta. De fato, como foi observado por Garcia (1989); Hall e Levison (1990); Aguiar (1996); Costa (1997) e Bruck e O'Donnel (2001), a marcação para o Ki67 é determinante para a mensuração de ciclos longos de divisão celular.

A marcação do epitélio olfatório através da técnica de imunohistoquímica para PCNA ocorreu de forma variada tanto em cães adultos quanto os jovens (60 dias de vida), sendo verificada com maior ou menor intensidade, na dependência da

região observada. A característica pseudo-estratificada deste epitélio também possibilitou a observação de núcleos de células marcados positivamente em diversas camadas celulares. Essa observação encontrou-se alicerçada nas hipóteses da localização das sub-populações de células-tronco residentes nas porções média e basal do epitélio olfatório, como também foi descrito por Nakamura et al. (1998) e Higuchi et al. (2005) em estudos da dinâmica dos precursores celulares do epitélio olfatório em *Cavia sp* jovens. Tais resultados também foram compartilhados por Ohta e Ichimura (2000) quando estudaram alterações da proliferação celular e presença do fator de crescimento epidermal (EGFR) no epitélio olfatório de ratos, através de técnica de imunohistoquímica para identificação de PCNA nuclear. Corroboram ainda aos achados Legrier et al. (2001) em seus estudos sobre o ciclo de regulação da neurogênese em ratos.

Para o PCNA, nas duas faixas etárias analisadas, verificou-se uma preferência por núcleos de células mais próximos à membrana basal, onde se visualizou alta taxa de atividade de proliferação celular. Tais características foram condizentes com as observações feitas por Levey et al. (1991) e Getchell et al. (2000) ao retratarem o mecanismo de diferenciação basal de células do epitélio olfatório em ratos, através de técnica de imunohistoquímica, com marcação positiva para citoqueratinas, identificando preferencialmente células horizontais basais (HBC's), que foram observadas povoando uma região paralela e em contato com a lâmina própria. Para a mesma região, a marcação para o Ki67 deu-se de maneira diferenciada, havendo uma predileção por células localizadas na região apical do epitélio. Deste modo, embora o Ki67 marque o mecanismo de proliferação celular em um maior número de fases (todas as fases, com exceção da G₀), como relatado por Carpello et al. (2006), quando comparado ao PCNA, este possibilitou mensurar apenas fases mais longas desse processo, como também foi descrito por Jascur e Boland (2006), permitindo-nos, desse modo, inferir o rápido mecanismo de proliferação celular observado nas células basais para cães com 60 dias de vida e justificando a marcação mais intensa das células apicais pelo Ki67, cujo processo de divisão se dá em caráter mais lento.

Tanto em animais adultos quanto nos jovens, em nenhum momento identificaram-se marcações positivas para PCNA e Ki67 em núcleos de células em

atividade mitogênica abaixo da linha da membrana basal. Estes achados são compartilhados também por Holcomb et al. (1995) ; Huard et al. (1998) ; Kovacs et al. (1999) ; Legrier et al. (2001) ; Jin et al. (2002) e Kawauchi et al. (2004) em seus estudos realizados em camundongos. A manifestação do potencial mitogênico das células sugeriu predileção por determinadas áreas do epitélio, onde a marcação do PCNA no núcleo foi vista mais intensamente.

Em todos os animais avaliados, o estudo realizado através de corte semi-fino e corado com azul de toluidina demonstrou a marcação de um grupamento celular típico em região adjacente à lâmina basal.

A análise ultra-estrutural para os animais adultos demonstrou semelhança morfológica entre estas células basais e aquelas localizadas na camada média e no epitélio de sustentação, cujo pólo apical apresentou cílios, núcleos esféricos posicionados na porção média das células, cromatina frouxa e nucléolo evidente, reforçando a idéia da renovação do epitélio, das células de sustentação e dos neurônios olfatórios locais. Entre as células basais e colunares, verificou-se intensa atividade metabólica, caracterizada pela presença de mitocôndrias e pelo grau de condensação da cromatina nuclear, conforme foi descrito por Roisen et al. (2001) em estudo ultra-estrutural e de cultura de células-tronco do epitélio olfatório de indivíduos adultos humanos.

Para os animais jovens, esta característica foi vista de modo semelhante. Associado a isso, sob microscopia eletrônica de transmissão, pôde-se detalhar a relação existente entre as células sustentaculares e os neurônios olfatórios regionais, caracterizada por meio de junções comunicantes. É notada ainda para esses animais a intensa atividade metabólica, verificada pela presença de mitocôndrias próximas aos núcleos desses neurônios, bem como pela presença da eucromatina visualizada no citoplasma das células basais. Esses achados são condizentes com as citações feitas por Caggiano et al. (1994) ; Huard et al. (1998) ; Nakamura et al. (1998) e Higuchi et al. (2005), sustentando a hipótese da presença de células progenitoras residentes entre as células basais do epitélio olfatório, dando origem a todos os constituintes desta região, particularmente neurônios olfatórios.

