



Universidade Nova de Lisboa  
Faculdade de Ciências Médicas

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AUTOTRANSPLANTAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS**  
**OLFACTIVAS NO TRATAMENTO DAS LESÕES**  
**TRAUMÁTICAS CRÓNICAS DA MEDULA ESPINAL**  
**ESTUDOS DA REGIÃO OLFATIVA E DA SUA MUCOSA**

**Pedro Alberto Batista Brissos de Sousa Escada**  
**Dissertação de Doutoramento em Medicina**

**2010**



**AUTOTRANSPLANTAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS  
OLFACTIVAS NO TRATAMENTO DAS LESÕES  
TRAUMÁTICAS CRÓNICAS DA MEDULA ESPINAL  
ESTUDOS DA REGIÃO OLFATIVA E DA SUA MUCOSA**

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Medicina,  
especialidade de Otorrinolaringologia, apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Elaborada pelo Mestre:

Pedro Alberto Batista Brissos de Sousa Escada

Orientada pelo Professor Associado com Agregação:

José Francisco Higinio Madeira da Silva

Co-Orientada pelo Licenciado:

António Carlos Lima da Costa



*Aos meus Pais*

*À minha tia Maria Teresa*

*Ao meu irmão António*

*Aos meus sobrinhos Mariana, António,*

*Mafalda e Maria*



*A memória só conta realmente se tiver  
ao mesmo tempo a marca do passado e  
o projecto do futuro, se permitir fazer  
sem o esquecer o que se queria fazer, de  
se tornar sem deixar de ser, de ser sem  
deixar de se tornar.*

**Italo Calvino**

*Acreditai que a dignidade em que hão-de  
falar-vos tanto  
Não é senão essa alegria que vem  
De estar-se vivo e sabendo que  
nenhuma vez  
Alguém está menos vivo ou sofre ou  
morre.*

**Jorge de Sena**



## **Agradecimentos:**

Os agradecimentos aqui expressos dirigem-se àqueles que contribuíram para a concretização do trabalho descrito nesta dissertação mas dirigem-se igualmente aos que, pelo seu exemplo ou pela sua actuação, contribuíram de alguma forma para a minha educação médica e académica:

- Ao Prof. Doutor Madeira da Silva, Orientador desta Dissertação, agradeço o facto de sempre ter temperado o seu rigor e espírito crítico elevados por uma ainda maior e mais permanente generosidade.
- Ao Dr. Carlos Lima, Co-orientador desta Dissertação, agradeço a oportunidade de me ter permitido participar nas investigações deste projecto original e multidisciplinar.
- Ao Doutor José Pratas Vital agradeço a sua importante participação em parte do trabalho descrito nesta dissertação, mas agradeço igualmente ter-me ensinado o valor do estudo e do treino experimental em cirurgia.
- Ao Prof. Doutor Celso Cunha e aos Doutores Verónica Carvalhal, Vera Basto, Helder Cruz e Pedro Cruz agradeço a sua importante participação em parte do trabalho descrito nesta dissertação.
- Ao Dr. Francisco Costa Santos e a todos os profissionais do Serviço de Patologia Forense da Delegação de Lisboa do Instituto Nacional de Medicina Legal agradeço todas as facilidades concedidas para a realização dos estudos em cadáver.
- Aos autores e co-autores das publicações em que participei e que serviram de base à realização desta dissertação agradeço a sua preciosa colaboração na concretização deste trabalho.
- À Dra. Maria Clara Capucho agradeço a determinação na realização das muitas actividades e realizações científicas em que ambos participámos.

- Ao Prof. Doutor Rui Penha, agradeço o exemplo que me soube transmitir de entusiasmo pela actividade científica e pela participação na vida académica.
- Ao Prof. Doutor Pedro Abecasis, agradeço o seu estímulo e a colaboração e confiança transmitidas em todas as actividades científicas que organizámos.
- Ao Prof. Doutor João Goyri O'Neill, agradeço a confiança e apoio inestimáveis que me soube transmitir em momentos importantes da minha vida académica.
- Aos académicos da minha especialidade, que me serviram de exemplo, e aos académicos da minha faculdade, que me ensinaram, agradeço a influência que sobre mim exerceram na ambição de participar na vida académica.
- A todos os colegas do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas e do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Egas Moniz, de agora e do passado, agradeço a sua contribuição para a minha formação médica e científica.
- A todos os elementos da Direcção do Internato Médico do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental com que tenho trabalhado, e em particular ao Doutor Miguel Viana Baptista, ao Dr. João Lameiras Campagnolo e à D. Mariana Paulino, agradeço o dinamismo que souberam empreender nas actividades científicas em que participámos.
- A todos os dadores anónimos das peças anatómicas utilizadas neste estudo e aos doentes que participaram nas investigações descritas nesta dissertação o meu mais sincero reconhecimento.

## Normalização adoptada:

Esta tese está de acordo com a norma portuguesa NP 405-1 (1994), que por sua vez deriva da norma internacional ISO 690 (1987), destinadas a especificar os elementos das referências bibliográficas relativos a todos os tipos de documentos, incluindo as teses e dissertações científicas de índole académica.

Estas normas incluem a possibilidade de se utilizarem estilos diferentes de referência, dos quais os mais utilizados são o estilo **Autor-Data** e o estilo **Numerado**.

Muitas publicações privilegiam actualmente o estilo **Numerado**, no qual a citação do texto é indicada por um número de ordem crescente e a lista final de referências é ordenada pelo número da citação correspondente. Este estilo foi concebido para economizar espaço nas revistas de publicação médica periódica, onde foi amplamente aceite.

No caso concreto desta dissertação, a escolha incidiu sobre o estilo **Autor-Data**. Este caracteriza-se pela indicação do apelido dos autores (até 3) e ano da publicação na citação do texto e pela criação de uma lista final de referências por ordem alfabética do primeiro autor. A escolha teve o seguinte fundamento:

- Uma dissertação de doutoramento deve facilitar a identificação imediata da publicação referenciada, mais fácil se a citação incluir elementos essenciais do documento.
- A economia de espaço não é determinante numa dissertação de doutoramento.



## **Índice:**

Epígrafes	VII
Agradecimentos	IX
Normalização adoptada	XI
Índice	XIII
Trabalhos publicados	XVII
<b>PREÂMBULO</b>	<b>XIX</b>
<b>INTRODUÇÃO E DEFINIÇÃO DE OBJECTIVOS</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1. ANATOMIA ENDOSCÓPICA E RELEVÂNCIA CIRÚRGICA DA REGIÃO OLFACTIVA</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Introdução</b>	<b>9</b>
1.1.1 Considerações gerais	9
1.1.2 Aspectos históricos	9
1.1.3 Limites da região olfactiva	11
1.1.4 A região olfactiva como sede de patologia própria	12
1.1.5 Biópsia da região olfactiva	16
<b>1.2 Objectivos</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Métodos</b>	<b>22</b>
1.3.1 Permeabilidade das fossas nasais e exposição da região olfactiva	24
1.3.2 Modelo segmentar	25
1.3.3 Estudo morfométrico e descritivo	26
1.3.3.1 Alargamento cirúrgico da região olfactiva	27
1.3.3.2 Distâncias	28
1.3.3.3 Anatomia descritiva da região olfactiva	29
<b>1.4 Resultados</b>	<b>30</b>
1.4.1 Modelo segmentar e permeabilidade nasal	30
1.4.2 Permeabilidade nos segmentos da região A e sua repercussão na exposição da região olfactiva	31
1.4.3 Permeabilidade nos segmentos da região B e sua repercussão na exposição da região olfactiva	32
1.4.4 Sucesso na exposição da região olfactiva	34
1.4.5 Estudo morfométrico	35
1.4.6 Anatomia descritiva da região olfactiva	37
<b>1.5 Discussão</b>	<b>45</b>
1.5.1 Resumo geral dos resultados	45
1.5.2 Limitações do estudo	46
1.5.3 Significado clínico dos resultados	46
1.5.4 Conclusões	48
<b>CAPÍTULO 2. LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA MUCOSA OLFACTIVA HUMANA NAS FOSSAS NASAIS</b>	<b>49</b>
<b>2.1 Introdução</b>	<b>51</b>
2.1.1 Considerações gerais	51
2.1.2 Composição da mucosa olfactiva	51
2.1.3 Aspectos evolutivos	55
2.1.4 Homeostase neuronal olfactiva	56
2.1.5 Localização e distribuição da mucosa olfactiva	58

2.1.6 Mapeamento da região olfactiva	59
2.1.7 Identificação da mucosa olfactiva pela microscopia óptica	62
<b>2.2. Objectivos</b>	65
<b>2.3. Métodos</b>	66
2.3.1 Colheita das peças anatómicas da região olfactiva	66
2.3.2 Critérios de selecção das peças anatómicas	67
2.3.3 Processamento e observação das lâminas	67
2.3.4 Análise histológica e morfométrica da região olfactiva	68
2.3.5 Morfologia das paredes septal e turbinal da região olfactiva	71
2.3.6 Imagens utilizadas	72
<b>2.4. Resultados</b>	73
2.4.1 Banco de peças anatómicas da região olfactiva	73
2.4.2 Selecção das peças anatómicas	73
2.4.3 Identificação positiva da região olfactiva	73
2.3.4 Análise histológica e morfométrica da região olfactiva	74
2.3.5 Paredes septal e turbinal da região olfactiva	77
<b>2.5 Discussão</b>	79
2.5.1 Resumo geral dos resultados	79
2.5.2 Limitações do estudo	80
2.5.3 Comparação dos resultados com os de outros estudos	81
2.5.4 Significado clínico dos resultados	82
2.5.4 Conclusões	82
<b>CAPÍTULO 3. COLHEITA DE MUCOSA OLFRACTIVA POR VIA TRANSNASAL ENDOSCÓPICA. DISSECÇÃO CADAVERICA E TÉCNICA CIRÚRGICA PASSO A PASSO</b>	83
<b>3.1 Introdução</b>	85
<b>3.2 Objectivos</b>	86
<b>3.3 Métodos</b>	87
3.3.1 Estudo em cadáver	87
3.3.2 Casos cirúrgicos	87
<b>3.4 Resultados</b>	89
3.4.1 Estudo em cadáver	89
3.4.2 Técnica cirúrgica passo a passo	97
3.4.2.1 Preparação geral da operação	97
3.4.2.2 Primeiro tempo operatório: tempo neurocirúrgico de exposição e preparação da medula espinal	98
3.4.2.3 Tempo otorrinolaringológico: colheita de mucosa olfactiva por via transnasal endoscópica	100
3.4.2.4 Segundo tempo neurocirúrgico: preparação e transplantação da mucosa olfactiva	110
<b>3.5 Discussão</b>	113
3.5.1 Resumo geral dos resultados	113
3.5.2 Limitações do estudo	113
3.5.3 Significado clínico dos resultados	118
3.5.4 Conclusões	120
<b>CAPÍTULO 4. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DA MUCOSA OLFRACTIVA HUMANA NO ADULTO</b>	121
<b>4.1 Introdução</b>	123
4.1.1 Considerações gerais	123
4.1.2 Identificação das células estaminais	124
4.1.3 Meios de cultura utilizados	125

<b>4.2 Objectivos</b>	127
<b>4.3 Métodos</b>	128
4.3.1 Selecção dos pacientes	128
4.3.2 Colheita da mucosa olfactiva	128
4.3.3 Transporte	129
4.3.4 Dissociação do tecido e isolamento das células	129
4.3.5 Contagem e viabilidade das células	131
4.3.6 Teor em células estaminais após a dissociação	131
4.3.6.1 Teor em células estaminais: células CD133-positivas	131
4.3.6.2 Teor em células estaminais: células nestina-positivas	132
4.3.6.2.1 Passos da imunofluorescência: adesão celular a uma superfície	132
4.3.6.2.3 Passos da imunofluorescência: fixação	132
4.3.6.2.2 Passos da imunofluorescência: bloqueio	133
4.3.6.2.4 Passos da imunofluorescência: marcação	133
4.3.6.2.5 Passos da imunofluorescência: coloração do núcleo e montagem para visualização microscópica	134
4.3.6.2.6 Passos da imunofluorescência: controles	134
4.3.7 Cultura das células estaminais olfactivas	134
4.3.7.1 Cultura das células: determinação do meio de cultura mais favorável	134
4.3.7.2 Cultura das células: cocultura no meio ECBioNS19	137
4.3.7.3 Cultura das células: passagem das células aderentes	139
4.3.7.4 Cultura das células: propagação das células por longos períodos	139
4.3.7.4.1 Imunoreactividade à nestina nas culturas por longos períodos	139
4.3.7.4.2 Percentagem de células CD133-positivas nas culturas por longos períodos	139
4.3.7.4.3 Imunoreactividade à $\beta$ -tubulina (isotipo III) nas culturas por longos períodos	140
4.3.7.4.3 Imunoreactividade ao GFAP nas culturas por longos períodos	140
4.3.7.4.3 Imunoreactividade à vimentina nas culturas por longos períodos	140
<b>4.4 Resultados</b>	141
4.4.1 Dissociação dos tecidos	141
4.4.2 Contagem e viabilidade das células após a dissociação	142
4.4.3 Teor em células estaminais: separação magnética	142
4.4.4 Teor em células estaminais: imunofluorescência	143
4.4.4.1 Passos da imunofluorescência: adesão celular a uma superfície	143
4.4.4.2 Passos da imunofluorescência: bloqueio	143
4.4.4.3 Passos da imunofluorescência: marcação das células	143
4.4.5 Cultura das células estaminais olfactivas	144
4.4.6 Co-culturas no meio ECBioNS19	147
4.4.7 Passagem das células aderentes	152
4.4.8 Propagação das células e culturas por longos períodos	154
4.4.8.1 Imunoreactividade à nestina nas culturas por longos períodos	155
4.4.8.2 Células CD133-positivas nas culturas por longos períodos	157
4.4.8.3 Imunoreactividade à $\beta$ -tubulina (isotipo III) nas culturas por longos períodos	157
4.4.8.4 Imunoreactividade ao GFAP nas culturas por longos períodos	158
4.4.8.5 Imunoreactividade à vimentina	158
<b>4.5 Discussão</b>	159
4.5.1 Resumo geral dos resultados	159
4.5.2 Limitações do estudo	159
4.5.3 Importância clínica dos resultados	160
4.5.4 Investigações futuras	161
4.5.5 Conclusões	161

<b>CAPÍTULO 5. SEGURANÇA E EFICÁCIA DOS AUTO-TRANSPLANTES DE MUCOSA OLFACTIVA NO TRATAMENTO DAS LESÕES TRAUMÁTICAS CRÓNICAS SEVERAS DA MEDULA ESPINAL EM SERES HUMANOS</b>	163
<b>5.1. Introdução</b>	165
<b>5.2 Objectivos</b>	169
<b>5.3 Métodos</b>	170
5.3.1 Estudo da fase I	170
5.3.1.1 Desenho do estudo	170
5.3.1.2 Selecção dos doentes e critérios de inclusão	170
5.3.1.3 Operação	171
5.3.1.4 Estudos de seguimento	171
5.3.1.5 Análise estatística	171
5.3.1.6 Financiamento	171
5.3.2 Estudo da fase II	172
5.3.2.1 Desenho do estudo	172
5.3.2.2 Selecção dos doentes e critérios de inclusão	172
5.3.2.3 Operação	173
5.3.2.4 Reabilitação pré- e pós-operatória	173
5.3.2.5 Estudos de seguimento	173
5.3.2.6 Variáveis estudadas	174
5.3.2.7 Análise estatística	175
5.3.2.8 Financiamento	175
<b>5.4 Resultados</b>	176
5.4.1 Estudo da fase I	176
5.4.1.1 Exequibilidade	176
5.4.1.2 Segurança	177
5.4.1.2 Eficácia	179
5.4.2 Estudo da fase II	182
5.4.2.1 Segurança	182
5.4.2.2 Eficácia	183
5.4.2.2.1 Avaliação neurológica (escala ASIA)	183
5.4.2.2.2 Avaliação funcional e da marcha	185
5.4.2.2.3 Avaliações electrofisiológicas	187
5.4.2.2.4 Estudos urodinâmicos	188
5.4.2.2.5 Ressonância magnética	188
<b>5.5 Discussão</b>	190
5.5.1 Resumo geral dos resultados	190
5.5.2 Limitações do estudo	190
5.5.3 Validação dos resultados por entidade externa	192
5.5.4 Comparação dos resultados com os de outros estudos	192
5.5.5 Importância da mucosa olfactiva e das suas células para os resultados	193
5.5.6 Efeitos da colheita da mucosa olfactiva nas fossas nasais e no olfacto	194
<b>CONCLUSÕES</b>	197
<b>RESUMO</b>	203
<b>ABSTRACT</b>	207
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	211

**Trabalhos preliminares publicados dentro da temática da dissertação de doutoramento:**

**Resumos publicados**

- C. Lima, J. Pratas-Vital, P. Escada, A. Hasse-Ferreira e J. D. Peduzzi (2004). Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: from rats to humans. 2004 International Campaign for cures of spinal cord injury paralysis: spinal cord injury clinical trials workshop. Vancouver, Canadá.
- P. Escada, C. Lima, J. Pratas-Vital, A. Hasse-Ferreira, C. Capucho e J. D. Peduzzi (2005). Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. XVIII IFOS World Congress. Roma, Itália.
- C. Lima, J. P. Vital, P. Escada, A. H. Ferreira, C. Capucho e J. Peduzzi (2005). "Cellular therapies for human spinal cord injury: The olfactory mucosa autograft experience "ongoing clinical trial"." European Journal of Neurology **12 (Suppl. 2)**(34).

**Trabalhos publicados "in extenso"**

- C. Lima, J. Pratas-Vital, P. Escada, A. Hasse-Ferreira, C. Capucho e J. D. Peduzzi (2006). "Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study." Journal of Spinal Cord Medicine **29**(3): 191-203.
- A. V. Carvalhal, C. Lima, V. Basto, C. Cunha, P. Escada, H. Cruz e P. Cruz (2005). Adult human neural stem/progenitor cells from the olfactory epithelium and olfactory lamina propria, isolation method, proliferation and differentiation in serum free culture medium and utilization for transplantation (Patente Portuguesa). Boletim da Propriedade Industrial, nº 103333.

- A. V. Carvalho, C. Lima, V. Basto, C. Cunha, P. Escada, H. Cruz e P. Cruz (2007). Adult human neural stem/progenitor cells from the olfactory epithelium and olfactory lamina propria, isolation method, proliferation and differentiation in serum free culture medium and utilization for transplantation (Patente Internacional). **WO/020611**.
- P. Escada, C. Capucho, C. Lima, J. Pratas\_Vital e J. Madeira\_da\_Silva (2007). "Transplantes autólogos de mucosa olfactiva em doentes traumatizados da medula espinal." Clínica e Investigação em Otorrinolaringologia **1**(3): 128-138.
- P. Escada, C. Capucho e J. Madeira\_da\_Silva (2008). "Diagnóstico diferencial da "cefaleia sinusal". O papel do otorrinolaringologista." Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. **46**(4): 251-256.
- P. Escada e J. Madeira\_da\_Silva (2008). "Anatomia endoscópica e relevância cirúrgica da região olfactiva." Clínica e Investigação em Otorrinolaringologia. **2**(3): 256-267.
- P. Escada, C. Lima e J. Madeira\_da\_Silva (2009). "The human olfactory mucosa." European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck Surgery. **266**(11): 1675-1680.
- C. Lima, P. Escada, J. Pratas-Vital, C. Branco, C. A. Arcangeli, G. Lazzeri, C. A. Santana\_Maia, C. Capucho, A. Hasse-Ferreira, e J. D. Peduzzi (2009). "Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury." Neurorehabilitation and Neural Repair. **24**(1): 10-22.

# **PREÂMBULO**



Quando Prometeu transgrediu a lei dos deuses antigos e roubou o fogo para a humanidade, para lhe transmitir a civilização e as artes, a sua punição foi exemplar: Júpiter acorrentou o grande Titã a uma rocha do cume do monte Cáucaso, onde diariamente um abutre se alimentava do seu fígado, que se regenerava tão rapidamente quanto era devorado ([Ésquilo, Sófocles e Eurípidos 1993](#)).

Além de simbolizar a vontade e a audácia humanas pelo conhecimento e pela sua demanda, a lenda de Prometeu captura bem outro aspecto essencial da natureza humana: o potencial notável do corpo para se auto-reparar ([Rosenthal 2003](#)).

Não que nós, simples mortais, possuamos fígados com uma tão tremenda capacidade de regeneração. Todavia, ao longo da vida, somos submetidos repetidamente a lesões não tão ofensivas, das quais recuperamos espontaneamente, muitas das vezes sem nos apercebemos que fomos feridos. Isso só é possível porque o organismo tem a capacidade de recrutar e proliferar células capazes de restaurar os tecidos à sua forma e função originais. Essas células retêm uma memória colectiva do processo complexo de desenvolvimento pelo qual o tecido foi construído inicialmente, o que nos leva de novo à lenda de Prometeu, cujo nome significa “promessa” ou “premeditação” ([Radice 1973](#)).

No passado, presumia-se que as populações de células progenitoras indiferenciadas contribuíam exclusivamente para a reconstituição do órgão no qual residiam. Esta restrição explicava a razão pela qual alguns órgãos não tinham capacidade de regeneração: simplesmente esses órgãos não mantinham uma população de células progenitoras suficientemente robusta. O exemplo mais dramático é o do sistema nervoso central, a que desde há muito tempo se reconhece uma resistência especial à regeneração e reparação após doenças ou insultos ([Davies, Fitch, Mumberg et al. 1997](#); [Barnett, Alexander, Iwashita et al. 2000](#); [Bartolomei e Greer 2000](#); [Ruff, McKerracher e Selzer 2008](#); [Zietlow, Lane, Dunnett et al. 2008](#)).

Nas últimas décadas, porém, o conceito de regeneração específica de órgão foi ultrapassado por descobertas de que era possível isolar, em vários tecidos do corpo, células multipotentes capazes de dar origem a várias

linhagens celulares. Essas células do organismo adulto, genericamente designadas de células estaminais (stem cells), assemelham-se de alguma forma às populações de células pluripotentes derivadas do embrião no estadio inicial, capazes de dar origem a todos os tipos celulares dum organismo adulto (Preston, Alison, Forbes *et al.* 2003).

Designa-se por Medicina Regenerativa a transplantação, com propósitos curativos, de células estaminais que tenham capacidade para promover a regeneração das células ou tecidos do hospedeiro que estejam lesados e que tenham perdido a capacidade para se auto-reparar (Escada, Capucho, Lima *et al.* 2007).

A presença de células estaminais na mucosa olfactiva humana, com capacidade de auto-renovação e multipotência, já foi demonstrada (Wolozin, Sunderland, Zheng *et al.* 1992; Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998; Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Carvalhal, Lima, Basto *et al.* 2007) e as linhagens celulares que se obtiveram a partir da sua diferenciação incluem vasos sanguíneos, músculo cardíaco e esquelético, intestino, fígado, espinal medula e cérebro (Murrell, Feron, Wetzig *et al.* 2005). A mucosa olfactiva, única estrutura localizada periféricamente onde estão neurónios com projecção directa no sistema nervoso central e única localização superficial onde se encontram células estaminais nervosas (Perry, Mackay-Sim, Feron *et al.* 2002), tem vindo ademais a ser reconhecida pela sua grande e permanente capacidade de regeneração (Graziadei e Graziadei 1979; Calof e Chikaraishi 1989; Schwob, Youngentob e Mezza 1995; Murrell, Bushell, Livesey *et al.* 1996).

Contudo, não é apenas a capacidade própria que as células olfactivas têm de se regenerar, mas também a dos seus axónios se projectarem, do epitélio para o bulbo olfactivo, de uma forma não aleatória mas que revela uma navegação precisa na organização espacial e topográfica das suas conexões (Key 1998; Axel 2005), que faz das células olfactivas as células mais promissoras para reparar o sistema nervoso central.

As células da mucosa olfactiva podem ser obtidas através da exploração das fossas nasais por meios minimamente invasivos, por exemplo usando endoscópios (Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998; Winstead, Marshall, Lu *et al.* 2005). A identificação desta fonte acessível e universal de células estaminais, que podem ser obtidas sem dano permanente (Lanza, Deems, Doty *et al.* 1994) no

próprio indivíduo, veio permitir perspectivar a transplantação autóloga das células estaminais, eliminando a necessidade de imunossupressão e resolvendo em simultâneo os problemas éticos relacionados com a utilização das células estaminais embrionárias (Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Peduzzi-Nelson 2002; Peduzzi-Nelson 2003; Peduzzi-Nelson 2004).



## **INTRODUÇÃO E DEFINIÇÃO DE OBJECTIVOS**



A intenção deste trabalho é relatar um contributo pessoal para a utilização da mucosa olfactiva humana em medicina regenerativa, no tratamento das lesões traumáticas da medula espinal.

Em 2001, fui convidado pelo Dr. Carlos Lima, neurologista e neuropatologista do Hospital de Egas Moniz, para integrar a sua equipa de investigação, que ambicionava explorar a utilização dos transplantes autólogos de mucosa olfactiva na reparação das lesões traumáticas da medula espinal. O interesse do Dr. Carlos Lima no assunto vinha já de 1987, altura em que ele, com o Doutor Pratas Vital, neurocirurgião, tinha já realizado experiências em cobaios nos quais tinham transplantado mucosa olfactiva de outros animais da mesma espécie, em lesões completas da medula espinal criadas experimentalmente ([Lima e Pratas-Vital 1987](#)).

É preciso sublinhar que em 1987, a literatura médica só registava a ocorrência de 4 publicações sobre o assunto (pesquisa da *Medline* realizada com a expressão: *olfactory and regeneration and spinal cord*). Nenhuma das investigações tinha o mesmo propósito das investigações empreendidas pelo Dr. Carlos Lima e pelo Doutor Pratas Vital, o que permite considerar o seu trabalho experimental como o corolário de uma ideia que era inovadora, senão revolucionária, para a época.

Nos anos seguintes assistiu-se à publicação de um número crescente de trabalhos científicos sobre o assunto, e a mucosa olfactiva e a medicina regenerativa começaram a estar na ordem do dia (uma pesquisa da *Medline* utilizando as mesmas palavras e operadores registava 52 publicações até ao final do ano de 2001), razão que impulsionou o Dr. Carlos Lima a retomar as suas preocupações e as suas investigações.

Uma das constatações mais evidentes para quem fazia, à data, uma revisão dos trabalhos realizados sobre a matéria era, todavia, o fraco envolvimento da medicina clínica nessas investigações. Aquilo que é actualmente designado como de medicina translacional (“*translational medical research*”), que se pode condensar na expressão mais coloquial de “*from bench to bedside*” ou “da bancada (do laboratório) para a cabeceira (do doente)”, ou seja, a investigação que tem como propósito primeiro o de estabelecer uma

aplicação e um benefício clínico concreto dos resultados das investigações nas ciências básicas (Fontanarosa e DeAngelis 2002; Marincola 2003) ainda não se tinha imposto, neste assunto em particular, como uma questão ética pertinente a ser considerada na investigação (Cribb, Wainwright, Williams *et al.* 2008; Maienschein, Sunderland, Ankeny *et al.* 2008).

A reduzida participação da otorrinolaringologia nesta questão também podia ser constatada, sintomaticamente, pela verificação do número mínimo de trabalhos indexados provenientes de serviços de otorrinolaringologia ou publicados em revistas de otorrinolaringologia sobre medicina regenerativa e células olfactivas: 5 trabalhos até 2001 (Graziadei e Monti Graziadei 1983; Biedlingmaier, Whelan, Zoarski *et al.* 1996; Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998; Nibu, Li, Zhang *et al.* 1999; Holbrook, DiNardo e Costanzo 2001) e apenas mais 9 trabalhos de 2002 até à data actual, nos quais se incluem 4 trabalhos publicados pelo nosso grupo de investigação (Lane, Gomez, Dankulich *et al.* 2002; Escada, Lima, Pratas-Vital *et al.* 2005; Winstead, Marshall, Lu *et al.* 2005; Lima, Pratas-Vital, Escada *et al.* 2006; Watanabe, Kondo, Takeuchi *et al.* 2006; Mackay-Sim, Feron, Cochrane *et al.* 2008; Xue, Qiao, Qiu *et al.* 2008; Escada, Lima e Madeira da Silva 2009; Lima, Escada, Pratas-Vital *et al.* 2009).

No caso concreto da hipótese de investigação principal do nosso trabalho, que era a do valor terapêutico e da aplicabilidade clínica da auto-transplantação de mucosa olfactiva no tratamento das lesões traumáticas crónicas da medula espinal (paraplegia e tetraplegia), os problemas a que a otorrinolaringologia entendia ter que dar resposta ou solução, e que constituem os objectivos do trabalho que são descritos nesta tese de dissertação são os seguintes:

### **Capítulo 1:**

Investigar a anatomia cirúrgica da região olfactiva na perspectiva de uma abordagem transnasal endoscópica. Esse estudo, como demonstraremos, nunca foi realizado, uma vez que a região olfactiva, encarada individualmente, não foi até à data considerada cirurgicamente relevante ou interessante.

**Capítulo 2:**

Determinar, da forma mais precisa e interessante para os nossos propósitos, a localização e a distribuição da mucosa olfactiva humana nas fossas nasais.

**Capítulo 3:**

Conceber uma técnica cirúrgica nova e original, destinada a colher a mucosa olfactiva humana para a sua transplantação autóloga imediata. Uma vez desenvolvida, a técnica teria aplicação nos doentes com traumatismo crónico e severo da medula espinal, candidatos ao tratamento com células estaminais olfactivas.

**Capítulo 4:**

Colaborar com investigadores das ciências básicas no processo de colheita, isolamento e proliferação de células estaminais adultas obtidas a partir de biópsias da mucosa olfactiva. Com esses estudos procurar-se-á validar a aplicação terapêutica destas células e antecipar outras aplicações clínicas potenciais das mesmas células.

**Capítulo 5:**

Demonstrar a exequibilidade, segurança e eficácia dos auto-transplantes de mucosa olfactiva na reparação das lesões traumáticas crónicas e severas da medula espinal.



## **CAPÍTULO 1**

# **ANATOMIA ENDOSCÓPICA E RELEVÂNCIA CIRÚRGICA DA REGIÃO OLFACTIVA**



## 1.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 Considerações gerais

A abordagem cirúrgica da região olfactiva tem-se limitado à realização de operações mutilantes para tratar neoplasias, à execução de abordagens endoscópicas à base do crânio que passam nos limites da região ou à realização de biópsias da mucosa olfactiva com propósitos de investigação. A definição da região olfactiva como região anatómica particular, com limites bem definidos, patologia própria e anatomia cirúrgica a considerar nunca foi bem particularizada.

### 1.1.2 Aspectos históricos

Muitas das contribuições mais importantes para o conhecimento da anatomia naso-sinusal foram produzidas nos últimos 150 anos por autores como van Alyea, Dixon, Grünwald, Hajek, Halle, Hartmann, Heymann, Hilding, Ingal, Kasper, Keros, Killian, Lothrop, Messerklinger, Mosher, Mouret, Neivert, Ohnishi, Onodi, Proetz, Schaefer, Siebenmann, Uffenorde, Whitnall, Yankauer e Zuckerkandl, pelo menos a acreditar em Johannes Lang, que isso nos dá a conhecer no magnífico tratado, editado em 1988: *Klinische Anatomie der Nase, Nasenhöhle und Nebenhöhlen. Grundlagen für Diagnostik und Operation* (Lang 1988) que foi logo depois traduzido, um ano mais tarde, para a língua inglesa com o título: *Clinical anatomy of the nose, nasal cavity and paranasal sinuses* (Lang 1989).

No que diz respeito ao tratamento cirúrgico, até aos anos 80 do século XX a região olfactiva considerada individualmente não era cirurgicamente interessante. O tratamento cirúrgico da patologia naso-sinusal cirúrgica mais prevalente - a patologia inflamatória – dirigia a dissecação para os recessos da parede lateral das fossas nasais, não tendo que ter em atenção as particularidades anatómicas da região olfactiva. Por outro lado, as raras operações que incluíam a dissecação da lâmina crivosa do etmóide e da

região olfactiva destinavam-se a tratar tumores malignos como o esteseoneuroblastoma olfactivo, e eram operações agressivas e mutilantes, como a ressecção crânio-facial, que não se podiam preocupar com a fisiologia deste órgão dos sentidos nem com as considerações anatómicas mais detalhadas desta região (Ketcham, Wilkins, Vanburen *et al.* 1963).

Como todos sabemos, a cirurgia endonasal moderna, e particularmente aquela que utiliza os endoscópios, desenvolveu-se a partir da década de 80 graças às investigações e descrições de um número muito importante de cirurgiões, que incluíram, entre outros, Messerklinger (Messerklinger 1978), Wigand (Wigand 1989), Draf (Draf 1978; Draf 1983), Stammberger (Stammberger 1991), Terrier (Terrier 1991) e Kennedy (Kennedy 1985; Kennedy, Zinreich, Rosenbaum *et al.* 1985).

Nas décadas seguintes, assistiu-se à consolidação de uma técnica, a cirurgia endonasal endoscópica (ou microscópica), baseada numa investigação sistemática da microanatomia e da fisiologia, que progressivamente foi estendendo as suas indicações a partir do tratamento da rinosinusite crónica, passando a incluir o tratamento da epistaxis, dos tumores benignos e malignos, da patologia do sistema lacrimal, da órbita, do nervo óptico e da base do crânio (Hosemann, Weber, Keerl *et al.* 2000; Clemente 2005).

Actualmente, assiste-se a uma extensão ainda maior das possibilidades da cirurgia endoscópica, personalizada nos otorrinolaringologistas mas também nos neurocirurgiões. Esse desenvolvimento iniciou-se com a utilização das técnicas transnasais endoscópicas para abordagem da sela turca (Jankowski, Auque, Simon *et al.* 1992; Jho, Carrau e Ko 1996; Cappabianca, Alfieri e de Divitiis 1998), mas já se estendeu para outras regiões como o ápex petroso (Duvvuri, Snyderman e Kassam 2004), o seio cavernoso (Frank e Pasquini 2003), ou áreas anatómicas já definitivamente intracranianas, como a região supraselar e as regiões anatómicas que são expostas após a fenestração do planum esfenoideal ou do clivus (Cappabianca, Frank, Pasquini *et al.* 2003). Já foi afirmado que a abordagem transnasal endoscópica virá a permitir o acesso a lesões localizadas numa extensão que vai da apófise *crista gali* à segunda vértebra cervical (Maroon 2005).

Numa perspectiva que considera mais particularmente a região olfactiva, poder-se-á então afirmar que as abordagens cirúrgicas que foram desenvolvidas começaram por não considerar a região por não ser a sede das patologias correspondentes e evoluíram para uma outra fase em que as abordagens cirúrgicas transpunham a região olfactiva, todavia, sem que da mesma forma se manifestasse uma preocupação com a anatomia e as particularidades desta região. De qualquer forma o resultado foi o de que, antes e depois, a anatomia e a relevância cirúrgica da região olfactiva nunca foram suficientemente consideradas, ou, pelo menos, sistematizadas.

### **1.1.3 Limites da região olfactiva**

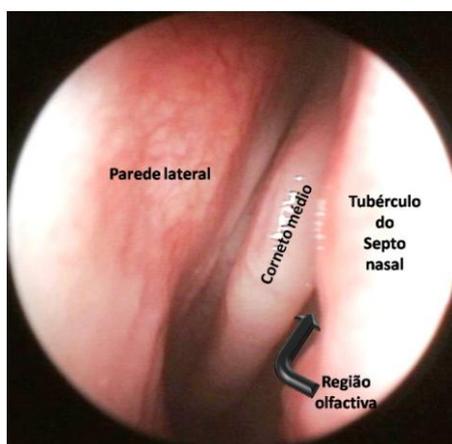
Para efeitos da sua definição como uma região anatómica precisa, propõe-se que se considere como região olfactiva o espaço da fossa nasal situado entre o corneto médio e superior, por um lado, e o septo nasal, por outro. Além do espaço propriamente dito – a fenda olfactiva – a região inclui ainda as respectivas paredes: superior (lâmina crivosa); medial (septal); e lateral (turbinal). A parede posterior corresponde à parede anterior do seio esfenoidal. Anteriormente e inferiormente a região comunica directamente com a fossa nasal através de um espaço, ou hiato, situado entre o bordo respectivo do corneto médio e o septo nasal confrontante.

É importante referir que até à data nunca foi proposta uma definição topográfica clara da região, ou porque a questão da distribuição da mucosa olfactiva nunca foi devidamente considerada na apreciação da região olfactiva como um região anatómica bem individualizada ou, mais provavelmente, porque o olfacto tem sido até ao presente, como já se mencionou, uma área negligenciada em rinologia ([Doty e Mishra 2001](#); [Lund 2008](#); [Escada, Lima e Madeira da Silva 2009](#)).

Assim definida, reconhece-se na região uma função evidente de protecção do órgão olfactivo. A protecção da região é extremamente importante, uma vez que a mucosa olfactiva contém os corpos celulares dos neurónios bipolares olfactivos, que são verdadeiramente células do sistema nervoso central localizadas perifericamente, facto já reconhecido há quase 120 anos

pelo genial anatomista, anatomo-patologista e histologista espanhol Santiago Ramon y Cajal, prémio Nobel da Medicina em 1906 (Cajal 1890).

Assim: 1) a localização da região, distante da entrada das fossas nasais; 2) as reduzidas dimensões da fenda olfactiva; e 3) o acesso condicionado do ar inspirado, resultante do estrangulamento causado pela proximidade do bordo anterior do corneto médio ao septo nasal (Figura 1.1); são tudo factores que contribuem para a protecção desta região anatómica, tanto mais necessária quanto se sabe que as fossas nasais são sede de agressões importantes potencialmente lesivas da mucosa: agressões ambientais, infecciosas, e outras (Lanza, Moran, Doty *et al.* 1993). A demonstração de que apenas 10 a 15% do ar que entre pelas narinas alcança na realidade a fenda olfactiva (Hahn, Scherer e Mozell 1993; Keyhani, Scherer e Mozell 1995; Keyhani, Scherer e Mozell 1997; Hornung 2006) é igualmente uma demonstração dessa função protectora.



**Fig. 1.1** A localização alta e posterior da região olfactiva, distante da entrada das fossas nasais, e o seu acesso dificultado pela proximidade do bordo anterior do corneto médio ao septo nasal, conferem uma protecção muito especial a esta região.

#### **1.1.4 A região olfactiva como sede de patologia própria**

A patologia da região olfactiva não tem sido distinguida das outras entidades que afectam mais genericamente as fossas nasais ou o sistema nasosinusal. Na verdade, o paradigma da interpretação deste sistema tem favorecido mais o conceito de unidades mais alargadas, veja-se a própria alteração da designação de sinusite para rinosinusite ou a preocupação com

a relação entre o tracto respiratório superior e o tracto respiratório inferior em certas doenças (Madeira da Silva e Ribeiro 1982; Dinis e Gomes 1997). É verdade também que se tem entendido que as patologias que afectam a região são na maior parte dos casos apenas uma extensão de uma patologia mais generalizada, como é o caso, por exemplo, da polipose naso-sinusal.

Contudo, mais recentemente tem-se vindo a reconhecer que a região olfactiva pode ser sede de patologias ou quadros clínicos mais específicos e particularizados.

Biacabe *et al.*, em 2004, propõem critérios para uma definição de “doença da fenda olfactiva” (Quadro 1.1) e apresentam os achados clínicos, endoscópicos e imagiológicos de 13 doentes que cumpriam os critérios mencionados e que tinham sido seleccionados de entre os mais de 500 doentes com alterações no olfacto e/ou no gosto seguidos nessa instituição num período de 4 anos (Biacabe, Faulcon, Amanou *et al.* 2004).

**Quadro 1.1** Critérios de definição da “doença da fenda olfactiva”

---

Alteração do olfacto

Alteração clínica ou imagiológica da fenda olfactiva

Processo patológico limitado a ou predominando na fenda olfactiva

---

Os diagnósticos realizados nos doentes avaliados incluíram 3 grupos de situações (Quadro 1.2).

Nas situações de doença congénita, observa-se uma agénésia bilateral completa da fenda olfactiva. As alterações anatómicas são geralmente localizadas e as estruturas envolvidas são as que constituem a própria parede da região olfactiva: septo nasal e corneto médio. Habitualmente associam-se a um certo grau de inflamação da mucosa correspondente nas áreas de contacto. As causas inflamatórias caracterizam-se, pelo contrário, pela presença de inflamação localizada na ausência de alterações anatómicas predisponentes.

**Quadro 1.2** Etiopatogenia da “doença da fenda olfactiva”

Causa	n
<b>Congénita</b>	
Malformação bilateral da fenda olfactiva	2
<b>Anatómica</b>	
Desvio do septo nasal	2
Corneto médio bolhoso	2
Outras (sinéquia pós-operatória)	1
<b>Inflamatória</b>	
Inflamação não associada a alteração anatómica	6

Uma situação clínica que se pode enquadrar nesta “doença da fenda olfactiva” é a do caso clínico que incluímos numa revisão recentemente publicada na Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia a propósito do diagnóstico diferencial da cefaleia sinusal ([Escada, Capucho e Madeira\\_da\\_Silva 2008](#)), e no qual o corneto médio contactava o septo nasal na região olfactiva (Figuras 1.2 e 1.3), causando um quadro de cefaleias designado de “síndrome da cefaleia do corneto médio” ([Morgenstein e Krieger 1980](#)).

Este diagnóstico já foi incluído na Classificação Internacional das Cefaleias no item das “Cefaleias por ponto de contacto mucoso intranasal” (“[The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition](#)” 2004), e as alterações anatómicas associadas podem merecer um tratamento cirúrgico adequado ([Welge-Luessen, Hauser, Schmid et al. 2003](#)). Curiosamente, no caso clínico por nós descrito a perda ou a diminuição do olfacto não foi mencionada, pelo que se torna evidente que pode haver também patologia da região olfactiva sem perturbação desta função.



**Fig. 1.2** Tomografia naso-sinusal em corte coronal: bilateralmente, mas mais à direita, observa-se que as células etmoidais são volumosas e medializadas e que o corneto médio contacta francamente o septo na região olfactiva. Apesar do contacto, não se observa edema das áreas vizinhas (fotografia obtida com permissão, de Escada, P *et al.* Diagnóstico diferencial da “cefaleia sinusal”. O papel do otorrinolaringologista. Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia, 2008 (Escada, Capucho e Madeira\_da\_Silva 2008).



**Fig. 1.3** A mesma situação, em corte axial

Por outro lado, Trotier *et al.*, em 2007, apresentam os resultados das investigações realizadas em 34 indivíduos com obstrução inflamatória limitada à região olfactiva determinada por meios imagiológicos (tomografia computadorizada). O aspecto mais interessante deste trabalho foi a demonstração de que a patologia inflamatória limitada à fenda olfactiva responde muito menos aos tratamentos médicos com corticóides, antibióticos e vasoconstritores do que a patologia inflamatória mais comum,

localizada mais lateralmente nos seios perinasais (Trotier, Bensimon, Herman *et al.* 2007), o que faz pressupor, ou pelo menos suspeitar, que a patologia limitada à região olfactiva possa constituir de facto uma entidade clínica com características diversas da restante patologia inflamatória naso-sinusal.

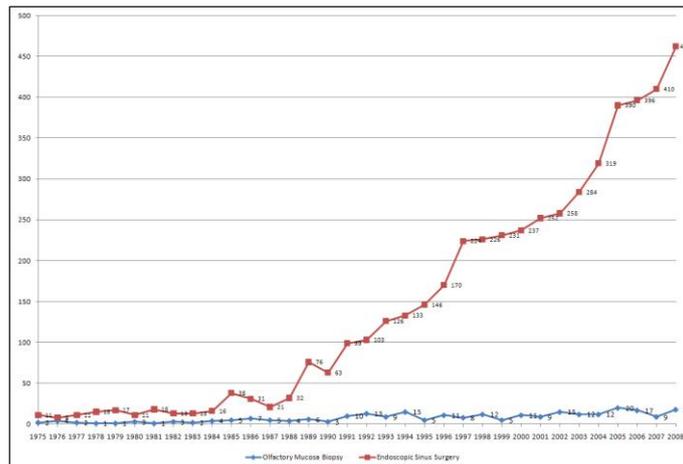
Também existem evidências que alterações mais generalizadas das fossas nasais podem ter uma origem na região olfactiva. Por exemplo, algumas poliposes naso-sinusais são consideradas “nativas” da região olfactiva, tendo origem em sítios anatómicos diversos da região, tais como o corneto superior ou a região do ósteo esfenoide (Larsen, Tingsgaard, Harcourt *et al.* 1998; Masaki e Tanaka 1998; Sethi, Lau, Chee *et al.* 1998).

### **1.1.5 Biópsia da região olfactiva**

A biópsia da mucosa olfactiva foi desenvolvida em 1982 como um recurso de investigação, para esclarecer a natureza das perturbações clínicas do olfacto e contribuir para identificar as suas causas e tratamento (Lovell, Jafek, Moran *et al.* 1982; Jafek, Eller, Johnson *et al.* 1997).

Apesar de proposta como um meio auxiliar de diagnóstico a integrar na avaliação rotineira dos doentes com perturbações do olfacto, e tendo até merecido a publicação de um artigo na popular secção da revista *Laryngoscope*: “How I do it”, em Julho de 1993 (Lanza, Moran, Doty *et al.* 1993), a biópsia da mucosa olfactiva manteve-se sempre apenas como um procedimento de investigação (Seiden 1997), utilizado apenas por um número muito limitado de centros dedicados ao estudo do olfacto ou então, mais recentemente, pelos centros que têm investigado a utilização da mucosa olfactiva em medicina regenerativa (Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Winstead, Marshall, Lu *et al.* 2005; Escada, Capucho, Lima *et al.* 2007).

Uma constatação do interesse marginal deste procedimento no contexto dos procedimentos cirúrgicos, diagnósticos ou terapêuticos, que se podem realizar nas fossas nasais, são os resultados da comparação, que fizemos, entre o número anual de publicações sobre o tema *versus* o número anual de publicações sobre cirurgia endoscópica naso-sinusal (Figura 1.4).



**Fig. 1.4** Gráfico mostrando a evolução do número de publicações indexadas na Medline entre o início de 1975 e o final de 2008 para 2 temas diversos: “Olfactory Mucosa Biopsy” e “Endoscopic Sinus Surgery”.

A escolha do período de tempo para a pesquisa foi justificada porque ambas as técnicas tiveram o seu início entre o final dos anos 70 e o início dos anos 80. Verifica-se no entanto que, enquanto o número anual de publicações sobre a cirurgia endoscópica naso-sinusal tem aumentado de forma regular e consistente (total de 4860 publicações), no que diz respeito à biópsia da mucosa olfactiva (total de 264 publicações), o aumento foi muito mais discreto, e o número máximo de trabalhos publicados num só ano foi de 20 para a biópsia da mucosa olfactiva (2005) contra 462 para a cirurgia endoscópica naso-sinusal (2008).

Não nos parece que seja questionável que a biópsia da mucosa olfactiva seja um recurso de utilidade para o esclarecimento da patologia deste órgão no contexto de quadros clínicos diversos. Já foram bem identificadas as alterações histopatológicas, imunohistoquímicas e ultraestruturais (microscopia electrónica) de situações tão diversas como as mencionadas no Quadro 1.3 (Jafek, Murrow, Michaels *et al.* 2002).