6.2 Cultivo de células do neuroepitélio olfatório de cães adultos e com 60 dias de vida intra-uterina

Os estudos relacionados ao cultivo de células-tronco receberam atenção especial, desde que foi verificada a capacidade de seu uso, não apenas na pesquisa neurogênica básica, como também pela possibilidade do tratamento de disfunções neurológicas degenerativas, tal como a doença de Parkinson, descrita por Li e Xi. (2005) e Zhang et al. (2006).

O cultivo de células-tronco a partir do neuroepitélio olfatório, utilizando cães como modelo animal (KRUDEWIG; DESCHL; WEWETZER, 2006; OVERALL; ARNALD, 2007), abre precedentes para viabilizar um protocolo que propicie acesso mais fácil a progenitores celulares, capazes de gerar linhagens de caráter neuronal, sem a necessidade de acesso ao Sistema Nervoso Central.

Em nossos estudos, o cultivo de células coletadas a partir do epitélio olfatório de cães adultos, utilizando-se como meio de cultura DMEM Alta glicose, evidenciou grande liberação celular, 24 horas pós-cultivo. Contudo, após 10 dias em cultivo, a observação apenas de células de morfologia globóide, não caracterizou a presença de células progenitoras originadas a partir do epitélio olfatório, o que inviabilizou o prosseguimento do cultivo. De fato, citações feitas por Roisen et al. (2001); Chandran et al. (2004) e Zhang et al. (2005), quando isolaram de células -tronco a partir do epitélio olfatório humano, demonstraram que estas células permanecem em estado de quiescência quando apenas submetidas ao meio de cultura padrão (DMEM-High glicose e DMEM-Low) ou na ausência de fatores de diferenciação.

De modo contrário, células isoladas a partir do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida e cultivadas em Meio D-MEM/F-12, exibiram alto nível de liberação a partir de fragmentos postos em cultura e observados 24 horas após o cultivo. Em estudos recentes, autores como Odorico, Kaufman e Thomson (2001) e Lumelsky et al. (2001), quando estudaram o potencial de diferenciação de multilinhagens de células-tronco embrionárias, também apontaram o alto nível mitogênico de células jovens quanto a capacidade de auto-renovação, bem como sua potencialidade para diferenciação ilimitada, quando comparadas a células adultas. Alicerçando ainda nossos achados, Pagano et al. (2000), em seus estudos com células-tronco isoladas a partir do bulbo olfatório, demonstraram que estas, quando expostas a fatores

mitogênicos, somente 1% eram representativas de células-tronco reais, sendo o restante composta por uma população transiente, que eventualmente morria ou se diferenciava, inviabilizando assim cultura.

Em nossas avaliações, células com alto potencial para confluência foram observadas aderidas no fundo da garrafa após cinco dias de implementação do cultivo. Estes mesmos achados também foram compartilhados por Murrell et al. (2005), quando encontraram células viáveis em cultura, 7 a 10 dias de início da cultura. Krudewig, Deschl e Wewetzer (2006) encontraram resultados semelhantes, conseguindo adesão e confluência total de células isoladas a partir do bulbo olfatório de cães em 3 dias de cultivo, em meio suplementado com FGF-2. Para nossas culturas, a confluência total só foi alcançada aos 10 dias de tratamento.

Vinte dias após o início do cultivo celular, apenas em meio D-MEM/F-12, as células manifestavam formato fusiforme típico, muitas apresentando morfologia espalhada, mantendo nível de homogeneidade elevado. Estas morfologias têm sido mencionadas inúmeras vezes na literatura, em citações de autores como Pagano et al. (2000); Jin et al. (2002); Zhang et al. (2005) e Zhang et al. (2006) quando lançaram mão de fatores de estimulação neurogênica, tais como EGF, FGF-2 e BDNF (fator neurotrófico cerebral), a fim de promover diferenciação de celular em linhagens neuronais.

Ao nível da quarta passagem, encontrava-se estabelecida a manutenção de uma morfologia estrelada, evidenciada pela emissão de expansões citoplasmáticas que lembravam a interação existente entre células de caráter neuronal. Este aspecto da cultura foi descrito por Roisen et al. (2001) ao nível da décima oitava passagem, então confirmada por imunomarcação para β -tubulina isótopo III, NCAM e MAP2ab. Outros autores, como Krudewig, Deschl e Wewetzer (2006), obtiveram tais resultados em cultura, entre a 6ª e 9ª passagens, também realizando imunomarcação para GFAP e Fibronectina. Os melhores resultados para a demonstração dessa característica foram, até o momento, alcançados por Zhang et al. (2006), quando evidenciaram a formação de neuritos, os quais também foram identificados, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, pela presença de vesículas contendo sinapsina e VACHT (transportador funcional para o neurotransmissor ACh).

Nossos estudos nos possibilitaram o estabelecimento de um protocolo de cultivo celular adaptado ao isolamento de células obtidas a partir do epitélio olfatório

de cães com 60 dias de vida intra-uterina. Evidenciou-se a predominância do potencial de crescimento e expansão em cultura das células oriundas de indivíduos de menor idade, caracterizada pela sua capacidade de diferenciação em cultura, produzindo células cuja morfologia assemelha-se àquelas citadas na literatura como de caráter neuronal.

6.3 Caracterização do cultivo de células-tronco isoladas a partir do epitélio olfatório de cães de 60 dias de vida intra-uterina

6.3.1 Citometria de fluxo

Inúmeros trabalhos têm apontado a expressão positiva de marcadores para proteínas de membrana como SH2, SH3, CD29, CD44, CD71 e CD90 (PITTENGER et al., 1999; KAUFFMAN et al.; 2001; ZUK et al., 2002). Entretanto, em nossas avaliações, foram testados 12 marcadores, verificando-se expressão positiva apenas do CD29 (integrina $\beta 1$) e uma leve tendência à expressão observada para o CD13 e CD34. É importante ressaltar que essa característica é consequência da inexistência de marcadores específicos para cães, lembrando também que não existem trabalhos disponíveis na literatura relatando a caracterização de tipos celulares provenientes de cães, salvo estudo realizado por Sampaolesi et al. (2006), o qual obteve resultados semelhantes aos nossos. Todos os marcadores utilizados eram específicos para células mesenquimais humanas.

Deste modo, não se deve atribuir a inespecificidade observada pela citometria de fluxo para células caninas a não expressão ou inexistência de proteínas de membrana nesses animais, devendo-se confrontar esses resultados com outras técnicas como observação da plasticidade dessas células através de protocolos de diferenciação para outros tipos de tecido.

6.3.2 Imunofluorescência

O cultivo celular de células-tronco isoladas do epitélio olfatório expressou marcadores típicos, tais como OCT-4, CK18 e vimetina, somente verificados em linhagens de células progenitoras. Do mesmo modo, estes marcadores foram também descritos por Barnett and Chang (2004); Ramón-Cueto e Avila (1998); Chuah e West (2002) e Wewetzer et al. (2002), quando estudaram células sustentaculares isoladas do Sistema Nervoso Central em humanos. Krudewig; Deschl e Wewetzer (2006) relatam ainda que a expressão do OCT-4, particularmente é observada, independente das condições de cultura, à exceção de um tratamento desse cultivo com FGF-2/fosfokolina, o que sugere que a expressão do OCT-4 está alicerçada na proliferação celular ou apresenta uma “downregulation” coordenada pela fosfokolina.

A não marcação ou marcação inespecífica verificada para marcadores como β tubulina III, integrina β I, determinam aqui o padrão indiferenciado das células em cultivo primário utilizadas neste estudo, visto que estes marcadores são específicos de células diferenciadas, particularmente neurônios. Esses achados corroboram com as descrições de Lie et al. (2005) e Murdoch e Roskams (2007) quando estudaram células progenitoras oriundas do epitélio olfatório de ratos transgênicos. Esse padrão de multipotencialidade é então revelado quando da realização dos protocolos de diferenciação celular, os quais revelaram informações importantes sobre o nível de plasticidade da população de células isoladas a partir do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina.

6.4 Diferenciação celular (osteogênica, adipogênica e neurogênica)

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; KERKIS et al., 2006).

As células cultivadas sob meio específico para diferenciação osteogênica (DMEM – Low Glicose, Soro Fetal Bovino, 2-fosfato ácido ascórbico (50µM), Antibiótico (1%), Dexametasona) apresentaram elevado nível de diferenciação a partir da segunda semana de cultivo, apresentando morfologia que variava de cubóide a poligonal. De igual modo, os achados de Jaiswal et al. (1997) corroboram com os nossos achados, quando em seus estudos com células-tronco mesenquimais humanas demonstram uma população de 80% de células diferenciadas que adotavam a mesma morfologia. Jaiswal et al. (2000) verificaram marcação positiva para fosfatase alcalina após sete dias em cultivo experimental. Embora não tenhamos realizado ensaios para fosfatase alcalina, marcações realizadas ao nível do 14º dia de cultivo, utilizando-se Alizarin Red, demonstram coloração positiva para depósitos de cálcio intracelular.

Trabalhos realizados avaliando o potencial de diferenciação de células mesenquimais demonstraram um comportamento homogêneo desses cultivos, verificando-se confluência e apresentação de um tapete de células diferenciadas (SOTTILE et al., 2003; KERKIS et al., 2006). Entretanto, em nossas avaliações, a partir do 14º dia de cultivo, as células do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina tenderam a um processo de rápida apoptose, restando algumas poucas células com alto grau de diferenciação e com morfologia “like-osteoblast” e fortemente marcadas com coloração específica para tecido ósseo (Alizarin Red e Von Kossa). Este mecanismo, provavelmente, pode ser atribuído a um pico de crescimento influenciado pelo meio de cultivo e posteriormente a uma seleção competitiva de células com alto nível de diferenciação.

A diferenciação adipogênica comportou-se de modo contrário ao previamente descrito na literatura. Os trabalhos realizados por e Ahdjoudj et al. (2002) e Sekiya et al. (2004) demonstraram 30% de colônias diferenciadas em adipócitos, cuja morfologia era típica nos primeiros 14 dias de cultivo, ao passo que em 21 dias de cultivo essa diferenciação pôde chegar a 60%. De modo contrário, em nosso experimento, ocorreu um crescimento lento do número de células em cultivo,

mantendo-se indiferenciadas até um padrão de confluência, a partir do qual resultou em elevada morte do número de células em cultivo.