É compreensível que a técnica da mucosa olfactiva tenha tido dificuldades para se impor na prática clínica. Em primeiro lugar, a anatomia da região é desfavorável: a difícil visualização do hiato anterior da região dificulta o seu acesso directo, mesmo com visualização endoscópica. Os desvios do septo nasal, assim como o próprio espessamento anterior normal do septo nasal (tubérculo do septo) também podem ser impedimentos à realização da

biópsia. Não é por acaso que as publicações que descrevem a técnica da biópsia mais detalhadamente, acabam por admitir na maior parte das vezes que a biópsia propriamente dita é realizada sem visualização directa, ou, por outras palavras, é uma biópsia cega (Lovell, Jafek, Moran *et al.* 1982; Lanza, Moran, Doty *et al.* 1993).

### **Quadro 1.3** Etiopatologia das doenças da mucosa olfactiva

---

---

Anósmia pós-traumática (traumatismo craniano)
Anósmia ou hipósmia pós-viral
Rinosinusite
Anósmia dependente dos esteróides
Anósmia ou hipósmia idiopática
<b>Outros</b>
Síndrome de Kallman (hipogonadismo familiar com anósmia)
Doença de Alzheimer
Outras doenças neurodegenerativas

---

Uma história curiosa, e que reflecte as dificuldades de visualização e acesso à região olfactiva, é referida por Lovell, considerado o pioneiro da técnica da biópsia da mucosa olfactiva, quando faz o comentário, irónico, a um trabalho publicado anteriormente (Polyzonis, Kafandaris, Gigis *et al.* 1979) e no qual era descrita a ultraestrutura da mucosa olfactiva numa peça obtida por biópsia. Mantivemos o texto na língua original: “*Polyzonis et al. used intranasal forceps to perform a biopsy on one subject and missed the olfactory region entirely*” (Lovell, Jafek, Moran *et al.* 1982).

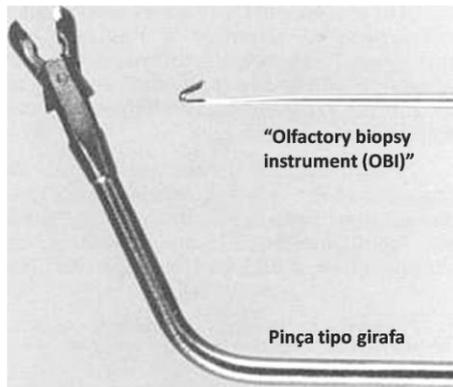
A anestesia local da região também não é simples, pois geralmente tem que ser realizada em duas fases, processo moroso e desconfortável para o doente: numa primeira fase faz-se a anestesia e a vasoconstrição da parte mais anterior e inferior das fossas nasais (nós utilizamos uma solução de tetracaína e fenilefrina aplicada em tiras finas de algodão); só depois se procede à anestesia da fenda olfactiva propriamente dita, com algodões (se possível) ou com um “*spray*” de lidocaína.

Por último, muitas complicações potenciais têm sido mencionadas, quanto a nós sem que ao longo do tempo se tenha verificado a sua ocorrência real, pelo menos a acreditar na literatura médica, que nunca registou nenhuma das complicações mais severas (Lane, Gomez, Dankulich *et al.* 2002). De entre as complicações potenciais mencionadas incluem-se a epistaxis, a violação da lâmina crivosa com rinorráquia, meningite ou lesão das estruturas intracranianas e a hipósmia (Lovell, Jafek, Moran *et al.* 1982; Lanza, Moran, Doty *et al.* 1993). Da nossa experiência na técnica, a complicação mais frequente é a hemorragia (epistáxis), que geralmente cede espontaneamente ou após tamponamento com esponja hemostática reabsorvível.

Deve-se ainda sublinhar que a biópsia da mucosa olfactiva, “cega” ou sob visualização directa, deve ser sempre realizada no septo ou num dos cornetos, preferencialmente o superior, e o instrumento utilizado nunca deve ser aplicado directamente, e sob pressão, sobre a lâmina crivosa.

Os instrumentos mais utilizados para as biópsias da mucosa olfactiva são a pinça de girafa da Storz® com referência Ref. 651010 (Lanza, Moran, Doty *et al.* 1993), que é também a que temos utilizado, ou o Instrumento de Biópsia Olfactiva (Olfactory Biopsy Instrument) (Lovell, Jafek, Moran *et al.* 1982; Lanza, Deems, Doty *et al.* 1994; Jafek, Murrow, Michaels *et al.* 2002). Este último é um estilete que tem um gancho em forma de cureta cortante numa das extremidades, que remove uma pequena fatia do epitélio e da lâmina própria mais superficial da mucosa olfactiva sem que, segundo os seus inventores, haja esmagamento e deterioração dos tecidos, como ocorre com as pinças (Figura 1.5). Apesar de os seus inventores mencionarem que este instrumento está comercializado pela Bausch & Lomb Storz, USA® nunca o fomos capazes de encontrar, nem contactando os seus inventores, nem contactando a firma mencionada, que inclusivamente não inclui o instrumento no seu catálogo.

Outros instrumentos que têm sido utilizados são a pinça de Nakano (Yamagishi, Hasegawa e Nakano 1988), a pinça de Blakesley, quando as biópsias foram realizadas sob anestesia geral durante a realização de outros procedimentos nasosinusais (Lane, Gomez, Dankulich *et al.* 2002; Bianco, Perry, Harkin *et al.* 2004), ou lâminas e curetas cortantes variadas (Leopold, Hummel, Schwob *et al.* 2000).



**Fig. 1.5** Pormenor de dois dos instrumentos mais utilizados na biópsia da mucosa olfactiva: a pinça em forma de girafa e o OBI (*olfactory biopsy instrument*).

## **1.2 OBJECTIVOS DO ESTUDO**

Desenvolver um modelo anatómico destinado a planear a abordagem da região olfactiva por via transnasal endoscópica.

Estudar e descrever a anatomia cirúrgica endoscópica da região olfactiva.

### 1.3 MÉTODOS

Este estudo prospectivo foi realizado no Serviço de Tanatologia (actualmente Serviço de Patologia Forense) da Delegação de Lisboa do Instituto Nacional de Medicina Legal, após todas as autorizações institucionais necessárias, no cumprimento da legislação existente sobre a dissecação de cadáveres e extracção de peças, tecidos ou órgãos para fins de ensino e de investigação científica (Decreto-Lei nº 274/99 de 22 de Julho) e ainda, para cada uma das dissecações realizadas, após consulta do Registo Nacional de não Dadores (RENDA: Decreto-Lei nº 244/94 de 26 de Setembro).

Antes da realização do estudo foram realizadas algumas dissecações em cadáver, exploratórias, com o propósito de facilitar o conhecimento da anatomia cirúrgica, desenvolver aspectos mais básicos da técnica e desenhar o estudo propriamente dito. As investigações foram realizadas nos anos de 2001 e 2002, mas alguma da documentação necessária para a ilustração do texto (imagens) foi obtida posteriormente, nos anos de 2007 e 2008.

Foram excluídos os cadáveres que apresentavam sinais de traumatismo ou cirurgia nasal prévios, assim como aqueles com afecções naso-sinusais que pudessem prejudicar a dissecação anatómica, tais como tumores ou polipose naso-sinusal. As dissecações foram realizadas em 25 cadáveres recentes, com menos de 48 horas após o falecimento. A média de idades dos cadáveres dissecados foi de  $38 \pm 19$  (extremos 18 e 73) anos. Dezassexes (64%) dos indivíduos eram do sexo masculino e 9 (36%) eram do sexo feminino.

O instrumental cirúrgico utilizado foi o mesmo em todas as dissecações. Nos casos em que se procedeu ao registo de imagens, em vez de utilizar a fonte de luz simples de halogéneo utilizou-se a fonte de luz incorporada na unidade de documentação (Quadro 1.4.).

## Quadro 1.4 Instrumental cirúrgico

---

---

### Para a visualização, recolha e registo das imagens

Fonte de luz fria de halogéneo, pequena, de 150W: Karl Storz® Ref. 482B

Cabo de fibra óptica de 4,8 mm de diâmetro e 180 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 495NB

Endoscópio de 0° de ângulo de visão largo, com 4mm de diâmetro e 18 cm de comprimento, Karl Storz® Ref. 7230 AWA

Cabeça de câmara de 1-chip com lentes Zoom Panfocal sistema PAL f=25-50mm e 2 botões programáveis: Karl Storz® TELECAM, Ref. 20212030

Unidade multifuncional compacta de documentação sistema PAL: Karl Storz® TELEPAK Control Unit, Ref. 20043020-020

### Para a dissecação cirúrgica

Cânula de aspiração angulada FRAZIER, diâmetro externo de 1,67 mm, com orifício de interrupção, 17 cm de comprimento e 10 cm de distância de trabalho: Karl Storz® Ref. 529205

Cânula de aspiração angulada FRAZIER, diâmetro externo de 2,3 mm, com orifício de interrupção, 17 cm de comprimento e 10 cm de distância de trabalho: Karl Storz® Ref. 529207

Cânula de aspiração angulada FRAZIER, diâmetro externo de 3 mm, com orifício de interrupção, 17 cm de comprimento e 10 cm de distância de trabalho: Karl Storz® Ref. 529209

Cânula de aspiração angulada FUJITA nº 6, com controlo digital, 18 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro na extremidade: Sontec® Ref. 180-406

Cânula de aspiração angulada FUJITA nº 7, com controlo digital, 18 cm de comprimento e 2,3 mm de diâmetro na extremidade: Sontec® Ref. 180-407

Descolador de FREER-JOSEPH com 2 extremidades: cortante e semi-cortante, com 20 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 456501

Descolador de FREER com 2 extremidades: romba e semi-cortante, com 20 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 474000

Pinça nasal recta BLAKESLEY com 11 cm de comprimento, tamanho 1: Karl Storz® Ref. 456001

Pinça nasal com ângulo superior de 45° BLAKESLEY com 11 cm de comprimento, tamanho 1: Karl Storz® Ref. 456501

Pinça de preensão serrilhada delicada para cirurgia da hipófise, com distância de trabalho de 15 cm: Karl Storz® Ref. 649160

Faca em foice pontiaguda com 19 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 628001

Cabo de canivete nº3 com 12,5 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 208000

Lâminas nº 15

Tesoura de JOSEPH recta, com 14 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 511314

Tesoura de JOSEPH curva, com 14 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 511414

Tesoura de hipofisectomia recta, com 15 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 662301

Tesoura de hipofisectomia curva para a direita, com 15 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 662304

Tesoura de hipofisectomia curva para a esquerda, com 15 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 662305

Cureta de antro oblonga de pequeno tamanho, com 19 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 628702

Perfurador de antro de BEYER para fenestração endonasal com corte limpo com distância de trabalho de 9,5 cm: Karl Storz® Ref. 6615000

Cânula de antro de v.EICKEN com orifício de interrupção, curva curta, diâmetro externo de 3 mm e 12,5 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 586230

Cânula de antro de v.EICKEN com orifício de interrupção, curva larga, diâmetro externo de 3 mm e 12,5 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 586231

Régua de aço inoxidável flexível, milimetrada, com 159 mm: Karl Storz® Ref. E2420

---

Para o planeamento inicial do estudo utilizaram-se as descrições da região e da fenda olfactiva apresentadas por Lang (Lang 1989) e outros autores (Stamberger e Kennedy 1995; Clerico, To e Lanza 2003; Biacabe, Faulcon, Amanou *et al.* 2004).

### **1.3.1 Permeabilidade das fossas nasais e exposição da região olfactiva**

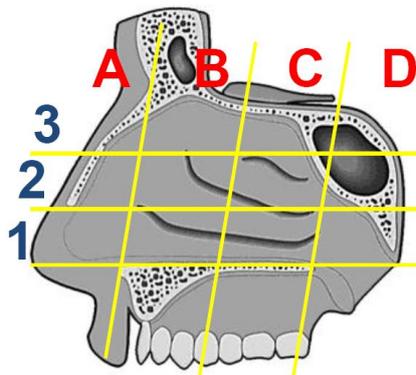
Numa primeira fase, apreciaram-se as condicionantes anatómicas da porção mais anterior das fossas nasais, com influência na abordagem e na exposição da região.

Para tal, socorremo-nos de modelos anatómicos que já foram utilizados e validados para estudar a relação entre os volumes intra-nasais e o olfacto (Damm, Vent, Schmidt *et al.* 2002) ou para estudar a relação entre a anatomia nasal e o olfacto (Leopold 1988; Hong, Leopold, Oliverio *et al.* 1998; Hornung e Leopold 1999). Nestes estudos as fossas nasais foram divididas em áreas volumétricas ou segmentos e avaliada por meios imagiológicos. No nosso estudo, a avaliação da permeabilidade dos segmentos para o efeito definidos foi realizada utilizando um endoscópio de 0<sup>0</sup> com 4mm de diâmetro.

As determinações da permeabilidade observadas nos diferentes segmentos e áreas anatómicas das fossas nasais foram depois relacionadas com a facilidade de visualização directa e de acesso à região olfactiva quando se utiliza o instrumental da cirurgia endoscópica. Com esta análise pretendemos prever a exequibilidade do acesso à região olfactiva perante as várias variações da anatomia das fossas nasais que podem ser observadas nos casos clínicos concretos.

### 1.3.2 Modelo segmentar

As determinações avaliaram a permeabilidade da porção mais anterior das fossas nasais em diferentes regiões topográficas. Este modelo não considerou as estruturas ou acidentes anatómicos individuais, antes definiu um número determinado de segmentos, obtidos pela quadriculação das fossas nasais a partir de linhas imaginárias, horizontais e verticais, passando por determinadas referências anatómicas. As linhas verticais passam pela abertura piriforme, pela porção média das fossas nasais e pelo bordo posterior do septo nasal, e as linhas horizontais passam pelo pavimento da fossa nasal, pelo bordo inferior do corneto médio e pela axila do corneto médio, respectivamente (Figura 1.6). Estas referências foram escolhidas porque são todas elas facilmente identificáveis no exame endoscópico das fossas nasais.



**Fig. 1.6** Modelo segmentar concebido para avaliar a permeabilidade da porção da fossa nasal por onde é feito o acesso à região olfactiva. O modelo foi adaptado de um estudo realizado para estudar a relação entre os volumes intranasais e o olfacto.

Aos segmentos assim definidos foram atribuídos uma letra e um número para identificar a sua posição nas fossas nasais. Os segmentos mais anteriores, com as letras A e B, são os que têm influência na exposição e visualização da região olfactiva, pelo que foram os seleccionados para o estudo anatómico (Quadro 1.5).

**Quadro 1.5** Segmentos avaliados

Segmento A1	Segmento B1
Segmento A2	Segmento B2
Segmento A3	Segmento B3

Ambas as fossas nasais foram inspeccionadas, anotando-se o lado e o segmento em que se observou uma diminuição significativa da permeabilidade na zona correspondente. Dada a variabilidade nas dimensões e simetria das fossas nasais, considerou-se existir diminuição significativa da permeabilidade quando a sua largura não permitia a progressão do endoscópio (4 mm) ou quando a progressão do endoscópio só era possível quando se exercia pressão importante do instrumento em uma ou ambas as paredes do segmento considerado.

### **1.3.3 Estudo morfométrico e descritivo**

Nesta segunda fase, o estudo incidiu directamente sobre a região olfactiva dentro dos seus limites anatómicos, compreendendo 2 diferentes avaliações: medição de várias distâncias anatómicas importantes; e descrição da região olfactiva.

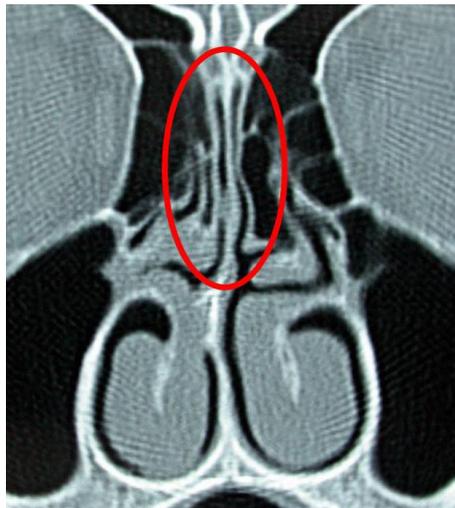
Em cada um dos cadáveres apenas se dissecou uma das regiões olfactivas, a do lado considerado de exposição mais fácil por haver maior permeabilidade da região anterior das fossas nasais. Nos casos de simetria seleccionou-se o lado em que não se registaram alterações mais particulares da anatomia, ou em que estas alterações eram menores.

A decisão de apenas se dissecar o lado com melhor acesso justificou-se pelo propósito das investigações. Este estudo experimental destinou-se a fundamentar e ensaiar a técnica da colheita da mucosa olfactiva, situação em que é importante considerar apenas a colheita unilateral, de forma a minimizar as consequências deletérias sobre a função olfactiva. Por isso, foi decidido dissecar apenas uma das fossas nasais em todos os cadáveres - a

fossa nasal de mais fácil acesso - para proceder de uma forma semelhante à que foi planeada para a aplicação humana da técnica.

### 1.3.3.1 Alargamento cirúrgico da região olfactiva

Um aspecto importante a mencionar tem a ver com o alargamento da região olfactiva que é necessário realizar para se completar a exposição cirúrgica de toda a região. Os estudos por nós previamente realizados em peças anatómicas de lâminas crivosas, a observação de tomografias computadorizadas da região (Figura 1.7), as dissecações exploratórias realizadas antes do início do estudo, assim como estudos anatómicos publicados (Lang 1989), todos eles apontavam para uma largura média da fenda olfactiva de 1 a 2 mm, insuficiente para a visualização da região ou para a introdução do endoscópio ou dos instrumentos cirúrgicos.



**Fig. 1.7** A tomografia computadorizada nasosinusal demonstra que a fenda olfactiva tem uma largura mínima (1 a 2 mm).

O alargamento da região olfactiva prévio à dissecação cirúrgica da região foi considerado um passo importante e necessário à abordagem. Para o conseguir, concebeu-se uma técnica que incluiu 2 gestos: o primeiro, uma etmoidectomia parcial, destinada a diminuir o suporte lateral do corneto médio e do corneto superior, suporte esse que é constituído pelas trabéculas ósseas das células etmoidais; o segundo gesto, a lateralização do corneto

médio e do corneto superior. A etmoidectomia nunca foi descrita anteriormente como um procedimento necessário ao alargamento do corredor nasal em outras intervenções cirúrgicas, mas a simples lateralização do corneto médio, sob pressão forte e sem etmoidectomia já foi mencionada para alargar o corredor nasal nas abordagens transnasais à base do crânio (Shahinian 2008). A técnica por nós concebida, que inclui a etmoidectomia, destina-se a minimizar a manipulação dos tecidos da região olfactiva evitando o traumatismo da mucosa pois é realizada com menor pressão nos cornetos médio e superior.

### 1.3.3.2 Distâncias

As distâncias que foram determinadas foram consideradas úteis para uma melhor caracterização da anatomia cirúrgica, da variabilidade anatómica e da orientação cirúrgica endoscópica na região olfactiva (Quadro 1.6).

**Quadro 1.6** Distância entre a porção anterior da fossa nasal e estruturas anatómicas da região olfactiva

---

Distância do *limen nasi* ao bordo anterior do corneto médio

Distância do *limen nasi* ao bordo anterior do corneto superior

Distância do *limen nasi* ao ósteo esfenoidal

Distância do *limen nasi* ao limite anterior da lâmina crivosa

Distância do *limen nasi* ao limite posterior da lâmina crivosa

---

Poucos estudos anatómicos com morfometria têm sido realizados utilizando a visualização endoscópica das fossas nasais. Por essas razões a referência da região mais anterior das fossas nasais que tem sido utilizada é a espinha nasal anterior (Davis, Templer e Parsons 1996; Turgut, Gumusalan, Arifoglu *et al.* 1996) ou a zona imediatamente abaixo da espinha, designada de ponto subspinal (“subspinal”) (Lang 1989). As nossas medições utilizaram como referência anterior a válvula nasal interna ou *limen nasi*. O *limen nasi* é uma referência que é visualizável directamente quando da exposição endoscópica das

fossas nasais, quer na parede lateral (relevo do bordo inferior da cartilagem triangular) quer na parede inferior da porção mais anterior das fossas nasais (rebordo inferior do orifício piriforme) A sua utilização e validação só foi mencionada anteriormente num estudo anatómico sobre o ósteo do seio esfenoidal ([Kim, Kim, Kang et al. 2001](#)).

### **1.3.3.3 Anatomia descritiva da região olfactiva**

A descrição da anatomia cirúrgica da região incluiu uma descrição do espaço tridimensional, das paredes e dos achados e incidentes encontrados durante a dissecação da mucosa olfactiva.

## 1.4 RESULTADOS

### 1.4.1 Modelo segmentar e permeabilidade nasal

No Quadro 1.7 estão representados os resultados relativos à avaliação da permeabilidade da porção anterior das fossas nasais, nos 25 cadáveres investigados, de acordo com o modelo segmentar anteriormente definido.

**Quadro 1.7.** Segmentos permeáveis (endoscópio de 4 mm) (n=25)

	Fossa nasal direita	Fossa nasal esquerda
A1	24 (96%)	23 (92%)
A2	22 (88%)	21 (84%)
A3	23 (92%)	22 (88%)
B1	23 (92%)	22 (88%)
B2	21 (84%)	20 (80%)
B3	23 (92%)	22 (88%)

Em média, só se observa uma diminuição da permeabilidade ao endoscópio de 4 mm, no conjunto das observações realizadas, em  $11,2 \pm 4,5$  % dos segmentos considerados.

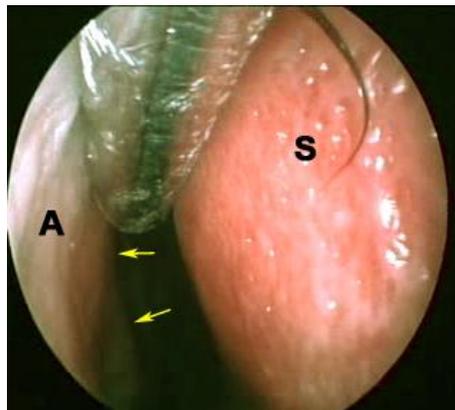
Quando a análise é realizada pelos segmentos de cada uma das regiões (região A: mais anterior, e região B: mais posterior), verifica-se que a diminuição da permeabilidade é mais frequente na região B ( $12,7 \pm 4,7$  % dos segmentos considerados) do que na região A ( $10 \pm 4,2$  % dos segmentos considerados). A diferença na permeabilidade nasal entre os segmentos destas 2 regiões não tem contudo significado estatístico ( $p=0,32$ ; teste t para amostras independentes).

Quando a análise é realizada pelos segmentos de cada um dos lados, verifica-se que a diminuição da permeabilidade é maior à esquerda ( $13,3 \pm 4,1$  %) do que à direita ( $9,3 \pm 4,1$  %). No entanto, da mesma forma que para a diferença na permeabilidade nasal entre os segmentos das regiões

situadas mais anteriormente ou posteriormente, também a diferença na permeabilidade entre os segmentos das 2 fossas nasais não demonstrou ter significado estatístico ( $p=0,12$ ).

#### 1.4.2 Permeabilidade nos segmentos da região A e sua repercussão na exposição da região olfactiva

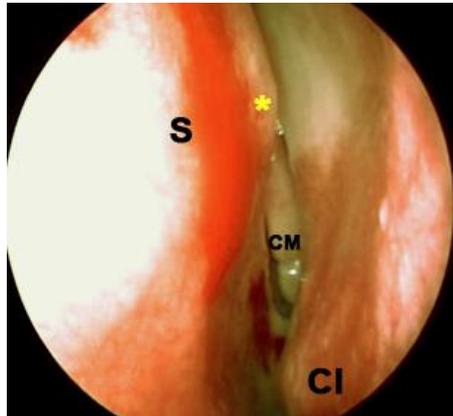
Na Figura 1.8 observa-se uma imagem que apresenta um exemplo de uma fossa nasal com diminuição da permeabilidade nos segmentos mais anteriores. A cânula de Frazier que se observa na imagem tem 3 mm de diâmetro e não consegue progredir, quer no segmento A2, quer no segmento A3. A região da fossa nasal – vestíbulo nasal – onde se observa este desvio, está contida na porção cartilaginosa da pirâmide nasal, anterior à válvula nasal interna ou *limen nasi*.



**Fig. 1.8** Exemplo de uma fossa nasal com diminuição na permeabilidade nos segmentos A2 e A3. As setas apontam para o *limen nasi*, linha de demarcação muito nítida e observável endoscopicamente. (S=septo nasal; A=asa do nariz).

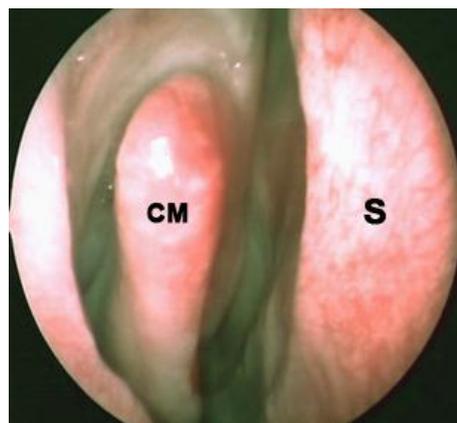
No que diz respeito à repercussão das obstruções com esta localização topográfica na visualização e acesso da região olfactiva, os resultados são os seguintes. Em primeiro lugar, as obstruções na região A não se acompanham, em regra, de obstruções ipsilaterais na região B. O que é mais frequente é que quando existe uma obstrução na região A, o septo nasal esteja desviado para o lado contralateral na região B. Nos 7 cadáveres

que totalizavam as obstruções segmentares da região A já mencionadas, a fossa nasal ipsilateral não tinha obstruções na região B, ao contrário da fossa nasal contralateral, que tinha obstruções segmentares na região B em 3 dos 7 cadáveres (Figura 1.9)



**Fig. 1.9** No mesmo cadáver apresentado na Figura 2.7, que tinha uma obstrução da região A à direita, observa-se uma obstrução contralateral na região B (segmentos B2 e B3). (S=septo nasal; A=asa do nariz).

Em segundo lugar, quando existe uma obstrução nos segmentos da região A, a região B ipsilateral é geralmente ampla e a visualização da região olfactiva está facilitada (Figura 1.10).



**Fig. 1.10** Ainda o mesmo cadáver das figuras anteriores. No lado onde se verificou uma obstrução muito significativa na região A, a visualização da região olfactiva é obtida sem dificuldades, mesmo ainda antes da lateralização dos cornetos (S=septo nasal; CM=corneto médio).

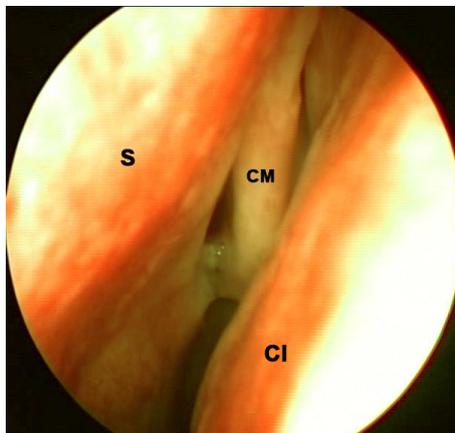
Uma vez que a parede externa da região A corresponde à asa do nariz, o endoscópio e os instrumentos podem desviar lateralmente esta estrutura mole, alargando a entrada da fossa nasal, e vencendo a obstrução. Por isso, as obstruções segmentares da região A não são prejudiciais ao acesso e visualização da região olfactiva, podendo até ser facilitadoras, na medida em que se associam a uma região B mais larga na fossa nasal ipsilateral. A maior limitação que pode ser antecipada por uma obstrução da área A é a facilidade de traumatismo da mucosa com a introdução do endoscópio e dos instrumentos, podendo causar sangramento que suje a extremidade do endoscópico e interfira com visualização.

#### **1.4.3 Permeabilidade nos segmentos da região B e sua repercussão na exposição da região olfactiva**

É importante não confundir o tubérculo septal de Morgagni, achado anatómico constante apesar de variável nas suas dimensões, com um desvio verdadeiro do septo nasal que causa obstrução. O tubérculo septal resulta do espessamento da cartilagem quadrangular do septo ou da lâmina perpendicular do etmóide, na região próxima da articulação entre estas 2 estruturas. Na maior parte das observações o tubérculo septal está presente sem haver obstrução.

Para confirmar a obstrução na região B, não basta uma inspecção distante, quer seja realizada com espéculo nasal, quer com o endoscópio nasal. A imagem endoscópica ampliada não permite prever a largura exacta das passagens das fossas nasais. É necessário que se avance o endoscópio directamente até à entrada da região olfactiva. Só com este gesto a obstrução é evidenciada, pois o endoscópio vê-se impedido de progredir pelas paredes da fossa nasal, quando a largura da região é inferior a 4 mm. Um sinal típico da obstrução eminente é o empalidecimento da mucosa quando o endoscópio é introduzido, causado pela pressão do endoscópio na mucosa. Curiosamente é um sinal que também se observou nos estudos em cadáver, provavelmente por se tratar se cadáveres recentes.

Na Figura 1.11 observa-se uma obstrução nos segmentos B2 e B3 da fossa nasal esquerda, e o aspecto empalidecido da mucosa do septo e do corneto inferior causado pela pressão do endoscópio.



**Fig. 1.11** Obstrução dos segmentos B2 e B3 da fossa nasal esquerda (S=septo nasal; CI=corneto inferior; CM=corneto médio).

Ao contrário das obstruções segmentares da região A, que não são impeditivas do acesso e visualização da região olfactiva, as obstruções da região B dão-se entre 2 paredes que são rijas e não são compressíveis, e por isso não permitem uma progressão do endoscópio que seja suficiente para visualizar a região e da mesma forma não permitem a introdução e manipulação correcta do instrumental cirúrgico no interior da região olfactiva.

#### **1.4.4 Sucesso na exposição da região olfactiva**

Nos 25 cadáveres estudados, em nenhum caso se encontraram obstruções segmentares bilaterais das fossas nasais que fossem impeditivas do acesso à região olfactiva em pelo menos uma das fossas nasais. Esta constatação é importante, pois permite prever que, em indivíduos bem seleccionados e sem patologia naso-sinusal prévia, será possível a exposição cirúrgica de uma das regiões olfactivas destinada à colheita da mucosa olfactiva em todos os indivíduos.

### 1.4.5 Estudo morfométrico

No Quadro 1.8 estão representados os resultados relativos à determinação das distâncias entre a porção mais anterior das fossas nasais e diversas estruturas usadas como referência anatômica durante a exposição e a abordagem cirúrgica endoscópica da região olfactiva.

**Quadro 1.8** Distâncias do *limen nasi* às referências da região olfactiva (em mm)

Cadáver e sexo		Corneto médio	Corneto superior	Ósteo esfenoidal	Limite anterior da lâmina crivosa	Limite posterior da lâmina crivosa
1	M	28	45	67	41	63
2	M	22	42	59	38	58
3	M	24	41	64	44	66
4	M	23	39	58	43	57
5	M	24	42	62	40	68
6	M	27	41	60	41	64
7	M	25	42	62	40	58
8	M	24	39	57	44	59
9	M	20	40	61	39	60
10	M	24	44	59	43	60
11	M	26	43	58	45	58
12	M	26	41	63	42	62
13	M	25	42	60	44	59
14	M	25	43	59	42	63
15	M	26	41	60	42	64
16	M	21	39	59	41	59
17	F	23	42	53	40	57
18	F	22	41	56	39	56
19	F	23	40	55	37	59
20	F	19	41	60	42	60
21	F	22	38	53	36	58
22	F	21	37	54	41	54
23	F	21	43	56	39	61
24	F	23	44	55	43	58
25	F	21	41	54	41	59
<b>Média:</b>		<b>23,4</b>	<b>41,2</b>	<b>58,6</b>	<b>41</b>	<b>60</b>
<b>Desvio-padrão:</b>		<b>2,3</b>	<b>1,9</b>	<b>3,6</b>	<b>2,3</b>	<b>3,2</b>
<b>Mínimo:</b>		<b>19</b>	<b>37</b>	<b>53</b>	<b>36</b>	<b>54</b>
<b>Máximo:</b>		<b>28</b>	<b>45</b>	<b>67</b>	<b>45</b>	<b>68</b>

Como já mencionado, o *limen nasi* é uma referência anatômica que já foi utilizada para sinalizar a porção mais anterior das fossas nasais. Tem a vantagem de ser facilmente identificado com endoscópios na abordagem das fossas nasais, ao contrário de outras referências que dizem respeito a estruturas do esqueleto nasal, como a espinha nasal anterior ou o ângulo entre a espinha e a face anterior da maxila (“*subspinal*”), que têm que ser adivinhadas porque só são identificáveis no esqueleto ósseo já desprovido de partes moles ou em exames de imagem. Por ser mais fácil de identificar intra-operatoriamente no vivo o *limen nasi* foi a referência igualmente escolhida para o estudo no cadáver.

A porção mais anterior do corneto médio, que sinaliza o limite anterior da região olfactiva, está situada em média a  $23,4 \pm 2,3$  mm do *limen nasi* (valores extremos de 19 e 28 mm). Verificou-se que esta distância é maior no sexo masculino ( $24,4 \pm 2,1$  mm com valores extremos de 20 e 28 mm) do que no sexo feminino ( $21,7 \pm 1,3$  mm com valores extremos de 19 e 23 mm) e a diferença entre os 2 sexos tem significado estatístico ( $p < 0,01$ ; teste t para amostras independentes).

A porção mais anterior do corneto superior está situada em média a  $41,2 \pm 1,9$  mm do *limen nasi* (valores extremos de 37 e 45 mm). Ao contrário da distância entre o *limen nasi* e o corneto médio, neste caso não se verificou uma diferença com significado estatístico entre esta distância no sexo masculino ( $41,5 \pm 1,8$  mm com valores extremos de 39 e 45 mm) e no sexo feminino ( $40,8 \pm 2,2$  mm com valores extremos de 37 e 44 mm) ( $p = 0,42$ ; teste t para amostras independentes).

O ósteo esfenoidal é um elemento anatômico de extrema importância na cirurgia endoscópica naso-sinusal, em particular nas operações que envolvem o seio esfenoidal ou a base do crânio. Tem sido apontado como uma referência útil para avaliar as distâncias: à base do crânio e aos elementos intracranianos correspondentes, às estruturas nervosas importantes da parede lateral dos seios perinasais (nervo óptico) (Kim, Kim, Kang *et al.* 2001), servindo ainda para sinalizar o limite posterior da fossa nasal no recesso eseno-etmoidal (que corresponde à região olfactiva).

Nas determinações que realizámos constatámos que a distância entre o *limen nasi* e o ósteo esfenoideal foi, em média  $58,6 \pm 3,6$  mm (valores extremos de 53 e 67 mm). Verificou-se também que esta distância é maior no sexo masculino ( $60,4 \pm 2,4$  mm com valores extremos de 57 e 67 mm) do que no sexo feminino ( $54,9 \pm 2,3$  mm com valores extremos de 53 e 60 mm) ( $p < 0,01$ ; teste t para amostras independentes).

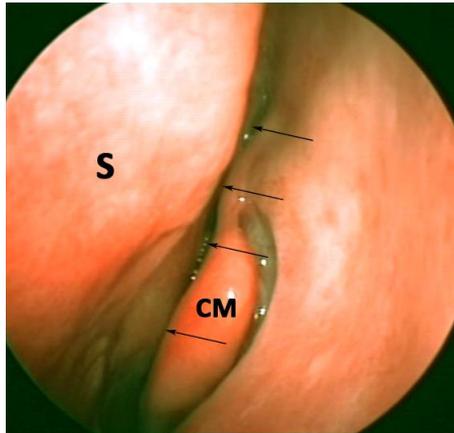
A distância entre o *limen nasi* e os primeiros orifícios da lâmina crivosa foi, em média, de  $41 \pm 2,3$  mm (valores extremos de 36 e 45 mm). Também se verificou-se que esta distância é maior no sexo masculino ( $41,8 \pm 1,9$  mm com valores extremos de 38 e 45 mm) do que no sexo feminino ( $39,8 \pm 2,3$  mm com valores extremos de 36 e 43 mm) e a diferença tem significado estatístico ( $p = 0,04$ ; teste t para amostras independentes).

Por sua vez, a distância entre o *limen nasi* e os últimos orifícios da lâmina crivosa foi, em média, de  $60 \pm 3,2$  mm (valores extremos de 54 e 68 mm). Tal como para todas as outras medidas, esta distância é também maior no sexo masculino ( $61,1 \pm 3,2$  mm com valores extremos de 57 e 68 mm) do que no sexo feminino ( $58 \pm 2,1$  mm com valores extremos de 54 e 61 mm) e a diferença tem significado estatístico ( $p < 0,01$ ; teste t para amostras independentes).

#### **1.4.6 Anatomia descritiva da região olfactiva**

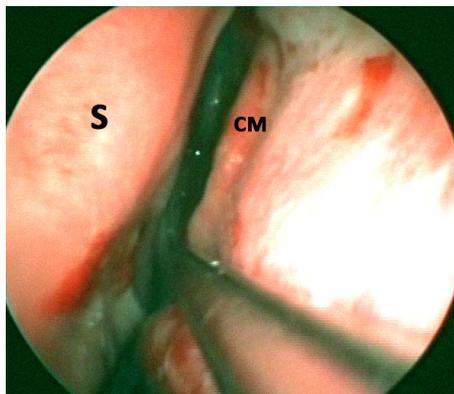
A região olfactiva é estreita lateralmente, e nela se podem descrever: uma cavidade ou lúmen, por vezes designado de fenda olfactiva; e 6 paredes: as duas paredes principais, pela maior área que ocupam, são a parede medial ou septal e a parede lateral ou turbinal. A parede superior corresponde à lâmina crivosa e a parede posterior corresponde à parede anterior do seio esfenoideal. A parede anterior e a parede inferior são abertas para as regiões anatómicas vizinhas e comunicam com a porção mais anterior e inferior das fossas nasais, respectivamente.

A fenda olfactiva é naturalmente estreita, com cerca de 1 a 2 mm de largura, como já foi demonstrado em estudos anteriores (Lang 1989) (Figura 1.12).



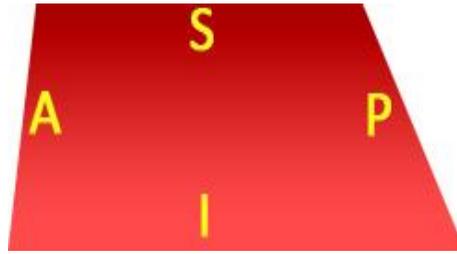
**Fig. 1.12** A fenda olfactiva, mesmo nos casos em que a porção mais anterior das fossas nasais é ampla e permeável, é, de uma forma constante, muito estreita, quase virtual (S=septo nasal; CM=corneto médio).

Só depois do afastamento dos cornetos médio e superior é possível a abordagem endoscópica da fenda olfactiva, que passa a ter cerca de 4 a 5 mm (Figura 1.13).



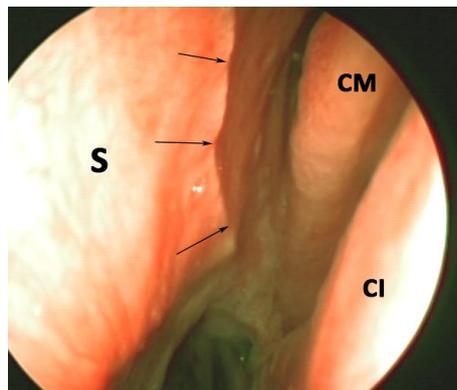
**Fig. 1.13** O alargamento da região olfactiva à custa da parede lateral é necessário para que a região passe a ser cirurgicamente acessível (S=septo nasal; CM=corneto médio).

As paredes medial e lateral da região olfactiva têm uma forma de trapézio escaleno, com 4 lados, 2 deles paralelos, que neste caso são o lado inferior e o superior (Figura 1.14).



**Fig. 1.14** Diagrama representando a forma de trapézio escaleno das paredes medial e lateral da região olfactiva, com 4 lados, todos diferentes, e 2 paralelos entre si: o superior e o inferior (S=lado superior; A=lado anterior; P=lado posterior; I=lado inferior).

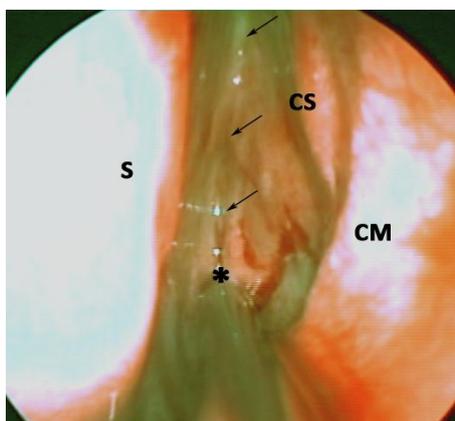
O lado inferior ou base é maior que o superior e corresponde ao bordo inferior do corneto inferior na parede lateral e à sua projecção mediana, na parede medial (Figura 1.15).



**Fig. 1.15** Aspecto do bordo inferior do corneto médio, que constitui o lado inferior da figura geométrica previamente descrita. A projecção do bordo inferior do corneto médio no septo nasal não coincide, como se pode observar facilmente na figura, com uma aresta que se observa na mucosa do septo nasal (setas), poucos milímetros adiante do local da projecção do corneto. Por outro lado essa aresta também não coincide com nenhuma sutura do esqueleto ósteo-cartilaginoso do septo. A explicação mais provável para este incidente anatómico tem a ver com a constituição da mucosa e com a função protectora que a fossa nasal exerce sobre os hiatos da região olfactiva, desviando grande parte do ar inalado (S=lado superior; A=lado anterior; P=lado posterior; I=lado inferior).

O lado superior corresponde, na parede lateral, à união da raiz vertical dos cornetos médio e superior com a base do crânio (lâmina crivosa); na parede medial corresponde à união do limite superior da lâmina perpendicular com a lâmina crivosa do etmóide. Na maior parte dos casos o lado superior do trapézio não é exactamente rectilíneo e desenhando um ângulo nítido com o lado posterior, como fazia pressupor a observação de algumas figuras de

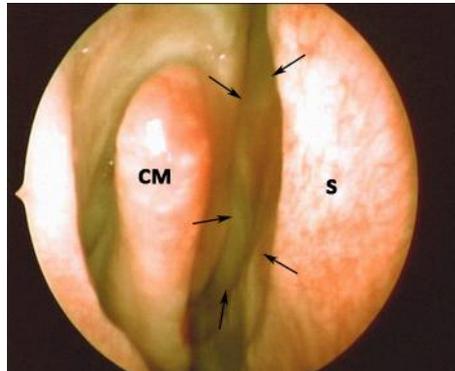
textos anatómicos, como a figura 56 (página 43) do livro de Lang (Lang 1989). Pelo contrário, a observação mais frequente nos cadáveres que foram dissecados foi a de que o lado superior descreve uma curva em direcção posterior e inferior, continuando-se com o lado posterior sem que seja possível identificar muitas vezes o limite preciso entre ambos. Este achado tem relevância cirúrgica, uma vez que expõe a base do crânio a um risco acrescido de lesão iatrogénica durante a dissecção da região. Como veremos adiante, a única forma segura de identificar a lâmina crivosa e distingui-la da parede anterior do seio esfenoidal, é visualizando directamente os nervos que se dirigem para os orifícios da base do crânio e identificar os orifícios mais posteriores (Figura 1.16).



**Fig. 1.16** Como é sabido, as abordagens endoscópicas não dão uma visão tridimensional das áreas visualizadas, uma vez que não existe estereoscopia e portanto não existe a informação da profundidade. Costuma afirmar-se que o cirurgião tem que construir mentalmente a imagem tridimensional a partir da imagem bidimensional do monitor, fazendo-o a partir do conhecimento da anatomia e do treino na observação endoscópica. Esta imagem é um exemplo de como o conhecimento prévio da anatomia é essencial. As setas indicam a progressão, que parece rectilínea mas não o é, da lâmina crivosa até ao ósteo esfenoidal (asterisco) (S=septo nasal; CS=corneto superior; CM=corneto médio).

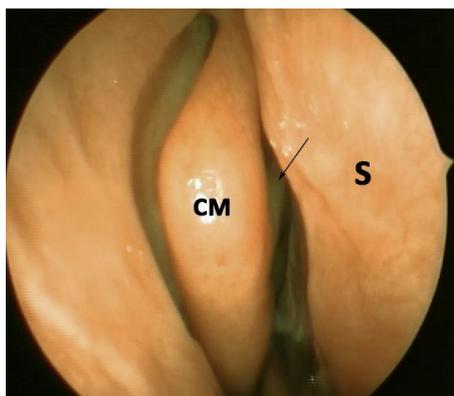
O lado anterior do trapézio escaleno corresponde ao bordo anterior do corneto médio lateralmente, e à sua projecção mediana, no septo nasal. Este lado faz um ângulo quase recto com os lados vizinhos (Figuras 1.1 e 1.12). O lado posterior corresponde à inserção do corneto superior na parede anterior do seio esfenoidal lateralmente e à inserção do septo nasal na face anterior do corpo do esfenóide, medialmente (Figura 1.16).

A superfície medial ou septal da região olfactiva, delimitada pelos lados anteriormente descritos é lisa e constituída maioritariamente pela mucosa olfactiva na sua porção mais superior (Figura 1.17).



**Fig. 1.17** A superfície medial da região olfactiva é discretamente côncava. Essa configuração não resulta em regra de uma assimetria, em que um dos lados é côncavo por oposição ao lado contralateral que é convexo. Pelo contrário, geralmente ambos os lados são côncavos, pois nos limites periféricos da região olfactiva o osso do septo nasal é mais espesso do que na parte média, onde por vezes pode ser papiráceo ou inexistir (CM=corneto médio; S=septo nasal; setas=limites da mucosa olfactiva).

A superfície lateral da região olfactiva ou superfície turbinal é constituída pelos cornetos médio e superior. A mucosa que reveste esta superfície é constituída maioritariamente por mucosa olfactiva no corneto superior e por ambos os tipos de mucosa: respiratória e olfactiva, no corneto médio. Um aspecto interessante a descrever no que diz respeito à parede turbinal da região olfactiva é o das dimensões apreciáveis do corneto superior, que ocupa uma área importante desta parede (Figuras 1.18 e 1.19). Na Figura 1.16, na qual o corneto superior foi lateralizado, também se pode confirmar a área apreciável que o corneto superior ocupa na parede turbinal da região olfactiva. Um facto assinalável: nas 25 dissecções cadavéricas que foram realizadas, em nenhuma delas se observou um corneto supremo, o que é curioso, uma vez que existem estudos que referem a identificação desta estrutura inconstante em 50% das peças anatómicas (Kim, Lee, Kim *et al.* 2001).



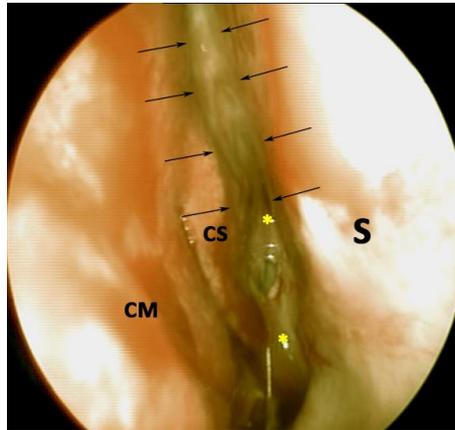
**Fig. 1.18** Quando o corneto superior é observado a partir da porção mais anterior das fossas nasais, a sua visibilidade é mínima, dando a impressão de ser uma pequena estrutura limitada ao canto mais superior e posterior da fossa nasal na região olfactiva (S=septo nasal; CM=corneto médio; seta=corneto superior).