Apesar do elevado processo de diferenciação para tecido ósseo, a observação da presença de células com gotículas de gordura em seu citoplasma foi marcante, mesmo não apresentando morfologia típica de um adipócito. É importante salientar que a origem embrionária constitui um fator preponderante para determinar a maior ou menor expressão da plasticidade de alguns tipos celulares para níveis elevados de diferenciação. O epitélio olfatório tem sua origem embrionária no ectoderma, de modo que deve apresentar pouca expressão para a diferenciação em células que compartilham uma origem mesenquimal, como no caso das células de gordura.

As células-tronco isoladas a partir do epitélio olfatório de cães de 60 dias de vida intra-uterina demonstraram alto potencial de diferenciação para progenitores celulares neuronais. De igual modo, Calof et al. (2002) e Chandran et al. (2004) observaram a expressão de marcadores como GFAP, Oligodendrócitos, Neurofilamentos e β tubulina III. Para esses autores, as proteínas fibrilar glial dos astrócitos (GFAP) e β tubulina III são observadas sendo expressas em células diferenciadas do bulbo olfatório e células derivadas da zona sub-ventricular, cuja morfologia assemelha-se à descrita nesta pesquisa. Estes mesmos autores apenas conseguiram identificar modificações morfológicas sete dias pós-cultivo. De modo contrário, em nossos estudos, tal observação foi possível 24 horas após a colocação do agente de indução neurogênica monoetilglicerol. A imunomarcação positiva também foi verificada 24 horas pós-indução. Ressalta-se ainda que, grande parte dos autores tem descrito resultados de diferenciação neurogênica restritos a modelos animais como ratos e camundongos (TAUPIN et al., 2002; JIN et al., 2004) ou ainda em humanos (SHIH et al., 2005), de outros tecidos corporais ou ainda mesmo bulbo olfatório (HACK et al., 2005). A possibilidade de aquisição de células viáveis, através de um protocolo de diferenciação prontamente estabelecido, utilizando como modelo um mamífero de maior porte, como cão, é vantajosa e promove maiores subsídios para a caracterização dos tipos celulares originados a partir de populações de células-tronco isoladas do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

1) O protocolo de cultivo e isolamento de células-tronco a partir do epitélio olfatório mostrou-se viável para cães com 60 dias de vida intra, entretanto quando isoladas do epitélio olfatório de cães adultos não demonstrou bons resultados, sendo estas culturas freqüentemente acompanhadas de processos de contaminação e pouca proliferação celular.

2) Dentre os meios de cultura testados, o DMEM-F12 demonstrou alto nível de proliferação celular, propiciando confluência da cultura em poucos dias pós-plaqueamento.

3) O protocolo de diferenciação osteogênica pôde demonstrar a plasticidade das células-tronco isoladas a partir do epitélio olfatório de cães com 60 dias de vida intra-uterina, evidenciando-se células com morfologia de osteoblastos e depósitos de cálcio e matriz extra-celular após 21 dias de indução.

4) A origem embrionária endodermal do epitélio olfatório não permite a expressão de uma morfologia típica de células de gordura, quando submetidas à diferenciação adipogênica.

5) O epitélio olfatório apresenta alto nível de plasticidade para diferenciação em progenitores neuronais, observada por meio da diferenciação neurogênica e comprovadas por imunofluorescência para marcadores de diferenciação neurogênica típicos.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. C. F. **Estudo comparativo das proteínas p53, PCNA, Ki-67 e das regiões organizadoras nucleares (NORs) no epitélio de revestimento da mucosa próximo ao carcinoma epidermóide de boca**. 110 p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- AHDJOU DJ, S.; LASMOLES, F.; HOLY, X.; ZERATH, E.; MARIE, P. J. Transforming growth factor β 2 inhibits adipocyte differentiation induced by skeletal unloading in rat bone marrow stroma. **Journal of Bone and Mineral Research**, n. 17, p. 668-677, 2002.
- ANKER, W. A.; NOORT, S. A.; SCHERJON, C.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, A. B.; KRUISSELBRINK, R. L.; VAN BEZOOIJEN, W.; BEEKHIZN, R.; WILLEMZE, R.; KANHAI, H. H.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. **Haematologica**, n. 88, p. 845-852, 2003.
- BARNETT, S.C.; CHANG, L. Olfactory ensheathing cells and CNS repair: going solo or in need of a friend?. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 1, p. 54-60, 2004.
- BEITES, C.; KAWAUCHI, S.; CROCKER, C. E.; CALOF, A. L. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. **Experimental Cell Research**, n. 306, p. 309-316, 2005.
- BRAND, A. H.; VAN-ROESSEL, P. J. Region specific apoptosis limits neural stem cell proliferation. **Neuron**, v. 37, p. 185-192, 2003.
- BRUCK, I.; O'DONNELL, M. The ring-type polymerase clamp family. **Genome Biology**, v. 2, n. 1, p. 3001-3003, 2001.
- BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. **Cell**, n. 65, p. 175-187, 1991.
- CAGGIANO, M.; KAUER, J. S.; HUNTER, D. D. Global basal cells are a neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. **Neuron**, n. 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**, n. 58, p. 176-188, 2002.
- CALOF, A. L.; CHIKARAISHI, D. M. Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory epithelium neuron precursor in vitro. **Neuron**, n. 3, p. 115-127, 1989.
- CALOF, A. L.; MUMM, J. S.; RIM, P. C.; SHOU, J. The neuronal stem cell of the olfactory epithelium. **Journal of Neurobiology**, n. 36, p. 190-205, 1998.

- CAPPELLO, F.; RIBBENE, A.; CAMPANELLA, C.; CZARNECKA, A. M.; ANZALONE, R.; BUCCHIERI, F.; PALMA, A.; ZUMMO, G. The value of immunohistochemical research on PCNA, p53 and heat shock proteins in prostate cancer management: a review. **Eur. J. Histochem.** v. 50, n. 1, p. 25-34, 2006.
- CARR, V. M.; FARBMAN, A. I.; COLLETI, L. M.; MORGAN, J. I. Identification of a new non-neuronal cell type in rat olfactory epithelium. **Neuroscience**, n. 45, p. 433-449, 1991.
- CARTER, L. A.; MACDONALD, J. L.; ROSKAMS, A. J. olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. **The Journal of Neuroscience**, n. 24, p. 5670-5683, 2004.
- CHANDRAN, S.; COMPSTON, A.; JAUNIAUX, E.; GILSON, J.; BLAKEMORE, W.; SVENDSEN, C.. Differential generation of oligodendrocytes from human and rodent embryonic spinal cord neural precursors. **Glia**, v. 47, p. 314-324, 2004.
- CHEN, X.; FANG, H.; SCHWOB, J. E. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 469, p. 457-474, 2004.
- 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, 2003
- CHIASSON, B. J.; TROPEPE, V.; MORSHEAD, C. M.; VAN DER KOOT, D. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells have neural stem cell characteristics. **Journal of Neuroscience**, n. 19, p. 4462-4471, 1999.
- CHUAH, M. I.; WEST, A. K. Cellular and molecular biology of ensheathing cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 58, n. 3, p. 216-227, 2002
- COSTA, A. L. L. **Dupla marcação PCNA/AgNOR e Ki-67/ AgNOR em carcinoma epidermóide de boca**. 84 p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal)- Faculdade de Odontologia -Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- COVAS, D. T.; SIUFI, J. L. C.; SILVA, A. R. L.; ORELLANA, M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 36, p. 1179-1183, 2003.
- DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases, **Oncogene**, v. 22, p. 8543-8567, 2003.
- DEHAMER, M. K.; GUEVARA, J. L.; HANNON, K.; OLWIN, B. B.; CALOF, A. L. Genesis of olfactory receptor neurons in vitro: regulation of progenitor cell divisions by fibroblast growth factors. **Neuron**, n. 13, p. 1083-1097, 1994.

DIEZ DEL CORRAL, R.; OLIVERA-MARTINEZ, I.; GORIELY, A.; GALE, E.; MADEN, M.; STOREY, K. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. **Neuron**, v. 40, p. 65-79, 2003.

DOETSCH, F.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. **Journal of Neuroscience**, n. 17, p. 5046-5061, 1997.

DOTY, R. L. Olfaction. **Psychology**, v. 52, p. 423-452, 2001.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Haematology**, n. 109, p. 235-242, 2000.

FARBMAN, A. I. **Cell biology olfaction**. New York: Cambridge University Press, 1992.

FARBMAN, A. I. Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls?. **Trends Neuroscience**, n. 13, p. 362-365, 1990.

FERON, F.; MACKAY-SIM, A.; ANDRIEU, J. L.; MATTHAEI, K. I.; HOLLEY, A.; SICARD, G. Stress induces neurogenesis in non-neuronal cell in cultures of adult olfactory epithelium. **Neuroscience**, n. 88, p. 571-583, 1999.

FORBES, S. J.; VIG, P.; POULSOM, R.; WRIGHT, N. A.; ALISON, M. R. Adult stem cell plasticity: new pathway of tissue regeneration become visible. **Clinical Science**, n. 103, p. 355-369, 2002.

FRANKFURT, O.S.; KRISHAN, A. Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. **J. Histochem. Cytochem**, v. 49, p. 369-378, 2001.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental hematology**, n. 4, p. 267-274, 1974.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1431-1438, 2000.

GALLO, V.; ARMSTRONG, R. C. Developmental and growth factor-induced regulation of nestin in oligodendrocyte lineage cells. **J. Neurosci**, v. 5, p. 394-406, 1995.

GARCIA, R. L.; COLTRERA, M. D.; GOWL, A. M. Analysis of proliferative grade using PCNA / cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues- comparison with flow - cytometric analysis. **Am. J. Pathol.**, v. 134, p. 733-739, 1989.

GETCHELL, T. V.; NARLA, R. K.; LITTLE, S.; HYDE, J. F.; GETCHELL, M. L. Horizontal basal cell proliferation in the olfactory epithelium of transforming growth factor- α transgenic mice. **Cell Tissue Res**, n. 299, p. 185-192, 2000.