**Fig. 1.19** Depois da lateralização do corneto médio, com o endoscópio introduzido directamente na fenda olfactiva, pode verificar-se que o corneto superior é volumoso e tem uma área considerável (ocupando cerca de 50% da distância ântero-posterior da porção superior da região olfactiva, de acordo com os estudos morfométricos realizados) (CM=corneto médio; S=septo nasal; CS=corneto superior).

A parede superior da região olfactiva é constituída pela lâmina crivosa. A lâmina crivosa separa a fossa nasal da cavidade craniana e tem uma configuração arredondada, am abóbada estreita (Figura 1.20). Nas disseccções que foram realizadas não tivemos oportunidade de confirmar uma propriedade que é adiantada amiúde na literatura médica, e que é a da extrema fragilidade da lâmina crivosa (Lovell, Jafek, Moran *et al.* 1982; Lanza, Moran, Doty *et al.* 1993; Lane, Gomez, Dankulich *et al.* 2002). Pelo contrário, tivemos o cuidado de experimentar, em vários cadáveres, a realização de uma pressão importante sobre esta estrutura em várias localizações e com diferentes

instrumentos (cânula de espiração de Frazier com 1,67 mm, descolador de Freer de extremidade semi-cortante, faca em foice e cureta de antro oblonga) e de verificar que é difícil perfurar a lâmina crivosa sem o pretender especificamente.



**Fig. 1.20** As setas apontam os limites medial e lateral da lâmina crivosa. Reconhece-se-se a sua configuração abobadada e observa-se, no relevo da mucosa, o trajecto de alguns nervos olfactivos a dirigirem-se da parede turbinal da região olfactiva (corneto superior) em direcção à porção média da lâmina crivosa. Os asteriscos, a amarelo, indicam o limite superior e o limite inferior da parede posterior da região olfactiva, a parede esfenoidal. Neste espécimen o ângulo entre a base do crânio e a parede esfenoidal permitiu a diferenciação destas duas paredes. Num ponto intermédio entre o limite superior e o limite inferior da parede esfenoidal, mas mais próximo do primeiro, identificou-se facilmente o ósteo esfenoidal (CM=corneto médio; CS=corneto superior; S=septo nasal).

A parede posterior da região olfactiva corresponde à parede anterior do seio esfenoidal, na qual se identifica o ósteo esfenoidal numa posição próxima da porção intermédia desta parede (Figura 1.20). Alguns estudos anatómicos referem que o ósteo não se abre no recesso esfeno-etmoidal (porção mais posterior da região olfactiva) mas sim no meato superior em cerca de 17% dos casos (Kim, Kim, Kang *et al.* 2001). Esses estudos avaliaram a posição relativa do corneto superior em relação ao ósteo esfenoidal em cabeças humanas seccionadas pelo plano sagital. Em consequência o corneto superior não foi mobilizado antes da posição relativa das estruturas ter sido determinada. Esse tipo de análise não foi possível quando a avaliação da região foi precedida da lateralização dos cornetos médio e superior, como nos nossos estudos. De qualquer forma, em todas as dissecções foi possível a exposição ampla do ósteo esfenoidal e portanto a identificação correcta da

parede respectiva, pelo que o nosso estudo não ficou diminuído por essa razão.

A parede anterior e a parede inferior da região olfactiva, que já foram descritas (Figuras 1.12, 1.13 e 1.15) são abertas para a porção mais anterior e para a porção mais inferior das fossas nasais, respectivamente, constituindo um hiato formado pelo bordo anterior e inferior do corneto médio e a projecção destas estruturas no septo nasal.

## 1.5 DISCUSSÃO

### 1.5.1 Resumo geral dos resultados

Os estudos anatómicos realizados permitiram demonstrar que a exposição cirúrgica da região olfactiva por técnica endoscópica é exequível em todos os doentes previamente seleccionados e sem patologia naso-sinusal prévia. As obstruções dos segmentos mais anteriores das fossas nasais, situadas no interior da pirâmide nasal cartilaginosa são menos impeditivas do acesso à região olfactiva do que as obstruções nasais situadas numa região imediatamente anterior ao hiato anterior da região olfactiva.

A consideração de uma anatomia cirúrgica endoscópica da região olfactiva pressupõe, como foi explicitado, o alargamento da fenda olfactiva à custa da parede lateral, uma vez que só com este gesto a região olfactiva passa a ser cirurgicamente acessível ([Escada e Madeira\\_da\\_Silva 2008](#)). A técnica concebida para alcançar a exposição ideal foi apresentada, e todas as dissecções e descrições subsequentes foram realizadas após este gesto cirúrgico ter sido realizado no modelo de cadáver.

Uma vez alargada, a região olfactiva pode ser explorada cirurgicamente em toda a sua extensão com visualização endoscópica permanente, e todas as estruturas anatómicas da região podem ser manipuladas com segurança, incluindo a parede superior, constituída pela lâmina crivosa.

As distâncias mais importantes para uma orientação cirúrgica na região olfactiva por técnica endoscópica são as distâncias entre o *limen nasi* e o corneto médio, o corneto superior, o ósteo esfenoidal e as porções mais anterior e posterior da lâmina crivosa, que são de  $23,4\pm 2,3$ mm,  $41,2\pm 1,9$ mm,  $58,6\pm 3,6$ mm,  $41\pm 2,3$  mm e  $60\pm 3,2$  mm, respectivamente. Todas as distâncias são maiores no sexo masculino do que no sexo feminino, à excepção da distância entre o *limen nasi* e o corneto superior.

### **1.5.2 Limitações do estudo**

Todos os estudos anatómicos ou as descrições de técnicas cirúrgicas devem ser confrontados ou comparados com estudos anteriores nos quais se alicercessem ou que tenham sido realizados com os mesmos propósitos. As maiores limitações deste estudo decorrem da escassez de descrições anteriores da anatomia cirúrgica da região olfactiva.

Por outro lado, os estudos anatómicos existentes sobre as fossas nasais quase sempre utilizaram espécimes de cadáver ou radiografias, e só recentemente se entendeu a utilidade de basear os estudos dirigidos à actividade cirúrgica por técnica endoscópica na observação e avaliação endoscópica de referências que sejam facilmente identificáveis com endoscópios (Joe, Ho e Yanagisawa 2000), pelo que também não existem estudos suficientes, com estas particularidades, para efeitos comparativos.

### **1.5.3 Significado clínico dos resultados**

Os estudos anatómicos são essenciais na definição da anatomia cirúrgica e no desenvolvimento das técnicas e do desempenho cirúrgico que acompanham os progressos na medicina.

Por sua vez, os estudos morfométricos geralmente são realizados para estabelecer valores normativos das variáveis anatómicas, para analisar a variabilidade das estruturas ou para orientar as técnicas cirúrgicas. As discrepâncias que se verificam na literatura médica nas determinações das distâncias em alguns estudos morfométricos têm sido atribuídas a variações relacionadas com as populações ou as características raciais, com a definição de diferentes referências anatómicas ou com a dificuldade efectiva em identificar correctamente as referências anatómicas escolhidas (Unlu, Tekdemir, Ersoy *et al.* 1994; Sato, Murakami, Tsubota *et al.* 2000; Kim, Kim, Kang *et al.* 2001; Padua e Voegels 2008).

Por se ter privilegiado a abordagem endoscópica e a selecção de referências anatómicas que são identificáveis com endoscópios, os resultados do estudo têm aplicabilidade prática concreta na abordagem

cirúrgica que irá ser desenvolvida para a colheita da mucosa olfactiva por via transnasal endoscópica.

Verificou-se que o maior obstáculo à abordagem cirúrgica da região se relaciona com a largura da fenda olfactiva, naturalmente estreita, com cerca de 1 a 2 mm de largura, tal como já foi demonstrado em estudos anteriores (Lang 1989). É curioso que, contrariamente ao que seria de esperar em virtude da sua largura muito reduzida, só ocasionalmente se observa patologia localizada nesta área, mesmo patologia inflamatória que, como é sabido, pode ser causada por estreitamentos anatómicos das cavidades nasosinusais (Biacabe, Faulcon, Amanou *et al.* 2004; Trotier, Bensimon, Herman *et al.* 2007; Escada, Capucho e Madeira\_da\_Silva 2008). Uma explicação para a reduzida prevalência de doença limitada à região olfactiva pode ser a constância das suas dimensões, apesar de reduzidas, nos vários pontos da região.

Um aspecto interessante a mencionar é o das distâncias relativas entre 3 das estruturas que relatámos, e que estão localizadas numa posição sucessivamente mais posterior relativamente à abertura das fossas nasais. Em média, a diferença entre a posição do corneto médio e do corneto posterior é de 17,8 mm e a diferença entre a posição do corneto superior e do ósteo esfenoide é de 17,4 mm. Estas distâncias são praticamente iguais, o que contraria a ideia habitual de que o corneto superior é uma pequena estrutura localizada longe do bordo anterior do corneto médio e muito próxima da parede anterior do seio esfenoide: este facto já tinha todavia sido referido na literatura médica (Orlandi, Lanza, Bolger *et al.* 1999).

Por sua vez a determinação da distância relativa ao limite mais anterior da lâmina crivosa é importante, porque nos últimos anos, alguns trabalhos têm apontado para uma distribuição da mucosa olfactiva mais anterior do que o habitualmente considerado (Leopold, Hummel, Schwob *et al.* 2000). Da mesma forma a determinação da distância relativa ao limite mais posterior da lâmina crivosa é importante, pois nem sempre esta referência anatómica é identificável com facilidade.

#### **1.5.4 Conclusões**

O modelo do cadáver recente foi útil no estudo da anatomia cirúrgica endoscópica da região olfactiva, na avaliação das condicionantes anatómicas determinantes para o acesso a essa área, e na concepção de uma técnica destinada a alargar a fenda olfactiva, permitindo a exposição atraumática das paredes da região. Todos estes passos prévios são essenciais na concepção de uma técnica destinada à colheita de mucosa olfactiva por via transnasal endoscópica.

## **CAPÍTULO 2**

### **LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA MUCOSA OLFACTIVA HUMANA NAS FOSSAS NASAIS**



## 2.1 INTRODUÇÃO

### 2.1.1 Considerações gerais

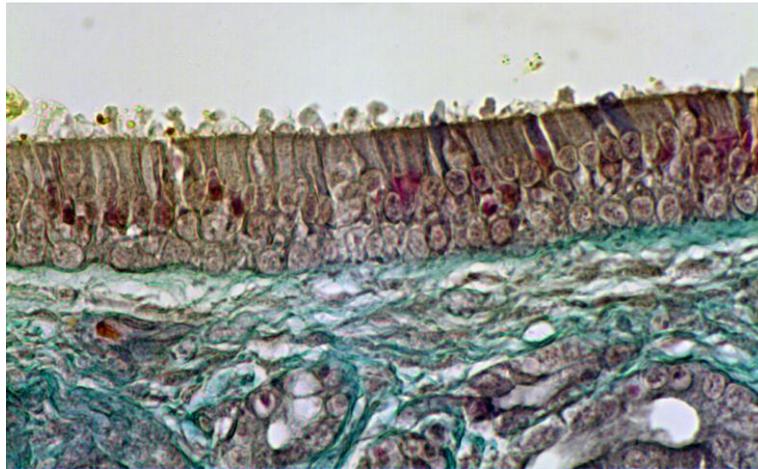
A distribuição da mucosa olfactiva humana nas fossas nasais não foi até à data documentada ou sistematizada de forma suficiente, provavelmente porque o olfacto tem sido uma área relativamente negligenciada em rinologia e na investigação dos órgãos dos sentidos (Doty e Mishra 2001; Lund 2008; Hawkes e Doty 2009).

Os estudos existentes sobre a constituição da mucosa olfactiva basearam-se na realização de biópsias da mucosa olfactiva, mas foram realizados num número muito limitado de centros ou instituições, e apenas com propósitos de investigação, pretendendo primariamente correlacionar as alterações estruturais histopatológicas observadas com a natureza ou grau da disfunção olfactiva (Jafek, Johnson, Eller *et al.* 1997; Jafek, Murrow, Michaels *et al.* 2002).

Existe um consenso generalizado de que a mucosa olfactiva está localizada na porção superior e posterior das fossas nasais. Todavia, a distribuição anatómica exacta e a área coberta por neuroepitélio olfactivo não são conhecidas (Leopold, Hummel, Schwob *et al.* 2000), e embora tenha sido descrito que o epitélio olfactivo do feto é uniforme com limites bem definidos, alguns estudos sugerem que o epitélio olfactivo dos adultos pode ter limites mais irregulares e manchas intercaladas de epitélio respiratório (Naessen 1970; Nakashima, Kimmelman e Snow 1984; Morrison e Costanzo 1990).

### 2.1.2 Composição da mucosa olfactiva

A mucosa olfactiva humana consiste num epitélio colunar pseudoestratificado que repousa sobre uma lâmina própria altamente celular (Figura 2.1).

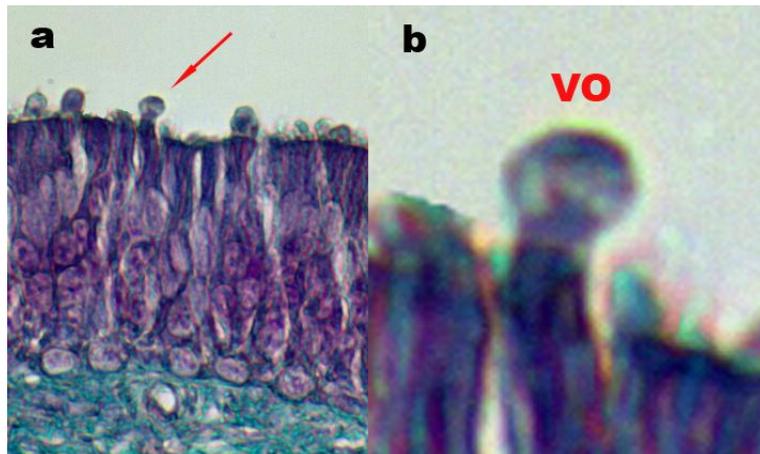


**Fig. 2.1** Imagem original de microscopia óptica da mucosa olfactiva (amostra de cadáver, Tricrómico de Masson, ampliação original de 200X). O epitélio é pseudo-estratificado. A membrana basal é fina e a lâmina própria rica em células.

O epitélio tem 4 tipos celulares: as células olfactivas bipolares receptoras, as células de sustentação, as células microvilares e as células basais (Moran, Rowley, Jafek *et al.* 1982; Jafek 1983; Morrison e Costanzo 1990; Jafek, Eller, Jonhson *et al.* 1997).

A célula receptora olfactiva é um verdadeiro neurónio bipolar, projectando um único dendrito para a superfície do neuroepitélio olfactivo e um único axónio para o bulbo olfactivo. Os núcleos dos neurónios bipolares dispõem-se a todos os níveis da espessura do epitélio, com os núcleos das células mais velhas mais próximos da superfície do epitélio do que os núcleos das células mais recentemente diferenciadas (Hawkes e Doty 2009). A disposição variável dos núcleos das células confere-lhe o seu aspecto típico pseudo-estratificado.

O dendrito do neurónio bipolar tem uma terminação em forma de taco, conhecida como a *vesícula olfactiva* (*olfactory vesicle* or *knob*). A vesícula olfactiva estende-se para a superfície epitelial (Figura 2.2 a e b) e contém cílios imóveis com receptores de membrana aos quais as moléculas odoríferas se ligam (este último aspecto só é observável em microscopia electrónica). Cada um dos axónios das 6 a 20 milhões de células bipolares atravessa a membrana basal em direcção à lâmina própria, reúne-se para formar fascículos e nervos passando através dos 15 a 20 orifícios de cada uma das lâminas crivosas (Figura 2.3) para ir formar uma sinapse no interior do bulbo olfactivo (Moran, Rowley, Jafek *et al.* 1982; Hadley, Orlandi e Fong 2004).



**Fig. 2.2.** Imagem original de microscopia óptica do neuroepitélio olfativo (amostra de cadáver, Tricrómico de Masson, ampliação original de 400X). A superfície do neuroepitélio olfativo é caracterizada pela presença das projecções dendríticas dos neurónios bipolares, em forma de bulbo ou de taco de *baseball*, designadas de vesículas olfativas (b=pormenor de a; VO=vesícula olfactiva).



**Fig. 2.3** Imagem original de microscopia óptica da lâmina crivosa (amostra de cadáver, Hematoxilina-Eosina, ampliação original de 40X). Os nervos olfativos, constituídos pelos axónios dos neurónios bipolares, atravessam a lâmina crivosa em direcção ao bulbo olfativo, localizado na fossa craniana anterior (LC=lâmina crivosa; NO=nervo olfativo; MO=mucosa olfactiva; BO=bulbo olfativo).

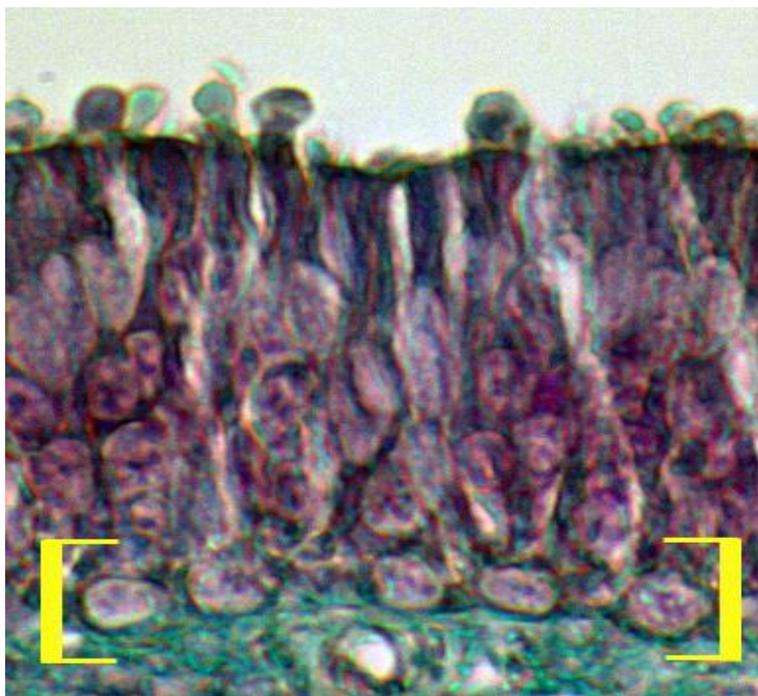
As células de sustentação, que são as células predominantes no neuroepitélio olfativo, circundam as células bipolares, contribuindo para a regulação e a manutenção do meio iónico apropriado em redor das células receptoras, favorável à ocorrência da transdução olfactiva (Nickell 1997).

As células microvilares, apenas identificáveis por microscopia electrónica, foram descritas pela primeira vez em 1982 e admitidas como uma segunda classe, morfológicamente distinta, de células receptoras da mucosa olfactiva, porém, o seu papel putativo no olfacto ainda não foi definitivamente demonstrado (Moran, Rowley e Jafek 1982; Lipschitz e Michel 2002; Montani, Tonelli, Elsaesser *et al.* 2006).

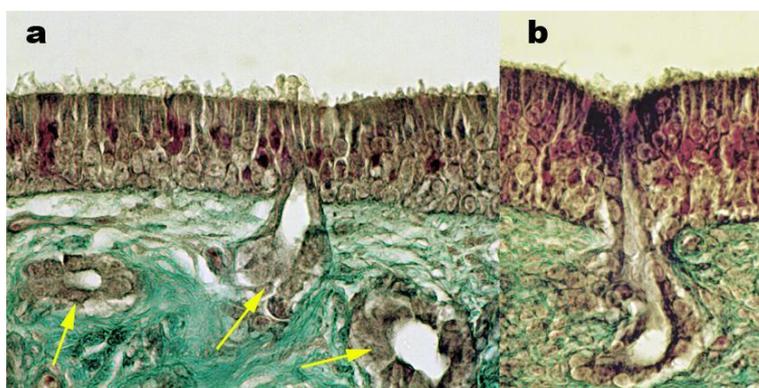
As células basais, o único tipo de células que não se projecta na superfície epitelial e repousa sobre a membrana basal (Figura 2.4), são, pelo contrário, bem reconhecidas como uma população distinta de células estaminais do epitélio olfactivo, capazes de regenerar continuamente e ao longo da vida as células olfactivas danificadas (Graziadei e Graziadei 1979; Calof e Chikaraishi 1989; Bartolomei e Greer 2000; Hahn, Han, Rawson *et al.* 2005; Murrell, Feron, Wetzig *et al.* 2005). Estas células têm propriedades de auto-renovação e multipotência e são capazes de originar, experimentalmente, outras células, neurais e não neurais (Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Carter, MacDonald e Roskams 2004; Chen, Fang e Schwob 2004). Não se observam na mucosa olfactiva humana os 2 subtipos de células basais: globosas e horizontais, muitas vezes mencionada na literatura médica a partir da observação de animais de experimentação roedores (Hahn, Han, Rawson *et al.* 2005).

A lâmina própria contém fascículos de axónios, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e glândulas de Bowman (Menco e Morrison 2003). Os axónios dos neurónios olfactivos são envolvidos, na sua transição do sistema nervoso periférico (neuroepitélio olfactivo) para o sistema nervoso central (bulbo olfactivo) por uma linhagem única de células gliais: as células da bainha dos axónios olfactivos (“*olfactory ensheathing cells*” - OEC) (Doucette 1991; Bartolomei e Greer 2000).

As glândulas de Bowman são glândulas tubulo-alveolares serosas, compostas por ácinos secretores dispostos em forma circular e excretando os seus produtos por um ducto que passa através do epitélio olfactivo (Figura 2.5 a e b) (Moulton e Beidler 1967). Os produtos secretados por estas glândulas para a camada mucosa da região olfactiva são essenciais para a transdução olfactiva.



**Fig. 2.4** Imagem original de microscopia óptica do neuroepitélio olfativo (amostra de cadáver, Tricrômico de Masson, ampliação original de 600X). As células basais do neuroepitélio olfativo são poliédricas ou arredondadas e dispõem-se de modo regular ao longo da membrana basal do epitélio (observam-se as células basais na zona delimitada entre as marcas amarelas).



**Fig. 2.5** Imagem original de microscopia óptica do neuroepitélio olfativo (amostra de cadáver, Tricrômico de Masson, ampliação original de 100X). a) As glândulas de Bowman são esféricas, contituídas por células serosas dispostas à volta de um lúmen central (porção alveolar); a) e b) as glândulas de Bowman atravessam em seguida o neuroepitélio olfativo (porção tubular), vindo abrir num orifício localizado na sua superfície (setas=porção alveolar da glândulas de Bowman).

### 2.1.3 Aspectos evolutivos

A área da superfície da mucosa olfativa ou o volume do bulbo olfativo têm sido usados para interpretar diferenças na sensibilidade olfativa entre as

diferentes espécies e para designá-las de *macrosmáticas* ou *microsmáticas* (Smith e Bhatnagar 2004). Os seres humanos são considerados *microsmáticos* porque os seus bulbos olfactivos são proporcionalmente menores (Smith, Bhatnagar, Tuladhar *et al.* 2004) e as regiões das fossas nasais que estão recobertas por neuroepitélio olfactivo têm proporcionalmente uma área menor nos homens e nos outros primatas em comparação com outros mamíferos, particularmente os carnívoros (Negus 1958; Le\_Gros\_CLark 1959). A regressão olfactiva é um processo evolutivo que pode ainda ser exagerado pela elaboração de outras porções do cérebro (Martin 1990), e os primatas em geral têm sido considerados microsmatas com uma ênfase concomitante no sentido da visão (Zhang e Webb 2003).

Na realidade, é o número e a capacidade das células receptoras olfactivas por unidade de área e não a área da superfície da mucosa olfactiva considerada isoladamente que determina a acuidade do sentido do olfacto (Ankel-Simons 2000). Outras particularidades anatómicas das fossas nasais e outras variáveis físicas são igualmente importantes na capacidade olfactiva. Foi demonstrado que a configuração anatómica das fossas nasais afecta o fluxo do ar na região olfactiva, e, como já foi mencionado anteriormente, apenas 10 a 15% do ar que entre pelas narinas alcança na realidade a fenda olfactiva (Hahn, Scherer e Mozell 1993; Keyhani, Scherer e Mozell 1995; Keyhani, Scherer e Mozell 1997; Hornung 2006).

Muitos dos aspectos anatómicos ou fisiológicos do sistema olfactivo reflectem aspectos evolutivos. As estruturas designadas de *etmoidoturbinais*, que correspondem ao corneto médio e superior, assim como os espaços situados no interior do *recessus cupularis* (fenda olfactiva) são geralmente interpretados como adaptações que sobrevieram para aumentar a área de superfície da mucosa olfactiva (Negus 1958; Moore 1981; Koppe, Nagai e Alt 1999).

#### **2.1.4 Homeostase neuronal olfactiva**

Os neurónios bipolares do sistema olfactivo estão directamente expostos ao meio exterior, o que facilita a transdução olfactiva mas torna estas células

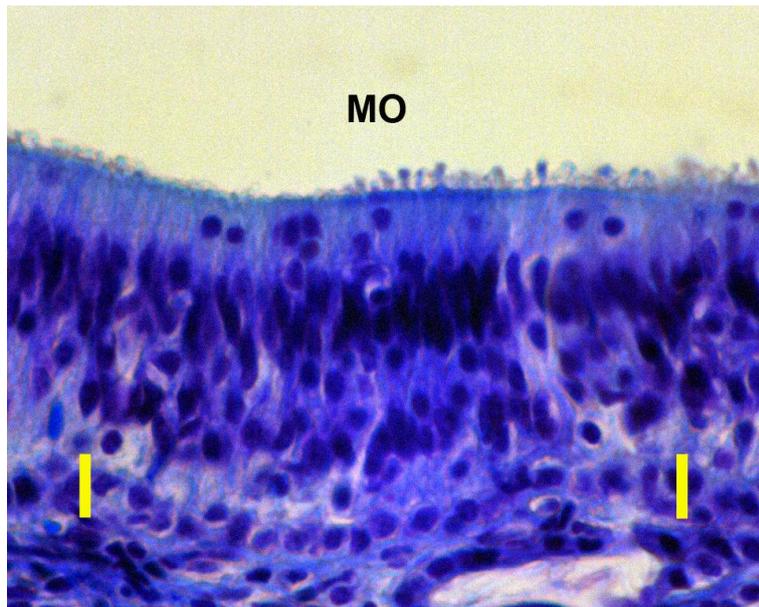
vulneráveis ao dano induzido por agentes inflamatórios, infecciosos e químicos (Robinson, Conley, Shinnars *et al.* 2002).

Como um mecanismo adaptativo para contrariar esse dano, o epitélio olfativo dos mamíferos mantém uma capacidade regenerativa impressionante mesmo na idade adulta, e as células basais progenitoras dão origem a neurónios imaturos que depois se diferenciam elaborando dendritos ciliados que se dirigem para a superfície e axónios que vão crescer até ao bulbo olfativo (Graziadei e Monti Graziadei 1983; Schwob, Szumowski e Stasky 1992; Calof, Mumm, Rim *et al.* 1998).

O balanço entre a perda de neurónios olfativos e a regeneração foi designado de *homeostase neuronal olfativa* e é responsável pela manutenção de um número adequado de células receptoras olfativas, necessário para o sentido do olfacto (Holcomb, Graham e Calof 1996).

A morte celular, que resulta primariamente da apoptose (ou morte celular programada) pode ocorrer mesmo na ausência de doença óbvia, ou pode ser influenciada ou iniciada por uma variedade de factores que incluem o estado nutricional e alterações hormonais, a idade, infecções virais ou bacterianas (sinusite), toxinas, radiação, citocinas ou a ausência de factores tróficos importantes (Farbman 1990; Nakagawa, Aiba, Shiotani *et al.* 1996; Ge, Tsukatani, Nishimura *et al.* 2002; Robinson, Conley, Shinnars *et al.* 2002). De igual forma outros factores ambientais agressivos derivados da cultura humana, como a exposição ao fumo do tabaco, a poluição industrial, ocupacional ou do ar em geral podem sobrelevar os mecanismos de sobrevivência das células nervosas olfativas e ser lesivos ou destrutivos (Halpern 1982; Vent, Robinson, Gentry-Nielsen *et al.* 2004).

A *homeostase neuronal olfativa* também influencia a distribuição anatómica exacta e a área recoberta pela mucosa olfativa, em cada indivíduo e em cada momento. É possível que este processo explique o facto de que, no adulto, se possam documentar manchas de epitélio respiratório em áreas que no feto humano se observava uma distribuição mais uniforme do epitélio olfativo (Naessen 1970; Nakashima, Kimmelman e Snow 1984; Morrison e Costanzo 1990) (Figura 2.6).



**Fig. 2.6** Imagem original de microscopia óptica do neuroepitélio olfactivo de um feto (amostra de cadáver, Coloração de Lugol, ampliação original de 400X). O neuroepitélio da mucosa olfactiva do feto é mais uniforme e espesso do que no adulto (observam-se as células basais na zona delimitada entre as marcas amarelas).

Apesar de que a teoria mais preponderante seja a de que estas manchas de epitélio respiratório representam uma substituição ou “invasão” da área olfactiva devido à perda das células neuronais e basais progenitoras por alguma forma de agressão epitelial ou pelo processo de envelhecimento (Nakashima, Kimmelman e Snow 1984; Trojanowski, Newman, Hill *et al.* 1991; Moran, Jafek, Eller *et al.* 1992; Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992; Schwob, Youngentob e Mezza 1995; Jang, Youngentob e Schwob 2003; Holbrook, Leopold e Schwob 2005), é também possível que as manchas de epitélio respiratório resultem igualmente da “invasão” ou substituição de áreas de epitélio respiratório por epitélio olfactivo nas áreas vizinhas (Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998).

### **2.1.5 Localização e distribuição da mucosa olfactiva**

A mucosa olfactiva humana constitui provavelmente 1,25% da mucosa nasal, ocupando 2 cm<sup>2</sup> da porção superior da cavidade nasal e recobrendo os 10 mm da porção superior do septo, a lâmina crivosa e a porção medial do corneto superior (Williams e Warnick 1975; Jafek, Johnson, Eller *et al.* 1997; Hadley, Orlandi e Fong 2004). Outras estimativas teóricas que já foram apontadas são o

número e a densidade dos neurónios bipolares olfactivos: 6 a 20 X 10<sup>6</sup> e 30.000/mm<sup>2</sup>, respectivamente (Moran, Rowley, Jafek *et al.* 1982; Hadley, Orlandi e Fong 2004).

Em 1892, von Brunn fez medições na área olfactiva em dois casos *post-mortem*, revelando áreas de 307 e 238 mm<sup>2</sup>, respectivamente (Caso 1: 133 mm<sup>2</sup> no septo e 174 mm<sup>2</sup> na parede lateral; Caso 2: 99 mm<sup>2</sup> no septo e 139 mm<sup>2</sup> na parede lateral) (von Brunn 1892). Na figura retratada por Lang baseada nas medições de von Brunn reconhece-se que a região olfactiva se estende para uma posição inferior ao plano do ósteo do seio esfenoidal e se distribui em áreas do corneto médio (Lang 1989), contradizendo a assumpção por vezes referida de que a mucosa olfactiva na parede lateral apenas ocupa o corneto superior.

Muitos outros estudos subsequentes reconhecem também que a mucosa olfactiva tem uma distribuição mais inferior e anterior do que o tradicionalmente admitido (Moran, Rowley, Jafek *et al.* 1982; Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992; Restrepo, Okada, Teeter *et al.* 1993; Rawson, Brand, Cowart *et al.* 1995; Thurauf, Gjuric, Kobal *et al.* 1996; Rawson, Gomez, Cowart *et al.* 1997; Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998; Jones e Rog 1998; Gomez, Rawson, Hahn *et al.* 2000; Leopold, Hummel, Schwob *et al.* 2000; Jafek, Murrow, Michaels *et al.* 2002; Lane, Gomez, Dankulich *et al.* 2002; Perry, Mackay-Sim, Feron *et al.* 2002; Rawson e Gomez 2002; Menco e Morrison 2003; Bianco, Perry, Harkin *et al.* 2004; Hadley, Orlandi e Fong 2004; Lima, Pratas-Vital, Escada *et al.* 2006; Choi, Li, Law *et al.* 2008). Num desses estudos, Leopold *et al.* usou a electro-olfactografia e biópsias localizadas, para identificar a presença de mucosa olfactiva junto à inserção anterior do corneto médio e anteriormente a essa inserção, quer na parede medial, quer na parede lateral da fossa nasal (Leopold, Hummel, Schwob *et al.* 2000). Restrepo *et al.* colheram neurónios receptores olfactivos em biópsias realizadas no septo oposto à porção superior do corneto médio (Restrepo, Okada, Teeter *et al.* 1993), e Féron *et al.* demonstraram epitélio olfactivo distribuído em áreas do corneto médio em mais de 50% de 71 espécimes de biópsia colhidos de voluntários saudáveis (Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998). Resultados similares foram demonstrados por Rawson *et al.* que obtiveram neurónios olfactivos identificáveis morfológicamente em biópsias realizadas no septo nasal oposto à porção superior do corneto médio e no corneto médio propriamente dito (Rawson, Brand, Cowart *et al.* 1995). Os mesmos autores verificaram que, quer

as biópsias obtidas na metade superior do corneto médio e no septo confrontante, quer as obtidas na metade inferior do corneto médio, eram capazes de produzir, na maior parte dos espécimes, neurónios olfactivos responsivos às substâncias odorantes (Rawson, Gomez, Cowart *et al.* 1997). Estudos imunquímicos realizados por Nibu *et al.* também confirmaram que a mucosa olfactiva se estende sobre uma área mais extensa do que previamente descrito, estando presente no epitélio de revestimento da porção mais inferior da parede medial dos cornetos médios (Nibu, Li, Zhang *et al.* 1999).

Biedlingmaier *et al.* não encontraram células olfactivas no tecido superficial dos cornetos médios parcialmente removidos em doentes submetidos a cirurgia endoscópica naso-sinusal (Biedlingmaier, Whelan, Zoarski *et al.* 1996), todavia os resultados podem ser explicados pelas alterações patológicas da mucosa olfactiva induzidas pela doença inflamatória (Kern 2000).

Com base nestes estudos, pode afirmar-se que a mucosa olfactiva está localizada na porção superior das fossas nasais: na região da lâmina crivosa, na porção superior do septo nasal, na porção medial do corneto superior e em zonas da superfície medial do corneto médio (Li, Doty, Kennedy *et al.* 2003).

### **2.1.6 Mapeamento da mucosa olfactiva**

A maior parte dos estudos realizados para estudar e identificar a mucosa olfactiva nos seres humanos basearam-se na realização de biópsias. A utilização de endoscópios com este propósito foi introduzida em 1992 (Lovell, Jafek, Moran *et al.* 1982) e, depois de demonstrada a segurança e os bons resultados da biópsia endoscópica (Lanza, Moran, Doty *et al.* 1993; Lanza, Deems, Doty *et al.* 1994), esta passou a ser considerada a técnica de eleição para obter amostras destinadas ao estudo morfológico da mucosa olfactiva.

Curiosamente, foram os próprios autores que desenvolveram e validaram a técnica da biópsia endoscópica da mucosa olfactiva que reconheceram, logo nessa altura, a sua insuficiência para concretizar estudos destinados ao mapeamento da mucosa olfactiva nas fossas nasais (Lanza, Deems, Doty *et al.*

1994). De acordo com estes autores, a distribuição exacta da mucosa olfactiva nas fossas nasais só poderia ser realizada em estudos cadavéricos, pois só assim seria possível, por motivos técnicos e por razões éticas, a análise de quantidades maiores de tecido ou de peças anatómicas que incluíssem uma parte maior ou a totalidade da região olfactiva.

Os únicos estudos publicados até à data sobre o mapeamento da região olfactiva, nos quais se utilizaram peças anatómicas de cadáver constituídas por áreas mais extensas da região, foram realizados por Paik *et al.* e por Nibu *et al.* (Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992; Nibu, Li, Zhang *et al.* 1999). Em ambos os estudos a colheita da peça anatómica foi realizada por abordagem intracraniana, após craniotomia e remoção do encéfalo e da dura-máter. Os espécimens incluíam a lâmina crivosa, o septo nasal e os cornetos médio e superior, e foram removidos em bloco utilizando serras circulares.

No primeiro estudo foram colhidos 12 espécimens mas só em 3 deles o epitélio foi mantido preservado e pôde ser analisado. Os dadores eram indivíduos sem antecedentes ou presença de patologia naso-sinusal, com 34, 57 e 82 anos de idade, sendo o último do sexo feminino. A técnica utilizada para a visualização da mucosa olfactiva (neuroepitélio) foi a microscopia óptica dos cortes impregnados com prata pelo método de Bodian. Os critérios para a sua identificação foram a presença dos dendritos das células bipolares (vesículas olfactivas) e a ausência de cílios respiratórios. Os resultados foram a identificação de mucosa olfactiva em todos os 3 espécimens, numa extensão vertical média da região olfactiva (a partir da lâmina crivosa) de 14,3 mm. A presença de áreas de epitélio respiratório no meio do neuroepitélio olfactivo foi identificada, mas só de forma assinalável no indivíduo com 82 anos de idade (Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992).

No segundo estudo, cujo propósito principal era investigar a neurogénese no neuroepitélio olfactivo, os 2 espécimens cadavéricos utilizados foram obtidos menos de 24 horas após o falecimento. Não foram indicados dados demográficos ou clínicos dos dadores. A identificação da mucosa olfactiva foi realizada utilizando-se técnicas de imunohistoquímica com anticorpos que marcam o neuroepitélio olfactivo. Os resultados permitiram concluir que a

mucosa olfactiva se estendia mais inferiormente do que o previamente estabelecido, incluindo na sua área de distribuição a porção mais inferior do corneto médio (Nibu, Li, Zhang *et al.* 1999).

Os diferentes métodos que têm sido utilizados para a identificação da mucosa olfactiva humana nas amostras recolhidas por biopsia de doadores vivos incluem a microscopia óptica, a microscopia electrónica de transmissão e técnicas de imunohistoquímica (Hempstead e Morgan 1985; Hempstead e Morgan 1985; Nakashima, Kimmelman e Snow 1985; Nakashima, Kimmelman e Snow 1985; Spicer 1993; Jafek, Johnson, Eller *et al.* 1997). No cadáver, todavia, a microscopia electrónica e a imunohistoquímica parecem ser prejudicadas pela degenerescência das proteínas e do tecido neural do neuroepitélio olfactivo que ocorre desde as primeiras horas após o falecimento (Graziadei 1973; Jafek 1983; Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992; Kim, Choi, Kim *et al.* 2003; Pinna 2008). O estudo de Nibu *et al.* utilizou marcadores imunológicos mas só foram utilizados espécimens de 2 indivíduos e as colheitas foram realizada menos de 24 horas após o falecimento, condição essa que é difícil de ser cumprida na maior parte das colheitas realizadas no cadáver.

Por todas estas razões e até à data actual, a microscopia óptica convencional é a técnica que é considerada a mais adequada para a identificação da mucosa olfactiva e para a sua diferenciação da mucosa respiratória nos espécimens cadavéricos.

### **2.1.7 Identificação da mucosa olfactiva por microscopia óptica**

A diferenciação entre a mucosa olfactiva e a mucosa respiratória, pela microscopia óptica, só foi desenvolvida num número muito reduzido de publicações (Polyzonis, Kafandaris, Gigis *et al.* 1979; Schwob, Szumowski, Leopold *et al.* 1993; Lee, Lim, Lee *et al.* 2000; Kim, Choi, Kim *et al.* 2003). A mais importante delas foi realizada por Robert Kern, um otorrinolaringologista de Chicago, na sua tese de candidatura à Sociedade Americana de Laringologia, Rinologia e Otologia (*Triological Society*) em 2000, na qual foram investigadas as alterações patológicas na mucosa olfactiva nos doentes com sinusite crónica (Kern 2000).

De acordo com este autor, os critérios para diferenciar a mucosa olfactiva da mucosa respiratória pela microscopia óptica são os seguintes (Quadro 2.1).

**Quadro 2.1** Diferenciação histológica entre mucosa olfactiva e respiratória

<b>Mucosa olfactiva</b>	<b>Mucosa respiratória</b>
Epitélio pseudoestratificado	Epitélio pseudoestratificado
Sem células calciformes	Com células calciformes
Membrana basal fina	Membrana basal espessa
Cílios irregulares	Cílios regulares
Lâmina própria celular	Lâmina própria vascular
Feixes nervosos grandes e numerosos	Raros feixes nervosos

Uma contribuição importante para a definição destes critérios, de acordo com Kern, foi a do tratado de patologia da área otorrinolaringológica “*Atlas of otolaryngic pathology*”, publicado em 1956 por autores do prestigiado “*Instituto de Patologia das Forças Armadas*”, de Washington, EUA (Ash e Raum 1956) e considerado ainda hoje como seminal (Fechner 2002).

Outros autores, como Pinna (2008) tentaram criar uma escala para a identificação positiva da mucosa olfactiva a partir da verificação de um número mínimo de entre uma série de critérios, que incluíam os que foram propostos por Kern, e ainda outros, baseados na marcação imunológica (Pinna 2008). Apesar do seu carácter objectivo, resultante da quantificação, a escala proposta tinha o inconveniente de não ponderar o valor diagnóstico diferente dos vários critérios enumerados. Por exemplo, as características da lâmina própria são importantes mas a observação directa das células sensoriais é mais importante. Na verdade, como bem enunciado por Paik *et al.*, a identificação da mucosa olfactiva normal deve ser realizada pela identificação positiva das células bipolares, que pode ser verificada pela observação da sua extremidade dendrítica – a vesícula olfactiva; por outro lado, a identificação da mucosa respiratória deve ser realizada pela identificação positiva da característica mais distintiva das células

respiratórias epiteliais – os cílios longos, regulares e uniformemente distribuídos na superfície epitelial das células (Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992).

## **2.2 OBJECTIVOS**

Avaliar a distribuição da mucosa olfactiva humana nas fossas nasais, a partir do estudo histológico por microscopia óptica de peças anatómicas da região olfactiva obtidas do cadáver.

## 2.3 MÉTODOS

As peças anatómicas da região olfactiva foram seleccionadas de entre as existentes no banco de peças anatómicas humanas da Unidade Funcional de Neuropatologia do Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (Responsável: Dr. Carlos Lima). Os estudos patológicos foram realizados na Unidade de Microcirurgia e na Unidade Funcional de Neuropatologia do Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental.

### 2.3.1 Colheita das peças anatómicas da região olfactiva

As peças foram recolhidas durante a autópsia clínica ou médico-legal realizada em cadáveres recentes, para investigar morfológicamente a mucosa olfactiva em estudos futuros. A colheita das peças foi precedida de todas as autorizações institucionais necessárias, no cumprimento da legislação existente à data da sua realização. A maioria das peças foi obtida pelo Dr. Carlos Lima no período de tempo entre 1987 e 1994.

A técnica utilizada para a colheita das peças anatómicas da região olfactiva foi a seguinte: a colheita foi realizada por abordagem intracraniana. A face superior do andar anterior da base do crânio foi exposta após craniotomia e remoção do encéfalo e da dura-máter e secção dos bulbos olfactivos. A peça incluiu a base do crânio e as estruturas nasais incluídas nas seguintes linhas de corte, realizadas com serras circulares: anteriormente, o corte foi realizado adiante do limite anterior da lâmina crivosa e da apófise *crista gali*; posteriormente, o corte foi realizado imediatamente atrás do limite posterior da lâmina crivosa no limite anterior do *planum* esfenoidal; lateralmente, os cortes foram realizados um centímetro para fora do limite lateral da lâmina crivosa, de forma a incluir na peça toda a inserção dos cornetos médio e superior na base do crânio.

As peças foram fixadas durante vários dias numa solução tamponada de aldeído fórmico a 10% e depois colocadas durante 24 horas numa solução descalcificante. Depois de desidratadas foram incluídas em parafina e guardadas. Além do arquivo constituído pelos blocos parafinados com as

peças anatómicas, o banco de peças anatómicas possui ainda um registo informatizado das características dos dadores, com os respectivos dados demográficos e história clínica, num ficheiro da base de dados Microsoft Works para Windows®, versão 2.0.

### 2.3.2 Critérios de selecção das peças anatómicas

Numa primeira fase, consultaram-se os registos das características clínicas dos dadores das peças anatómicas, de forma a excluir todos aqueles em que se conhecessem afecções potencialmente indutoras de perturbações do olfacto ou de alterações patológicas do neuroepitélio olfactivo (Quadro 2.1) (Doty 1991; Jafek, Eller, Jonhson *et al.* 1997; Seiden 1997; Jones e Rog 1998; Doty e Mishra 2001; Nordin e Bramerson 2008). O critério de exclusão baseado na idade baseou-se no pressuposto e nas evidências estabelecidas de que a mucosa olfactiva é gradualmente substituída por mucosa respiratória ao longo da idade (Naessen 1971; Doty, Shaman, Applebaum *et al.* 1984; Nakashima, Kimmelman e Snow 1984; Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992; Robinson, Conley, Shinnors *et al.* 2002).

#### Quadro 2.2 Critérios de exclusão das peças anatómicas

---

---

Perturbação conhecida do olfacto

Rinite e rinosinusite

Traumatismo nasal ou craniano

Tumores ou cirurgias nasais

Idade superior a 50 anos

Doenças neurodegenerativas

---

### 2.3.3 Processamento e observação das lâminas

Os blocos parafinados foram cortados em 3 localizações diferentes: na porção mais anterior; na porção média; e na porção mais posterior da peça. Todos os cortes tinham 3µm de espessura e foram realizados no sentido transversal do comprimento do bloco, tendo as lâminas sido coradas pela Hematoxilina-Eosina (H&E) e pelo Tricrómico de Masson (TM).

As lâminas foram observadas utilizando-se um microscópio de microscopia óptica Olympus®, modelo CX40, com ampliações de 40X, 100X, 200X, 400X e 600X. Para o registo das imagens utilizou-se um microscópio Meiji®, modelo MX5300H, com uma câmara digital acoplada Deltapix® modelo Infinity X com o software Deltapix Viewer Professional 1.7.

A primeira observação das lâminas, realizada em pequena ampliação (ampliação de 40X) destinou-se a comprovar a correcta orientação dos cortes e a integridade da peça. Foi ainda avaliada a qualidade da técnica histológica, se necessário com ampliações superiores. Todos os 3 cortes de cada peça anatómica foram observados.

Foram seleccionadas as lâminas que permitiram a identificação positiva da região olfactiva bilateralmente, pelo menos numa extensão de 10 a 15 mm abaixo da lâmina crivosa. A identificação da região olfactiva baseou-se na visualização dos seus acidentes anatómicos mais importantes: lâmina crivosa; septo nasal; e corneto médio ou superior. A qualidade da técnica histológica foi verificada por parâmetros como a agregação da cromatina, a redução do volume celular, a perda de contacto inter-celular e a perda de resolução tissular no microscópio (Uraih e Maronpot 1990).

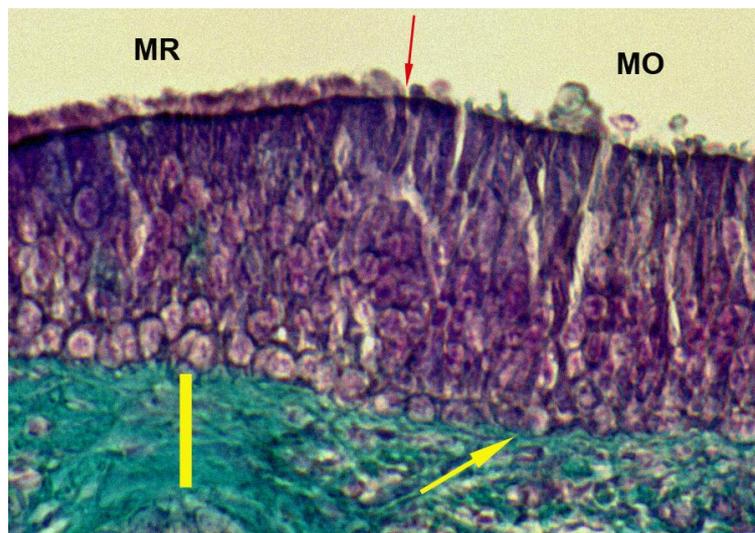
#### **2.3.4 Análise histológica e morfométrica da região olfactiva**

A mucosa das 2 regiões olfactivas (direita e esquerda) de cada lâmina foi observada microscopicamente em toda a sua extensão, e caracterizada como olfactiva ou respiratória, de acordo com os critérios anteriormente enunciados (Quadro 2.1) (Kern 2000). Os critérios prevaletes na diferenciação entre a mucosa olfactiva e a respiratória foram: a identificação dos cílios irregulares ou da extremidade dendrítica (vesícula olfactiva) das células bipolares, para a mucosa olfactiva; e a observação dos cílios de distribuição uniforme na superfície epitelial das células, para a mucosa respiratória.

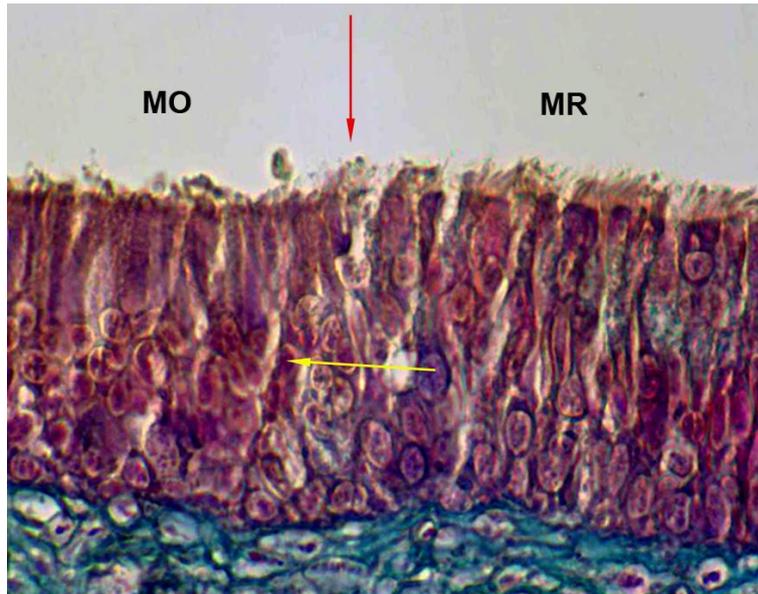
Em cada observação foi determinada e registada a distância entre a lâmina crivosa e o limite inferior da mucosa olfactiva - transição da mucosa olfactiva para a mucosa respiratória (Figuras 2.7 a 2.10) nas 2 paredes: medial (septo

nasal) e lateral (corneto médio ou superior). As medições foram realizadas com o auxílio de uma escala milimétrica colocada sobre a lâmina em baixa ampliação.

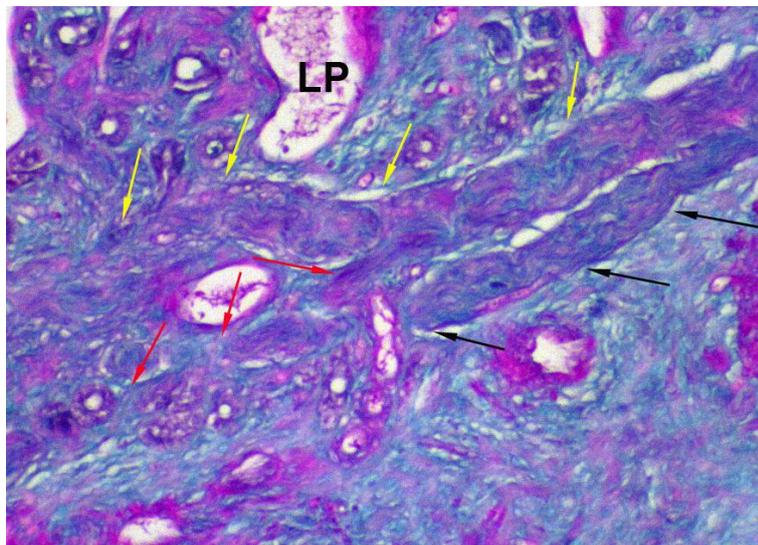
Tem de ser mencionado que os diferentes passos do processamento histológico dos tecidos, em particular a parafinação, reduzem as dimensões que os mesmos apresentavam *in vivo* (Denef, Cordier, Mesquita *et al.* 1979; Uraih e Maronpot 1990; McLean e Prothero 1991; Sittel, Eckel, Sprinzi *et al.* 1997). No que diz respeito ao processamento da região olfactiva, a magnitude dessa redução foi estimada em cerca de 30% (Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992). No nosso estudo apresentaram-se os resultados sem nenhuma ponderação desses efeitos, pelo que é necessário sublinhar que seria necessário acrescentar 30% aos valores apresentados para que representassem uma medida mais real da extensão da mucosa olfactiva no indivíduo vivo.



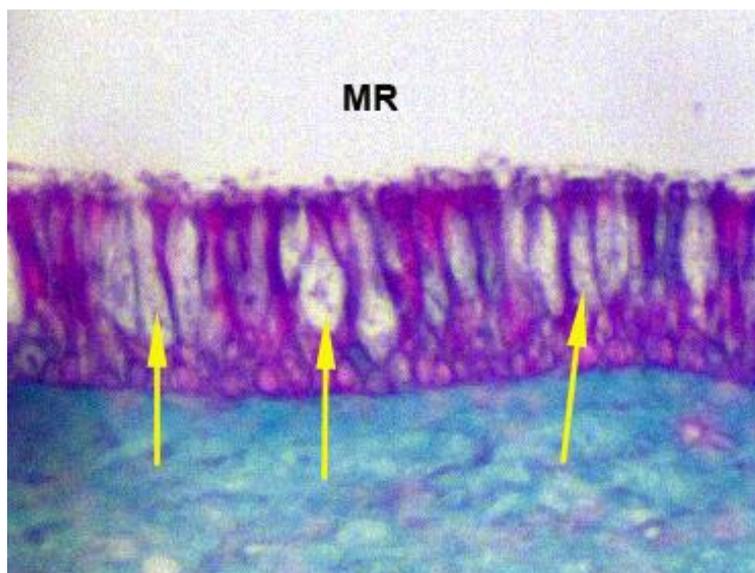
**Fig. 2.7** Imagem original de microscopia óptica da mucosa da região olfactiva (amostra de cadáver, Tricrómico de Masson, ampliação original de 400X). Observa-se neste caso uma transição nítida entre a mucosa olfactiva e a mucosa respiratória (seta vermelha). O epitélio olfactivo é identificável pela sua característica distintiva mais importante, a presença de cílios irregulares e vesículas dendríticas, contrastando com o epitélio respiratório, que apresenta maior densidade de cílios uniformes e paralelos. Outro aspecto muito característico na diferenciação entre a mucosa olfactiva e a mucosa respiratória é a membrana basal, muito espessa na mucosa respiratória (barra amarela) e fina na mucosa olfactiva (seta amarela) (MO=mucosa olfactiva; MR=mucosa respiratória).



**Fig. 2.8** Imagem original de microscopia óptica da mucosa da região olfactiva (amostra de cadáver, Tricrómico de Masson, ampliação original de 400X). Apesar de ambos os tipos de mucosa: olfactiva e respiratória, terem um aspecto pseudoestratificado, este é mais nítido no epitélio olfativo, com maior abundância de núcleos na porção mais profunda do epitélio (seta amarela) (MO=mucosa olfactiva; MR=mucosa respiratória).



**Fig. 2.9** Imagem original de microscopia óptica da mucosa olfactiva (amostra de cadáver, Tricrómico de Masson, ampliação original de 400X). Outra das características distintivas da mucosa olfactiva é a presença de nervos abundantes na lâmina própria, neste caso da porção septal da região (LP=lâmina própria da mucosa olfactiva; setas=nervos na lâmina própria).



**Fig. 2.10** Imagem original de microscopia óptica da mucosa respiratória da face lateral do corneto superior (amostra de cadáver, Tricrômico de Masson, ampliação original de 200X). As células caliciformes (*goblet cells*), células epiteliais glandulares simples que segregam muco, identificáveis nesta coloração pela sua cor clara (setas amarelas), são uma característica distintiva da mucosa respiratória, que não se observa na mucosa olfactiva (MR=mucosa respiratória).

### 2.3.5 Morfologia das paredes septal e turbinal da região olfactiva

Nos estudos exploratórios realizados em dissecação de cadáver, verificou-se que a mucosa olfactiva é facilmente dissecável na parede medial ou septal, através da realização de um túnel submucoperiosteal. Pelo contrário, na parede lateral ou turbinal encontraram-se muitas aderências fibrosas entre a superfície mais profunda da lâmina própria e o osso rugoso da superfície do corneto; a separação dessas aderências e a dissecação da mucosa levou à laceração da mucosa, à fractura do osso do corneto e à provável contaminação dos espécimes com a mucosa da face contrária (lateral) dos cornetos (médio ou superior), que é mucosa respiratória.

Do ponto de vista dos objectivos das investigações, relacionados com a intenção de localizar e colher uma porção da mucosa olfactiva com segurança e um mínimo de morbilidade, era importante confirmar que existiam razões anatómicas para seleccionar a mucosa olfactiva da parede septal como o local da colheita a ser realizada por técnica endoscópica. Por essa razão, a observação das lâminas focalizou também as diferenças entre

as paredes septal e turbinal da região olfactiva, incidindo nos seguintes aspectos (Quadro 2.3).

**Quadro 2.3** Comparação entre a parede septal e a turbinal

---

Estrutura e superfície do osso

Constituição da porção mais profunda da lâmina própria (periósteo)

Interface entre o osso e a lâmina própria

---

### **2.3.6 Imagens utilizadas**

Todas as imagens utilizadas em todas as secções deste capítulo da dissertação, incluído a introdução, foram obtidas e preparadas especificamente para o fim em questão a partir dos espécimens existentes no banco de peças anatómicas humanas da Unidade Funcional de Neuropatologia do Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental.

## 2.4. RESULTADOS

### 2.4.1 Banco de peças anatómicas da região olfactiva

O banco de peças anatómicas da Unidade de Neuropatologia do Hospital de Egas Moniz tem 230 peças anatómicas da região olfactiva resenceadas, que estão fixadas e incluídas em blocos de parafina.

### 2.4.2 Selecção das peças anatómicas

Das 230 peças anatómicas identificadas, seleccionaram-se 52. Os motivos de exclusão das restantes 178 peças estão indicados no Quadro 2.4. Só estão indicadas na linha correspondente à exclusão pelo critério da idade as peças que não tinham sido excluídas pelos outros critérios.

**Quadro 2.4** Peças excluídas por patologias

Inexistência de dados demográficos ou clínicos	18
Infecções generalizadas do SNC (inclui HIV)	86
Doenças neurodegenerativas	40
Idade superior a 50 anos	21
Rinite ou sinusite	13
<b>Total</b>	<b>178</b>

### 2.4.3 Identificação positiva da região olfactiva

Das 52 peças anatómicas seleccionadas, cortadas e coradas, foram ainda excluídas 39 após a observação das lâminas em baixa ampliação e a repetição dos cortes para reconfirmação dos critérios de exclusão. Os resultados desta fase do estudo estão indicados no quadro correspondente (Quadro 2.5). No final foram seleccionadas 13 peças anatómicas consideradas adequadas para o mapeamento da mucosa olfactiva em cortes histológicos seriados.

**Quadro 2.5** Peças excluídas por patologias

Peça de dimensão insuficiente	18
Corte incorrecto	16
Técnica histológica incorrecta	5
<b>Total</b>	<b>39</b>

#### **2.4.4 Análise histológico-morfométrica da região olfactiva**

Os quadros 2.6 e 2.7 resumem o conjunto de todas as observações e determinações realizadas, estando indicados o sexo e a idade do indivíduo a que correspondia o espécimen avaliado. Foram registadas separadamente as determinações realizadas na parede medial (septo nasal) (Quadro 2.6) e na parede lateral (cornetos) (Quadro 2.7). Foram feitas 2 determinações por lâmina em cada uma das paredes, uma vez que a mesma lâmina incluía as regiões olfactivas de ambas as fossas nasais.

Em 59% das determinações realizadas na parede septal e em 62% das determinações realizadas na parede turbinal da região olfactiva, o limite da peça observável na lâmina era constituído por mucosa olfactiva e portanto não incluía a transição da mucosa olfactiva para a mucosa respiratória. Nesses casos registou-se o limite máximo da mucosa olfactiva incluído na peça e assinalou-se essa medição pelo respectivo valor precedido do sinal  $\geq$ .

Em 13% das determinações realizadas na parede septal e em 18% das determinações realizadas na parede turbinal da região olfactiva observaram-se alterações da mucosa, e em particular do epitélio, que não permitiram uma identificação conclusiva da mucosa de revestimento. Esses casos estão assinalados no quadro por uma célula vazia (“*missing value*”).

**Quadro 2.6** Distância entre a lâmina crivosa e o limite inferior da mucosa olfactiva na parede medial da região (septo nasal)

Sexo e idade		Região anterior		Região média		Região posterior	
M	29	≥13	≥13	14	≥15	13	≥17
M	45	-	-	≥14	≥14	17	15
M	27	≥21	≥21	≥17	-	≥17	≥17
M	42	≥13	12	≥11	≥11	≥16	≥16
M	27	≥21	20	17	≥18	≥13	≥13
M	39	13	16	-	-	12	≥14
F	37	15	≥16	≥18	17	≥17	15
M	26	19	≥21	≥20	16	≥18	≥18
F	18	-	≥12	-	12	≥12	≥12
M	38	≥13	≥13	≥11	-	≥18	14
M	39	≥16	15	12	≥13	-	-
M	29	≥14	≥14	≥16	≥16	≥18	17
M	28	16	≥18	≥21	19	≥22	≥22
<i>n:</i>		<b>23</b>		<b>21</b>		<b>24</b>	
<i>Média e desvio-padrão:</i>		<b>15,9±3,2</b>		<b>15,3±3</b>		<b>16±2,8</b>	
<i>Mínimo:</i>		<b>12</b>		<b>≥11</b>		<b>12</b>	
<i>Máximo:</i>		<b>≥21</b>		<b>≥21</b>		<b>≥22</b>	

O limite inferior da mucosa olfactiva no septo nasal, determinado histologicamente a partir da posição da lâmina crivosa, foi encontrado em média a 15,9±3,2 mm na porção mais anterior da região olfactiva, a 15,3±3 mm na porção média da região olfactiva e a 16±2,8 mm na porção mais posterior da região olfactiva. O valor mínimo observado na distância entre a base do crânio e a transição da mucosa olfactiva para a mucosa respiratória (12 mm) só foi registado em 4 observações (5% das determinações).

**Quadro 2.7** Distância entre a lâmina crivosa e o limite inferior da mucosa olfactiva na parede lateral da região (cornetos)

Sexo e idade		Região anterior		Região média		Região posterior	
M	29	≥16	≥13	≥12	≥15	≥11	≥9
M	45	≥14	≥16	≥14	≥13	≥12	≥11
M	27	≥16	≥17	-	≥14		≥14
M	42	-	12	14	13	≥12	≥10
M	27	≥14	≥13	17	≥16	-	-
M	39	15	≥16	-	≥13	12	-
F	37	≥14	≥16	≥15	≥14	≥11	≥13
M	26	19	≥17	≥17	16	≥12	≥14
F	18	≥13	-	15	-	-	≥12
M	38	15	≥13	-	≥11	≥18	14
M	39	-	15	12	15	≥12	-
M	29	≥18	≥22	≥14	≥16	-	≥11
M	28	≥12	16	≥21	19	≥13	≥13
<b>n:</b>		<b>23</b>		<b>22</b>		<b>19</b>	
<b>Média e desvio-padrão:</b>		<b>15,3±2,4</b>		<b>14,8±2,3</b>		<b>12,3±1,9</b>	
<b>Mínimo:</b>		<b>12</b>		<b>≥11</b>		<b>≥9</b>	
<b>Máximo:</b>		<b>≥22</b>		<b>≥21</b>		<b>≥18</b>	

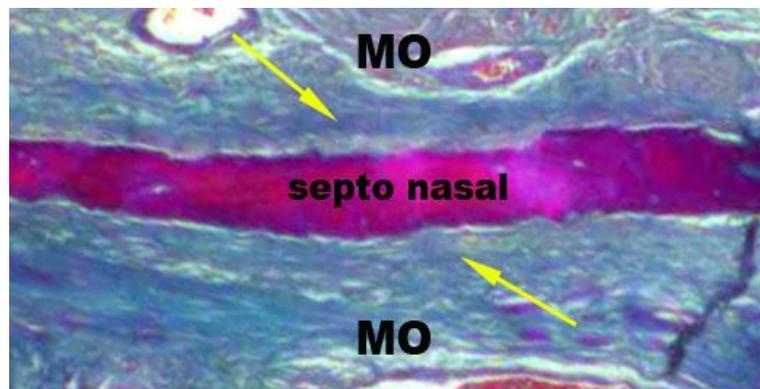
O limite inferior da mucosa olfactiva nos cornetos médio e superior, determinado histologicamente a partir da posição da lâmina crivosa, foi encontrado em média a 15,3±2,4 mm na porção mais anterior da região olfactiva, a 14,8±2,3 mm na porção média da região olfactiva e a 12,3±1,9 mm na porção mais posterior da região olfactiva.

Para os cálculos dos valores médios da distribuição da mucosa olfactiva foram usadas as determinações reais da verificação histológica da transição entre a mucosa olfactiva e a respiratória, nos casos em que foi possível, e o limite observável da peça que incluía mucosa olfactiva, nos restantes casos.

#### 2.4.5 Paredes septal e turbinal da região olfactiva

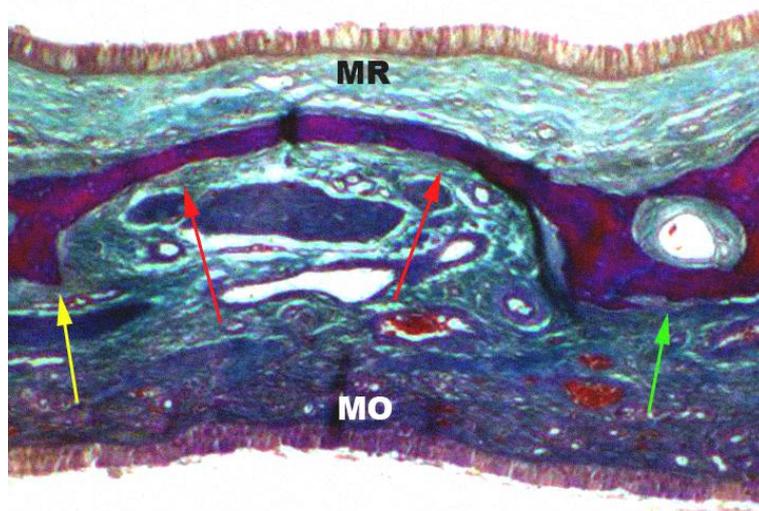
Os estudos histológicos demonstraram diferenças importantes entre a parede septal e a parede turbinal da região olfactiva: na constituição da parede óssea, na superfície profunda da lâmina própria e na interface entre estas 2 superfícies.

No lado septal, observou-se que o osso (lâmina perpendicular do etmóide) era muito mais compacto e apresentava uma superfície lisa ao longo de toda a sua extensão. O periósteo era espesso e constituído por fibras de colagénio paralelas à superfície do osso (Figura 2.11).



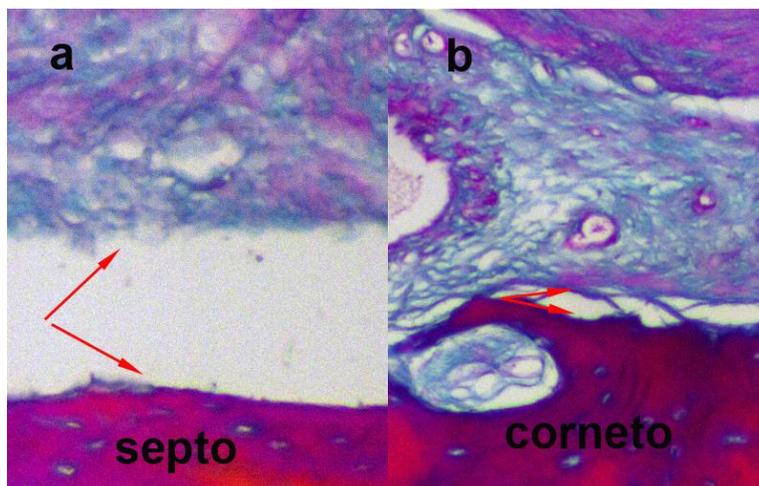
**Fig. 2.11** Imagem original de microscopia óptica da parede septal da região olfactiva (Tricrómico de Masson, ampliação original de 200X). O periósteo era espesso e constituído por fibras paralelas, o osso compacto e liso e a linha de demarcação entre as 2 estruturas era regular (MO=mucosa olfactiva; setas=parte mais profunda da lâmina própria).

No lado turbinal, verificou-se que o osso (corneto superior, neste caso) tinha áreas compactas e áreas lacunares, era de espessura variável, com muitas irregularidades na configuração e superfície. O periósteo tinha uma morfologia variável, sendo espesso e fortemente aderente em algumas zonas e fino, laxo e pouco aderente em outras (Figura 2.12).



**Fig. 2.12** Imagem original de microscopia óptica da parede turbinal da região olfactiva (Tricrómico de Masson, ampliação original de 100X). O periósteeo tinha uma espessura variável, com zonas mais espessas e aderentes à superfície rugosa do osso (setas amarela e verde) e zonas menos aderentes (setas vermelhas). O osso tinha espessura variável. No meio da imagem a separação entre a mucosa olfactiva e a respiratória era extremamente fina (MO=mucosa olfactiva; MR=mucosa respiratória).

Outra demonstração das diferenças na união entre a superfície do septo ou do corneto e a face profunda da lâmina própria da mucosa olfactiva, foi o achado muito mais frequente de artefactos resultantes da preparação histológica na primeira estrutura (Figura 2.13 a e b).



**Fig. 2.13** Imagens originais de microscopia óptica das paredes septal (a) e turbinal (b) da região olfactiva (Tricrómico de Masson, ampliação original de 100X). Observaram-se mais artefactos de descolamento dos tecidos no septo nasal do que nos cornetos (setas=separação artefactual da mucosa olfactiva).

## 2.5. DISCUSSÃO

### 2.5.1 Resumo geral dos resultados

Os estudos histológicos e morfométricos realizados demonstram que a extensão da mucosa olfactiva na região olfactiva das fossas nasais é importante, ocupando uma área considerável das suas paredes lateral (corneto médio e superior) e medial (septo nasal).

A parede medial da região olfactiva é mais importante para o propósito do estudo, por ter características mais favoráveis à dissecação atraumática da mucosa por um plano submucoperiosteal (face profunda da lâmina própria). Nesta parede, o limite inferior da mucosa olfactiva no septo nasal foi encontrado em média a  $15,9 \pm 3,2$  mm,  $15,3 \pm 3$  mm e  $16 \pm 2,8$  mm da base do crânio, respectivamente na porção mais anterior, média e posterior da região olfactiva.

Estes valores demonstram que a mucosa olfactiva se estende, na face medial da região, a um nível inferior ao do plano definido pela posição do ósteo esfenoideal, uma vez que esta estrutura está situada a  $10,3 \pm 4,3$  mm da base do crânio (Kim, Kim, Kang *et al.* 2001). É importante mencionar que o estudo morfométrico de Kim *et al.* que definiu a posição do ósteo esfenoideal tem grande validade, pois utilizou 100 peças anatómicas (cabeças) seleccionadas aleatoriamente. Por outro lado, as suas medições são comparáveis com as dos propósitos do nosso estudo, pois as determinações da posição do ósteo esfenoideal foram realizadas a partir do seu limite inferior.

Não é indiferente ainda referir que 59% das determinações que contribuíram para a média no nosso estudo estavam subavaliadas, por dimensão insuficiente da peça anatómica. Por outro lado, o valor mínimo observado na distância entre a base do crânio e a transição da mucosa olfactiva para a mucosa respiratória (12 mm) só foi registado em 4 observações (5% das determinações).

Por último, os valores do nosso estudo estão ainda subavaliados pela não aplicação, por nós assumida, do factor de correcção (30%) resultante da

necessidade de compensar os efeitos do processamento histológico dos tecidos quando se realizam estudos morfométricos (Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992).

### **2.5.2 Limitações do estudo**

Apesar do desenho do estudo ter pretendido ultrapassar as limitações já antecipadas por outros autores nos estudos destinados ao mapeamento da mucosa olfactiva, ao utilizar peças anatómicas de cadáver (Lanza, Deems, Doty *et al.* 1994), registaram-se apesar disso algumas dificuldades.

Em primeiro lugar, apesar do banco de peças anatómicas da Unidade de Neuropatologia do Hospital de Egas Moniz possuir um número importante de peças anatómicas, uma percentagem significativa das mesmas não pôde ser utilizada: ou pela existência, nos dadores, de patologias ou outras condições potencialmente indutoras de alterações estruturais ou patológicas da mucosa olfactiva; ou ainda pelo facto da colheita não ter preservado uma parte importante, a mais inferior, da região olfactiva. Isso deveu-se à técnica de colheita das peças anatómicas, que não incluiu a secção transnasal da base do septo, passo que já foi proposto por outros autores para a remoção do “*órgão olfactivo humano completo*” (Nibu, Sasaki, Kawahara *et al.* 1998; Nibu, Li, Zhang *et al.* 1999). Refira-se todavia que este gesto importante na colheita das peças não foi considerado, uma vez que a constituição do banco de peças anatómicas precedeu a publicação dos trabalhos que o descreveram. Por outro lado, os propósitos originais da constituição do banco de peças anatómicas dirigiam-se à investigação das alterações estruturais histopatológicas da mucosa olfactiva que podem ser observadas em diferentes doenças, e não à realização de estudos morfométricos, pelo que a preocupação com a completitude do órgão não foi uma prioridade à data das colheitas.

Pelo que foi dito, é razoável afirmar que os resultados permitem validar uma técnica de colheita da mucosa olfactiva que utilize o plano do ósteo esfenoideal como o limite inferior da área da colheita, todavia o propósito mais

ambicioso de conhecer a distribuição real da mucosa olfactiva ou de mapear a mucosa olfactiva na região olfactiva e nas fossas nasais não foi alcançado.

Uma outra limitação do estudo foi a dificuldade, que foi observada, de obter cortes com uma orientação anatómica ajustada ao propósito do estudo: transversal à peça anatómica, de forma a permitir a identificação dos acidentes anatómicos da região e a determinação de medidas das distâncias verticais. O facto deveu-se à discrepância entre a orientação da peça e a do bloco, que por sua vez terá resultado da geometria variável das várias peças obtidas do cadáver.

Por último, a diminuição da qualidade histológica de algumas das preparações foi também uma limitação, pois prejudicou a identificação correcta dos limites da mucosa olfactiva em algumas preparações.

### **2.5.3 Comparação dos resultados obtidos com os de outros estudos**

Como já foi mencionado, estudos pioneiros com mais de 100 anos e muitas investigações subsequentes mais recentes, realizadas em particular nas últimas décadas, descreveram a área da mucosa olfactiva como estendendo-se inferiormente ao plano do ósteo do seio esfenoidal e distribuindo-se em regiões mais inferiores e anteriores do que o previamente estabelecido, incluindo áreas mais inferiores do corneto médio, áreas do septo nasal confrontante e mesmo áreas do septo nasal localizadas adiante da inserção anterior do corneto médio (von Brunn 1892; Moran, Rowley, Jafek *et al.* 1982; Lang 1989; Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992; Restrepo, Okada, Teeter *et al.* 1993; Rawson, Brand, Cowart *et al.* 1995; Thurauf, Gjuric, Kobal *et al.* 1996; Rawson, Gomez, Cowart *et al.* 1997; Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998; Jones e Rog 1998; Gomez, Rawson, Hahn *et al.* 2000; Leopold, Hummel, Schwob *et al.* 2000; Jafek, Murrow, Michaels *et al.* 2002; Lane, Gomez, Dankulich *et al.* 2002; Perry, Mackay-Sim, Feron *et al.* 2002; Rawson e Gomez 2002; Menco e Morrison 2003; Bianco, Perry, Harkin *et al.* 2004; Hadley, Orlandi e Fong 2004; Lima, Pratas-Vital, Escada *et al.* 2006; Choi, Li, Law *et al.* 2008). Os resultados apresentados confirmam as indicações que todos esses estudos faziam pressupor e ainda os resultados dos outros 2 estudos que foram mencionados e que utilizaram peças anatómicas de cadáver no mapeamento da mucosa olfactiva (Paik, Lehman, Seiden *et al.* 1992; Nibu, Li, Zhang *et al.* 1999).

#### **2.5.4 Significado clínico dos resultados**

Os resultados deste estudo foram determinantes para as nossas investigações, pois confirmaram a presença de mucosa olfactiva numa área da região olfactiva que pode ser reconhecida a partir da utilização de referências cirúrgicas identificáveis endoscopicamente, neste caso o ósteo do seio esfenoidal.

Por outro lado, foi confirmado pela histologia que existem razões morfológicas para seleccionar a parede septal da região olfactiva para a colheita endoscópica da sua mucosa.

#### **2.5.5 Conclusões**

O estudo histológico das peças anatómicas da região olfactiva obtidas do cadáver foi útil para definir a área de distribuição da mucosa olfactiva humana nas fossas nasais e o local de colheita da mucosa olfactiva.

Foram confirmados os resultados de muitos outros estudos disponíveis na literatura, que indicavam que a mucosa olfactiva se estende mais inferiormente do que o previamente estabelecido.

Foi confirmado que a superfície medial da região olfactiva é anatomicamente mais favorável para a remoção da mucosa olfactiva.

## **CAPÍTULO 3**

### **COLHEITA DE MUCOSA OLFACTIVA POR VIA TRANSNASAL ENDOSCÓPICA**

### **DISSECÇÃO CADAVÉRICA E TÉCNICA CIRÚRGICA PASSO A PASSO**



### 3.1 INTRODUÇÃO

As células estaminais da mucosa olfactiva humana já foram obtidas com propósitos de investigação no campo da medicina regenerativa (Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998; Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Lane, Gomez, Dankulich *et al.* 2002; Klueber, Roisen e Lu 2003; Bianco, Perry, Harkin *et al.* 2004; Zhang, Klueber, Guo *et al.* 2004; Hahn, Han, Rawson *et al.* 2005; Marshall, Guo, Lu *et al.* 2005; Murrell, Feron, Wetzig *et al.* 2005; Winstead, Marshall, Lu *et al.* 2005; Xiao, Klueber, Lu *et al.* 2005; Zhang, Cai, Klueber *et al.* 2005; Zhang, Cai, Klueber *et al.* 2006; Zhang, Klueber, Guo *et al.* 2006; Xiao, Klueber, Zhou *et al.* 2007; Choi, Li, Law *et al.* 2008; Murrell, Wetzig, Donnellan *et al.* 2008) e também já foram utilizadas em ensaios clínicos realizados em seres humanos (Feron, Perry, Cochrane *et al.* 2005; Mackay-Sim, Feron, Cochrane *et al.* 2008). Em todos esses estudos que foram referenciados, contudo, o método que foi utilizado para a recolha das células baseou-se na obtenção de uma quantidade mínima de tecido da mucosa olfactiva por meio de biopsia.

No caso particular das nossas investigações, o método pressupõe a recolha de uma quantidade de mucosa olfactiva que seja suficiente para preencher a solução de continuidade na medula espinal traumatizada. Em consequência, depois de investigada a anatomia cirúrgica e a distribuição da mucosa olfactiva nas fossas nasais, havia que conceber uma técnica cirúrgica, original, destinada a recolher a mucosa olfactiva das fossas nasais em quantidade suficiente para o propósito do presente estudo.

Este capítulo descreve a técnica cirúrgica utilizada para a colheita da mucosa olfactiva por via transnasal endoscópica.

### **3.2 OBJETIVOS**

Ilustrar, em modelo anatómico de cadáver, as referências anatómicas e a técnica cirúrgica utilizadas para a colheita de mucosa olfactiva por via transnasal endoscópica.

Descrever a colheita da mucosa olfactiva a partir da experiência dos casos cirúrgicos realizados.

### **3.3. MÉTODOS**

#### **3.3.1 Estudo em cadáver**

Este estudo prospectivo foi realizado no Serviço de Tanatologia (Patologia Forense) da Delegação de Lisboa do Instituto Nacional de Medicina Legal, após todas as formalidades e processo de selecção que já foram descritos num capítulo anterior desta tese.

As dissecções foram realizadas nos mesmos cadáveres e em tempo subsequente às dissecções realizadas no âmbito do estudo sobre a anatomia cirúrgica da região olfactiva. O instrumental cirúrgico utilizado foi descrito no Quadro 1.4.

Foram recolhidas as imagens mais significativas para ilustrar as referências anatómicas e a técnica cirúrgica da colheita de mucosa olfactiva por via transnasal endoscópica.

#### **3.3.2 Casos cirúrgicos**

As descrições e imagens da técnica cirúrgica apresentadas foram seleccionadas de entre a iconografia do estudo experimental que incluiu 27 doentes operados, e cujo desenho e resultados do estudo clínico experimental serão apresentados em capítulo subsequente da tese.

Inclui-se na descrição dos casos cirúrgicos todos os tempos da operação: primeiro tempo neurocirúrgico, tempo otorrinolaringológico e segundo tempo neurocirúrgico, de forma a tornar compreensível o método utilizado e justificar a cronologia dos procedimentos operatórios. Como é evidente, a descrição dos tempos neurocirúrgicos será breve e resumida.

O instrumental cirúrgico utilizado foi o já descrito anteriormente, à excepção do equipamento para registo de imagens em vídeo, que foi o indicado no Quadro 3.1.

### **Quadro 3.1** Instrumental cirúrgico para o registo de imagens em vídeo

---

Câmara digital de vídeo a cores de 1-chip sistema PAL: Karl Storz® TELEPAK Control Unit, Ref. 20212020

Cabeça de câmara de 1-chip sistema PAL com 2 botões programáveis: Karl Storz® TELECAM, Ref. 20212020

Fonte de luz fria de Xenon, de 300W: Karl Storz® Ref. 20133101-1

Cabo de fibra óptica de 4,8 mm de diâmetro e 180 cm de comprimento: Karl Storz® Ref. 495NB

Endoscópio de 0º de ângulo de visão largo, com 4mm de diâmetro e 18 cm de comprimento, Karl Storz® Ref. 7230 AWA

---

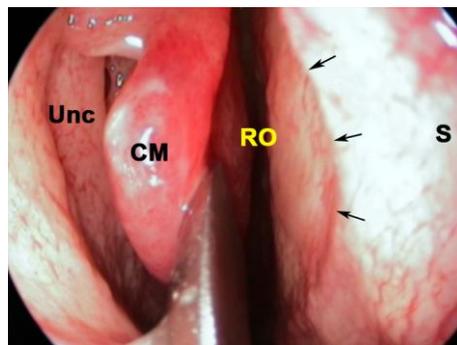
Os comentários, que serão relegados para a discussão, atenderão não apenas aos vários passos da técnica cirúrgica, o que já foi parcialmente realizado no estudo em cadáver, mas às ocorrências observadas nas operações, com ênfase nas sugestões e incidentes (*tips and pitfalls*) que foram recolhidos e anotados ao longo do período em que foram realizadas as operações.

## 3.4 RESULTADOS

### 3.4.1 Estudo em cadáver

No primeiro tempo da dissecação procedeu-se à selecção da fossa nasal a ser dissecada. A escolha baseou-se nas particularidades anatómicas de cada uma das fossas nasais, tal como descrito no primeiro capítulo desta dissertação. A permeabilidade dos segmentos da região B, região que inclui o espaço situado entre a abertura piriforme e a porção média das fossas nasais, avaliada endoscopicamente, foi o critério determinante para a escolha da fossa nasal a ser dissecada, por ser o que demonstrou ter implicação na visualização e no acesso à região olfactiva.

A fossa nasal escolhida nos cadáveres que servirão de exemplo a este capítulo foi a fossa nasal direita. Na figura (Figura 3.1) são observáveis as referências mais importantes da região, que incluem o bordo anterior do corneto médio, o lúmen da região olfactiva, o septo nasal e, na parede lateral da fossa nasal, o meato médio e a extremidade mais superior da porção vertical da apófise unciforme. Na parede medial da região olfactiva, observa-se uma linha de demarcação bastante nítida (setas) entre a mucosa respiratória, mais anterior, mais vascularizada e mais espessa, e a mucosa olfactiva, mais fina, pálida e amarelada.

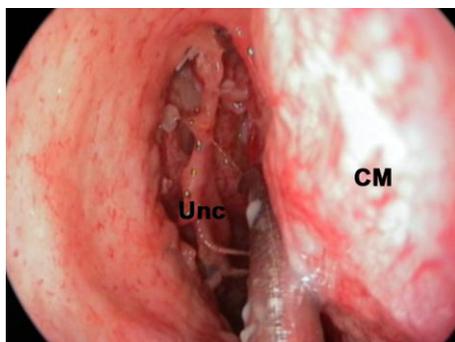


**Fig. 3.1** Imagem endoscópica da extremidade anterior da região olfactiva antes da sua dissecação cirúrgica (Unc=apófise unciforme; CM=corneto médio; RO=região olfactiva; S=septo nasal).

A coloração amarelada da mucosa olfactiva foi observada em muitos dos cadáveres estudados e dos indivíduos operados. Apesar de ser uma característica mencionada com frequência na literatura médica (Jones e Rog 1998), não tem uma explicação definitiva, e as hipóteses propostas incluíram os grânulos das glândulas de Bowman, os carotenóides da mucosa, os fosfolípidos ou os seus produtos de degradação ou os lisossomas presentes na porção basal das células de sustentação do neuroepitélio (Douek 1974).

O corneto médio foi lateralizado com a extremidade romba de um descolador de Freer, para melhorar a visualização da região olfactiva. As estruturas da região olfactiva situadas nas porções mais superior (lâmina crivosa) e posterior (corneto superior e ósteo esfenoidal) ainda não são visualizáveis nesta fase da dissecação.

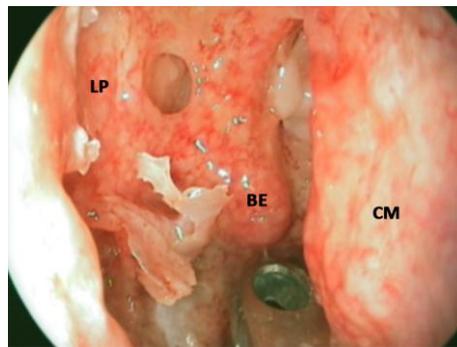
O alargamento cirúrgico mais completo da região olfactiva é necessário para permitir a visualização de todas as suas paredes e para a introdução dos instrumentos cirúrgicos. Esse alargamento é conseguido à custa do afastamento lateral do corneto médio e do corneto superior. Para o realizar, o suporte estrutural dos cornetos na parede lateral tem de ser diminuído, realizando-se uma etmoidectomia. Na Figura 3.2 observa-se o meato médio. O corneto médio foi afastado medialmente com o descolador de Freer e fez-se uma incisão no limite anterior da porção vertical da apófise unciforme, antes de se remover esta estrutura.



**Fig. 3.2** Fase inicial da etmoidectomia: remoção da apófise unciforme (Unc=apófise unciforme; CM=corneto médio).

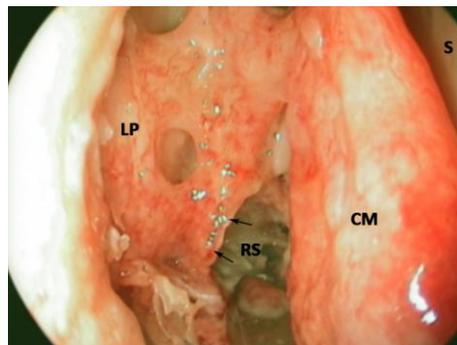
Depois de removida a apófise unciforme, as células etmoidais anteriores e posteriores são sucessivamente dissecadas até à exposição do tecto etmoidal, de acordo com a técnica clássica designada como “*díssecção anterior para posterior*”, e que inclui os seguintes os passos (Hosemann, Weber, Keerl *et al.* 2000):

1. A trepanação e remoção da bula etmoidal, iniciada na porção ínfero-medial e realizadas com a cânula de aspiração de Frazier, a cureta de antro oblonga e as pinças de Blakesley recta e de 45° (Figura 3.3).



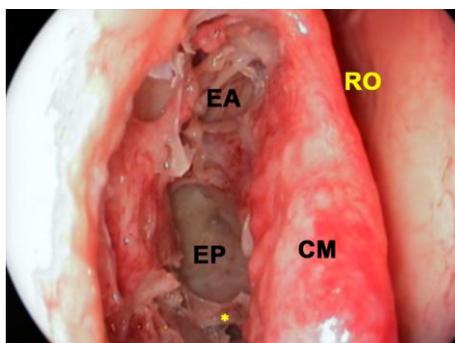
**Fig. 3.3** O próximo passo na etmoidectomia é a abertura da bula etmoidal, que deve ser sempre iniciada na sua porção medial e inferior (LP=lâmina papirácea; BE=bula etmoidal; CM=corneto médio).

2. A trepanação e remoção da raiz septante do corneto médio, iniciadas na porção ínfero-medial, realizadas com os mesmos instrumentos (Figura 3.4).



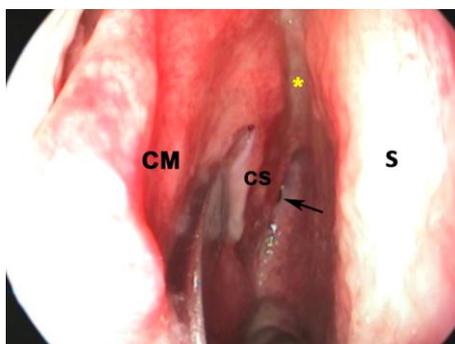
**Fig. 3.4** Não é necessária a remoção da totalidade da parede das células etmoidais, apenas a suficiente para facilitar a luxação do corneto médio e do corneto superior. A imagem mostra que uma parte substancial da raiz septante do corneto médio foi preservada (LP=lâmina papirácea; RS=raiz septante; CM=corneto médio).

3. A remoção das septações ósseas das células etmoidais posteriores até à visualização do tecto etmoidal correspondente (Figura 3.5).



**Fig. 3.5** Aspecto do etmóide anterior e posterior após a remoção das trabéculas ósseas que servem de suporte aos cornetos médio e superior. Evitou-se a remoção da mucosa das superfícies expostas para evitar aderências e estenose do meato médio no pós-operatório. A raiz horizontal do corneto foi preservada, para evitar a instabilidade final do corneto médio, que é habitualmente designado de corneto mole (*"floppy turbinate"*) (EA=etmóide anterior; EP=etmóide posterior; asterisco=raiz horizontal do corneto médio; CM=corneto médio; RO=região olfactiva).

Só após a criação, por meios cirúrgicos, de um espaço livre de septações ósseas no interior do etmóide, é possível a lateralização da parede lateral da região olfactiva (dos cornetos) com uma pressão mínima a ser exercida na sua superfície (Figura 3.6). A mucosa da superfície olfactiva dos cornetos não deve ser traumatizada para se evitarem aderências no pós-operatório.



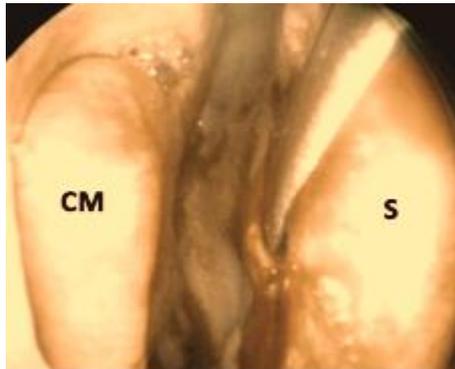
**Fig. 3.6** Aspecto da região olfactiva após a lateralização dos cornetos médio e superior. Todas as estruturas da região são observáveis. A mucosa dos cornetos não foi traumatizada quando da lateralização dos cornetos (CM= corneto médio; CS= corneto superior; asterisco=lâmina crivosa; seta=ósteo esfenoidal; S=septo nasal).

A mucosa olfactiva será colhida da porção mais superior e posterior da superfície medial da região, correspondente ao septo nasal. Os limites do retalho correspondente estarão incluídos na área de distribuição da mucosa olfactiva nas fossas nasais. Em termos gerais, esses limites devem respeitar anterior e posteriormente os limites da lâmina crivosa. Estes limites podem ser identificados a partir da observação dos nervos e dos orifícios do osso na base do crânio, o que é possível comprovar cirurgicamente. O limite inferior deve ser respeitar o plano do ósteo esfenoidal, uma vez que este está situado a uma distância previsível da base do crânio:  $10,3 \pm 4,3$  mm (Kim, Kim, Kang *et al.* 2001). A área compreendida nessa distância na superfície do septo nasal, de acordo com os nossos estudos realizados previamente, é constituída por mucosa olfactiva.

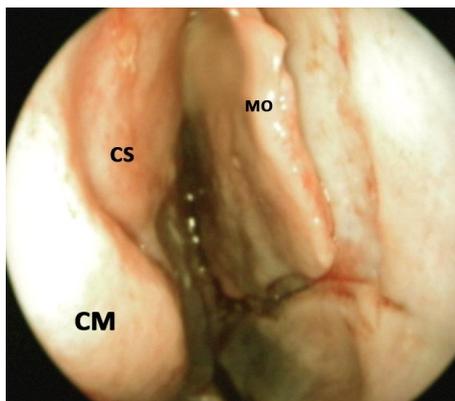
A primeira incisão a ser realizada para a constituição do retalho de mucosa olfactiva a ser colhida é a incisão inferior. Desta forma, o sangramento resultante não prejudica a visualização das outras incisões e do retalho. A incisão é realizada com canivete e lâmina nº 15, e inicia-se na porção mais posterior do septo, junto ao rebordo inferior do ósteo esfenoidal. A incisão deve ser completa em profundidade até ao osso, e dirigir-se para diante, paralelamente à base do crânio (lâmina crivosa) terminando num ponto ligeiramente posterior ao limite (bordo anterior) do corneto médio, um pouco atrás do tubérculo do septo nasal. A segunda incisão a ser realizada é a incisão anterior. Esta é vertical, é realizada com a extremidade cortante do descolador de Freer-Joseph, unindo a base do crânio à extremidade anterior da incisão inferior (Figura 3.7 e 3.8).

Após a realização das incisões inferior e anterior, procede-se à elevação do retalho no plano submucoperiósteo, em direcção aos limites superior e posterior. O descolamento do retalho é realizado com a extremidade cortante ou semi-cortante do descolador de Freer-Joseph ou com uma das cânulas Fujita com controlo digital da aspiração. A cânula de aspiração Fujita, instrumento habitualmente utilizado em neurocirurgia, permite, graças ao controle digital progressivo da intensidade da aspiração, uma dissecação atraumática e exangue sem aspirar o retalho, o que acontece geralmente

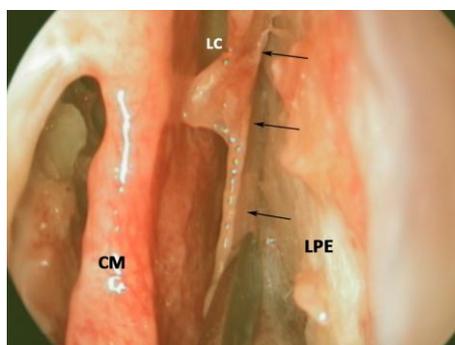
com as outras cânulas de aspiração. O descolamento é realizado da porção anterior para a posterior e da inferior para a superior (Figura 3.9).