GOLDSTEIN, B. J.; SCHOWOB, J. E. analysis of the global basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells. **Journal of Neuroscience**, n. 16, p. 4005-4016, 1996.

GRAZIADEI, P. P. C.; GRAZIADEI, G. A. M. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals: Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. **Journal of Neurocytology**, n. 8, p. 1-18, 1979.

GRITTI, A.; PARATI, E. A.; COVA, L.; FROLICHSTHAL, P.; GALLI, R.; FARAVELLI, E. W. L.; MORASSUTTI, D. J.; ROISEN, F.; NICKEL, D. D.; VESCOVI, A.L. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self renew in response to basic fibroblast growth factor. **J. Neurosci**, v.16, p. 1091-1100, 1996.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, p. 406-409.

HACK, M. A.; SAGHATELYAN, A.; CHEVIGNY, A.; PFEIFER, A.; ASHERY-PADAN, R.; LLEDO, P.; GÖTZ, M. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. **Nature Neuroscience**, n. 8, p. 865-872, 2005.

HALL, A.; HALL, F. M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**, v. 106, p. 619-633, 1989.

HALL, P. A.; LEVISON, D. A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. **J. Clin. Pathol**, v. 43, n. 3, 184-192, 1990.

HANSEL, D. E.; EIPPER, B. A.; RONNETT, G. V. *Mini-Review* : Regulation of Olfactory Neurogenesis by Amidated Neuropeptides. **Journal of Neuroscience Research**, n. 66, p. 1-7, 2001

HARLEY, C.B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblast. **Nature**, v. 345, p. 458-460, 1990.

HEMPSTEAD, J. L.; MORGAN, J. I. Monoclonal antibody to the rat olfactory sustentacular cell. **Brain Research**, n. 288, p. 289-295, 1983.

HIGUCHI, Y.; NAKAMURA, H.; KAWASAKI, M.; TAKAHASHI, S. The dynamics of precursor cells in the olfactory epithelium of juvenile and adult guinea pigs. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol**, n. 262, p. 64-68, 2005.

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

HOLCOMB, J. D.; MUMM, J. S.; CALOF, A. L. apoptosis in the neuronal lineage of the mouse olfactory epithelium: regulation in vivo and in vitro. **Developmental Biology**, n. 172, p. 307-323, 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**, n. 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.
- ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells**, v. 17, p. 306-313, 1999.
- IWAI, M.; SATO, K.; KAMADA, H.; OMORI, N.; NAGANO, I.; SHOJI, M.; ABE, K. Temporal Profile of stem cell division, Migration, and Differentiation from subventricular zone to olfactory bulb after transient forebrain ischemia in gerbils. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 23, p. 331-341, 2003.
- JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E.; CAPLAN, A.; BRUDER, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. **Journal of Cell Biochemistry**, n. 64, p. 295-312, 1997.
- 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.
- JAFEK, B. W.; MICHAEL, B. M. R.; RESTREPO, D.; LINSCHOTEN, M. Biopsy of human of olfactory epithelium. **Cheme. Senses**, v, 27, p. 623-628, 2002.
- JASCUR, T.; BOLAND, C. R. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 9, p. 2030-2035, 2006.
- JIN, K.; MAO, X. O.; SUN, Y.; XIE, L.; GREENBERG, D. A. Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **J. Clin. Invest**, n. 110, p. 311-319, 2002.
- JIN, K.; MINAMI, M.; XIE, L.; SUN, Y.; MAO, X. O.; WANG, Y.; SIMON, R. P.; GREENBERG, D. A. Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. **Aging Cell**, v. 3, n. 6, p. 373-377, 2004.
- KAUFMAN, D. S.; HANSON, E. T.; LEWIS, R. L.; JAMES, R. A.; THOMSON, A. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. **Cell Biology**, v. 9, n. 19, p. 10716-10721, 2001.
- KAWAUCHI, C. I.; BREITES, C. E.; CROCKER, C. E.; WU, H. H. BONNIN, R.; MURRAY, A. L. Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium. **Developmental Neuroscience**, n. 26, p. 166-180, 2004.

- KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; MASSIRONI, S. M. G.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUT, H. F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing oct-4 and other embryonic stem cell markers. **Cell Tissues Organs**, v. 184, n.3-4, p. 105-116, 2006.
- KIRSCHENBAUM, B.; NEDERGAARD, M.; PREUSS, A.; BARAMI, K.; FRASER, R. A.; GOLDMAN, S. A. In vitro neuronal production and differentiation of precursor cells derived from the adult human forebrain. **Cereb. Cortex**, v. 6, 576-589, 1994.
- KOVACS, T.; CAIRNS, N. J.; LANTOS, P. L. Beta-amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in the olfactory bulb in ageing and Alzheimer's disease. **Neuropathology and Applied neurobiology**, v. 25, n. 6, p. 481-491, 1999.
- KRUDEWIG, C.; DESCHL, U.; WEWETZER, K. Purification and in vitro characterization of adult canine olfactory ensheathing cells. **Cell and Tissue Research**, v. 326, n. 3, p. 687-696, 2006.
- LEGRIER, M. E.; DUCRAY, A.; PROPPER, A.; CHAO, M.; KASTNER, A. Cell Cycle Regulation during mouse olfactory neurogenesis. **Cell Growth & Differentiation**, v. 12, p. 591-601, 2001.
- LEVEY, M. S.; CHIKARAISHI, D. M.; KAUER, S. Characterization of Potential Precursor Populations in the Mouse Olfactory Epithelium Using Immunocytochemistry and Autoradiography. **The Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 11, p. 3556-3564, 1991.
- LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: Structure and function. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 605-631, 2005.
- LI, X. J.; DU, Z. W.; ZARNOWSKA, E. D.; PANKRATZ, M.; HANSEN, L. O.; PEARCE, R. A. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 2, p. 215-221, 2005.
- LIE, D. C.; COLAMARINO, S. A.; SONG, H. J.; DÉSIÉ, L.; MIRA, H.; CONSIGLIO, A.; LEIN, E. S.; JESSBERGER, S.; LANSFORD, H.; DEARIE, A. R.; GAGE, F. H. Wnt signaling regulates adult hippocampus neurogenesis. **Nature**, n. 437, p. 1370-1375, 2005.
- LIM, D. A.; TRAMONTIN, A. D.; TREVEJO, J. M.; HERRERA, D. G.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. **Neuron**, n. 28, p. 713-726, 2000.
- LUMELSKY, N.; BLONDEL, O.; LAENG, P.; VELASCO, I.; RAVIN, R.; MCKAY, R. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. **Science**, v. 292, n. 5520, p. 1389 -1394, 2001.
- 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**, n. 3, p. 209-215, 1990.
- MAHANTHAPPA, N. K.; SCHWARTING, G. A. Peptide growth factor control of olfactory neurogenesis and neuron survival in vitro: roles of EGF and TGF-beta s. **Neuron**, n. 10, p. 293-305, 1993.
- MARMUR, R.; MABIE, C.; GOKHAN, S.; SONG, Q.; KESSLER, J.A.; EHLER, M. F.; Isolation and developmental characterization of cerebral cortical multipotent progenitors, **Dev. Biol.**, v. 204, p. 577-591, 1998.
- MARSHALL, C. T.; GUO, Z.; LU, C.; KLUEBER, K. M.; KHALYFA, A.; COOPER, N. G. F.; ROISEN, F. J. Human adult olfactory neuroepithelial derived progenitors retain telomerase activity and lack apoptotic activity. **Brain Research**, v. 1045, 45-56, 2005.
- MASLOV, A. Y.; BARONE, T. A.; PLUNKETT, R. J.; PRUIT, S. C. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 1726 -1733, 2004.
- MENCO, B. P.; JACKSON J. E. A banded topography in the developing rat's olfactory epithelial surface. **Journal of Comparative Neurology**, n. 388, p. 293-306, 1997.
- MORRISON, E. E.; CONSTANZO, R. M. Morphology of the olfactory epithelium. **Journal of Comparative Neurology**, v. 1, n. 297, p. 1-13, 1990.
- MURDOCH, B.; ROSKAMS, A. J. Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology. **Journal of Molecular Histology**, v. 38, n. 6, p. 581-599, 2007.
- MURRAY, R. C.; NAVI, D.; FESENKO, J.; LANDER, A. D.; CALOF, A. L. Wide-spread defects in the primary olfactory pathway caused by loss of Mash 1 function. **Journal of Neuroscience**, n. 23, p. 1769-1780, 2003.
- MURRELL, W.; FÉRON, F.; WETZIG, A.; CAMERON, N.; SPLATT, K.; BELLETTE, B.; BIANCO, J.; PERRY, C.; LEE, G.; MACKAY-SIM, A. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. **Developmental Dynamics**, v. 233, p. 496-515, 2005.
- 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. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 255, p. 289-292, 1998.
- ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, 193-204, 2001.
- OHTA, Y.; ICHIMURA, K. Immunohistochemical localization of proliferating cells and epidermal growth factor receptors in mouse olfactory epithelium. **J. Oto-Rhin-Laryngol. Rel. Special.**, v. 1, p. 20-25, 2000.

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

PAGANO, S. F.; IMPAGNATIELLO, F.; GIRELLI, M.; COVA, L.; GRIONI, E.; ONOFRI, M.; CAVALLARO, M.; ETTERI, S.; VITELLO, F.; GIOMBINI, S.; SOLERO, C. L.; PARATI, E. A. Isolation and Characterization of Neural Stem Cells from the Adult Human Olfactory Bulb. **Stem Cells**, n. 18, p. 295-300, 2000.

PENDLETON, N.; DIXON, G. R.; BURNETT, H. E.; OCCLESTON, N. L.; MYSKOW, M. W.; GREEN, J. A. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in dysplasia of the bronchial epithelium. **J. Pathol.**, v. 170, p. 169-172, 1993.

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.

RAMÓN-CUETO, A.; PLANT, G.W.; AVILA, J.; BUNGE, M.B. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 3803-3815, 1998.

REYNOLDS, B. A.; RITZE, R. L. Neural stem cell and neurospheres- re-evaluating the relationship. **Nature Methods**, v. 2, n. 5, p. 333-336, 2005.