**Fig. 3.7** O descolador de Freer-Joseph é útil para a realização da incisão anterior, pois a sua curva permite ultrapassar a dificuldade constituída pelo tubérculo do septo (CM=corneto médio; S=septo nasal, na região do tubérculo).

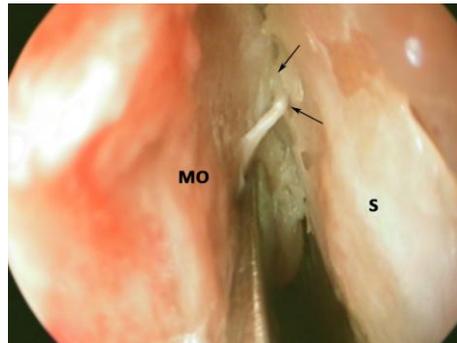


**Fig. 3.8** Aspecto do delineamento inicial do retalho da mucosa olfactiva, após a realização das incisões inferior e anterior (CM=corneto médio; CS=corneto superior; MO=mucosa olfactiva).

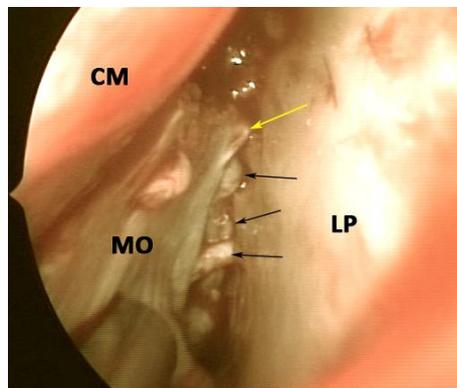


**Fig. 3.9** Aspecto da elevação inicial do retalho da mucosa olfactiva, após a realização das incisões inferior e anterior (CM=corneto médio; LC=lâmina crivosa; LPE=lâmina perpendicular do etmóide; setas=retalho constituído pela mucosa olfactiva).

À medida que o descolamento da mucosa olfactiva progride superior e posteriormente em direcção à lâmina crivosa, os nervos olfactivos de maior calibre tornam-se visíveis. Inicialmente vêem-se alguns nervos isolados (Figura 3.10) e quando a lâmina crivosa é alcançada podem observar-se todos os nervos provenientes da superfície septal da mucosa olfactiva a atravessar os orifícios contíguos da base do crânio (Figura 3.11).

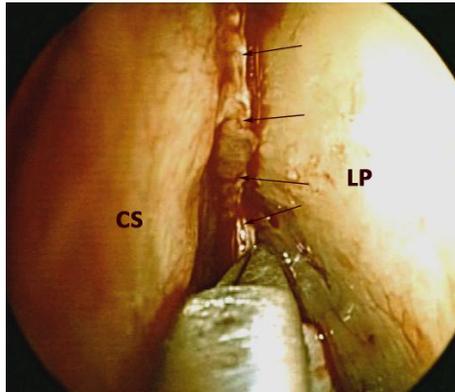


**Fig. 3.10** Na porção média do retalho já é possível a observação de nervos olfactivos com uma orientação vertical e que provêm da porção mais inferior da mucosa olfactiva (MO=mucosa olfactiva; S=septo nasal; setas=nervo olfactivo).



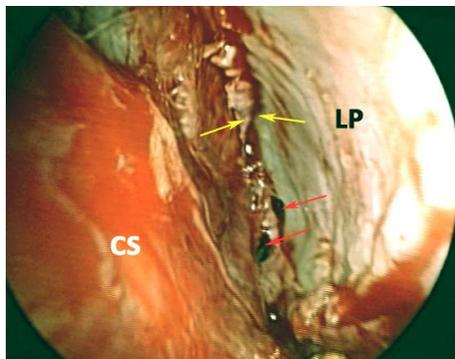
**Fig. 3.11** Na porção superior do retalho observam-se os vários nervos e os orifícios da lâmina crivosa. Repare-se que alguns nervos emergem da espessura da mucosa numa zona mais próxima da lâmina crivosa, porque incluem os axónios das células bipolares da porção mais superior da região olfactiva, enquanto outros nervos têm um trajecto maior longo na superfície mais profunda da mucosa, porque incluem os axónios das células bipolares situadas mais inferiormente (CM=corneto médio; MO=mucosa olfactiva; LP=lâmina perpendicular de etmóide; setas=nervos olfactivos na lâmina crivosa)

Depois do descolamento da mucosa olfactiva até à lâmina crivosa, o limite superior do retalho é seccionado com uma tesoura de hipofisectomia. (Figura 3.12).



**Fig. 3.12** O limite superior do retalho da mucosa olfactiva é seccionado junto à lâmina crivosa, desde a porção mais anterior até à porção mais posterior do retalho. É necessário cortar a mucosa cortando e desprendendo todos os nervos que a acompanham (CS=corneto superior; MO=mucosa olfactiva; LP=lâmina perpendicular de etmóide; setas=incisão superior da mucosa olfactiva, junto à lâmina crivosa)

Por último, o limite posterior da incisão superior é unido ao limite posterior da incisão inferior, este último localizado na vizinhança do ósteo esfenoidal (Figura 3.13).



**Fig. 3.13** O limite posterior do retalho é determinado unindo-se o ponto correspondente à entrada do nervo olfactivo mais posterior na lâmina crivosa, por um lado, e o limite posterior da incisão inferior junto do ósteo esfenoidal, por outro lado (LP=lâmina perpendicular de etmóide; CS=corneto superior; setas amarelas=a da esquerda aponta o nervo olfactivo de localização mais posterior, a da direita aponta o sulco do trajecto do nervo no osso do septo nasal; setas vermelhas=a da esquerda aponta o ósteo na sua posição anatómica normal, a da direita aponta o rebordo ósseo observável depois do descolamento da mucosa, entre os 2 observa-se uma fina tira de mucosa que não foi removida, para evitar a contaminação do retalho por mucosa do tipo respiratório)

### 3.4.2 Técnica cirúrgica passo a passo

#### 3.4.2.1 Preparação geral da operação

A operação é realizada sob anestesia geral e entubação endo-traqueal. O doente é deitado sobre o lado esquerdo em posição de banco de jardim com a cabeça rodada para a direita e fixada à marquesa com apoio de *Mayfield* e *pins* (Figura 3.14). O posicionamento destina-se a permitir o acesso neurocirúrgico à medula cervical ou torácica e o acesso às fossas nasais no mesmo tempo operatório, apenas com ajustes obtidos pelo apoio de Myfield e pela inclinação vertical (anti-Tredelenbourg) ou lateral da marquesa. Ao contrário do que é o habitual nas cirurgias endoscópicas nasais, o acesso otorrinolaringológico é realizado pelo lado esquerdo do doente (Figura 3.15 a e b).



**Fig. 3.14** Posicionamento de um doente com uma lesão na coluna torácica. A posição da lesão medular foi marcada na pele com um adesivo. O apoio de Mayfield estabiliza a cabeça e o pescoço, protegendo o doente de tracções ou movimentos disruptivos.

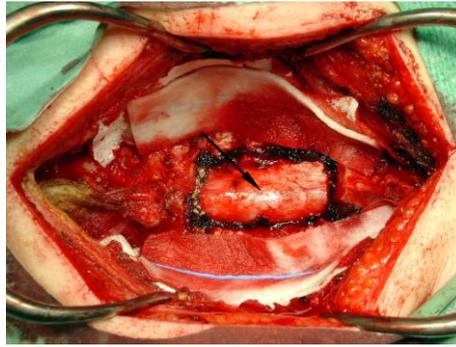
Após a anestesia geral e o posicionamento, a operação é constituída por três tempos operatórios distintos. O primeiro e o terceiro tempos operatórios serão descritos com mais brevidade, uma vez que são tempos neurocirúrgicos.



**Fig. 3.15** A equipa de otorrinolaringologia aborda as fossas nasais pelo lado esquerdo do doente (na imagem b observa-se o aspecto depois da colocação dos campos operatórios).

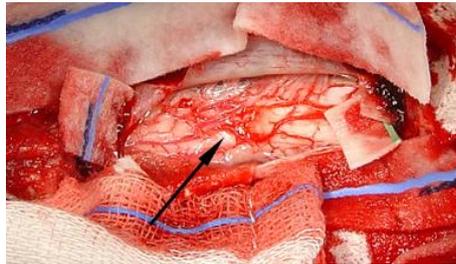
#### **3.4.2.2 Primeiro tempo operatório. Tempo neurocirúrgico de exposição e preparação da medula espinal**

No primeiro tempo, expõe-se a lesão da medula espinal e prepara-se o local para a colocação do transplante de mucosa olfactiva. Inicia-se com uma incisão cutânea coincidente com o nível da lesão medular. Os músculos são depois seccionados na linha média até à exposição das vértebras. Após a laminectomia posterior (remoção da lâmina posterior das vértebras) e a hemostase dos planos mais superficiais e do osso, a dura mater do canal medular é exposta, no nível correspondente ao do traumatismo medular prévio (Figura 3.16).



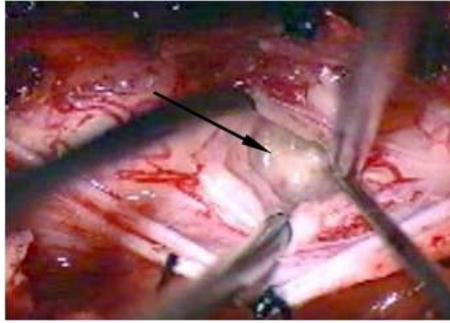
**Fig. 3.16** Pormenor da exposição da dura mater do canal medular no nível da lesão, após dissecação das partes moles e laminectomia (seta=dura mater).

O passo seguinte da exposição é a abertura da dura-máter e da aracnóide, que permite a visualização da medula. O local da lesão é habitualmente indicado pelo aspecto irregular dos vasos superficiais e por uma depressão na superfície posterior da medula (Figura 3.17).



**Fig. 3.17** Pormenor da exposição da medula após a abertura e afastamento das meninges. A seta indica o local da lesão.

Finalmente, há que expor o interior da medula espinal. Para tal realiza-se uma mielotomia posterior mediana. As lesões da medula cervical geralmente são constituídas por uma cavidade resultante da necrose pós-traumática do tecido nervoso e as lesões da medula torácica são geralmente constituídas por tecido cicatricial denso, mas aspectos mistos podem ser encontrados (Figura 3.18).



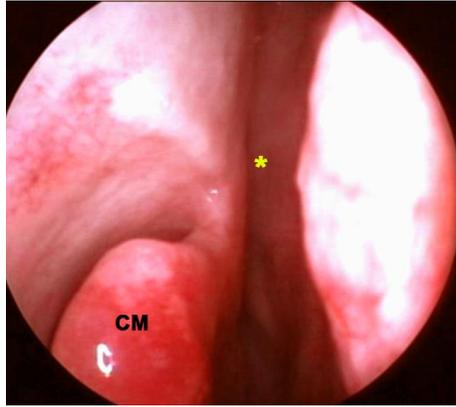
**Fig. 3.18** A dura mater foi aberta na linha mediana e está afastada por suturas, expondo a face posterior da medula espinal. A lesão, neste caso específico, era constituída por uma cavidade envolvida por algum tecido cicatricial.

O tecido fibroso e cicatricial deve ser removido cuidadosamente até se expor tecido nervoso normal nos topos proximal e distal da lesão medular. No final deste passo, que conclui o primeiro tempo neurocirúrgico do procedimento, faz-se o encerramento provisório da ferida operatória.

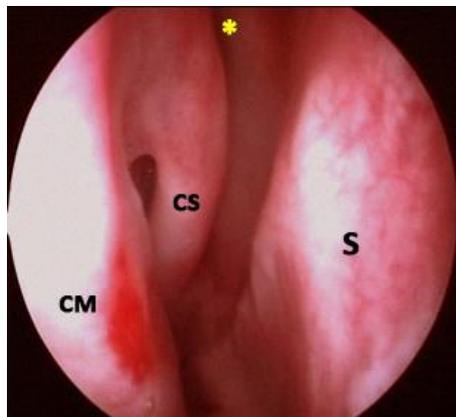
#### **3.4.2.3 Tempo otorrinolaringológico: colheita de mucosa olfactiva por via transnasal endoscópica**

Após o posicionamento e a desinfecção, é feita a vasoconstricção e a retracção da mucosa nasal com *patties* cirúrgicos de polivinil-acetato com 1,3 X 7,6 cm (Medtronic® 300506) embebidos em cloridrato de fenilefrina a 0,5% ou cloridrato de oximetazolina a 0,05%. O vasoconstritor é mantido nas fossas nasais durante 10 minutos.

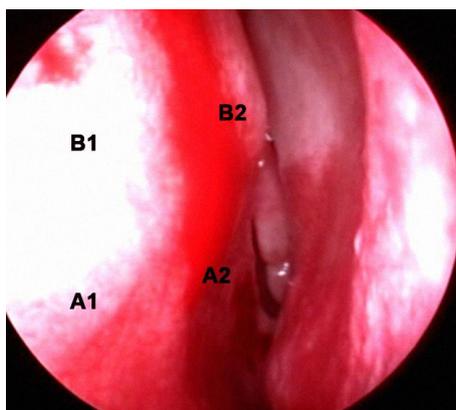
A escolha da fossa nasal na qual se procede à colheita da mucosa olfactiva, em cada caso, baseia-se na avaliação da anatomia individual. No pré-operatório, a rinoscopia anterior, a endoscopia nasal e a tomografia computadorizada, dão uma indicação do lado mais favorável, particularmente se houver uma assimetria evidente entre as fossas nasais. Em alguns casos a decisão é intra-operatória. No caso concreto com que ilustramos esta operação, a fossa nasal mais ampla e a região olfactiva mais visualizável eram as do lado direito (Figuras 3.19, 3.20 e 3.21).



**Fig. 3.19** A visualização endoscópica da porção mais anterior da região olfactiva na fossa nasal direita era praticamente completa (CM=corneto médio; asterisco=lâmina crivosa).

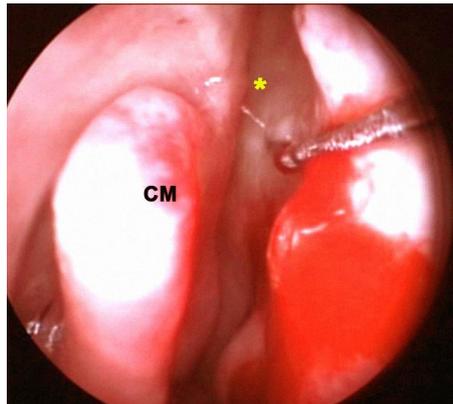


**Fig. 3.20** A porção posterior da região olfactiva direita era igualmente ampla. Apesar disso, como se observa habitualmente, o corneto superior não permitia a visualização do ósteo esfenoidal. (CM=corneto médio; CS=corneto superior; S=septo nasal; asterisco=lâmina crivosa).



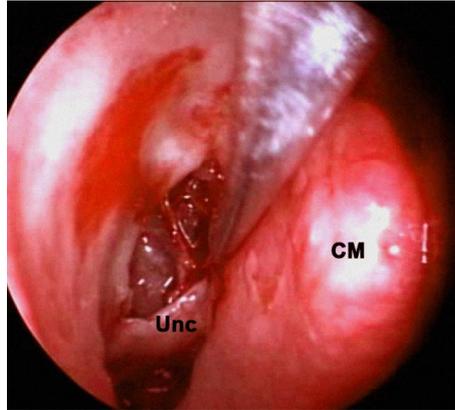
**Fig. 3.21** A fossa nasal esquerda, pelo contrário, não permitia a visualização da região olfactiva devido a um desvio sinistro-convexo do septo nasal nos segmentos A1, A2, B1 e B2 (modelo segmentar).

Após a inspecção cuidadosa das fossas nasais e a escolha do lado mais favorável para a colheita, é feita uma segunda vasoconstrição, por infiltração. Utiliza-se a lidocaína a 1% com adrenalina a 1:80.000. A infiltração inclui a apófise unciforme, a raiz do corneto médio e toda a porção do septo nasal localizada na região olfactiva. Utilizam-se habitualmente cerca de 4 cc desta solução (Figura 3.22).

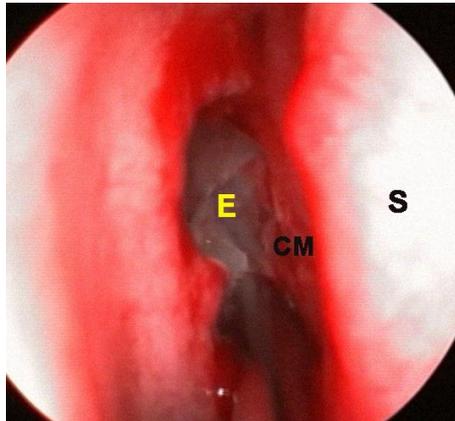


**Fig. 3.22** Deve injectar-se a solução de anestésico com vasoconstritor lentamente, para que o mesmo se difunda de forma uniforme e homogénea, o que se comprova pela coloração branca da mucosa que se segue à infiltração (CM=corneto médio; asterisco=lâmina crivosa).

Para visualizar toda a região olfactiva e obter exposição suficiente para a realização da técnica cirúrgica, é necessário lateralizar-se os cornetos médio e superior, alargando a região. A técnica e o seu racional foram descritos previamente. Inicia-se por uma etmoidectomia parcial, que diminui o suporte estrutural dos cornetos na parede lateral e permite ganhar espaço para acomodar estas estruturas, depois de lateralizadas (Figuras 3.23 e 3.24).

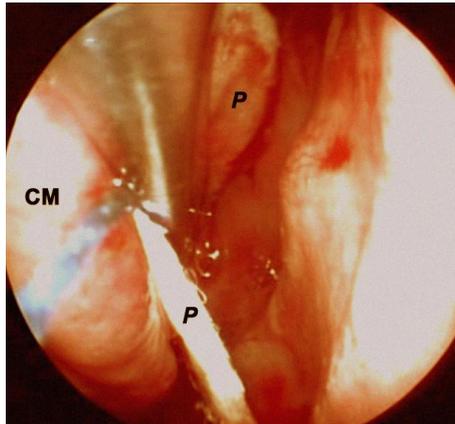


**Fig. 3.23** A etmoidectomia não se destina a excisar tecidos mas sim a diminuir o suporte dos cornetos médio e superior na parede lateral da fossa nasal, podendo ser realizada de forma simples com um descolador de Freer de ponta romba. Deve evitar-se a dissecação “cega”, assim como todo o traumatismo desnecessário sobre a mucosa. (CM=corneto médio; Unc=apófise unciforme).



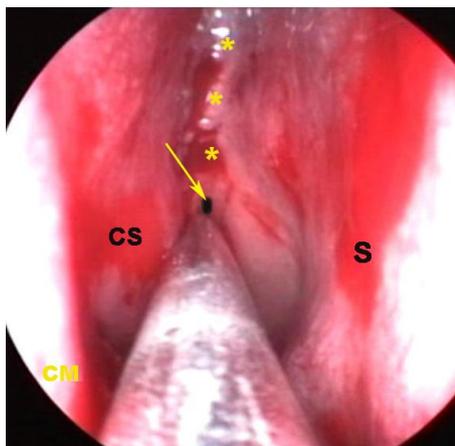
**Fig. 3.24** No final da etmoidectomia a cavidade etmoidal deve ter o volume suficiente para acomodar os cornetos médio e superior quando se proceder à sua luxação lateral (S=septo nasal; CM=corneto médio; E=cavidade etmoidal).

A lateralização dos cornetos é realizada fazendo uma pressão moderada com um descolador de Freer de ponta romba sobre a mucosa da sua face medial, que deve ser previamente protegida por um *pattie* cirúrgico (Figura 3.25).



**Fig. 3.25** Na lateralização do corneto médio, o instrumento deve apoiar-se num *pattie* cirúrgico para evitar o traumatismo da mucosa e o sangramento (CM=corneto médio; P=*pattie* cirúrgico).

Após este passo, obtêm-se uma exposição completa da região olfactiva que inclui a visualização do ósteo do seio esfenoidal, e que é suficiente para a realização da técnica cirúrgica (Figura 3.26).

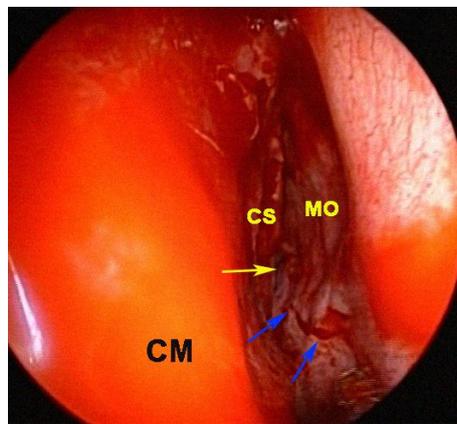


**Fig. 3.26** A lateralização atraumática dos cornetos médio e superior permite uma exposição correcta da região olfactiva (CM=corneto médio; CS= corneto superior; asteriscos=lâmina crivosa; seta=ósteo esfenoidal).

Após a exposição, procede-se à colheita da mucosa olfactiva. Ela é realizada na superfície do septo nasal, por meio de um retalho quadrangular com os seguintes limites: 1) superiormente, a lâmina crivosa; 2) inferiormente, uma linha horizontal paralela à base do crânio ao nível do limite inferior do ósteo esfenoidal; 3) anteriormente, uma linha vertical

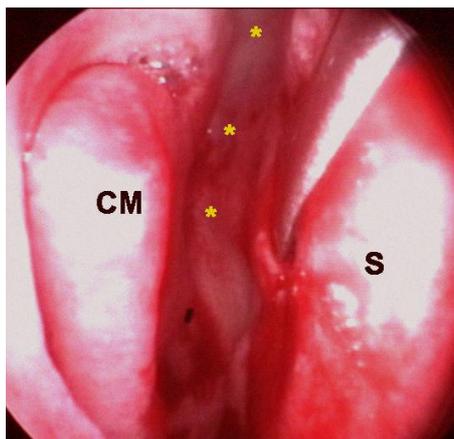
paralela ao bordo anterior do corneto médio; e 4) posteriormente, a parede anterior do seio esfenoidal.

Começa-se pela incisão inferior. Realizando-a de trás para a frente, desde o ósteo esfenoidal até ao limite anterior do retalho, o sangramento da mucosa não dificulta a sua visualização nem a visualização das incisões subsequentes. Utiliza-se o canivete cirúrgico com lâmina nº 15. A incisão deve ser franca até ao osso, que nesta localização é resistente e tolera a pressão da lâmina sem fracturar (Figura 3.27). Pode ser completada na porção mais anterior, se necessário, com uma tesoura de Joseph, recta ou curva.



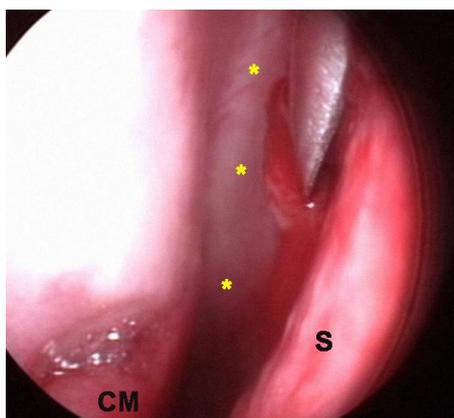
**Fig. 3.27** A incisão inferior é a primeira incisão a ser realizada (CM=corneto médio; CS= corneto superior; MO=mucosa olfactiva; seta amarela=ósteo esfenoidal; setas azuis: incisão).

A segunda incisão a ser realizada é a incisão anterior, que é executada em dois passos distintos. Em ambos se utiliza a ponta cortante do descolador de Freer-Joseph. No primeiro passo faz-se a metade inferior da incisão, aplicando verticalmente a superfície cortante do instrumento contra a mucosa, como uma lâmina, em gestos repetidos, até se sentir a superfície dura do osso. Nesta zona a lâmina perpendicular do etmóide é muito fina, podendo fracturar (Figura 3.28).



**Fig. 3.28** A incisão anterior é iniciada na porção mais próxima da incisão inferior. O tubérculo do septo prejudica muitas vezes a visualização da mucosa olfactiva nesta região, pelo que a curvatura ligeira e o bordo cortante do descolador de Freer-Joseph são úteis para evitar uma incisão desnivelada, como a que seria produzida por uma lâmina 15 ou outro instrumento cortante recto (CM=corneto médio; S=septo nasal; asteriscos=lâmina crivosa).

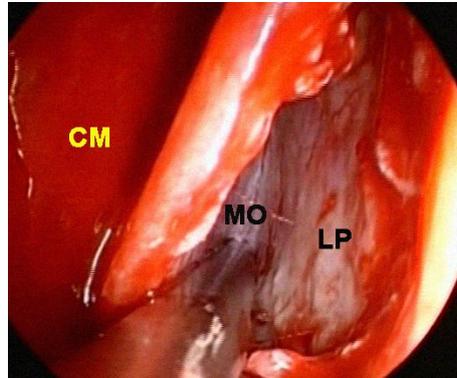
No segundo passo cria-se a metade superior da incisão, que se inicia na base do crânio, na extremidade anterior da lâmina crivosa. Nesta zona o osso é duro e é fácil realizar a incisão (Figura 3.29). O gesto mais difícil é a união da metade superior com a metade inferior da incisão, pois esta região fica parcialmente oculta pela porção mais superior do tubérculo do septo.



**Fig. 3.29** A incisão anterior do retalho da mucosa olfactiva é completada na parte superior, junto à base do crânio (CM=corneto médio; S=septo nasal; asteriscos=lâmina crivosa).

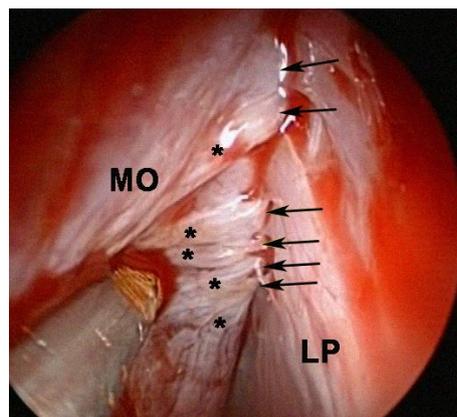
Criadas as incisões anterior e inferior, é possível elevar o retalho da mucosa olfactiva em toda a extensão, utilizando a extremidade cortante ou a semi-

cortante do descolador de Freer-Joseph e uma cânula de aspiração de Fujita, com orifício de interrupção (Figura 3.30).



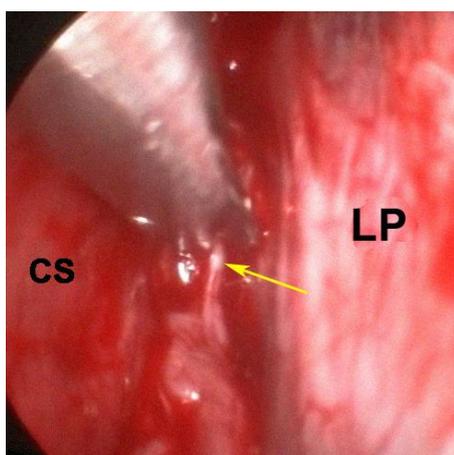
**Fig. 3.30** Aspecto da elevação da mucosa olfactiva, depois da realização das incisões inferior e anterior. O instrumento utilizado nesta imagem foi o descolador de Freer-Joseph com extremidade semi-cortante (CM=corneto médio; MO=mucosa olfactiva; LP=lâmina perpendicular do etmóide).

Na porção mais superior do retalho observam-se os nervos olfactivos na camada mais profunda da mucosa. Os nervos dirigem-se para cima em direcção à lâmina crivosa e escavam pequenas goteiras paralelas, de direcção vertical, na extremidade superior da lâmina perpendicular do etmóide (Figura 3.31).

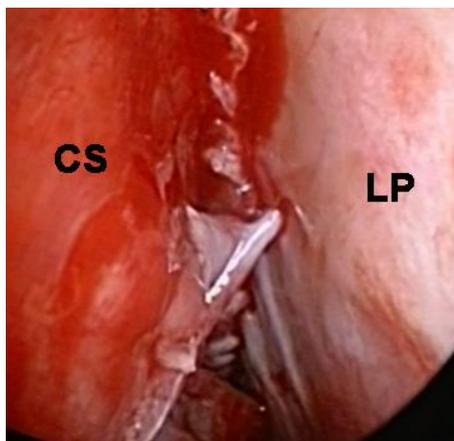


**Fig. 3.31** Na extremidade superior do retalho, observam-se os nervos que resultam da reunião dos fascículos da lâmina própria da mucosa olfactiva a dirigirem-se para os orifícios da lâmina crivosa (MO=mucosa olfactiva; LP=lâmina perpendicular do etmóide; asteriscos=fascículos nervosos olfactivos; setas=nervos olfactivos).

No final do descolamento subperiosteal, há que proceder à separação final do retalho das suas inserções superior e posterior. A inserção superior, no limite da lâmina crivosa, é seccionada de anterior para posterior. São utilizadas tesouras de hipofisectomia, recta ou curvas, de acordo com a anatomia e a direcção do corte. A tesoura secciona em simultâneo a mucosa e os nervos que a acompanham, antes destes últimos entrarem nos orifícios da lâmina crivosa (Figura 3.32 e 3.33).



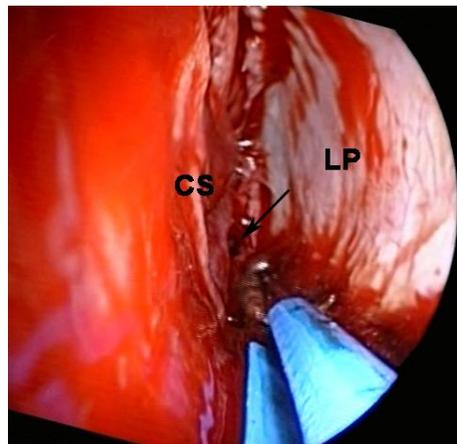
**Fig. 3.32** Tesouras de hipofisectomia são utilizadas para a realização da incisão e da libertação superior do retalho (CS=corneto superior; LP=lâmina perpendicular do etmóide).



**Fig. 3.33** Alguns nervos olfactivos entram em orifícios situados na lâmina perpendicular do etmóide alguns milímetros abaixo da lâmina crivosa, apresentando depois um trajecto ascendente em direcção à cavidade craniana num canal ósseo constituído na espessura do osso. Estes achados, que já foram apresentados e comentados no capítulo anterior desta tese, nunca foram anteriormente descritos na literatura médica (CS=corneto superior; LP=lâmina perpendicular do etmóide).

A secção da inserção posterior do retalho é realizada unindo o limite posterior da incisão superior (junto ao limite posterior da lâmina crivosa) com o limite posterior da incisão inferior (junto ao limite inferior do ósteo esfenoidal), utilizando as mesmas tesouras de hipofisectomia. Este passo completa o delineamento do retalho, que, depois de removido, deixa uma área cruenta na superfície septal da região olfactiva.

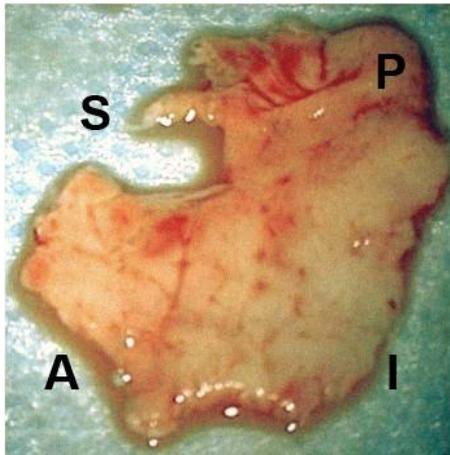
Este tempo operatório finaliza-se com a hemostase dos bordos da ferida (Figura 3.34) e a colocação de Surgicel® ou Spongostan® na região olfactiva, seguido do reposicionamento dos cornetos e do tamponamento da metade inferior da fossa nasal com Merocel®. Esse tamponamento permanece no local 24 a 48 horas.



**Fig. 3.34** A remoção do retalho deixa uma área cruenta na face medial da região olfactiva. A parte mais importante da conclusão do procedimento nasal é a hemostase, que tem que ser particularmente cuidadosa e sistemática na porção posterior e inferior da ferida mucosa, devido aos ramos septais posteriores da artéria esfenopalatina. Para o efeito utiliza-se uma pinça de coagulação bipolar em baioneta (CS=corneto superior; LP=lâmina perpendicular do etmóide).

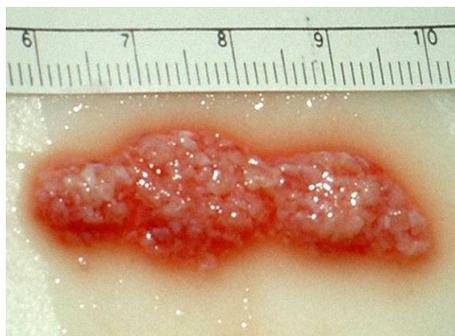
#### **3.4.2.4 Segundo tempo neurocirúrgico: preparação e transplantação da mucosa olfactiva**

Este último tempo operatório é neurocirúrgico, correspondendo à preparação e colocação do transplante, que deverá preencher a cavidade na zona lesada da medula espinal. Este tempo inicia-se com a remoção da mucosa olfactiva do meio estéril onde esteve colocado alguns minutos desde a sua remoção da fossa nasal (Figura 3.35).



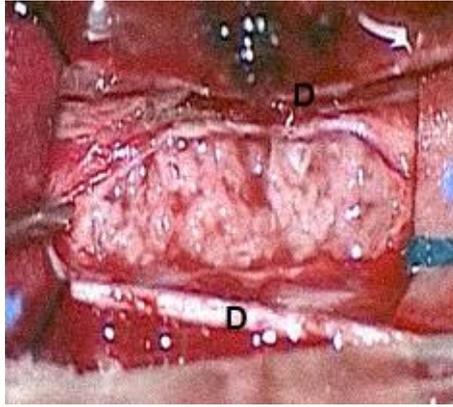
**Fig. 3.35** Aspecto da mucosa olfactiva que irá ser transplantada para o local da lesão medular (S=limite superior; A=limite anterior; P=limite posterior; I=limite inferior).

O passo seguinte consiste na colocação da mucosa olfactiva sobre uma superfície dura, e a sua divisão em pequenos fragmentos de cerca de 1mm. A preparação do tecido é realizada sob visualização do microscópio cirúrgico, sempre em meio estéril (Figura 3.36).

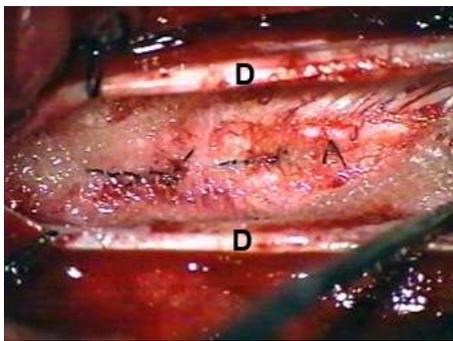


**Fig. 3.36** Aspecto da mucosa olfactiva depois da sua preparação.

Uma vez preparado o enxerto, o mesmo é incluído na cavidade da lesão medular (Figura 3.37). Procede-se de seguida ao encerramento, por planos, iniciando-se pela sutura da incisão da medula espinal (Figura 3.38). Segue-se a sutura ou reconstrução da dura mater (Figura 3.39) e finalmente a sutura dos planos musculares e da pele.



**Fig. 3.37** Aspecto da lesão medular preenchida pelo enxerto (D=dura máter).



**Fig. 3.38** Aspecto da medula espinal suturada (D=dura máter).



**Fig. 3.39** Aspecto final do encerramento da dura-máter.

No final da operação é colocada uma drenagem lombar (que permanecerá 48 horas), o doente é acordado, segue para a unidade de cuidados intensivos cirúrgicos onde permanece 24 horas, e depois é transferido para a enfermaria onde fica até à alta hospitalar, cerca de 1 semana depois da operação.

## 3.5 DISCUSSÃO

### 3.5.1 Resumo geral dos resultados

Os estudos anatómicos realizados permitiram conceber, aperfeiçoar e descrever os vários passos de uma técnica cirúrgica destinada a colher mucosa olfactiva para ser utilizada em medicina regenerativa.

As operações realizadas no decurso do estudo experimental, executadas de acordo com a técnica previamente planeada, validaram os estudos realizados e afirmaram a colheita de mucosa olfactiva por via transnasal endoscópica como uma técnica cirúrgica válida e adequada aos seus objectivos: a obtenção de mucosa olfactiva para ser utilizada em medicina regenerativa.

### 1.5.2 Limitações do estudo

As técnicas cirúrgicas originais, para demonstrarem a sua validade, além de terem um racional bem fundamentado, devem ser exequíveis e reproduzíveis, caso contrário, poderão ser rejeitadas por apresentarem dificuldades ou complicações que não foram descritas ou antecipadas.

Por essa razão, entendeu-se importante descrever algumas das ocorrências verificadas no decorrer das operações, que possam constituir uma dificuldade na sua execução prática. Da mesma forma, também foram acrescentadas algumas indicações consideradas úteis para ultrapassar obstáculos observados ou para facilitar a execução dos diferentes passos da técnica.

O formato escolhido para a enumeração destes aspectos foi o que já foi utilizado em livros de técnicas cirúrgicas otorrinolaringológicas: a enumeração de tópicos que foram designados como “sugestões e incidentes” (“*Tips ans Pitfalls*”) (Fisch e Mattox 1988; Fisch e May 1994; Sanna, Saleh, Russo *et al.* 1995; Sanna, Sunose, Mancini *et al.* 2003):

### **Sugestões e incidentes (Tips and Pitfalls):**

- O tempo otorrinolaringológico da operação é realizado depois da exposição da lesão medular, para que o intervalo entre a colheita e a transplantação seja mínimo. Assim, procura-se evitar a possível diminuição da viabilidade das células que são importantes para a regeneração do tecido nervoso.
- Nos doentes com lesões da medula espinal na coluna torácica, a rotação da cabeça necessária à abordagem nasal é realizada logo no início da operação, pois não prejudica o alinhamento das vértebras torácicas. Nos doentes com lesões da medula espinal na coluna cervical é necessário fazer a rotação da cabeça no início e desfazê-la no fim do tempo otorrinolaringológico para que as vértebras cervicais estejam alinhadas durante os tempos neurocirúrgicos.
- A abordagem endoscópica das fossas nasais pelo lado esquerdo do doente não levanta problemas de orientação anatómica ou de instrumentação, uma vez que as referências cirúrgicas se mantêm as mesmas. Requer apenas algum treino do cirurgião para se adaptar à posição diferente em que se encontra relativamente ao doente e ao campo operatório.
- Todos os doentes são submetidos a um exame microbiológico do vestíbulo nasal no pré-operatório e no intra-operatório, ajustando-se a antibioterapia nos casos em que haja uma colonização bacteriana.
- A vasoconstrição adequada da mucosa é importante numa região anatomicamente estreita e onde a visualização completa de todos os detalhes anatómicos é importante para evitar complicações potencialmente graves. Observámos menos efeitos adversos cardiovasculares com a oximetazolina do que com a fenilefrina.
- Alguns doentes com hemorragia mais abundante da mucosa consumiam produtos de medicina herbal que são reconhecidos como potencialmente hemorrágicos, tais como o sumo de toranja, o extracto de *ginko biloba*, o *ginseng*, o gengibre e o alho (Ang-Lee, Moss e

Yuan 2001; Pribitkin e Boger 2001; Hodges e Kam 2002). A partir desta constatação, passou a questionar-se todos os doentes acerca da ingestão destes produtos que podem ser obtidos sem prescrição médica.

- Deve evitar-se a infiltração da mucosa do tubérculo do septo, que está situado adiante da região olfactiva. O tubérculo do septo é um espessamento natural do septo nasal na zona da articulação condro-etmoidal. A mucosa que o reveste, do tipo respiratório, é particularmente espessa. Se infiltrada, o seu volume aumenta muito dificultando a visualização e o acesso à região olfactiva.
- A etmoidectomia realizada para lateralizar o corneto médio deve ser conservadora, podendo em alguns casos limitar-se à fractura das septações ósseas de algumas células etmoidais anteriores e posteriores usando uma cureta ou descolador de Freer.
- A lateralização do corneto médio deve ser realizada em bloco e não por partes, começando pela porção mais anterior e progredindo para a mais posterior. Esta última técnica, que já foi proposta por alguns cirurgiões para ganhar espaço no acesso endoscópico ao seio esfenoidal e à sela turca por técnica transnasal endoscópica (Shahinian, Kabil, Jarrahy *et al.* 2008), fractura desnecessariamente a superfície do corneto em várias regiões e facilita o fenómeno designado de corneto mole (“*floppy turbinate*”) (Thornton 1996; Friedman, Landsberg e Tanyeri 2000). O corneto mole não se mantém estável durante a operação prejudicando a visibilidade e facilita a constituição de aderências no pós-operatório.
- Quase sempre é necessária também a lateralização do corneto superior, para que se visualizem os limites posteriores da região e o ósteo esfenoidal. Da mesma forma que para o corneto médio, o corneto superior é lateralizado com a ponta romba de um descolador de Freer, protegido com um *pattie* cirúrgico.
- A introdução do canivete com a lâmina nº 15 até à porção mais posterior da fossa nasal (recesso eseno-etmoidal) não é difícil,

desde que a lâmina esteja sempre a ser visualizada pelo endoscópio e seja mantida numa posição vertical, para evitar lacerações na mucosa e sangramento.

- Nem sempre existe espaço suficiente na fossa nasal para completar a incisão inferior do retalho com a lâmina nº 15. Nesses casos, pode utilizar-se a faca em foice ponteaguda para concluir esse passo do procedimento.
- O limite posterior da incisão inferior pode dar lugar a hemorragia proveniente dos ramos arteriais septais da artéria eseno-palatina. Essa hemorragia deve ser controlada pela pressão exercida por um *pattie* embebido num vasoconstritor. Não se deve nesta fase utilizar a coagulação mono ou bipolar, para não comprometer a viabilidade da mucosa olfactiva e dos seus componentes celulares.
- Deve-se tentar que a incisão anterior da mucosa olfactiva seja perpendicular à superfície da mucosa, pois quanto mais oblíqua, maior a superfície de mucosa incisionada e o conseqüente hemorragia.
- No limite superior da incisão anterior do retalho, com frequência é seccionado um pequeno vaso arterial que sangra abundantemente, prejudicando a visualização e a continuação da operação. A hemorragia é controlada facilmente pela aplicação de um pequeno fragmento de Surgicel®, que não deve contudo contactar com o retalho de mucosa olfactiva, para não diminuir a sua viabilidade.
- A lâmina perpendicular do etmóide é muito variável na sua espessura e resistência, pelo que a incisão anterior e a elevação do retalho pelo plano submucoperiosteal devem ser muito cuidadosas, para evitar uma laceração transfixiva e a fractura desta estrutura óssea.
- O descolamento submucoperiosteal do retalho (criação de um “túnel”) é o passo mais fácil do procedimento, devido à superfície lisa do osso e à resistência do periósteo da lâmina própria da mucosa olfactiva. A utilização de cânulas de aspiração com controlo digital é imprescindível para evitar a aspiração do retalho.

- Junto à lâmina crivosa, o descolamento do retalho pode ser prejudicado pelos nervos olfactivos que apresentam algumas aderências à lâmina perpendicular do etmóide nesta localização. Alguns nervos entram mesmo em orifícios da lâmina perpendicular do etmóide situados a vários milímetros da lâmina crivosa, caminhando num canal ósseo que atravessa verticalmente o septo nasal ósseo antes de alcançar a base do crânio.
- Para se controlar a posição exacta da base do crânio e a distância à lâmina crivosa deve palpar-se a lâmina crivosa com um descolador de Freer rombo, sob visualização directa, com o instrumento introduzido na superfície mucosa do retalho. no lúmen da fossa nasal. Quando o retalho está todo descolado até à base do crânio, a posição do descolador de Freer quando introduzido no plano submucoperioteal coincide com a verificada no gesto precedente. Nunca se deve forçar a elevação superior do retalho sem se ter a certeza de que ainda não se alcançou a lâmina crivosa.
- Apesar de ser referido na literatura médica que a instrumentação da região olfactiva (biopsia) pode perfurar a base do crânio e causar lesões intracranianas ou fístulas de líquido cefalo-raquidiano (Lovell, Jafek, Moran *et al.* 1982; Lanza, Moran, Doty *et al.* 1993), as disseções que realizámos não confirmaram a extrema fragilidade da lâmina crivosa. Em várias disseções fizemos pressão com instrumentos rombos como o descolador de Freer, ou com instrumentos pontiagudos como a faca em foice, e foi necessária uma pressão considerável para perfurar o osso da lâmina crivosa. Comparativamente, o osso da base do crânio no tecto do etmóide (*fovea etmoidalis*) revelou-se muito mais vulnerável à perfuração com instrumentos cirúrgicos do que a lâmina crivosa.
- Nas incisões superior e posterior do retalho, o ramo da tesoura de hipofisectomia que é estático deve apoiar-se no osso na face profunda do retalho, próximo da lâmina crivosa. O ramo móvel corta a mucosa da superfície para a profundidade. Como a região olfactiva é muito estreita, deve ter-se o cuidado de não lacerar a mucosa da

parede lateral quando se abrem os ramos da tesoura, para evitar sinéquias no pós-operatório.

- Uma das maiores dificuldades na técnica deve-se à visualização difícil da lâmina crivosa na união do terço anterior com os dois terços posteriores da região, devida à proclividade da raiz anterior do corneto médio. Pode ultrapassar-se a dificuldade colocando o endoscópio ou numa posição superior ou numa posição inferior ao obstáculo, de forma a e não perder nunca a visualização directa quando se procede à instrumentação junto à base do crânio.
- Ultrapassada a dificuldade precedente, a porção posterior da região olfactiva é facilmente visualizada com o endoscópio numa posição inferior à proclividade da raiz anterior do corneto médio. A conclusão da incisão superior e a realização da incisão posterior com tesouras de hipofisectomia não oferece habitualmente dificuldades.
- A hemostase dos bordos da zona cruenta que é criada na região olfactiva deve ser particularmente rigorosa na união das incisões posterior e inferior, devido aos ramos arteriais septais da artéria eseno-palatina. Antes da remoção do retalho deve evitar-se a utilização da coagulação eléctrica mas, nesta fase, a pinça de coagulação bipolar em baioneta é o instrumento ideal.

### **1.5.3 Significado clínico dos resultados**

Este estudo permitiu conceber uma técnica cirúrgica destinada à colheita da mucosa olfactiva, a via transnasal endoscópica de acesso à região olfactiva.

A técnica, que pode ser considerada minimamente invasiva, é apenas mais uma extensão da moderna cirurgia endonasal endoscópica que, como foi mencionado em secção prévia, tem vindo progressivamente a alargar as suas indicações e o seu campo de aplicação para incluir um número de patologias e de regiões anatómicas muito diversos ([Jankowski, Auque, Simon et al. 1992](#); [Jho, Carrau e Ko 1996](#); [Cappabianca, Alfieri e de Divitiis 1998](#); [Hosemann, Weber, Keerl et al. 2000](#); [Frank e Pasquini 2003](#); [Duvvuri, Snyderman e Kassam 2004](#); [Maroon 2005](#)).

A vantagem da utilização de um tipo de abordagem cirúrgica já consolidado, como é a cirurgia endonasal endoscópica, resulta de haver um corpo de investigação amplo que a fundamenta, material e equipamentos disponíveis e experiência cirúrgica extensa por parte de grande número dos otorrinolaringologistas. Faltava alguma fundamentação da anatomia e da microanatomia da região para que a técnica pudesse ser desenvolvida, o que foi realizado nos estudos descritos nos capítulos precedentes.

A técnica cirúrgica desenvolvida não é difícil de realizar por otorrinolaringologistas familiarizados com a cirurgia endonasal endoscópica: os seus passos são compreensíveis e as referências anatómicas claras, os aspectos mais problemáticos foram expostos e as dificuldades esperadas têm uma solução que foi enunciada. Por outro lado, as operações realizadas no decurso do estudo experimental, executadas de acordo com os passos da técnica previamente planeada, validaram suficientemente os estudos prévios realizados.

A abordagem desenvolvida, além de cumprir o propósito para o qual foi desenhada, poderá ser utilizada para outras intervenções cirúrgicas que se dirijam ou passem pela região olfactiva, uma vez que permite uma exposição ampla da região e ao mesmo tempo é conservadora, na medida em evita a remoção desnecessária de elementos anatómicos importantes do sistema naso-sinusal, como são os cornetos. Adicionalmente, um dos passos importantes da técnica, a etmoidectomia, não tem por si só efeitos que possam atentar contra o normal funcionamento do sistema naso-sinusal (Kennedy, Shaman, Han *et al.* 1994; Lund e Scadding 1994; Clemente 2005; Levine e Clemente 2005).

Seria recompensador, para o autor deste trabalho, que alguns dos passos desenhados na técnica aqui apresentada fossem adoptados por outros cirurgiões, mesmo que dirigida a indicações diversas: a remoção de lesões de região olfactiva; o encerramento de fístulas da base do crânio na lâmina crivosa; a cura cirúrgica de algumas formas de cefaleia por ponto de contacto sinusal localizado na região olfactiva, já mencionadas (Welge-Luessen, Hauser, Schmid *et al.* 2003; Escada, Capucho e Madeira\_da\_Silva 2008); ou o tratamento por via endoscópica de lesões da fossa craniana anterior, entre outras.

#### **1.5.4 Conclusões**

O estudo realizado, baseado em estudos prévios da anatomia e da microanatomia da região olfactiva, permitiu o desenvolvimento de uma técnica destinada à colheita de mucosa olfactiva por via transnasal endoscópica. A técnica, que inclui uma abordagem endoscópica conservadora da região olfactiva, poderá ser útil para o tratamento de outras patologias da região.



## **CAPÍTULO 4**

### **ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DA MUCOSA OLFACTIVA HUMANA NO ADULTO**



## 4.1 INTRODUÇÃO

### 4.1.1 Considerações gerais

A mucosa olfactiva humana apresenta, na sua composição, células estaminais com capacidade de auto-renovação e multipotência e tem sido considerada uma fonte de células importante para a utilização em medicina regenerativa na reparação do sistema nervoso central (Wolozin, Sunderland, Zheng *et al.* 1992; Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998; Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Othman, Lu, Klueber *et al.* 2005; Carvalhal, Lima, Basto *et al.* 2007).

Todavia, as metodologias de laboratório de biologia celular desenvolvidas para o estudo e a proliferação destas células estão longe de estarem ainda suficientemente optimizadas. É importante que se desenvolvam investigações dirigidas ao esclarecimento ou aperfeiçoamento de aspectos tais como a colheita, o isolamento, a identificação, a cultura, a proliferação e a diferenciação destas células, e portanto existe também nesta área um potencial para a invenção de novas técnicas, patenteáveis internacionalmente.

Por estas razões, o nosso grupo de investigação decidiu associar-se e procurar parcerias que pudessem servir o interesse de ambas as partes: aos investigadores da área clínica interessava demonstrar a presença e importância das células estaminais olfactivas no material histológico colhido dos seus doentes; aos investigadores nas ciências básicas interessava a invenção de novas técnicas e o registo de uma patente com interesse comercial.

Encontrámos essa parceria junto na ECBio, I&D em Biotecnologia, S.A., uma companhia a trabalhar em investigação e desenvolvimento em biotecnologia celular, na área dos tratamentos com células estaminais do adulto. A ECBio está sediada em Oeiras, no edifício do Instituto de Tecnologia Química e Biológica (Universidade Nova de Lisboa) e do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica.

Os investigadores da ECBio, onde todo o trabalho laboratorial foi desenvolvido foram os responsáveis pela optimização dos procedimentos

laboratoriais que tornaram os resultados do estudo patenteáveis. São eles os Doutores Ana Verónica Carvalhal, Hélder Cruz, Pedro Cruz e Vera Bastos. Uma referência particular ainda ao Professor Doutor Celso Cunha, Director da Unidade Biologia Molecular do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, que deu o seu patrocínio científico ao trabalho e colaborou nas investigações.

#### **4.1.2 Identificação das células estaminais**

Para a investigação das células estaminais da linha neural têm sido até à data utilizados vários métodos que incluem a imunofluorescência e a separação magnética das células. As proteínas abaixo indicadas têm sido utilizadas como marcadores nestas investigações.

A nestina é uma proteína filamentosa intermediária do citoplasma das células (com diâmetro entre o da actina e o da miosina) que tem expressão nas células estaminais da linha neural, com uma expressão nas células nervosas adultas praticamente ausente (Frederiksen, Jat, Valtz *et al.* 1988; Price e Thurlow 1988; Reynolds e Weiss 1992; Tohyama, Lee, Rorke *et al.* 1992; Osada, Ichikawa e Costanzo 1995; Uchida, Buck, He *et al.* 2000; Carpenter, Inokuma, Denham *et al.* 2001; Doyle, Khan e Cunningham 2001; Rietze, Valcanis, Brooker *et al.* 2001; Witt, Bormann, Gudziol *et al.* 2009).

A proteína CD133 é uma glicoproteína de superfície celular com 120 kDa e características antigénicas e é utilizada também como um marcador das células estaminais da linha neural (Uchida, Buck, He *et al.* 2000; Tamaki, Eckert, He *et al.* 2002; Schwartz, Bryant, Fuja *et al.* 2003; Yu, Zhang, Zhao *et al.* 2004; Lee, Kessler, Read *et al.* 2005; Barraud, Stott, Mollgard *et al.* 2007; Corti, Nizzardo, Nardini *et al.* 2007; Pruszkak, Sonntag, Aung *et al.* 2007; Coskun, Wu, Bianchi *et al.* 2008; Hombach-Klonisch, Panigrahi, Rashedi *et al.* 2008; Mizrak, Brittan e Alison 2008).

A proteína glial fibrilar acídica (GFAP) é outra proteína filamentosa do citoplasma das células e tem sido utilizada como um marcador das células da linha glial, em particular das células da bainha dos axónios olfactivos (OEC), não sendo expressa em células estaminais indiferenciadas (Barber e Dahl 1987; Ramon-Cueto e Avila 1998; Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Wang, Han, Gao *et al.* 2007; Iwatsuki, Yoshimine, Kishima *et al.* 2008).

A  $\beta$ -tubulina (isotipo III) é um dos constituintes dos microtubulos do citoesqueleto celular, sendo considerada um antígeno específico dos neurónios em desenvolvimento, com expressão quer nos neurónios maduros quer nos neurónios imaturos da mucosa olfactiva (Cleveland e Sullivan 1985; Sullivan 1988; Jiang e Oblinger 1992; Lee e Pixley 1994; Roskams, Cai e Ronnett 1998; Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001).

#### 4.1.3. Meios de cultura utilizados

Os meios utilizados para a cultura e proliferação das células estaminais da linha neuronal utilizam habitualmente soro na sua composição (Vawter, Basaric-Keys, Li *et al.* 1996; Liu, Shields e Roisen 1998; Coon 1999; Wolozin e Coon 1999; Kato, Honmou, Uede *et al.* 2000; Messam, Hou e Major 2000; Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Klueber, Roisen e Lu 2003; Viktorov, Savchenko e Chekhonin 2007). Os meios com soro são utilizados nas culturas celulares porque são capazes de manter as células estaminais no seu estágio de indiferenciação. Pelo contrário, os meios sem soro induzem o desaparecimento das células estaminais, em detrimento de células já diferenciadas no sentido da linhagem neural (neurónio bipolar) ou glial (*olfactory ensheathing cell*), que passam a ter uma presença preponderante nas culturas (Zhang, Klueber, Guo *et al.* 2004; Murrell, Feron, Wetzig *et al.* 2005).

Todavia, os meios com soro, por terem uma origem animal, têm inconvenientes, tais como uma composição do meio que é variável ao longo do tempo, a eventual transmissão de infeções e a possibilidade de causar modificações não previsíveis no crescimento celular (Carvalho, Lima, Basto *et al.* 2007).

Até à data ainda não foi possível desenvolver um meio sem soro que seja capaz de manter as células cultivadas no seu estágio indiferenciado. Todavia, o desenvolvimento de um meio sem soro com estas características traria enormes vantagens práticas, pois eliminaria a possibilidade de transmitir infeções às células cultivadas e abriria perspectivas importantes no campo da utilização clínica das culturas de células estaminais da linha neural. As desvantagens da utilização do meio com soro em investigação, atrás mencionadas, podem ser temporizadas quando as investigações dizem respeito à experimentação com animais, todavia não são aceitáveis

quando dizem respeito à investigação em seres humanos, sobretudo se se está a considerar a aplicação em seres humanos das células submetidas a estes processos laboratoriais.

## 4.2 OBJECTIVOS

Em termos latos, este estudo pretendeu contribuir para uma maior fundamentação da técnica que usamos para o tratamento da lesão traumática crónica severa da medula espinal, como forma de medicina regenerativa.

Para dar mais força a essa fundamentação, investigámos a mucosa olfactiva nos próprios doentes submetidos ao procedimento. Interessava-nos esclarecer a composição do tecido usado para a transplantação, no que diz respeito aos elementos considerados fundamentais, que são as células estaminais da mucosa olfactiva.

Em termos mais específicos, os objectivos deste estudo foram os seguintes:

1. Demonstrar a presença e importância das células estaminais na mucosa olfactiva humana.
2. Desenvolver um método para a colheita, isolamento, identificação, cultura, e proliferação das células estaminais da mucosa olfactiva.

### **4.3 MÉTODOS**

O estudo, não aleatorizado e não controlado, foi realizado no Hospital de Egas Moniz (colheita da mucosa olfactiva e colocação no meio de transporte) e na ECBio, I&D em Biotectonologia, S.A. (procedimentos laboratoriais), e obteve parecer favorável da Comissão de Ética do Hospital de Egas Moniz. Todos os participantes deram o seu consentimento informado por escrito.

#### **4.3.1 Selecção dos pacientes**

A amostra foi de conveniência, tendo os participantes sido seleccionados de entre os doentes com lesão traumática crónica e severa da medula espinal, submetidos, no Hospital de Egas Moniz, a operação de auto-transplante de mucosa olfactiva para o tratamento da lesão medular.

Nenhum dos doentes tinha antecedentes de patologia naso-sinusal e todos tinham tomografia computadorizada naso-sinusal considerada normal e olfacto normal, avaliado pelo teste de olfacto *Smelldiskettes*® da Novimed Medizintechnik, Zurique, Suíça. Foram seleccionados, no intra-operatório, os doentes em que, depois do preenchimento de toda a solução de continuidade da medula espinal, ainda restava alguma mucosa olfactiva disponível para estudos complementares, para além dos estudos realizados por rotina, de histologia e microbiologia.

Foram incluídos no estudo 26 doentes, 20 do sexo masculino e 6 do sexo feminino, com uma média de idades de  $29 \pm 7$  anos (extremos de 18 e 40 anos).

#### **4.3.2 Colheita da mucosa olfactiva**

O protocolo circunstanciado da operação e a técnica da colheita, realizada sob anestesia geral por via transnasal endoscópica, foi descrito noutra secção desta tese. Após a colheita, a mucosa olfactiva foi separada, sob dissecação microscópica, nos seus 2 componentes: neuroepitélio e lâmina

própria, tal como previamente descrito na literatura para estudos afins (Feron, Mackay-Sim, Andrieu *et al.* 1999; Lu, Feron, Ho *et al.* 2001).

### 4.3.3 Transporte

O neuroepitélio e a mucosa olfactiva foram colocados, com cuidados de assepsia, em meio D-MEM/F-12 (1/1) (Gibco 11039), suplementado com Penicilina/Estreptomicina a 1% (Gibco 15140). Não houve adição de soro. As amostras foram mantidas a uma temperatura próxima dos 4 graus durante o transporte do Hospital de Egas Moniz para a ECBio.

### 4.3.4 Dissociação do tecido e isolamento das células

Os pequenos fragmentos de tecido e algum do meio de transporte foram colocados numa placa de Petri. Tipicamente tinham volumes entre 1 a 3 mm<sup>3</sup> (Figura 4.1).



**Fig. 4.1** Exemplo de tecido da lâmina própria recolhido de um doente e transferido para uma placa de Petri. Escala: 1cm.

Depois, as peças obtidas foram cortadas em fragmentos ainda mais pequenos e centrifugadas a uma velocidade entre 300-500g durante 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e eliminado.

Na digestão enzimática foram testadas diferentes soluções, isoladas ou em combinações variadas (Quadro 4.1). Foram igualmente testados a concentração, o tampão de dissolução utilizado (Quadro 4.2) e o tempo de

digestão enzimática. Todo o processo foi realizado à temperatura de 37 graus Celsius, com agitação constante.

#### **Quadro 4.1** Soluções enzimáticas usadas

---

Colagenase Ia (Sigma C2674)  
Colagenase IV (Sigma C5138),  
Tripsina (Gibco 15090)  
Tripsina (Gibco 25200)  
Tripsina (Gibco 25300)  
Hialuronidase (Sigma NH3884)  
Dispase II (Gibco 17105)  
DNase I (Sigma DN-25)

---

#### **Quadro 4.2** Tampões de dissolução

---

HBBS sem cálcio nem magnésio (Gibco 14175)  
HBBS com cálcio e magnésio (Gibco 14025)  
PBS (Gibco 20012)  
Tripsina (Gibco 15090, Cat. N°25200 e Cat. N°25300)  
Hialuronidase (Sigma NH3884)  
Dispase II (Gibco 17105)  
DNase I (Sigma DN-25)

---

A digestão enzimática foi realizada por períodos de 20 a 90 minutos. Para prevenir a contaminação bacteriana utilizou-se a Penicillina/Estreptomicina a 1% (Gibco 15140).

A dissociação mecânica, na qual se fez passar os agregados celulares por uma ponta de micropipeta, realizando movimentos de subir e descer, foi realizada em tempos entre 20 a 40 minutos do passo da digestão. No final, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante removido e eliminado.

O segundo (e último) passo da digestão enzimática foi efectuado por resuspensão do precipitado numa solução de 0,5/L de tripsina contendo 0,53 mM de EDTA (Gibco 25300) e incubada durante 7 minutos, com agitação. Foi também associado à dissociação mecânica. O passo foi concluído com a inibição da tripsina com o meio D-MEM/F-12 (1/1). No final a suspensão continha células isoladas e pequenos agregados com 5 a 10 células em média. Foi centrifugada, o sobrenadante eliminado e o centrifugado foi resuspenso de novo no meio D-MEM/F-12 (1/1).

#### **4.3.5 Contagem e viabilidade das células**

As contagens celulares foram realizadas com câmara de contagem de Neubauer (hemacitómetro) e a viabilidade foi determinada pelo método de exclusão do azul de tripano.

#### **4.3.6 Teor em células estaminais após a dissociação**

##### **4.3.6.1 Teor em células estaminais: células CD133-positivas**

Usou-se o sistema de separação magnética (Miltenyi Biotec 130-050-801). Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-CD133/1 conjugado com microesferas (componente magnético) para reconhecer o epítipo da proteína CD133 e ligar-se assim às células positivas para esta proteína. Uma vez marcadas, as células em suspensão foram aplicadas numa coluna MS ou LS do kit de separação magnética designado MiniMACS. As células CD133 negativas foram recolhidas após lavagem da coluna com um tampão. As células CD133 positivas foram recolhidas após lavagem depois de a coluna ter sido removida do magneto. No final, as duas amostras foram centrifugadas e re-suspendidas no meio final de cultura, separadamente.

#### **4.3.6.2 Teor em células estaminais: células nestina-positivas**

Para esta determinação usaram-se protocolos de imunofluorescência, que foram otimizados e que incluíram os seguintes passos: adesão, fixação, bloqueio, incubação com anticorpos primários e secundários, coloração do núcleo e montagem para visualização microscópica.

##### **4.3.6.2.1 Passos da imunofluorescência: adesão celular a uma superfície**

A adesão celular a uma superfície, passo fundamental da técnica, foi testada com superfícies de vidro recobertas com diferentes substâncias (Quadro 4.3). Foi também testada a utilização de uma superfície de vidro não lavada ou então uma superfície de vidro lavada previamente com uma solução de NaOH a 40% (v/v) e etanol a 60% (v/v) por 2 horas à temperatura ambiente.

A incubação foi realizada num incubador humidificado, suplementado com CO<sub>2</sub> a 5-7%. No final foi feita uma lavagem com PBS (Gibco 20012).

**Quadro 4.3** Substâncias testadas para a adesão das células

---

Gelatina a 0.2% (p/v) (Merck, Cat. N° 04078 )

Colagénio I a 20 ug/ mL (Sigma C9791)

Poli-D-lisina a 100 ug/mL (Sigma NT1024)

Poli-L-ornitina de peso molecular 30.000-70.000 (15 ug/mL) (SigmaP 3655)

---

##### **4.3.6.2.2 Passos da imunofluorescência: fixação**

Após a remoção do sobrenadante as células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído a 4% (p/v) (Sigma P6148), durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As células foram de seguida lavadas com solução de Tween 20 a 0.05% (v/v) em PBS (Sigma P2287).

#### 4.3.6.2.3 Passos da imunofluorescência: bloqueio

Esta fase foi testada com diferentes soluções de bloqueio (Quadro 4.4). Às soluções de bloqueio foi adicionado o PBS suplementado com Triton X100 a 0.1% (Sigma 9002-93-I). Foi usado um passo de 1 hora de incubação, à temperatura ambiente.

**Quadro 4.4** Substâncias de bloqueio

---

BSA a 2% (p/v) (Sigma A1470 ou A3294)

Soro de cabra normal a 5% (v/v) (Sigma G9023)

Soro de cabra normal a 10% (v/v) suplementado com BSA a 1% (p/v)

---

#### 4.3.6.2.4 Passos da imunofluorescência: marcação

A imunofluorescência foi realizada no mesmo dia e o anticorpo primário anti-nestina (Quadro 4.5) foi incubado durante 1 hora à temperatura ambiente ou durante 12 horas (noite) a 4 graus Celsius. A solução utilizada foi o PBS e as diluições utilizadas foram 1:100 e 1:40, respectivamente para o anticorpo de coelho e de rato, suplementados com Triton X100 a 0.1% (Sigma 9002-93-I). As células foram então submetidas a 5 lavagens repetidas de 10 minutos com a solução Tween 20 a 0.05% (v/v) em PBS (Sigma P2287).

**Quadro 4.5** Anticorpos anti-Nestina

---

**Primários**

Anticorpo anti-Nestina humana policlonal de coelho (Chemicon AB5922)

Anticorpo anti-Nestina humana monoclonal de rato (R&D MAB1259)

**Secundários**

Anticorpo anti-coelho TR (Jackson Immunoresearch Laboratories 111-075-003)

Anticorpo anti-rato FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories 115-095-003)

---

De seguida foi realizada a incubação com o anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (marcador imunofluorescente). De acordo com o anticorpo primário utilizou-se um anticorpo anti-coelho ou anti-rato, em solução de PBS a 1:100, suplementado com Triton X100 a 0.1% (Sigma 9002-93-I). A incubação do anticorpo secundário durou de 30 minutos a 1 hora à temperatura ambiente. Da mesma forma que para o anti-corpo primário, foram realizadas 5 lavagens repetidas de 10 minutos com a solução Tween 20 a 0.05% (v/v) em PBS.

#### **4.3.6.2.5 Passos da imunofluorescência: coloração do núcleo e montagem para visualização microscópica**

Para a marcação dos núcleos as células foram incubadas com uma solução de DAPI a 2 mg/mL (Sigma D9542) durante 3-4 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, depois da lavagem (igual à realizada nas fases anteriores) as células foram cobertas com uma lamela e um meio de montagem Vectashield® (Vector Laboratories, Califórnia, USA), próprio para a observação microscópica. Todas as fotografias foram tiradas com o mesmo tempo de exposição para permitir uma comparação entre elas com significado.

#### **4.3.6.2.6 Passos da imunofluorescência: controles**

Foi feito um ensaio controlo em cada protocolo de imunofluorescência, pela incubação com um anticorpo secundário, omitindo o anticorpo primário.

### **4.3.7 Cultura das células estaminais olfactivas**

#### **4.3.7.1 Cultura das células: determinação do meio de cultura mais favorável**

Numa fase inicial, exploratória, usou-se um meio de cultura sem soro mencionado na literatura e que tem os componentes mencionados no

Quadro 4.6 (Brewer, Torricelli, Evege *et al.* 1993). O meio foi suplementado com os factores de crescimento bFGF (Sigma F0291) e EGF (Sigma E9644) a 20 ng/mL cada 2/3 dias. Porém, verificou-se que o meio, apesar de ser capaz de manter as células na cultura durante um mês, não permitiu uma recuperação das células após a dissociação ou o crescimento por longos períodos.

**Quadro 4.6** Componentes do meio sem soro

---

D-MEM/F-12 (1/1) (Gibco 21331-020 ou 31330-038), com uma concentração final de 3-6 g/L de glucose (Sigma G7021)

2-3 mM de glutamina (Gibco 25030)

10-16 ug/mL de putrescina (Sigma P5780)

0.0063 ug/mL de progesterona (Sigma P7556)

0.0052 ug/mL de selenito de sódio (Sigma S5261)

25 ug/mL de insulina (Sigma I9278)

100 ug/mL de transferrina (Sigma T2036)

2% de suplemento B27 (Gibco 12587) e 1% de penicillina/streptomicina (Gibco 15140)

---

Na tentativa de melhorar a formulação do meio de cultura sem soro, foram de seguida comparados os resultados, na proliferação celular, entre 20 diferentes meios de cultura que diferiam pelos componentes individuais que eram adicionados ao meio básico, designado de Meio Neurobasal® (Gibco 1103). O meio Neurobasal foi desenvolvido a partir da optimização das concentrações do meio D-MEM/F-12 (1/1) (Brewer, Torricelli, Evege *et al.* 1993). Os componentes individuais e o desenho da experiência estão representados nos Quadros 4.7 e 4.8.

A selecção dos componentes individuais que foram adicionados ao Meio Neurobasal foi baseada na sua utilização corrente e difundida em culturas celulares de células de linhagem neural, completada por uma revisão extensa da literatura, destinada a explorar outros componentes com interesse potencial mas com utilização menos generalizada (ver as referências individuais no quadro respectivo). Os factores de crescimento

EGF, bFGF2 e LIF, quando compreendidos na formulação, foram adicionados ao meio cada 2/3 dias.

O suplemento B27 é comercializado pela Gibco e foi desenvolvido por Brewer et al. (Brewer 1995), e embora a composição precisa não seja conhecida, este suplemento é composto pelos seguintes 20 compostos: i) os anti-oxidantes: glutathione (reduzida), catalase, D.L-a-Tocoferol, acetato de D.L-a-Tocoferol e superoxidase dismutase; ii) hormonas: corticosterona, progesterona, acetato de retinil, insulina, e T3 (triiodo-l-tironina); iii) vitaminas: biotina (vitamina H ou B7); iv) precursores de lipidos: L-carnitina, etanolamina, ácido linoleico, ácido linolenico; v) carboidratos: D (+) - galactose; vi) outros: putrescina, selénio, albumina bovina, e transferina.

As 20 diferentes formulações do meio de cultura sem soro foram testadas com o mesmo tecido, do mesmo doente, para evitar o viés decorrente da variabilidade da biópsia e da composição individual dos tecidos.

Quadro 4.7 Componentes acrescentados ao meio de cultura	
MEIO OU COMPOSTO UTILIZADO	DESIGNAÇÃO
Putrescina	A
Progesterona	B
Selénio	C
Insulina	D
Transferrina	E
B27 (Brewer 1995)	F
LiCl (Fluka, Cat. N°62477) (Hashimoto, Senatorov, Kanai <i>et al.</i> 2003)	G
ATP (Sigma, Cat. N°A6419) (Neary, Zhu, Kang <i>et al.</i> 1996)	H
Heparina (Sigma, Cat. NH1027) (Garg, Thompson e Hales 2000)	I
Prolactina (Sigma, Cat. N°L6520) (Shingo, Gregg, Enwere <i>et al.</i> 2003)	J
Ácido glutâmico (Sigma, Cat. N°G8415)	K
Suplemento G5 (Gibco, Cat. N°17502)	L
Epidermal growth factor (EGF) (Mackay-Sim e Chuahb 2000; Newman, Feron e Mackay-Sim 2000)	M
Basic fibroblast growth factor (bFGF2) (Mackay-Sim e Chuahb 2000; Newman, Feron e Mackay-Sim 2000)	N
LIF (Sigma, Cat. N°L5283) (Haaland 1989)	O

**Quadro 4.8** Formulação dos meios de cultura experimentados

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	X	X	X	X	X								X	X	
2	X	X	X	X	X								X	X	
3	X	X	X	X	X	X							X	X	
4	X	X	X	X	X	X							X	X	
5	X	X	X	X	X								X	X	X
6	X	X	X	X	X				X				X	X	
7	X	X	X	X	X	X							X	X	X
8	X	X	X	X	X	X			X				X	X	
9	X	X	X	X	X				X				X	X	X
10	X	X	X		X	X			X				X	X	X
11	X	X	X	X	X	X	X						X	X	
12	X	X	X	X	X	X		X					X	X	
13	X	X	X	X	X	X	X	X					X	X	
14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X
15	X	X	X	X	X	X				X			X	X	
16	X	X	X	X	X	X			X				X	X	X
17	X	X	X	X	X	X					X		X	X	
18	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X
19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
20												X			

A avaliação dos meios de cultura foi realizada a partir das observações das células cultivadas, baseando-se numa escala de *performance* de 1 a 10, baseada no número e morfologia das células (Neary, Zhu, Kang *et al.* 1996).

#### 4.3.7.2. Cultura das células: co-culturas no meio ECBioNS19

Utilizando o meio que se mostrou mais favorável para a cultura das células estaminais olfactivas, foram testadas diferentes co-culturas, tal como indicado na Figura 4.2.

OE		
OL		
OE	+	OL
(OE) <sup>CD133+</sup>		
(OL) <sup>CD133+</sup>		
(OE+OL) <sup>CD133+</sup>		
(OE) <sup>CD133+</sup>	+	(OL) <sup>CD133+</sup>
(OE) <sup>CD133-</sup>		
(OL) <sup>CD133-</sup>		
(OE+OL) <sup>CD133-</sup>		
(OE) <sup>CD133-</sup>	+	(OL) <sup>CD133-</sup>
(OE) <sup>CD133+</sup>	+	(OE) <sup>CD133-</sup>
(OL) <sup>CD133+</sup>	+	(OL) <sup>CD133-</sup>
(OE+OL) <sup>CD133+</sup>	+	(OE+OL) <sup>CD133-</sup>
(OE) <sup>CD133+</sup>	///	(OE) <sup>CD133+</sup>
(OL) <sup>CD133+</sup>	///	(OE) <sup>CD133-</sup>
(OE+OL) <sup>CD133+</sup>	///	(OE+OL) <sup>CD133-</sup>

**Fig. 4.2** Co-culturas realizadas (OE=células obtidas a partir da dissociação isolada do epitélio olfativo; OL=células obtidas a partir da dissociação isolada da lâmina própria; CD133+=só as células positivas para esta proteína; CD133-=só as células negativas para esta proteína; (+)=co-cultura sem separação por membrana; (///)=Co-cultura separada por membrana porosa (*ThinCert*)

As células foram inoculadas nos meios de cultura e as suspensões, com densidades de 6.000 a 66.000 células/mL e um volume final de 1 mL, foram colocadas em diferentes sistemas de placas de cultura de 24 poços: *standard* (TPP®); *cell+* (Sarstedt®) ou hidrofóbicas (Sarstedt®). Após a primeira semana, ambas as células aderentes e em suspensão foram observadas, independentemente da co-cultura estudada.

#### **4.3.7.3 Cultura das células: passagem das células aderentes**

De modo a propagar as células, foram testados diferentes métodos (soluções) para a passagem das células aderentes: soluções de tripsina-EDTA (Gibco 25300) ou de colagenase la 1000 U/mL (Sigma C2674) e soluções sem proteases, nomeadamente a solução de desalojamento de células (SDC) (Sigma C5914) e a solução HyQ Tase (Hyclone, SV30030).

#### **4.3.7.4 Cultura das células: propagação das células por longos períodos**

Após ter uma confluência superior a 70% de células aderentes em poços de placa de 24 poços, inoculámos sistemas de cultura estática, designados por *t-flask*, de 25 cm<sup>2</sup> (T25) (TPP 90026) e a suspensão celular obtida foi reinoculada no meio sem soro ECBioNS19, tendo-se posteriormente procedido à identificação das suas células.

##### **4.3.7.4.1 Imunoreactividade à nestina nas culturas por longos períodos**

Utilizou-se o protocolo de imunofluorescência já anteriormente descrito na secção 4.3.6.2 (4.3.6.2.1 a 4.3.6.2.6).

##### **4.3.7.4.2 Percentagem de células CD133-positivas nas culturas por longos períodos**

Também se analisou a percentagem de células CD133-positivas presentes na cultura por longos períodos. Foi utilizada a co-cultura EO + LO com 139 dias. Removeram-se as células aderentes de um sistema T25 e procedeu-se à separação magnética pela técnica anteriormente descrita na secção 4.3.6.1.

#### **4.3.7.4.3 Imunoreactividade à $\beta$ -tubulina (isotipo III) nas culturas por longos períodos**

Foi usado um anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina isotipo III (rato) (Sigma T8660), nas 2 diluições que são sugeridas na literatura: 1:100 ou 1:1000. Testaram-se as células aderentes a uma superfície de poli-L-ornitina e as células em suspensão.

#### **4.3.7.4.4 Imunoreactividade ao GFAP nas culturas por longos períodos**

O protocolo de imunofluorescência foi idêntico ao descrito para a  $\beta$ -tubulina. Foi usado um anticorpo anti-GFAP (rato) (Chemicon MAB360) a uma diluição de 1:500.

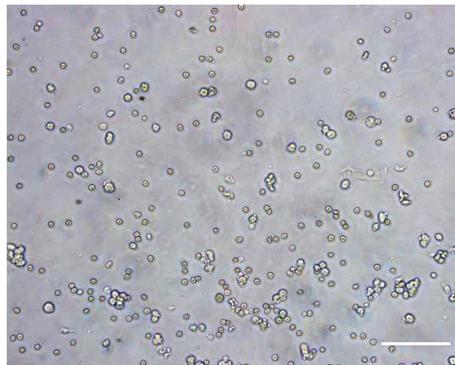
#### **4.3.7.4.5 Imunoreactividade à vimentina nas culturas por longos períodos**

Foi avaliada com o anticorpo monoclonal anti-vimentina humana (de rato) (Novo Castra, NCL-L-VIM-V9) a uma diluição de 1:100.

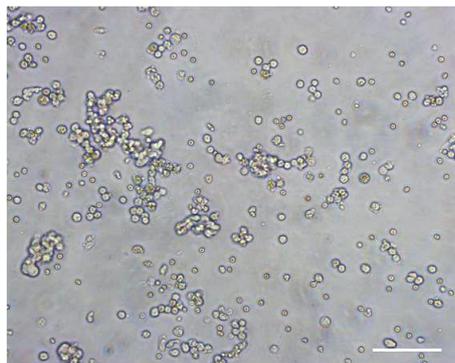
## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Dissociação dos tecidos

A melhor solução enzimática, isto é, a que deu os melhores resultados na dissociação dos tecidos com viabilidade e proliferação celular foi a que combinou a Colagenase la numa concentração máxima de 2000 U/ml com a Dnase I numa concentração de 20 U/mL. O melhor tampão foi o HBSS contendo cálcio e magnésio. As Figuras 4.3 e 4.4 mostram uma solução celular típica após o protocolo de dissociação.



**Fig. 4.3** Suspensão celular obtida após a dissociação do epitélio. Escala: 100  $\mu$ m.



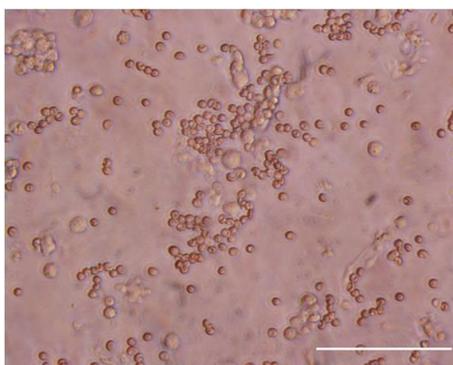
**Figura 4.4** Suspensão celular obtida após a dissociação da lâmina própria. Escala: 100  $\mu$ m.

#### 4.4.2 Contagem e viabilidade das células após a dissociação

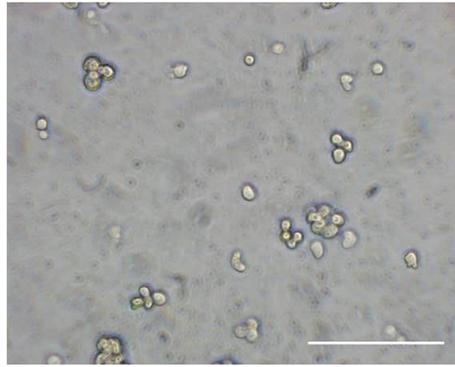
No final da dissociação (enzimática e mecânica), 68-91% das células obtidas eram eritrócitos. A lise dos eritrócitos iniciou-se 1 semana depois da dissociação, não se tendo observado uma diminuição da proliferação das células estaminais nesse processo. As células não sanguíneas viáveis, determinadas pelo método de exclusão do azul de tripano correspondiam a 60.000 a 264.000 por amostra, e a suspensão de células apresentava viabilidades de 75-100%. Uma vez que as amostras tinham 1 a 3 mm<sup>3</sup> de volume calcula-se que existam entre 60.000 a 264.000 células não sanguíneas viáveis por 1 a 3 mm<sup>3</sup> de mucosa olfactiva.

#### 4.4.3 Teor em células estaminais: separação magnética

A separação magnética das células CD133-positivas e negativas levou a uma perda média de 73% das células dissociadas não hemáticas (viáveis e não viáveis). O número de células CD133-positivas viáveis representou, em média, 67% do total de células viáveis recuperadas (CD133-positivas e negativas), demonstrando que a mucosa olfactiva é um tecido muito rico no que respeita a células estaminais. As Figuras 4.5 e 4.6 mostram a morfologia típica das células CD113-positivas e CD133-negativas após a dissociação.



**Figura 4.5** Suspensão celular de células CD133-negativas. A separação magnética foi realizada usando a mistura das suspensões do epitélio e lâmina própria. Escala: 100 µm.



**Figura 4.6.** Suspensão celular de células CD133-positivas. A separação magnética foi realizada usando a mistura das suspensões do epitélio e lâmina própria. Escala: 100  $\mu$ m.

#### **4.4.4 Teor em células estaminais: imunofluorescência**

##### **4.4.4.1 Passos da imunofluorescência: adesão celular a uma superfície**

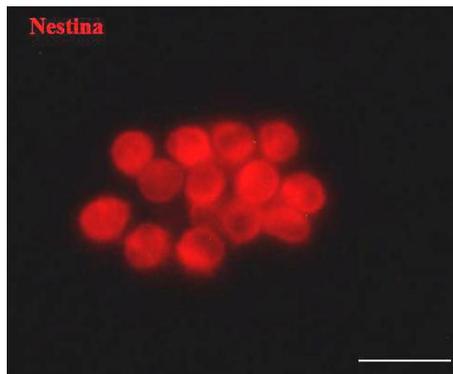
As células não aderiram nem ao vidro simples nem ao vidro recoberto por gelatina ou colagêneo. Quer a poli-D-lisina quer a poli-L-ornitina permitiram uma adesão celular que se iniciou após 24 horas em condições normais de cultura, mas a poli-L-ornitina foi a substância mais eficaz para este propósito.

##### **4.4.4.2 Passos da imunofluorescência: bloqueio**

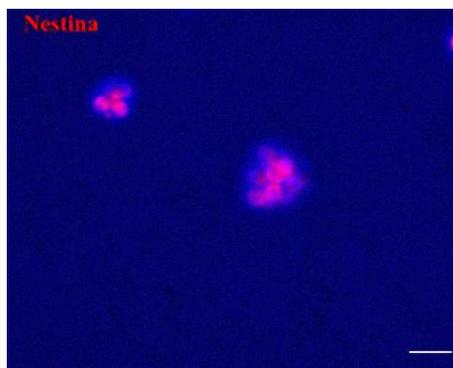
Os melhores resultados foram obtidos com a solução de BSA a 2% (p/v) suplementada com Triton X100 a 0.1%.

##### **4.4.4.3 Passos da imunofluorescência: marcação das células**

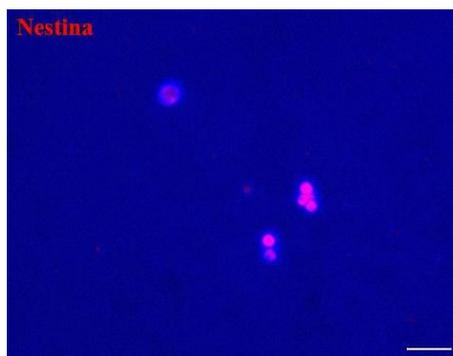
Nas figuras 4.7, 4.8 e 4.9 podem observar-se células nestina-positivas. Nem todas as células do *pool* de células obtido após a dissociação da mucosa olfactiva (sem separação magnética) são nestina-positivas. A proporção destas células é de 69% em média, praticamente igualando a proporção de células que, na separação magnética, eram CD133-positivas (67%). Quando se pondera a proporção de células que são nestina-positivas após a separação magnética (só analisando as que eram CD133-positivas), este valor sobe para 90-100%.



**Figura 4.7** Células nestina e CD133-positivas da mucosa olfactiva (epitélio + lâmina própria) 1 dia após a dissociação. Os agregados celulares são maiores do que os observados logo no final da dissociação do tecido (ver Figuras 4.3. e 4.4.) Escala: 20  $\mu$ m.



**Figura 4.8** Células nestina-positivas sem separação magnética (epitélio + lâmina própria) 1 dia após a dissociação. Escala: 20  $\mu$ m.



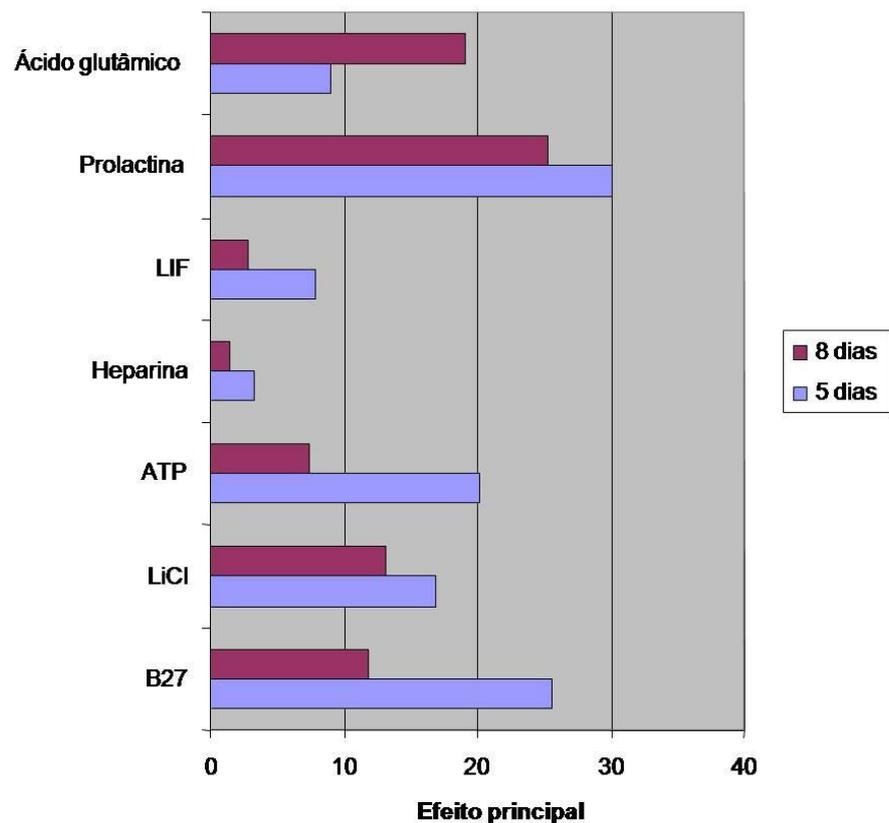
**Fig. 4.9** Outra imagem das células nestina-positivas sem separação magnética (epitélio + lâmina própria) 1 dia após a dissociação. Escala: 20  $\mu$ m.

#### **4.4.5 Cultura das células estaminais olfactivas**

Das diferentes 20 formulações do meio de cultura sem soro que foram avaliadas, a que demonstrou melhores resultados na proliferação das

células estaminais olfactivas foi a formulação 19, que se passou a designar de ECBioNS19. Este meio permitia o melhor crescimento, quer das células aderentes, quer dos agregados, e era constituído por meio Neurobasal®, suplementado com putrescina, progesterona, selenito de sódio, insulina, transferrina, B27, LiCl, ATP, heparina, prolactina e ácido glutâmico.

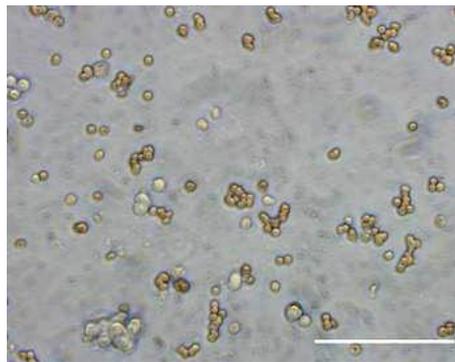
Comparando o resultado do meio ECBioNS19 com o resultado de outros meios que diferiam do primeiro pela ausência de alguns componentes, foi possível determinar o efeito de cada um desses componentes individuais quando adicionado ao meio de cultura. De acordo com o número de células e morfologia celular, o resultado de cada meio foi avaliado numa escala de 1 a 10, tendo sido de seguida determinada a diferença entre a pontuação média quando cada um dos componente estava e quando não estava presente (efeito principal) (Figura 4.10).



**Fig. 4.10** Resultados dos componentes individuais dos meios de cultura.

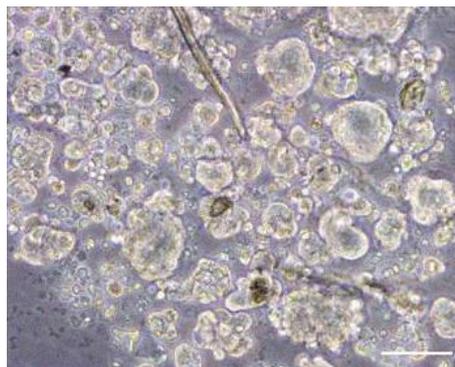
Todos os componentes testados tiveram um efeito positivo na proliferação celular. A prolactina em particular parece ser crucial para a fase inicial da cultura.

As células que foram inoculadas nos diferentes meios de cultura eram constituídas por pequenos agregados de 3 a 5 células, obtidas a partir do processo de dissociação anteriormente descrito (Figura 4.11).

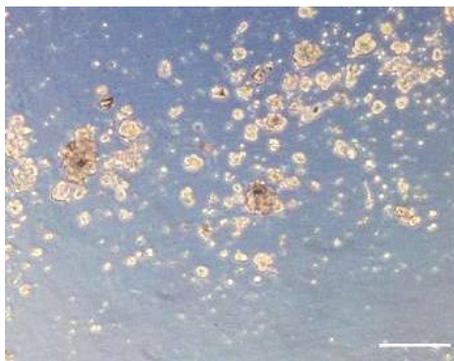


**Fig. 4.11** Células inoculadas no meio de cultura sem soro no dia 0. Escala: 100  $\mu$ m.

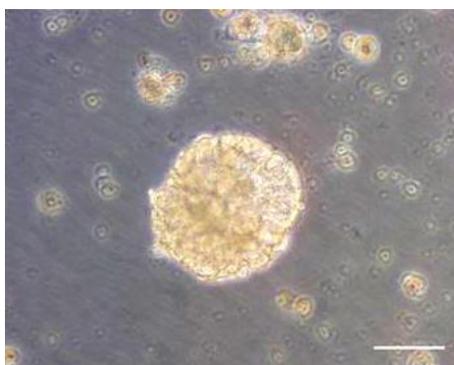
Entre o 5<sup>o</sup> e o 20<sup>o</sup> dia de cultura, observou-se a formação de grandes agregados de células (neurosferas) (Figuras 4.12 a 4.14).



**Fig. 4.12** Agregados de células no meio de cultura no dia 5. Verifica-se que os agregados são maiores do que os que foram inoculados no início da cultura, que só tinham 3 a 5 células (ver Figura 4.3.). Escala: 100  $\mu$ m.



**Fig. 4.13** Os agregados de células são ainda maiores no dia 8, começando a apresentar uma configuração esférica (neurosferas). Escala: 100  $\mu\text{m}$ .

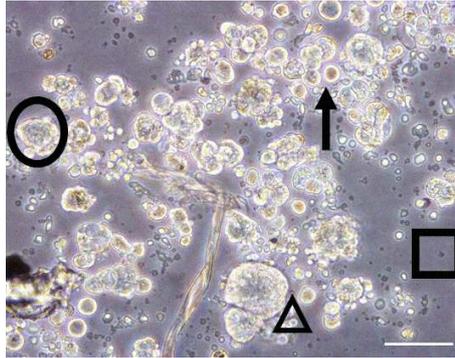


**Fig. 4.14** Pormenor de uma neuroesfera típica, observada no 20º dia de cultura. Escala: 100  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4.6 Co-culturas no meio ECBioNS19**

A Figura 4.15 mostra uma co-cultura OE + OL, uma semana depois da dissociação. Observam-se vários tipos de células em suspensão: células grandes (seta); células pequenas (triângulo); eritrócitos lisados (quadrado) e largos agregados (círculo). É interessante verificar que tipicamente os primeiros agregados a serem formados apresentaram um centro interior compacto rodeado por uma camada de células bem visível e organizada.

Pelo contrário, as células aderentes, formam tipicamente pequenos agregados de células pequenas (Figura 4.16).



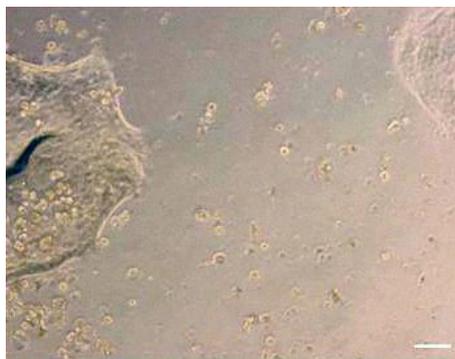
**Fig. 4.15** Células em suspensão na co-cultura de células da mucosa olfactiva, uma semana após a dissociação. Escala: 100  $\mu$ m.