REUBINOFF, B. E.; ITSYKSON, P.; TURETSKY, PERA, T.; REINHARTZ, M. F. E.; ITZIK, A.; BEN-HUR, T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, n. 19, p. 1134 – 1140, 2001.

RIETZE, R. L.; VALCANIS, H.; BROOKER, G. F.; THOMAS, T.; VOSS, A. K.; BARTLETT, P. F.. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. **Nature**, v. 412, p. 736-738, 2001.

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

SAMPAOLESI, M.; BLOT, S.; D'ANTONA, G.; GRANGER, N.; TONLORENZI, R.; INNOCENZI, A.; MOGNOL, P.; THIBAUD, J.; Galvez, B. G.; BARTHÉLÉMY, I.; PERANI, L.; MANTERO, S.; GUTTINGER, M.; PANSARASA, O.; RINALDI, C.; M. DE ANGELIS, G. C.; TORRENTE, Y.; BORDIGNON, C.; BOTTINELLI, R.; COSSU, G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. **Nature**, n. 444, p. 574-579, 2006.

SEKIYA I.; LARSON, B. L.; VUORISTO, J. T.; CUI, J.; PROCKOP, D. J. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). **Journal of Bone and Mineral Research**, n. 19, p. 256-264, 2004.

- SOTTILE, V.; THOMSON, A.; MCWHIR, J. In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. **Cloning & Stem Cells**, v. 5, n. 2, p. 149-158, 2003.
- SHIH, D. T.; LEE, D. C.; CHEN, S. C.; TSAI, R. Y.; HUANG, C. T.; TSAI, C. C.; SHEN, E. Y.; CHIU, W. T. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. **Stem Cells**, n. 23, p. 1012-1020, 2005.
- SHIPLEY, M. T.; ENNIS, M. Functional organization of olfactory system. **Journal of Neurobiology**, v. 1, n. 30, p. 123-176, 1996.
- SHOU, J.; RIM, P. C.; CALOF, A. L. BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. **Nature Neuroscience**, n. 2, p. 339-345, 1999.
- SUZUKI, Y.; TAKEDA, M.; FARBMAN, A. I. Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 376, p. 509-517, 1996.
- SUZUKI, Y.; TAKEDA, M.; OBORA, N.; SUZUKI, N.; TAKEICHI, N. Olfactory epithelium consisting of supporting cells and horizontal basal cells in the posterior nasal cavity of mice. **Cell Tissue Res**, n. 299, p. 313-325, 2000.
- TAUPIN, P.; GAGE, F. H. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. **Journal of Neuroscience Research**, n. 69, p. 745-749, 2002.
- TEMPLE, S. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. **Nature**, v. 340, p. 471-473, 1989.
- TEMPLE, S. The development of neural stem cells. **Nature**, v. 414, p. 112-117, 2001.
- TINTUT, Y.; ALFONSO, Z.; SAINI, T.; RADCLIFF, K.; WATSON, K.; BOSTROM, K.; DEMER, L. L. Multilineage potential of stem cells from the artery wall. **Circulation**, n. 108, p. 2505-2510, 2003.
- TSUJI, T.; SASAKI, K.; KIMURA, Y.; YAMADA, K.; MORI, M.; SHINOZAKI, F. Measurement of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its clinical application in oral cancer. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg**, v. 21, p. 369-372, 1992.
- UCHIDA, N.; BUCK, D. W.; DONGPING, H. E.; REITSMA, M. J.; MASEK, M.; PHAN, T. V.; TSUKAMOTO, A. S.; GAGE, F. H.; EISSMAN, I. L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. **PNAS**, v. 7, n. 26, p. 14720-14725, 2000.
- VASSAR, R.; NGAL, J.; AXEL, R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. **Cell**, n. 74, p. 309-318, 1993.
- VIKTOROV, I. V.; SAVCHENKO, E. A.; UKHOVA, O. V.; YU, ALEKSEYEVA, N.; CHEKHONIN, V. P. Multipotent stem and progenitor cells of the olfactory epithelium. **Cell Technologies in Biology and Medicine**, v. 2, n. 4, p. 495-502, 2006.

YANG, L.; SUWA, T.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W.; HORNSBY, P. J. Telomere shortening and decline in replicative potential as a function of donor age in human cells. **Mech. Ageing Dev.**, v. 122, p. 1685-1694, 2001.

ZHANG, X.; CAI, J.; KLUEBER, K. M.; GUO, Z.; LU, C.; QIU, M.; ROISEN, F. J. Induction of oligodendrocytes from adult human olfactory epithelial-derived progenitors by transcription factors. **Stem Cells**, v. 23, p. 442-453, 2005.

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**, p. 1073-1074, 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.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H.. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Cell biology**, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, 2002.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v. 116, p. 639-648, 2004.

WEILLER, E.; FARBMAN, A. I. Mitral cells loss following lateral olfactory tract transection increases proliferation density in rat olfactory epithelium. **European Journal of Neuroscience**, n. 11, p. 3265-3275, 1999.

WEWETZER, K.; VERDU, E.; ANGELOV, D.N.; NAVARRO, X. Olfactory ensheathing Glia and Schwann cells: two of a kind?. **Cell Tissue Research**, n. 309, p. 337-345, 2002.