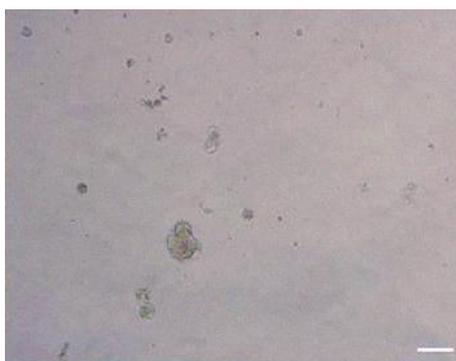
**Fig. 4.16** Células aderentes na co-cultura de células da mucosa olfactiva, uma semana após a dissociação. Escala: 100  $\mu$ m.

Entre a 2<sup>a</sup> e a 4<sup>a</sup> semana, os agregados em suspensão começam a aderir à superfície disponível.

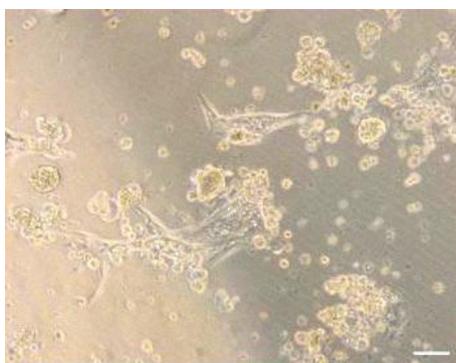
As Figura 4.17 a 4.22 mostram culturas OE e OL ou co-cultura OE+OL aos dias de cultura 16 e 41, verificando-se que as células aderentes estão firmemente compactadas formando camadas contínuas ou agregados.



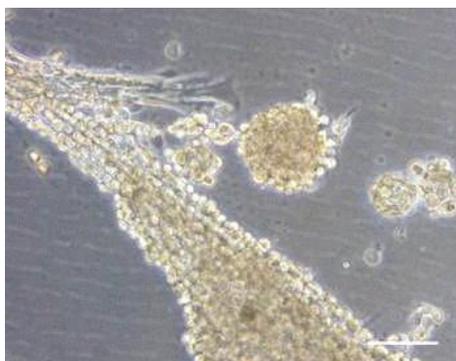
**Fig. 4.17** Células estaminais 16 dias após a dissociação e inoculação no meio ECBioNS19. Cultura OE. Escala: 100  $\mu$ m.



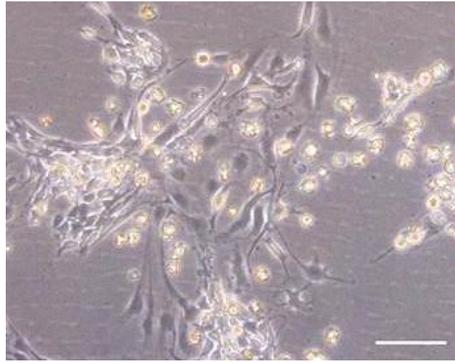
**Fig. 4.18** O mesmo, cultura OL. Escala: 100  $\mu$ m.



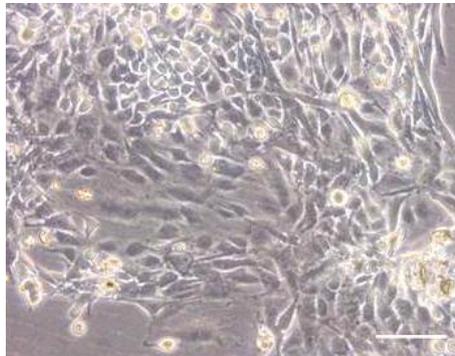
**Fig. 4.19** O mesmo, co-cultura OE+OL. Escala: 100  $\mu$ m.



**Fig. 4.20** Células estaminais 41 dias após a dissociação e inoculação no meio ECBioNS19. Cultura OE. Escala: 100  $\mu$ m.



**Fig. 4.21** O mesmo, cultura OL. Nesta fase foi possível observar células com uma morfologia mais alongada, semelhante a neurónios bipolares. Escala: 100  $\mu$ m.



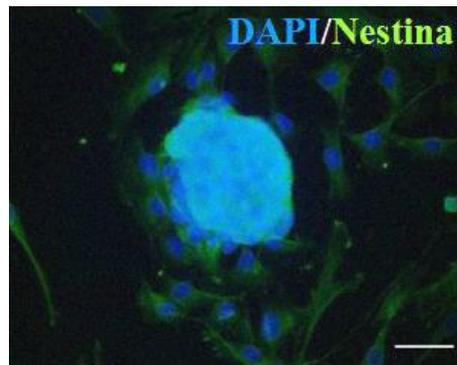
**Fig. 4.22** O mesmo, cultura OE+OL. As células de morfologia bipolar são muito evidentes nesta imagem. Escala: 100  $\mu$ m.

A observação cuidadosa permitiu ainda detectar no dia 30 células de morfologia mais alongada, incluindo células de morfologia bipolar (Figura 4.23.).

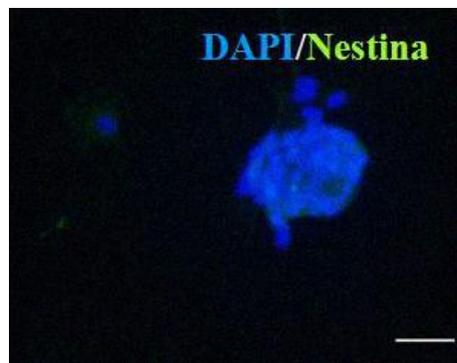


**Fig. 4.23** Células com morfologia tipo neurónio bipolar. Escala: 100  $\mu$ m.

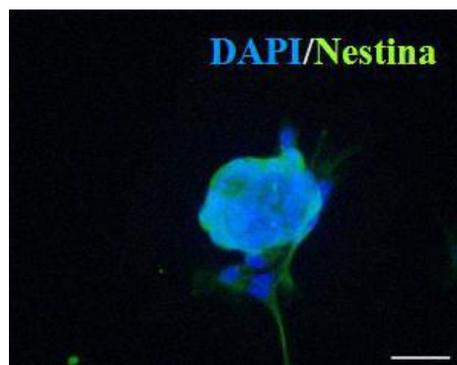
Foi também demonstrada a presença de células nestina-positivas ao dia 19 nas culturas OE e OL ou na co-cultura OE+OL. Nesta análise verificou-se que nas culturas OE e OE+OL as células eram praticamente todas nestina-positivas (Figuras 4.24 e 4.26 a 4.29), enquanto que nem todas as células eram nestina-positivas nas culturas OL (Figura 4.25). Quanto à morfologia, a morfologia das células nestina-positivas é alongada (Figuras 4.27 e 4.28) ou mesmo similar ao do neurónio bipolar olfactivo (Figura 4.29).



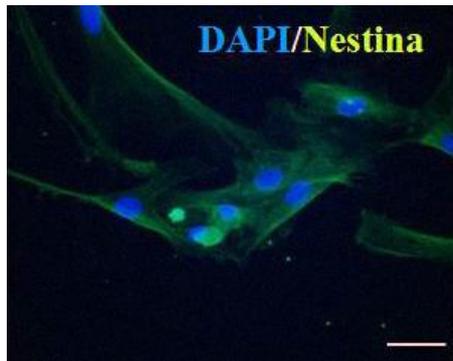
**Fig. 4.24** Células nestina-positivas ao dia 19 na co-cultura OE. Escala: 20  $\mu$ m.



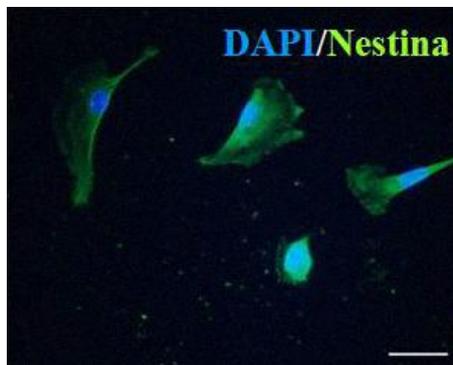
**Fig. 4.25** Cultura OL, dia 19. Células com núcleo marcado pelo DAPI mas sem marcação citoplasmática pela nestina. Escala: 20  $\mu$ m.



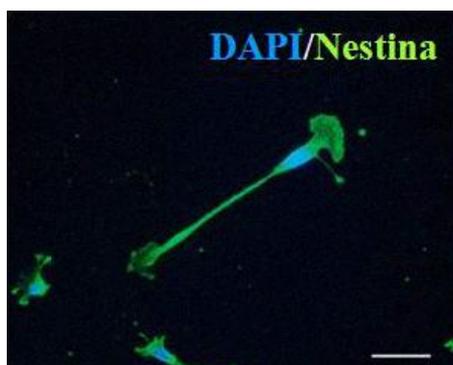
**Fig. 4.26** Células nestina-positivas ao dia 19 na co-cultura OE+OL. Escala: 20  $\mu$ m.



**Fig. 4.27** Morfologia das células nestina-positivas ao dia 19 na cultura OE. Escala: 20  $\mu$ m.



**Fig. 4.28** Algumas células da cultura OL são nestina-positivas. Escala: 20  $\mu$ m.



**Fig. 4.29** A morfologia das células nestina-positivas ao dia 19 na co-cultura OE+OL é semelhante ao do neurônio bipolar olfativo. Escala: 20  $\mu$ m.

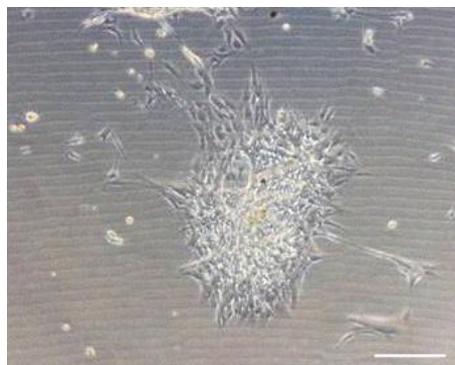
#### 4.4.7 Passagem das células aderentes

Das duas soluções avaliadas (tripsina e colagenase), apenas a tripsina foi rapidamente eficaz. No entanto ambas são proteases, e existe o risco de poderem danificar os receptores celulares das células estaminais, que são

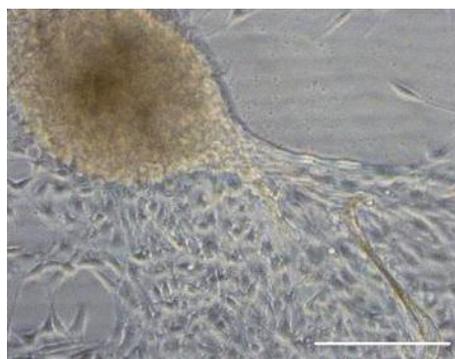
cruciais na manutenção do seu estado não diferenciado. Por outro lado a inibição das proteases, passo necessário quando se usam estas soluções, implica a utilização de soro, processo que queríamos evitar nas nossas culturas celulares.

No que diz respeito às soluções sem proteases, foram eficazes na remoção das células aderentes a crescer em meio sem soro ECBioNS19, embora com menor eficácia do que quando se usou a tripsina. A solução SDC foi usada como a solução *standard* para remoção das células aderentes.

Curiosamente, os melhores resultados na cultura foram obtidos quando as neuroesferas primárias não foram separadas das células aderentes, resultados que contrastam com os mencionados na literatura médica. As neuroesferas primárias acabaram por ficar aderentes à superfície do vidro, tendo migrado para a superfície disponível (Figuras 4.30 e 4.31). As células levaram em média cerca de 1-2 meses a atingirem a confluência de 60-90%, dependendo do inóculo.



**Fig. 4.30** Co-cultura OE+OL em microscopia de contraste de fase aos 2 meses. Escala: 100  $\mu$ m.

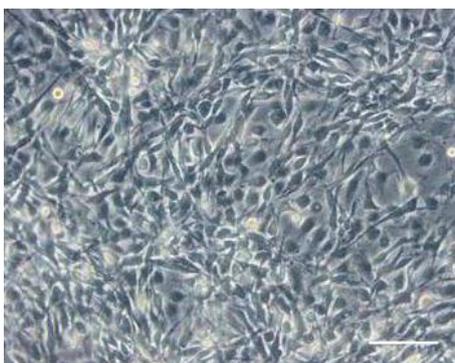


**Fig. 4.31** Co-cultura OE+OL em microscopia de contraste de fase aos 2 meses. Escala: 100  $\mu$ m.

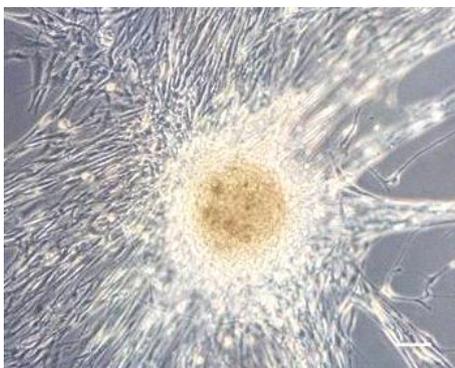
#### 4.4.8 Propagação das células e cultura por longos períodos

A co-cultura que demonstrou melhores qualidades na proliferação das células estaminais da mucosa olfactiva a longo prazo (até 7 meses) foi a constituída por células de toda a mucosa olfactiva (OE + OL).

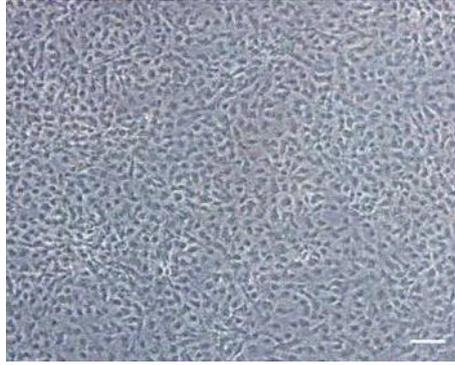
Quando a suspensão celular obtida foi reinoculada no meio sem soro ECBioNS19, as células voltaram a formar neuroesferas. Tipicamente, o tempo de duplicação destas células foi de 15 dias durante os primeiros 6 meses (Figuras 4.32 a 4.35). Os sistemas de cultura estática T25 com uma confluência de células aderentes de 75-90% apresentavam tipicamente, em média, 375.000 células estaminais olfactivas com uma viabilidade média de 77%.



**Fig. 4.32** Microscopia de contraste de fase mostrando a morfologia das células estaminais da mucosa olfactiva (co-cultura do epitélio e da lâmina própria) aos 3-4 meses. Escala: 100  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 4.33** Outra imagem de microscopia de contraste de fase mostrando a morfologia das células estaminais da mucosa olfactiva (co-cultura do epitélio e da lâmina própria) aos 3-4 meses. Escala: 100  $\mu\text{m}$ .



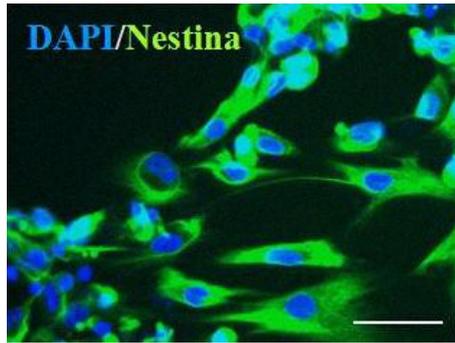
**Fig. 4.34** Microscopia de contraste de fase mostrando a morfologia das células estaminais da mucosa olfactiva (co-cultura do epitélio e da lâmina própria) aos 6 meses. Escala: 100  $\mu\text{m}$ .



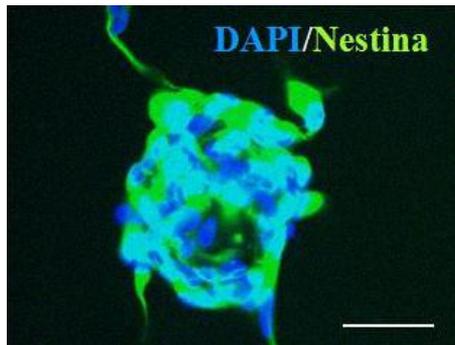
**Fig. 4.35** Microscopia de contraste de fase mostrando a morfologia das células estaminais da mucosa olfactiva (co-cultura do epitélio e da lâmina própria) aos 6 meses. Escala: 100  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4.8.1. Imunoreactividade à nestina nas culturas por longos períodos**

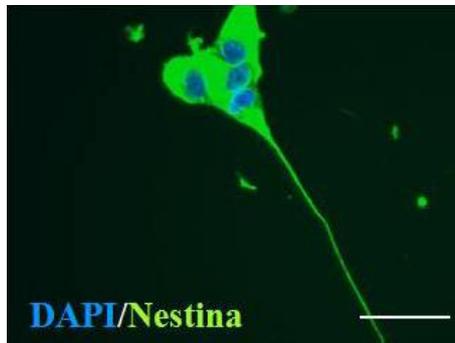
A marcação das células por técnicas de imunofluorescência evidenciou células nestina-positivas nos vários tempos da cultura por longos períodos que foram avaliados (Figuras 4.36 a 4.41). Todas as células são persistentemente nestina-positivas até aos 5-6 meses, mas é interessante assinalar que a partir dos 5 meses de cultura se observaram células com morfologia mais alongada que não formam agregados. Aos 6 meses a população de células mostrou ser 90 a 100% pura. Estes resultados confirmam que é possível propagar células estaminais nestina-positivas como células aderentes e mantê-las no seu estado não diferenciado. Por outro lado, não se observou uma contaminação com fibroblastos.



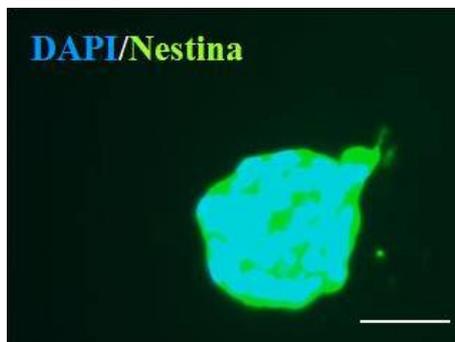
**Fig. 4.36** Células nestina-positivas ao dia 95 na co-cultura OE+OL. Escala: 20  $\mu$ m.



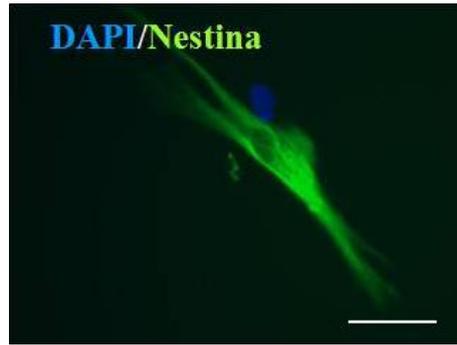
**Fig. 4.37** Células nestina-positivas ao dia 95 na co-cultura OE+OL. Escala: 20  $\mu$ m.



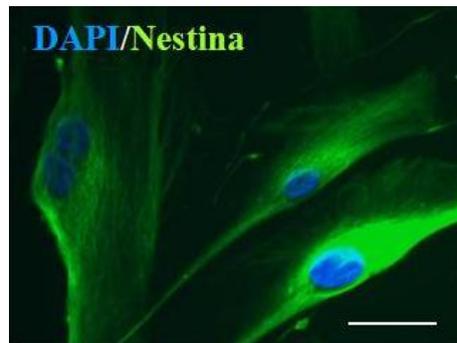
**Fig. 4.38** Células nestina-positivas ao dia 123 na co-cultura OE+OL. Escala: 20  $\mu$ m.



**Fig. 4.39** Células nestina-positivas ao dia 123 na co-cultura OE+OL. Escala: 20  $\mu$ m.



**Fig. 4.40** Células nestina-positivas ao dia 151 na co-cultura OE+OL. Escala: 20  $\mu$ m.



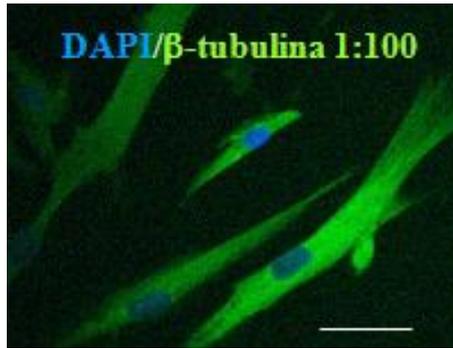
**Fig. 4.41** Células nestina-positivas ao dia 151 na co-cultura OE+OL. Escala: 20  $\mu$ m.

#### **4.4.8.2 Células CD133-positivas nas culturas por longos períodos**

A separação magnética para analisar a percentagem de células CD133-positivas no dia 139 da cultura determinou que 25% das células (e portanto 25% das células nestina-positivas) eram CD133-positivas.

#### **4.4.8.3 Imunoreactividade à $\beta$ -tubulina (isotipo III) nas culturas por longos períodos**

As células apresentaram ser  $\beta$ -tubulina (isotipo III)-negativas em ambas as diluições até aos 4 meses de cultura. Após os 4 meses, só as células de morfologia mais alongada eram  $\beta$ -tubulina (isotipo III)-positivas (Figura 4.42).



**Fig. 4.42** Células  $\beta$ -tubulina (isotipo III)-positivas aos 4 meses de cultura na co-cultura OE+OL, na superfície. Escala: 20  $\mu$ m.

#### **4.4.8.4 Imunoreactividade ao GFAP nas culturas por longos períodos**

Não se observaram células positivas ao GFAP, independentemente do tempo de cultura e da morfologia das células estudadas: redondas, bipolares e alongadas.

#### **4.4.8.5 Imunoreactividade à vimentina**

As células foram vimentina positivas em todos os tempos de cultura.

## 4.5 DISCUSSÃO

### 4.5.1 Resumo geral dos resultados

Os resultados deste estudo confirmam a presença de células estaminais na mucosa olfactiva humana. O isolamento das células estaminais já tinha sido obtido em biópsias da mucosa olfactiva (Wolozin, Sunderland, Zheng *et al.* 1992; Feron, Perry, McGrath *et al.* 1998; Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Klueber, Roisen e Lu 2003; Winstead, Marshall, Lu *et al.* 2005), mas pela primeira vez as células foram quantificadas logo após a dissociação da mucosa: 67-69% das 60.000 a 264.000 células isoladas por 1 a 3 mm<sup>3</sup> de mucosa olfactiva são células estaminais da linha neural.

A combinação da fonte (mucosa olfactiva humana) e processo de cultura (invenção patenteada pelo nosso grupo de investigação) permitiu estabelecer uma cultura de células estaminais/progenitoras humanas adultas em meio sem soro ECBioNS19. Estas células, sempre em cultura na ausência de soro, foram capazes de proliferar durante pelo menos 7 meses.

### 4.5.2 Limitações do estudo

Muitos dos procedimentos realizados neste estudo fizeram uma análise individualizada dos 2 componentes da mucosa olfactiva: neuroepitélio e lâmina própria, que para o efeito foram separados por dissecação microscópica, tal como já descrito na literatura médica em animais de experimentação (Feron, Mackay-Sim, Andrieu *et al.* 1999; Lu, Feron, Ho *et al.* 2001).

O racional da separação entre o neuroepitélio e a lâmina própria baseou-se na tentativa de distinguir a localização, na mucosa olfactiva, das células estaminais com interesse para serem utilizadas nos estudos de regeneração e reparação do tecido nervoso. A distinção pode ser importante, uma vez que se reconhece que são dois os tipos de células que existem na mucosa olfactiva com estas propriedades potenciais: as células estaminais do neuroepitélio e as OEC da lâmina própria (Calof, Mumm, Rim *et al.* 1998; Huard, Youngentob, Goldstein *et al.* 1998; Kato, Honmou, Uede *et al.* 2000; Lu, Feron, Ho *et al.* 2001; Roisen,

Clueber, Lu *et al.* 2001; Ramer, Au, Richter *et al.* 2004; Murrell, Feron, Wetzig *et al.* 2005; Xiao, Clueber, Lu *et al.* 2005; Tarasenko, Gao, Nie *et al.* 2007; Yan, Xu, Welsh *et al.* 2007).

Os estudos realizados identificaram diferenças pouco importantes e consistentes nos resultados quando se utilizou neuroepitélio, lâmina própria ou ambos os tecidos, o que está de acordo com as evidências de que existem células estaminais nos tecido epitelial e no tecido não epitelial da mucosa olfactiva (Murdoch e Roskams 2007; Tome, Lindsay, Riddell *et al.* 2009). É necessário mencionar, todavia, que, ao contrário do que é referido na experimentação animal, a separação entre o epitélio e a lâmina própria na mucosa olfactiva humana não é fácil, por não se conseguir individualizar um plano nítido entre estas duas estruturas durante a microdissecção.

#### **4.5.3 Importância clínica dos resultados**

Os resultados contribuem para fundamentar a técnica que usamos para o tratamento da lesão traumática crónica severa da medula espinal, uma vez que esclarece a composição celular da mucosa olfactiva e quantifica as células estaminais. Este estudo tem uma importância acrescida pois as amostras foram obtidas a partir do material recolhido dos próprios doentes que foram operados pela técnica mencionada.

O estudo conclui ainda que é possível colher, isolar, identificar, cultivar e proliferar as células estaminais da mucosa olfactiva. Um aspecto importante da invenção na qual estes procedimentos são descritos tem a ver com a utilização de um meio sem soro (os meios com soro têm origem animal) para a cultura e proliferação das células estaminais. A utilização de um meio sem soro nos meios de cultura das células elimina a possibilidade de transmitir infecções às células cultivadas e abre novas perspectivas quanto à utilização das células cultivadas em investigações ou aplicações clínicas nos seres humanos (Hashimoto, Onodera, Ikeda *et al.* 2000; Zhang, Clueber, Guo *et al.* 2004; Carvalhal, Lima, Basto *et al.* 2007).

#### **4.5.4 Investigações futuras**

A invenção de um meio sem soro destinado à cultura de células estaminais da linha neural abre caminho a outras investigações na área da medicina regenerativa. É razoável antecipar que as células estaminais olfactivas autólogas, obtidas por biopsia endoscópica das fossas nasais e cultivadas em laboratório, possam ser utilizadas no tratamento de várias doenças traumáticas ou degenerativas do sistema nervoso central.

Para tal, é necessário otimizar as técnicas de cultura e desenvolver investigação laboratorial que preceda e acompanhe a necessária investigação clínica nesta área. A antecipação da transplantação autóloga, por outro lado, torna ainda mais necessário o envolvimento do otorrinolaringologia nas investigações, uma vez que não se trata apenas de realizar uma biopsia, há que estudar a mucosa olfactiva e cultivar as células em cada doente individual.

O Serviço de Otorrinolaringologia da instituição está associado à iniciativa de criar de um laboratório de cultura de células estaminais no Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, que servirá de suporte à realização de projectos de investigação de translação. Pretende-se que o laboratório se possa associar a instituições congéneres nacionais e internacionais ou à instituição académica, que tenha vocação multidisciplinar e ligação forte à clínica. Um dos projectos que está a ser preparado nesta área destina-se a avaliar a segurança e a eficácia da administração de células estaminais olfactivas autólogas no tratamento de pacientes com esclerose lateral amiotrófica.

#### **4.5.4. Conclusões**

As investigações realizadas na área da cultura das células estaminais da mucosa olfactiva foram importantes pois vieram consolidar e validar a técnica da autotransplantação de mucosa olfactiva no tratamento das lesões traumáticas crónicas da medula espinal.

Por outro lado, os resultados dos estudos irão contribuir para prosseguir na investigação de novas aplicações clínicas para as células estaminais da mucosa olfactiva.



## **CAPÍTULO 5**

### **SEGURANÇA E EFICÁCIA DOS AUTO-TRANSPLANTES DE MUCOSA OLFACTIVA NO TRATAMENTO DAS LESÕES TRAUMÁTICAS CRÓNICAS SEVERAS DA MEDULA ESPINAL EM SERES HUMANOS**



## 5.1 INTRODUÇÃO

Actualmente, já se assiste a uma transferência para a medicina clínica, mesmo que ainda em fase de ensaio experimental, dos progressos que têm sido obtidos em investigação nas ciências básicas no campo da medicina regenerativa. As lesões traumáticas crónicas da medula espinal, outrora tidas como irreversíveis e sem esperança de cura ou sequer de melhoria para os doentes, são um exemplo de uma situação onde as células estaminais poderão oferecer algumas esperanças de melhoria concreta, mesmo que limitada, a alguns dos doentes afectados, contribuindo para melhorar a capacidade funcional e a qualidade de vida destes doentes.

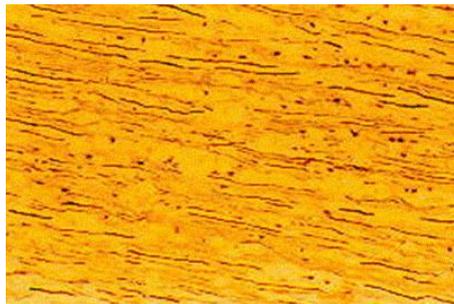
São dois os tipos de células que existem na mucosa olfactiva e reúnem um consenso entre os cientistas acerca do benefício potencial da sua utilização na regeneração e na reparação da medula espinal lesionada: as células estaminais e as OEC (Calof, Mumm, Rim *et al.* 1998; Huard, Youngentob, Goldstein *et al.* 1998; Kato, Honmou, Uede *et al.* 2000; Lu, Feron, Ho *et al.* 2001; Roisen, Klueber, Lu *et al.* 2001; Ramer, Au, Richter *et al.* 2004; Murrell, Feron, Wetzig *et al.* 2005; Xiao, Klueber, Lu *et al.* 2005; Tarasenko, Gao, Nie *et al.* 2007; Yan, Xu, Welsh *et al.* 2007).

A mucosa olfactiva é a única parte do sistema nervoso que mantém uma capacidade duradoura de neurogénese e axogénese durante toda a vida (Graziadei e Graziadei 1979), e a mucosa olfactiva e as suas células está prontamente acessível para colheita por meio de técnicas que são minimamente invasivas (Winstead, Marshall, Lu *et al.* 2005; Lima, Pratas-Vital, Escada *et al.* 2006).

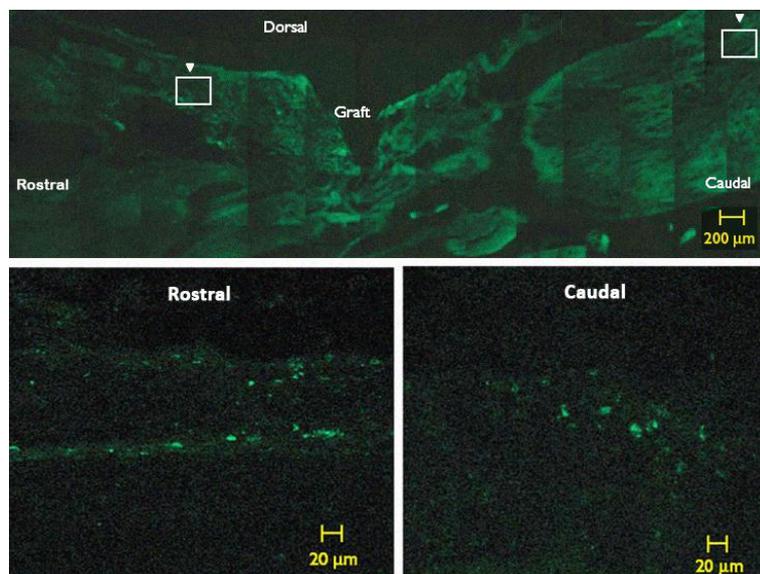
A hipótese principal deste estudo é a de que o tecido da mucosa olfactiva, uma vez transplantado para o local da lesão, pode promover a axogénese e a neurogénese nos doentes com lesão crónica traumática da medula espinal e levar a uma melhoria da condição neurológica, dos aspectos funcionais e da qualidade de vida destes doentes.

Do ponto de vista da interpretação dos resultados do estudo, e na impossibilidade de avaliar no ser humano, por motivos óbvios, as modificações histológicas induzidas pelo transplante no local da lesão –

modificações essas que já foram demonstradas em experimentação animal pelo nosso grupo de investigação (Lima e Pratas-Vital 1987; Iwatsuki, Yoshimine, Kishima *et al.* 2008) (Figuras 5.1 e 5.2) - é importante a verificação de que o mecanismo da melhoria, quando ocorra, tem a ver com o restabelecimento da conectividade neural e não com outros mecanismos ligados à plasticidade neuronal das zonas não lesionadas, que também já foram relatados (Steeves, Lammertse, Curt *et al.* 2007).



**Fig. 5.1** Imagem de um corte histopatológico marcado por técnica imunohistoquímica da medula espinal de um rato sacrificado 10 semanas após o autotransplante de mucosa olfactiva. Axónios paralelos e fibras citoqueratina-positivas, que não eram observáveis nos controlos, são observáveis na porção caudal da medula espinal (Lima, Pratas-Vital, Escada *et al.* 2004).



**Fig. 5.2** Imagem de um corte histopatológico da medula espinal de um rato sacrificado 10 semanas após o autotransplante de mucosa olfactiva. Duas semanas antes de ser sacrificado, foi realizada uma craniotomia e injectado no córtex motor o neuromarcador anterógrado imunofluorescente dextrana-amina-biotinilada (BDA). A imunofluorescência marca o tracto cortiço-espinhal. Verifica-se a presença do marcador quer na parte da medula espinal rostral à lesão e ao transplante (graft), quer na parte

caudal, apesar de nesta o marcador apresentar, naturalmente, uma distribuição mais limitada (Iwatsuki, Yoshimine, Kishima *et al.* 2008).

Nessa medida, os estudos experimentais que foram desenvolvidos pelo nosso grupo procuraram que o desenho de investigação permitisse responder também, com clareza, à questão anteriormente formulada. Para isso foram seleccionados unicamente doentes sem qualquer actividade motora abaixo do nível da lesão da medula espinal, isto é com lesões motoras completas, e cuja lesão fosse crónica. Nestes doentes a história natural da sua condição neurológica já foi bem documentada: qualquer recuperação neurológica é nula ou muitíssimo limitada (McDonald, Becker, Sadowsky *et al.* 2002; Burns, Lee, Ditunno *et al.* 2003; Kirshblum, Millis, McKinley *et al.* 2004; Fisher, Noonan, Smith *et al.* 2005), mesmo quando são realizados programas intensos de reabilitação (Wirz, Colombo e Dietz 2001; Harness, Yozbatiran e Cramer 2008).

Deve ser mencionado que a valorização do significado clínico dos resultados obtidos com os tratamentos, na perspectiva dos doentes, estará mais bem representada em variáveis que avaliem a sua capacidade funcional para realizar as actividades do dia-a-dia ou que avaliem o seu nível de participação nas actividades sociais (qualidade de vida). Todavia, não cabe no âmbito nem é propósito desta tese uma discussão mais aprofundada dos aspectos que se prendem com a recuperação neurológica dos doentes em todos as vertentes e nas suas diferentes dimensões. Pelo contrário, numa óptica que interessa mais à otorrinolaringologia e que se dirige predominantemente para o esclarecimento do papel efectivo das células estaminais da mucosa olfactiva na regeneração e reparação da medula espinal, as variáveis que importa apresentar com maior ênfase neste trabalho são, como já foi referido, as que sejam representativas do restabelecimento da *conectividade* neural e sirvam, em consequência, como “*prova do princípio*”. São elas: a recuperação neurológica, em particular a recuperação neurológica motora abaixo do nível da lesão; e avaliações electrofisiológicas que documentem objectivamente a conectividade, como a electromiografia ou os potenciais evocados somatosensitivos.

Este trabalho apresentará os resultados de 2 estudos que já foram realizados:

O primeiro - um estudo piloto realizado em seres humanos - um ensaio clínico da Fase 1 – que descreve os resultados dos autotransplantes de mucosa olfactiva realizados em 7 doentes entre Julho de 2001 e Março de 2003. Este estudo já foi publicado numa revista norte americana com comité de selecção, o Journal of Spinal Cord Medicine ([Lima, Pratas-Vital, Escada et al. 2006](#)) e nele não se registaram complicações ou efeitos adversos importantes, tendo-se observado melhorias significativas no estado neurológico – actividade motora e sensibilidade - num período de follow-up que foi até aos 18 meses.

O segundo – um ensaio clínico da Fase 2 – que descreve os resultados dos autotransplantes de mucosa olfactiva realizados entre Novembro de 2003 e Março de 2006 em 20 doentes adicionais. Os resultados deste estudo foram também recentemente publicados numa outra revista norte americana com comité de selecção, o Neurorehabilitation and Neural Repair ([Lima, Escada, Pratas-Vital et al. 2009](#)). Neste estudo, verificou-se uma complicação significativa em 1 doente - um quadro de meningite asséptica que requereu reinternamento - e observaram-se melhorias significativas no estado neurológico, nas avaliações electrofisiológicas, na capacidade funcional e na qualidade de vida dos doentes.

## **5.2 OBJECTIVOS**

O objectivo principal destes estudos é o de demonstrar a segurança e a eficácia dos auto-transplantes de mucosa olfactiva no tratamento das lesões traumáticas crónicas da medula espinal.

Secundariamente, pretende-se provar o papel da mucosa olfactiva nos resultados dos estudos, apresentando evidências da conectividade neural.

## **5.3 MÉTODOS**

### **5.3.1 Estudo da Fase 1**

#### **5.3.1.1 Desenho do estudo**

Este estudo foi concebido como um estudo piloto (com um número limitado de doentes), destinado primariamente a provar a exequibilidade e a segurança da técnica cirúrgica, e nessa medida foi considerado um estudo da fase 1. Foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Egas Moniz e todos os participantes deram o seu consentimento informado por escrito.

#### **5.3.1.2 Seleccção dos doentes e critérios de inclusão**

Foram seleccionados doentes cronicamente paraplégicos ou tetraplégicos, com lesão traumática da medula espinal ocorrida há mais de 6 meses. Os doentes foram recrutados ao longo de 2 anos, para que o estudo pudesse ser interrompido se se registassem efeitos adversos importantes. Os critérios de inclusão foram: lesão motora completa da medula espinal; idade  $\geq 18$  e  $\leq 35$  anos; lesão na medula cervical ou na medula torácica; ausência de patologia naso-sinusal; ausência de problemas médicos adicionais, outras doenças neurológica e distúrbios psicológicos.

Foram seleccionados 7 doentes (4 paraplegicos e 3 tetraplégicos), 4 do sexo masculino e 3 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 18 e os 32 anos (média de 23 anos).

Os doentes tinham lesões na medula espinal que tinham ocorrido entre 6 e 78 meses antes (média 33 meses). As lesões tinham resultado de acidentes de viação (6 casos) ou de quedas (1 caso), situavam-se a um nível da medula espinal entre C4 e T10 e tinham entre 1,3 a 4 cm de maior dimensão vertical (média de 2,7 cm).

### **5.3.1.3 Operação**

O protocolo da operação já foi descrito noutra secção desta tese.

### **5.3.1.4. Estudos de seguimento**

As avaliações pré- e pós-operatórias incluíram: avaliação neurológica pela escala de incapacidade da Associação Americana da Lesão Espinal (American Spinal Injury Association – ASIA) (ASIA 2002; ASIA 2003), electromiografia (EMG), estudos urodinâmicos, ressonância magnética da medula espinal, exame otorrinolaringológico e avaliação psicológica.

O estado neurológico dos doentes foi determinado de 6 em 6 meses.

A avaliação otorrinolaringológica incluiu uma avaliação completa dos ouvidos, fossas nasais (com endoscopia nasal) e faringe, avaliação da capacidade olfactiva (teste de olfacto *Smelldiskettes*® da Novimed Medizintechnik, Zurique, Suíça) e tomografia computadorizada naso-sinusal.

A duração do seguimento foi de 18 meses em todos os doentes.

### **5.3.1.5 Análise estatística**

Foram utilizados testes não paramétricos. A percentagem de doentes com melhoria no grau ASIA foi avaliada com o teste de McNemar. As pontuações dos 4 componentes da escala ASIA foram avaliadas com os testes de Wilcoxon e Friedman ANOVA.

### **5.3.1.6 Financiamento**

As despesas da operação e da reabilitação foram suportadas pelo Serviço Nacional de Saúde.

## 5.3.2 Estudo da Fase 2

### 5.3.2.1 Desenho do estudo

O estudo prospectivo, não aleatorizado e não controlado, foi aprovado pelas Comissões de Ética do Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental e dos outros centros associados. Todos os participantes deram o seu consentimento informado por escrito e estavam plenamente conscientes da natureza experimental do tratamento, da incerteza dos resultados e dos efeitos secundários possíveis, tais como dor, espasticidade, disautonomia, agravamento das funções motoras e sensitivas, infecção e outros efeitos adversos imprevistos.

### 5.3.2.2 Selecção dos doentes e critérios de inclusão

Os doentes foram seleccionados de entre os indivíduos com lesão traumática da medula espinal com mais de 12 meses desde a lesão e foram referenciados de centros de reabilitação portugueses e um centro italiano, especializados em tratamento de doentes com lesões vértebro-medulares (Quadro 5.1.).

**Quadro 5.1** Centros de reabilitação participantes do estudo

Designação	País	n
Centro de Medicina de Reabilitação Rovisco Pais, Tocha	Portugal	7
Serviço de Medicina Física e de Reabilitação do Hospital S. Sebastião, Feira	Portugal	5
Centro Giusti, Florença	Itália	8

Os critérios de inclusão foram: lesão motora completa da medula espinal; idade  $\geq 18$  e  $\leq 40$  anos; lesão na medula cervical  $\leq 3$  cm ou na medula torácica  $\leq 4$  cm; ausência de patologia naso-sinusal; ausência de problemas médicos adicionais, outras doenças neurológicas e distúrbios psicológicos.

Foram seleccionados 20 doentes com lesão traumática crónica da medula espinal (7 paraplégicos e 13 tetraplégicos), 17 do sexo masculino e 3 do

sexo feminino, com idades compreendidas entre os 19 e os 37 anos (média de 30 anos).

Os doentes tinham lesões na medula espinal que tinham ocorrido entre 18 a 189 meses antes (média 49 meses), como resultado de acidentes de viação (14 casos), acidentes desportivos (4 casos) e acidentes de trabalhos (2 casos). As lesões situavam-se a um nível variável da medula espinal entre C4 e T12 e tinham entre 1,3 a 4 cm de maior dimensão vertical (média de 2,4 cm).

### **5.3.2.3 Operação**

O protocolo circunstanciado da operação já foi descrito noutra secção desta tese.

### **5.3.2.4 Reabilitação pré- e pós-operatória**

Todos os doentes realizaram reabilitação pré-operatória ( $31,8 \pm 6,8$  horas semanais durante  $34,7 \pm 30$  semanas) e reabilitação pós-operatória ( $32,7 \pm 5,2$  horas semanais durante  $92 \pm 37,6$  semanas). O trabalho de reabilitação incluiu estratégias de fisioterapia estandardizadas para promover a função motora ao nível e abaixo do nível da lesão, iniciando o treino de marcha logo que possível.

### **5.3.2.5 Estudos de seguimento**

As avaliações pré- e pós-operatórias incluíram: avaliação neurológica pela escala de incapacidade da Associação Americana da Lesão Espinal (*American Spinal Injury Association – ASIA*) ([ASIA 2002](#); [ASIA 2003](#)), electromiografia (EMG), potenciais evocados somatosensitivos (SSEP), estudos urodinâmicos, ressonância magnética da medula espinal, exame otorrinolaringológico e avaliação psicológica.

Em 13 doentes foram aplicadas escalas para avaliar a capacidade funcional para realizar as actividades do dia-a-dia (*Functional Independence Measure*

- FIM) (Ditunno 1992; Anderson, Aito, Atkins *et al.* 2008) ou para avaliar a marcha (*Walking Index for Spinal Cord Injury - WISCI*) (Ditunno, Ditunno, Graziani *et al.* 2000).

O estado neurológico dos doentes foi determinado de 6 em 6 meses.

A avaliação otorrinolaringológica foi sobreponível à realizada no estudo da Fase 1, todavia, uma vez que muitos dos doentes fizeram o seu follow-up em centros de reabilitação distantes de Lisboa, não foi possível o exame objectivo, a endoscopia nasal ou a administração de testes olfactivos no follow-up mais distante, tendo alternativamente sido administrado um questionário no qual era inquirido o aparecimento ou permanência dos seguintes sintomas: diminuição do olfacto; diminuição do gosto; obstrução nasal; rinorreia; epistáxis; e cefaleias.

A duração média do follow-up foi de 27,7 meses (mínimo de 12 e máximo de 45 meses).

### 5.3.2.6 Variáveis estudadas

As variáveis definidas para avaliar a segurança e a eficácia estão apresentadas no Quadro 5.2.

**Quadro 5.2** *Outcome measures*

---

---

<b>Segurança</b>
Mortalidade
Incidência de complicações
Taxa de reinternamento
Percentagem de doentes com agravamento do grau na escala ASIA
Percentagens de doentes que não recuperaram o olfacto
<b>Eficácia</b>
Melhoria do grau na escala ASIA
Variação nas pontuações da escala ASIA
Percentagem de doentes que recuperaram a sensibilidade anal
Percentagem de doentes que recuperaram o controlo do esfíncter anal
Percentagem de doentes que recuperaram a sensibilidade vesical
Percentagem de doentes que recuperaram o controlo do esfíncter vesical
Variação no resultado da escala funcional FIM
Variação no resultado da escala funcional WISCI

---

### **5.3.2.7 Análise estatística**

Devido ao reduzido número da amostra ( $n = 20$ ), foi necessária a utilização de testes exactos não paramétricos em vez de testes paramétricos assintóticos. O teste de Wilcoxon (*signed-rank test* ou teste de postos com sinais) foi escolhido para testar a presença de qualquer diferença estatisticamente significativa entre as avaliações iniciais e as últimas avaliações realizadas. A regra de decisão estatística baseou-se num nível alfa de 0,05.

### **5.3.2.8 Financiamento**

As despesas da operação e da reabilitação foram suportadas pelo Serviço Nacional de Saúde (doentes portugueses) e pelas autoridades de saúde regionais da Toscana, Florença (doentes italianos).

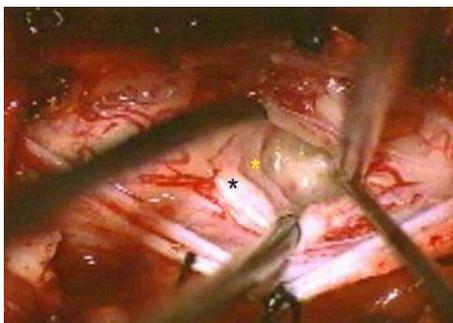
## 5.4. RESULTADOS

### 5.4.1 Estudo da Fase 1

#### 5.4.1.1 Exequibilidade

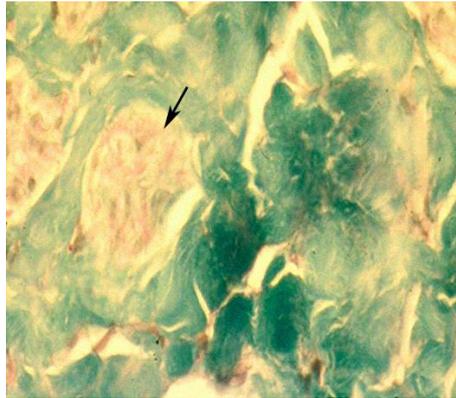
As intervenções cirúrgicas foram realizadas entre os dias 26 de Julho de 2001 e 12 de Março de 2003 e foram bem toleradas por todos os doentes.

Em todos os casos foi possível diferenciar microscopicamente, no intra-operatório (microscópio cirúrgico), o tecido nervoso normal da medula espinal do tecido lesado (Figura 5.3).



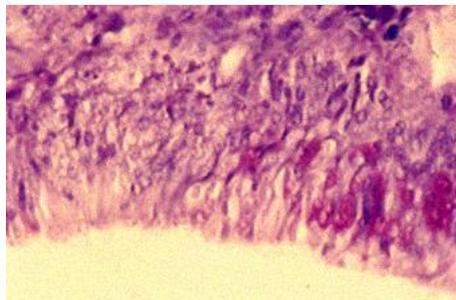
**Fig. 5.3** Campo cirúrgico da medula espinal de um doente, observando-se a cavidade da lesão medular, o tecido cicatricial que irá ser removido (asterisco amarelo) e o tecido nervoso de aspecto normal (asterisco negro).

O exame histológico do tecido cicatricial removido do campo cirúrgico revelou a sua composição mista de elementos gliais e fibróticos, com astrocitos, fibroblastos, colagéneo e laminina (Figura 5.4)



**Fig. 5.4** O tecido cicatricial removido da medula espinal de um doente operado evidencia a exuberância de colagénio (verde) com raros axónios em feixes, envolvidos por células de Schwan (Coloração Tricrómico de Masson 200X).

O exame histológico do transplante confirmou que se tratava de mucosa olfactiva contendo células estaminais em todos os espécimens examinados (Figura 5.5) e o exame microbiológico directo e cultural do mesmo tecido foi sempre negativo para bactérias, parasitas e fungos.



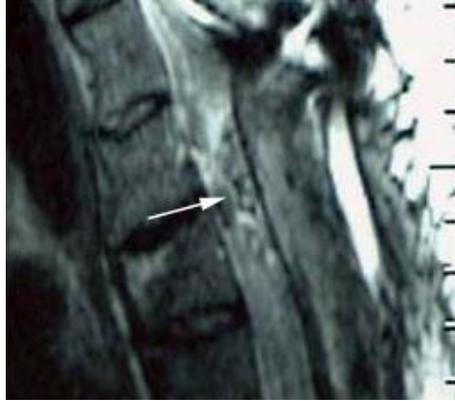
**Fig. 5.5** Histologia da mucosa olfactiva num espécimen recolhido de um dos enxertos utilizados nas operações (Coloração H&E X200).

#### **5.4.1.2. Segurança**

Não se registaram complicações pós-operatórias sistémicas, infecção na ferida cirúrgica e complicações nas fossas nasais ou a nível neurológico.

A ressonância magnética realizada aos 6 meses de pós-operatório revelou um preenchimento praticamente completo do local da lesão em todos os doentes excepto naquele que tinha a lesão com maiores dimensões (6 cm). O preenchimento das lesões tinha um aspecto de “sal e pimenta” (Figura

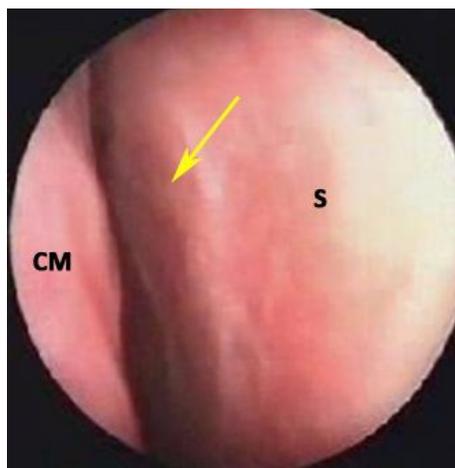
5.6.) e não se se documentaram evidências de crescimento neoplásico do tecido transplantado.



**Fig. 5.6** Ressonância magnética. Ponderação T2 sagital de um doente tetraplégico em T5, com lesão completa motora e sensitiva (ASIA A), 6 meses após a intervenção cirúrgica, revelando o aspecto típico em “sal e pimenta”.

Um doente registou um agravamento da sua condição neurológica no pós-operatório, só na sensibilidade. Dois doentes mencionaram o aparecimento de dor no tronco ou nos membros inferiores, mas a dor foi controlada com medicação (gabapentina). Não se registaram efeitos adversos no que diz respeito à espasticidade, disreflexia ou controle da temperatura corporal.

Não se registaram queixas nasais importantes no período do pós-operatório. A endoscopia nasal documentou a epitelização completa da fenda olfactiva em 2 doentes (Figura 5.7) e a presença de algumas sinéquias e tecido cicatricial em 5 doentes. O olfacto normalizou dentro de um período de 3 meses em todos os doentes.

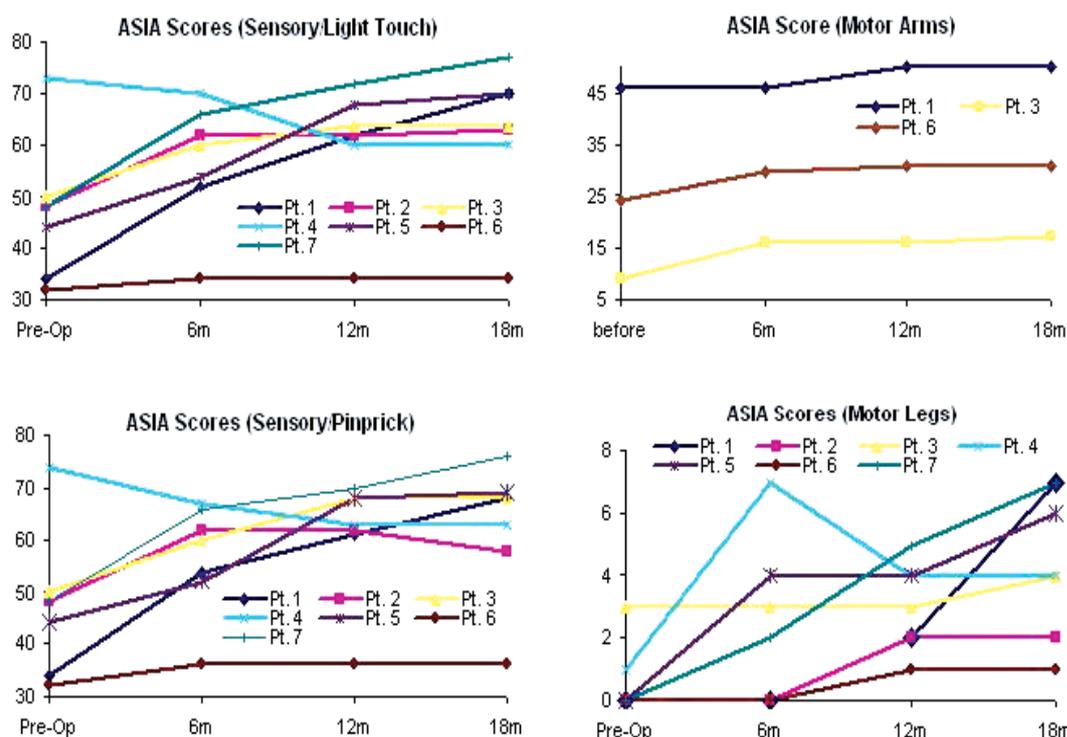


**Fig. 5.7** Imagem endoscópica da fossa nasal de um dos doentes do estudo da fase 1 no 3º mês de pós-operatório. Observa-se a epiteliação praticamente perfeita da superfície septal da região olfactiva (seta) (S=septo nasal; CM=corneto médio).

#### **5.4.1.3 Eficácia**

A avaliação neurológica incluiu a aplicação da escala ASIA aos 7 doentes, desde o pré-operatório até aos 18 meses, com avaliações realizadas de 6 em 6 meses (Figura 5.8). Dois doentes transitaram do grau A para o grau C da escala ASIA. Observou-se uma melhoria nas pontuações dos diferentes componentes motores e sensitivos em todos os doentes excepto num, o doente número 4. A melhoria teve significado estatístico em todos os componentes motores e sensitivos: teste de Friedman, *sensory light touch* ( $\chi^2=9.857$ ,  $P=0.02$ ), *sensory pinprick* ( $\chi^2=8.143$ ,  $P=0.043$ ), motor membros superiores ( $\chi^2=7.962$ ,  $P=0.047$ ), e motor membros inferiores ( $\chi^2=14.288$ ,  $P=0.003$ ).

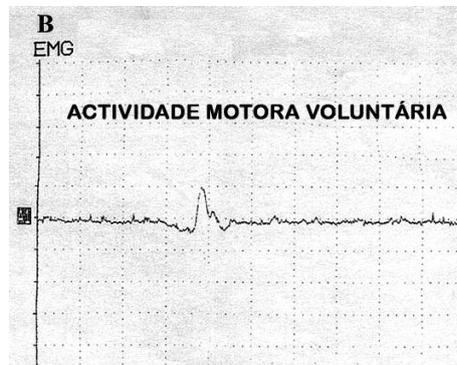
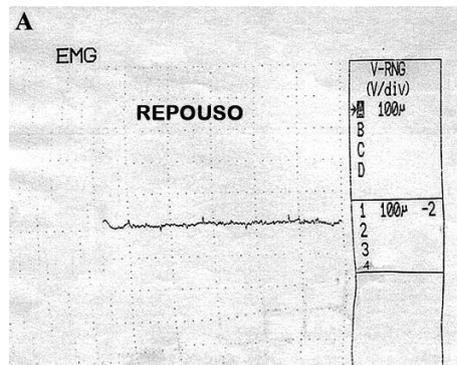
Em 2 doentes registou-se o aparecimento de actividade motora voluntária abaixo do nível da lesão, 1 doente recuperou a contracção voluntária do esfíncter anal e 2 doentes recuperaram a sensibilidade vesical (sensação de plenitude vesical).



**Fig. 5.8** Pontuações dos 4 componentes da escala ASIA nos 7 doentes durante os 18 meses de follow-up.

Em 3 doentes nos quais havia a indicação de que apresentavam novos movimentos voluntários, a electromiografia confirmou a contracção voluntária desses músculos (Figura 5.9).

Apesar das melhorias neurológicas que se registaram terem sido limitadas, tiveram um impacto muito importante na sua qualidade de vida, permitindo, entre outras coisas, dar passos com apoio de outras pessoas, mover as pernas para diante sem ajudas utilizando canadianas, realizar transferências da cadeira de rodas (nos doentes tetraplégicos).



**Fig. 5.9 (A e B)** Electromiografia do músculo longo adutor da coxa esquerdo num doente que era tetraplégico no pré-operatorio.

## 5.4.2. Estudo da Fase 2

### 5.4.2.1 Segurança

Não houve mortalidade na nossa série. Em 5 (25%) dos doentes registaram-se efeitos adversos resultantes do tratamento. Três tiveram complicações mínimas que resolveram espontaneamente (colecção subcutânea de líquido cefalo-raquidiano ao longo da cicatriz) ou com tratamentos simples (Quadro 5.3). Um doente desenvolveu um quadro tardio (um ano) de uma síndrome do cólon irritável, que requereu modificações dietéticas e medicação.

**Quadro 5.3** Incidência de complicações

n	Complicação	Tratamento
1	Colecção subcutânea de LCR	Resolveu espontaneamente
1	Pneumonia	Antibióticos
1	Epistáxis	Tamponamento nasal
1	Síndrome do cólon irritável	Dieta, fármacos antiespasmódicos e antidepressivos
1	Meningite asséptica	Antibióticos

Apenas se registou uma complicação mais severa que requereu reinternamento (5%). O doente em questão desenvolveu um quadro de meningite asséptica 2 semanas depois da operação, associado a uma deterioração do estado neurológico sensitivo e motor. Houve evidências imagiológicas (ressonância magnética) de edema da medula espinal. As manifestações agudas resolveram em 3 semanas com antibióticos (vancomicina) e dexametasona. O doente recuperou o seu estado neurológico motor aos 2 meses, todavia não recuperou na totalidade o seu estado neurológico sensitivo.

A maior parte da dor registada neste estudo foi de origem músculo-esquelética ou cirúrgica, e resolveu com normalidade. Um dos doentes desenvolveu um quadro tardio de síndrome do cólon irritável, que foi

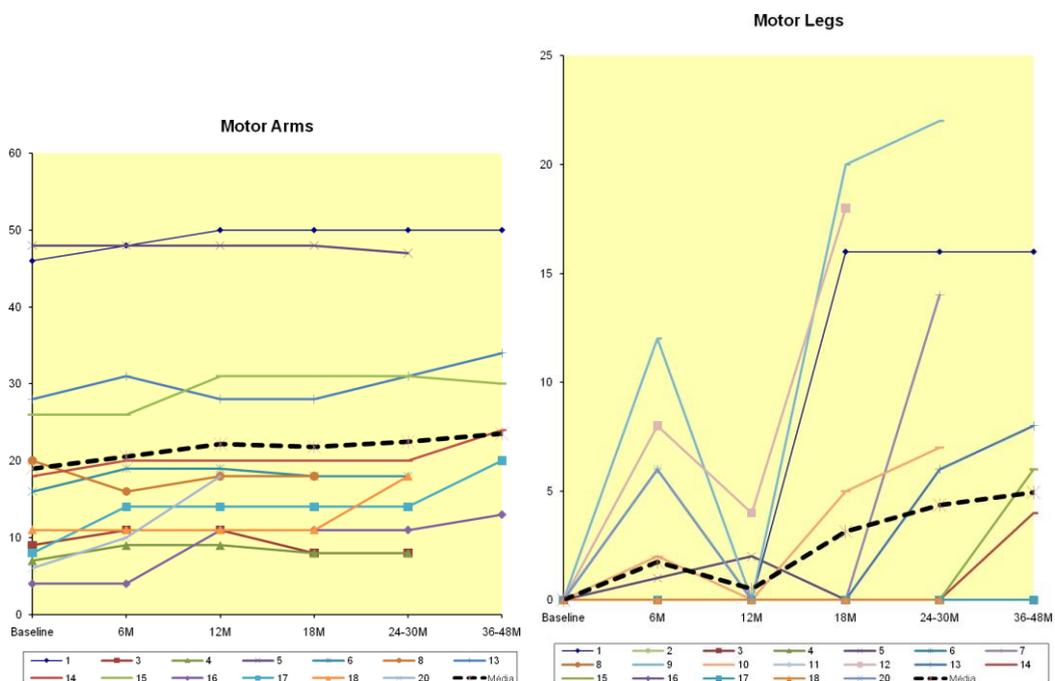
interpretado como de dor visceral. Não se registaram casos de aumento da espasticidade no pós-operatório.

Todos os doentes mencionaram ter recuperado o olfacto, 95% deles em menos de 3 meses. Todos os doentes negaram ainda o aparecimento de défices do gosto, obstrução nasal, rinorreia, epistáxis e cefaleias.

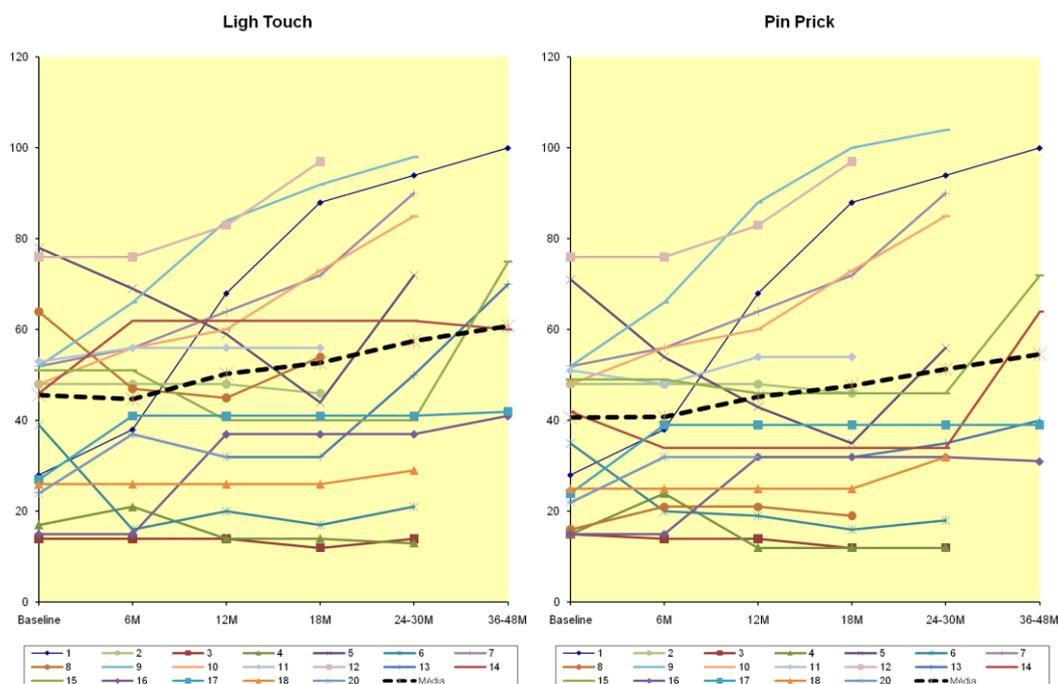
## 5.4.2.2 Eficácia

### 5.4.2.2.1 Avaliação neurológica (escala ASIA)

Os resultados estão sumarizados nas Figuras 5.10. e 5.11. A melhoria neurológica média nos diferentes componentes da escala ASIA (motor membros superiores, motor membros inferiores, *light touch* and *pin prick*) foi estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ). A variação foi ponderada entre o pré-operatório e a última observação realizada ( $28 \pm 11$  meses).



**Fig. 5.10** Pontuações dos componentes motores da escala ASIA nos 20 doentes do estudo da Fase 2. A pontuação dos membros superiores (motor arms) só foi determinada nos 13 doentes tetraplégicos. A linha tracejada representa os valores médios.



**Fig. 5.11** Pontuações dos componentes sensitivos da escala ASIA nos mesmos doentes.

Nove (45%) dos doentes que tinham pontuação de 0 na actividade motora voluntária dos membros inferiores melhoraram a sua pontuação nesta alínea para valores entre 4 e 22, demonstrando que houve uma recuperação motora importante abaixo do nível da lesão da medula espinal, o que, como anunciámos anteriormente, é uma evidência de conectividade neural e da eficácia das células estaminais olfactivas na regeneração da medula espinal.

Dos 15 doentes que não tinham sensibilidade anal na avaliação inicial, 9 tinham-na recuperado no momento da última observação: 5 doentes no primeiro ano e os restantes doentes depois deste tempo. Cinco dos 20 doentes sem contracção voluntária do esfíncter anal recuperaram-na: 1 doente no primeiro ano e os restantes doentes mais tarde.

Dos 15 doentes que não tinham sensibilidade na bexiga (sensação de plenitude) na avaliação inicial, 5 recuperaram-na: 1 doente no primeiro ano e os restantes doentes depois dessa data. Apenas 1 dos 20 doentes sem controlo do esfíncter vesical recuperou neste aspecto, ao 22º mês do pós-operatório.

Onze (55%) dos doentes melhoraram o seu grau da escala ASIA: 6 doentes do grau A para o grau C, 3 doentes do grau B para o grau C e 2 doentes do grau A para o grau B (Quadro 5.4).

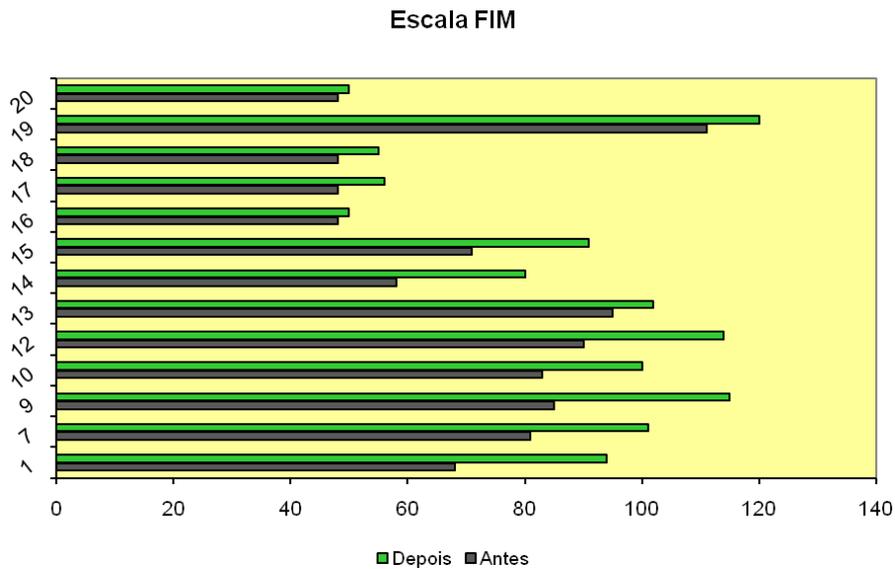
**Quadro 5.4** Sumário dos graus da Escala ASIA

Doente	Baseline	Grau ASIA no pós-operatório					
		6M	12M	18M	24-30M	36-48M	LOCF
1	A	A	B	C	C	C	C
2	A	A	A	A	-	-	A
3	A	A	A	A	A	-	A
4	A	A	A	A	A	-	A
5	B	C	C	B	B	-	B
6	A	A	A	A	A	-	A
7	A	A	A	B	C	-	C
8	B	A	A	A	-	-	A
9	A	B	C	C	C	-	C
10	A	A	A	A	B	-	B
11	A	A	A	A	-	-	A
12	A	A	B	C	-	-	C
13	A	A	A	A	A	C	C
14	B	B	B	B	C	C	C
15	B	A	A	B	C	C	C
16	A	A	A	A	A	A	A
17	A	A	A	A	A	B	B
18	A	A	A	A	A	-	A
19	A	A	C	-	-	-	C
20	B	B	C	-	-	-	C

M = meses; LOCF = *last observation carried forward*

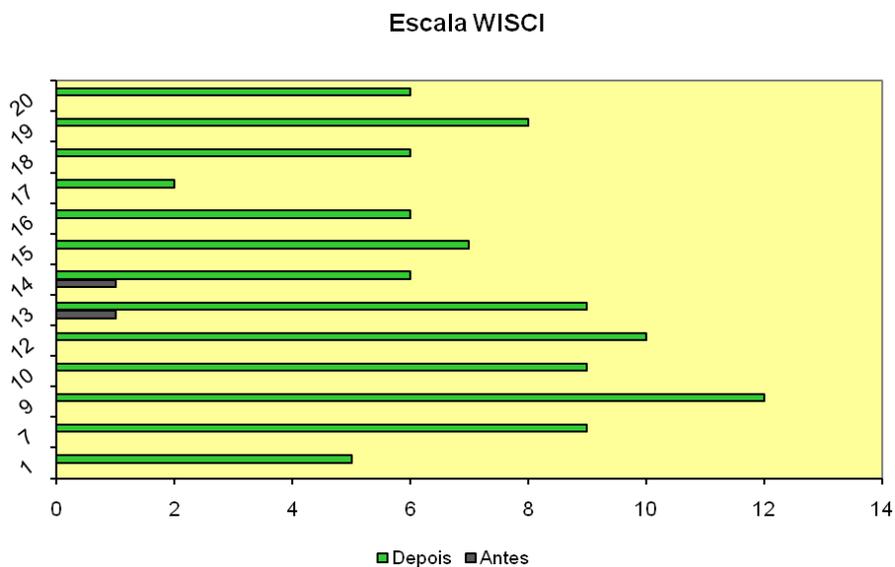
#### 5.4.2.2 Avaliação funcional e da marcha

Treze doentes provenientes de 2 dos 3 centros de reabilitação (Centro Giustu e São Sebastião, Santa Maria da Feira) foram avaliados com estudos funcionais. A pontuação média da escala FIM (*Functional Independence Measure*), destinada a avaliar a capacidade para a realização das actividades diárias, passou de  $71 \pm 23$  no pré-operatório para  $85 \pm 28$  no último *follow-up* ( $p < 0,01$ ) (Figura 5.12).



**Fig. 5.12** Todos os doentes melhoraram na pontuação da escala FIM, destinada a avaliar as capacidades para realizar as actividades diárias.

A pontuação média da escala WISCI (*Walking Index for Spinal Cord Injury*), destinada a avaliar a marcha, passou de  $0,2 \pm 0,4$  na primeira observação para  $7,4 \pm 2,6$  no último *follow-up* ( $p < 0,01$ ) (Figura 5.13).



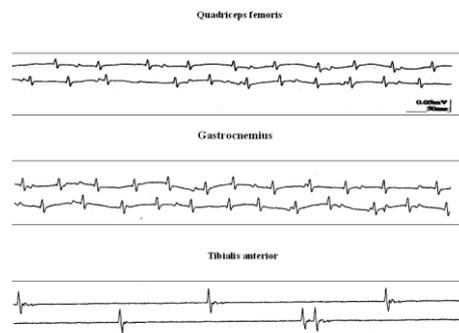
**Fig. 5.13** A melhoria na escala destinada a marcha foi ainda mais impressionante.

Em termos clínicos, dos 13 doentes avaliados por esta escala: 1 consegue deambular com canadianas e talas e sem ajudas de outras pessoas, 10

conseguem deambular com andarilhos e ajuda e 2 outros doentes conseguem deambular apenas em barras paralelas. No pré-operatório nenhum destes doentes conseguia realizar qualquer deambulação.

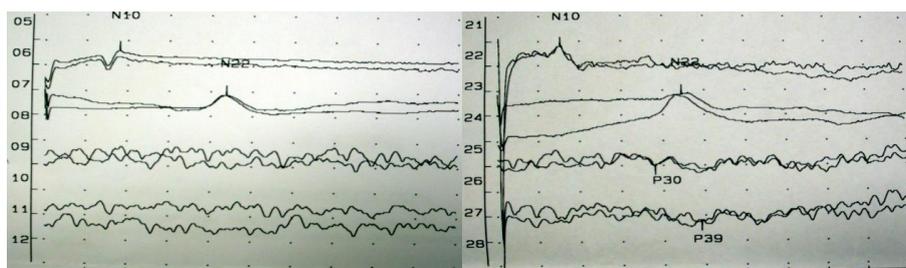
#### 5.4.2.2.3 Avaliações electrofisiológicas

Na electromiografia foi documentada actividade voluntária que não existia no pré-operatório em 15 (75%) dos doentes. Em 6 tetraplégicos e 5 paraplégicos registaram -se potenciais motores voluntários nos membros inferiores (Figura 5.14).



**Fig. 5.14** Achados electromiográficos dos músculos dos membros inferiores registados aos 18 meses de follow-up, num doente previamente tetraplégico (C6-C7) com lesão motora e sensitiva completa (grau A da escala ASIA): os potenciais foram registados durante a actividade voluntária nos músculos quadríceps femoral, gastrocnémio e tibial anterior.

Nos potenciais evocados somatosensitivos recolhidos a nível cortical (córtex cerebral) a partir de uma estimulação do nervo tibial, registou-se actividade eléctrica que não existia no pré-operatório em 4 doentes (Figura 5.15.).



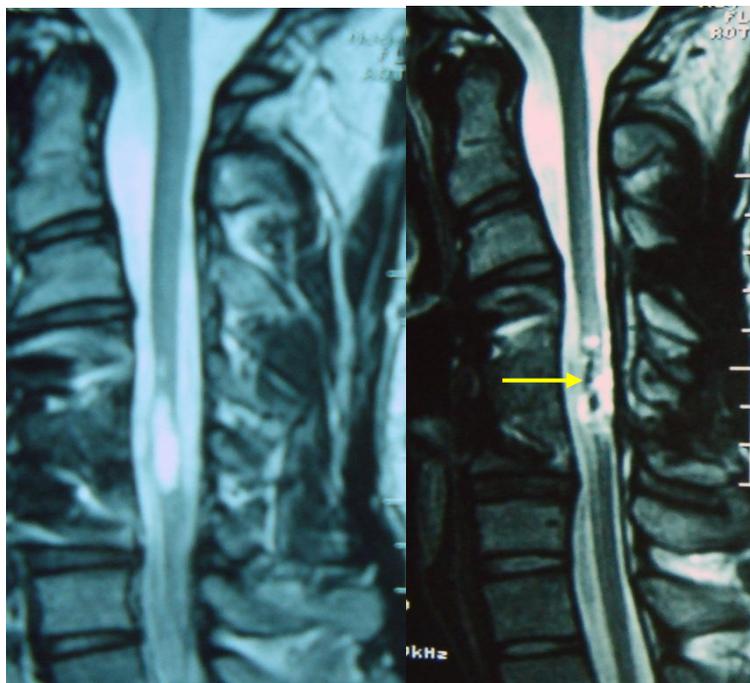
**Fig. 5.15** Achados dos potenciais evocados somatosensitivos (registo superior=pré-operatório; registo inferior=pós-operatório): observa-se a presença de novas ondas P30 e P39 8 meses após a operação.

#### 5.4.2.2.4 Estudos urodinâmicos

Observaram-se melhorias nos resultados dos estudos urodinâmicos no pós-operatório em 5 doentes, e particularmente em 1 deles os resultados foram muito significativos, pois houve evidência de contracção voluntária do esfíncter vesical.

#### 5.4.2.2.5 Ressonância magnética

A ressonância magnética evidenciou o preenchimento completo ou quase completo do local da lesão em todos os doentes. A aparência da área da medula espinal enxertada pode ser descrita como de “sal e pimenta”, em “pipoca” (“*pop corn*”) ou uma aparência mista entre estas duas (Lima, Pratas-Vital, Escada *et al.* 2006). A aparência em “pipoca”, uma aparência mais heterogênea e multiloculada é geralmente observada numa fase mais crónica após o tratamento cirúrgico (Figura 5.16). Nunca se documentaram evidências de crescimento neoplásico do tecido ou siringomielia em nenhum dos doentes.



**Fig. 5.16** Ressonância magnética. Esquerda: ponderação T2 sagital de um doente tetraplégico em C5, com lesão completa motora e sensitiva (ASIA A), revelando uma lesão quística; Direita:

ponderação T2 sagital do mesmo doente no pós-operatório mostra a aparência em “pipoca” típica das fases crónicas.

## 5.5. DISCUSSÃO

### 5.5.1. Resumo geral dos resultados

Os resultados destes estudos permitem demonstrar que a utilização de autotransplantes de mucosa olfactiva no tratamento de doentes com lesão crónica traumática e severa da medula espinal é realizável, razoavelmente segura e potencialmente benéfica.

### 5.5.2. Limitações do estudo

As maiores limitações que podem ser atribuídas a este trabalho derivam de não ser um estudo com grupo de controlo, selecção aleatorizada e duplamente cego. Um desenho do estudo que incluísse estas características teria maior valor científico na confirmação da eficácia deste tipo de tratamento. Todavia, existem motivos, sobretudo de ordem ética, para o desenho do estudo que foi realizado.

Em primeiro lugar, para que o estudo pudesse ter as características atrás mencionadas como as ideais, os doentes alocados ao grupo de controlo teriam que ser submetidos a uma operação fictícia (*sham operation*) que deveria incluir um procedimento nasal e um procedimento na coluna vertebral. Ora isso seria eticamente questionável, tal como já foi declarado em *guidelines* realizadas para orientar os ensaios clínicos destinados a avaliar os tratamentos dos doentes com lesões traumáticas da medula espinal. Essas *guidelines* referem que não se deve realizar qualquer procedimento que comporte riscos de morbilidade, sem que o mesmo não comporte em contrapartida alguma probabilidade de benefício para o doente, mesmo que hipotético (Fawcett, Curt, Steeves *et al.* 2007; Lammertse, Tuszynski, Steeves *et al.* 2007; Steeves, Lammertse, Curt *et al.* 2007; Tuszynski, Steeves, Fawcett *et al.* 2007). Ora esse não seria com certeza o caso se estas *sham operations* fossem realizadas. O mesmo documento refere ainda que as operações fictícias comportando riscos só seriam aceitáveis quando as mesmas já façam parte dos cuidados habituais no tratamento destas situações, o que também não é o caso.

O grupo de controlo possível para um estudo deste tipo poderia ser aquele que não incluiria operações fictícias mas apenas a reabilitação. Os 2 grupos do estudo seriam: o grupo do tratamento, que incluiria o tratamento cirúrgico e a reabilitação; e o grupo de controlo, que só incluiria a reabilitação. Não é fácil o recrutamento de doentes para um estudo deste tipo, pois os doentes dificilmente aceitam pertencer a um grupo de controlo acreditando que teriam maior possibilidades de melhoria se pertencessem ao grupo do tratamento. Todavia, estamos a planear realizar um estudo com este desenho futuramente, caso seja possível obter financiamento. De qualquer forma, há que reconhecer que a história natural da lesão traumática crónica da medula espinal é bem conhecida, quer quando evolui sem qualquer tratamento, quer quando se faz reabilitação, mesmo que intensiva: de acordo com a literatura médica a transformação de uma lesão motora e sensitiva completa em incompleta é limitada (menos de 2,1% dos casos) e não se observaram nunca recuperações motoras abaixo do nível da lesão (Wirz, Colombo e Dietz 2001; Kirshblum, Millis, McKinley *et al.* 2004; Harness, Yozbatiran e Cramer 2008). Por essa razão, os resultados obtidos em estudos concretos, como o nosso, podem ser comparados com o que se conhece da história natural da doença. Além disso, como os doentes submetidos ao tratamento com mucosa olfactiva são doentes crónicos, o doente poderá ser usado como o seu próprio controlo, se a evolução depois do tratamento for comparada com a evolução que se observou antes do tratamento, desde que o mesmo tipo de reabilitação for realizado antes e depois da operação.

Outra limitação que pode ser atribuída ao nosso estudo é a falta de uniformização do transplante utilizado no nosso procedimento, que não elimina a variabilidade entre as características e a composição celular individual dos transplantes. Esta limitação putativa decorre da opção, por nós assumida, de realizar uma transplantação com material autólogo não processado laboratorialmente, pois existem evidências de que a mucosa olfactiva completa pode ter vantagens relativamente à utilização de células isoladas obtidas por meio de cultura (Lowhagen, Johansson e Nordborg 1994; Clarkson, Zawada, Adams *et al.* 1998; Lu, Feron, Ho *et al.* 2001; Lima, Pratas-Vital, Escada *et al.* 2006; Carvalho, Lima, Basto *et al.* 2007). Por outro lado, apesar da provável variabilidade individual na composição dos transplantes, já conduzimos estudos

laboratoriais suficientes para a caracterização do material que usamos para o enxerto no que diz respeito à sua composição (ver capítulo anterior) (Carvalho, Lima, Basto *et al.* 2007).

### **5.5.3. Validação dos resultados por entidade externa**

É importante mencionar que, depois da realização e publicação dos resultados do estudo da fase 1 (estudo piloto), estudo esse que mereceu aos investigadores e ao Hospital de Egas Moniz a atribuição pelo Ministro da Saúde do Prémio Hospital do Futuro na categoria de Prémio Serviço Público (Edição 2004/2005), o Ministério da Saúde decidiu auditar o projecto. A auditoria realizada recomendou o acompanhamento de todas as investigações por uma entidade externa, para verificação e validação científica do projecto e dos seus resultados. A entidade escolhida foi a Eurotrials Scientific Consultants, uma Contract Research Organization (CRO), empresa de consultoria científica especializada em ensaios clínicos e investigação clínica na área da saúde, que foi associada ao projecto para monitorizar o estudo, participar na recolha dos dados e validar os resultados. Os resultados relativos ao estudo da fase 2 apresentados nesta tese de dissertação foram validados pela Eurotrials Scientific Consultants, antes de serem submetidos para publicação para a revista *Neurorehabilitation and Neural Repair*.

### **5.5.4 Comparação dos resultados com os de outros estudos**

Alguns estudos já realizados com terapias celulares para o tratamento das lesões traumáticas da medula espinal, com medula óssea autóloga (Sykova, Homola, Mazanec *et al.* 2006; Yoon, Shim, Park *et al.* 2007), factor de crescimento dos fibroblastos (Wu, Huang, Tsai *et al.* 2008) e células de Schwann autólogas (Saber, Moshayedi, Aghayan *et al.* 2008) não demonstraram qualquer melhoria neurológica. Outros estudos que utilizaram células estaminais olfactivas de origem embrionária mencionam a ocorrência de melhorias mas sem que tenha sido apresentada a modificação que poderá ter ocorrido nos graus da escala de avaliação neurológica ASIA (Huang, Chen, Wang *et al.* 2003; Huang, Chen, Wang *et al.*

2006). Também já se utilizaram OEC que foram injectadas na medula espinal dos doentes, com melhorias limitadas nas funções sensitivas mas sem que se tenham observado melhorias na função motora ou no grau da escala de avaliação neurológica ASIA (Mackay-Sim, Feron, Cochrane *et al.* 2008).

Os resultados dos nossos estudos na recuperação neurológica dos doentes são superiores a todos os que já foram publicados anteriormente. Em primeiro lugar, 2 dos 7 (29%) doentes do estudo da fase 1 deixaram de ter uma lesão motora e sensitiva completa (ASIA A) para ter uma lesão motora e sensitiva incompleta (ASIA C), o que aconteceu também em 6 dos 20 (30%) dos doentes do estudo da fase 2. Ora uma recuperação com esta dimensão nunca tinha sido observada em estudos realizados com doentes com este tipo de lesões em mais de 2,1% dos casos (Kirshblum, Millis, McKinley *et al.* 2004).

Por outro lado verificámos o aparecimento de actividade motora voluntária abaixo do nível da lesão em 2 dos 7 (29%) doentes no estudo da fase 1 e em 9 dos 20 (45%) doentes no estudo da fase 2, quando o aparecimento deste tipo de recuperação nunca tinha sido registado anteriormente (Wirz, Colombo e Dietz 2001; Kirshblum, Millis, McKinley *et al.* 2004; Harness, Yozbatiran e Cramer 2008).

Não iremos discorrer mais sobre a importância ou o significado da melhoria do estado neurológico ou da capacidade funcional dos participantes do estudo, uma vez que não é esse o assunto principal desta tese, que pretende apenas salientar os resultados que fundamentem a importância da intervenção da otorrinolaringologia nas investigações.

#### **5.5.5. Importância da mucosa olfactiva e das suas células para os resultados**

Como já foi mencionado, a hipótese principal deste estudo é a de que o tecido da mucosa olfactiva, uma vez transplantado para o local da lesão, pode promover a axogénese e a neurogénese e levar a uma melhoria da condição neurológica dos doentes. Uma vez que as melhorias neurológicas que ocorrem nestes doentes também se podem dever à plasticidade neuronal das zonas não lesionadas (Steeves, Lammertse, Curt *et al.* 2007), é

importante a verificação de que o mecanismo da melhoria tem a ver com o restabelecimento da conectividade neural determinado pelas células estaminais olfactivas.

O restabelecimento da conectividade neural, que foi demonstrado em experimentação animal com técnicas imunohistoquímicas ou neuromarcadores anterógrados quando a autotransplantação de mucosa olfactiva foi realizada utilizando a técnica por nós concebida (Lima, Pratas-Vital, Escada *et al.* 2004; Iwatsuki, Yoshimine, Kishima *et al.* 2008) (ver Figuras 5.1 e 5.2), no ser humano não pode ser demonstrado morfológicamente (histopatologia), mas sim por determinações funcionais. As determinações que são prova do restabelecimento da conectividade neural já foram enumeradas na *guidelines* produzidas para orientar este tipo de ensaios clínicos (Fawcett, Curt, Steeves *et al.* 2007; Lammertse, Tuszynski, Steeves *et al.* 2007; Steeves, Lammertse, Curt *et al.* 2007; Tuszynski, Steeves, Fawcett *et al.* 2007; Curt, Van Hedel, Klaus *et al.* 2008). São elas: a recuperação neurológica, em particular a recuperação neurológica motora abaixo do nível da lesão; e as avaliações electrofisiológicas: electromiografia e potenciais evocados somatosensitivos.

Os nossos estudos apresentaram resultados positivos em todas essas variáveis: o aparecimento de actividade motora voluntária abaixo do nível da lesão foi demonstrado em em 2 dos 7 (29%) doentes no estudo da fase 1 e em 9 dos 20 (45%) doentes no estudo da fase 2; a electromiografia confirmou a contracção voluntária de músculos com novos movimentos voluntários em 3 dos 7 (43%) doentes no estudo da fase 1 e em 15 dos 20 (75%) doentes da fase 2. Por último, os potenciais evocados somatosensitivos recolhidos a nível cortical (córtex cerebral) a partir de uma estimulação do nervo tibial registaram actividade eléctrica que não existia no pré-operatório em 4 dos 20 (20%) doentes.

#### **5.5.6. Efeitos da colheita da mucosa olfactiva nas fossas nasais e no olfacto**

Nos doentes do estudo da fase 1 pôde verificar-se a ausência de efeitos deletérios na função olfactiva ou de sintomas nasais consequentes à

intervenção cirúrgica, apesar de que 5 dos 7 (71%) doentes apresentavam sinéquias e/ou tecido cicatricial na região olfactiva nas avaliações realizadas no follow-up. Nos doentes do estudo da fase 2, por razões já apresentadas, não foram realizados testes olfactivos na avaliação pós-operatória, mas os doentes foram questionados sobre a presença de alterações olfactivas no pós-operatório, negando a sua ocorrência ou a presença de outros sintomas nasais importantes.

A auto-avaliação da função olfactiva e das suas modificações já foi utilizada em diferentes estudos para determinar os efeitos de intervenções cirúrgicas ou da remoção de tecido olfactivo com propósitos de investigação (Jankowski, Pigret e Decroocq 1997; Lane, Gomez, Dankulich *et al.* 2002). Durante algum tempo o valor desta forma de avaliação da função olfactiva foi questionado, por se entender que podia ser confundida por diversos factores como a permeabilidade nasal, a disposição mental, o humor, a motivação ou a atenção limitada prestada ao sentido do olfacto na vida diária por alguns indivíduos (Landis, Hummel, Hugentobler *et al.* 2003; Savina, Donini, Anzivino *et al.* 2003; Welge-Luessen, Hummel, Stojan *et al.* 2005). Todavia, publicações mais recentes vieram concluir que existe uma correlação positiva e importante entre o olfacto percebido pelos doentes e o determinado pelos testes olfactivos (Welge-Luessen, Hummel, Stojan *et al.* 2005; Gudziol, Lotsch, Hahner *et al.* 2006). Além disso, a determinação do olfacto percebido pela auto-avaliação feita pelos doentes mostrou indicar correctamente a repercussão da disfunção olfactiva na qualidade de vida dos doentes considerados individualmente. Estas conclusões ajudam a validar os resultados das nossas investigações e a concluir da ausência de repercussão negativa sobre a função olfactiva da colheita da mucosa olfactiva tal como foi realizada no nosso estudo experimental.

Seria útil que todos os doentes operados pudessem ter tido um seguimento mais sistemático no que diz respeito aos efeitos adversos ou sequelas possíveis da intervenção cirúrgica destinada à colheita da mucosa olfactiva. Essa avaliação incluiria a observação endoscópica, a realização de testes olfactivos e de exames de imagem. Todavia, uma vez que o estudo da fase 1 demonstrou a ausência de efeitos deletérios sobre o olfacto nos doentes

que foram operados, o desenho do estudo da fase 2 privilegiou a avaliação dos aspectos neurológicos e dos efeitos adversos considerados mais importantes em desfavor de uma avaliação mais exaustiva da função olfactiva, menos viável de ser realizada nos centros de reabilitação onde a observação otorrinolaringológica não estava disponível.

Deve-se contudo sublinhar que os aspectos relacionados com as consequências da intervenção nasal devem ser sempre contemplados nas investigações que envolvam a colheita de mucosa olfactiva em seres humanos, mesmo em outros estudos futuros que possam ser realizados.

## **CONCLUSÕES**



Esta dissertação original, especialmente elaborada com o propósito da obtenção do grau de Doutor em Medicina, especialidade de Otorrinolaringologia, descreve a contribuição do autor, desenvolvida ao longo de cerca de nove anos, na preparação, realização e avaliação de um ensaio clínico experimental em seres humanos destinado a investigar o potencial terapêutico da mucosa olfactiva na reparação e na regeneração da medula espinal lesionada.

Apesar do tema geral das investigações ter a ver com a medicina regenerativa, área fundamentalmente multidisciplinar ou transversal a vários ramos ou especialidades da medicina, o assunto específico da tese é do âmbito da Otorrinolaringologia.

A mucosa olfactiva é a única estrutura periférica com neurónios que apresentam projecção directa no sistema nervoso central e a única localização superficial onde se encontram células estaminais nervosas. Mas é igualmente um órgão localizado integralmente nos limites anatómicos das fossas nasais, com uma fisiologia que decorre do seu papel no sistema olfactivo e com patologia e clínica que são, pelo menos em grande parte, solidárias com a restante patologia naso-sinusal.

A minha participação nas investigações procurou valorizar a intervenção da otorrinolaringologia neste projecto, aplicando a metodologia científica considerada mais apropriada à luz dos conhecimentos científicos mais actualizados, numa orientação claramente assumida de investigação médica de translação.

No **primeiro capítulo** da dissertação descrevemos um estudo dirigido à anatomia cirúrgica endoscópica da região olfactiva. Defendemos que a região olfactiva deve ser considerada uma região anatómica individualizada, com limites e fisiologia própria e não uma porção indistinta e não particularizada das fossas nasais. Com base num modelo anatómico de experimentação em cadáver recente demonstrámos que a região olfactiva

pode ser considerada cirurgicamente relevante ou interessante, tendo sido definidas as condicionantes anatómicas e os passos essenciais para o acesso e a abordagem cirúrgica da região.

No **segundo capítulo** da dissertação descrevemos um estudo destinado a determinar a localização e distribuição da mucosa olfactiva humana nas fossas nasais. Utilizando peças anatómicas da região olfactiva obtidas do cadáver, a microscopia óptica permitiu confirmar os resultados de muitos outros estudos disponíveis na literatura, que demonstraram que a área de distribuição da mucosa olfactiva é maior do que o previamente estabelecido. Da mesma forma esse estudo contribuiu para definir a localização anatómica mais favorável para a colheita da mucosa olfactiva por meios cirúrgicos.

No **terceiro capítulo** da dissertação foram descritos os passos realizados para a concepção de uma técnica cirúrgica nova e original, destinada a colher a mucosa olfactiva humana para ser utilizada no tratamento dos doentes com traumatismo crónico e severo da medula espinal. Foi utilizado um modelo anatómico de experimentação em cadáver recente para a concepção e o desenho inicial da técnica cirúrgica. A partir da experiência dos casos cirúrgicos realizados demonstrou-se que a técnica é exequível e foram enumeradas as dificuldades e complicações antecipáveis, tendo sido acrescentadas indicações práticas consideradas úteis para facilitar a execução dos diferentes passos da técnica. Por último foi antecipado que a técnica cirúrgica descrita para a exposição endoscópica da região olfactiva, porque conservadora e minimamente invasiva, poderá ter aplicação no tratamento em outras patologias situadas na região.

No **quarto capítulo** da dissertação foram descritos os estudos laboratoriais realizados para estudar as células estaminais presentes na mucosa olfactiva. Foi possível isolar, identificar, quantificar, cultivar e proliferar as células estaminais. Os resultados dos estudos contribuíram para validar a aplicação terapêutica da mucosa olfactiva em medicina regenerativa.

Foi ainda inventado e patenteado um método que permite a utilização de um meio sem soro, destinado à cultura de células estaminais da linha neural. Essa invenção abre caminho a novas investigações na área da medicina regenerativa, ao antecipar que as células estaminais olfactivas autólogas, obtidas por biopsia endoscópica das fossas nasais e cultivadas em laboratório, possam ser utilizadas no tratamento de outras doenças, traumáticas ou degenerativas, do sistema nervoso central.

Na sequência das investigações realizadas está em constituição no Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental um laboratório de cultura de células estaminais e já foi iniciado um novo estudo experimental (estudo piloto), que pretende explorar o valor terapêutico das células estaminais olfactivas autólogas na esclerose lateral amiotrófica.

No **quinto e último capítulo** da dissertação foram descritos os resultados de 2 estudos clínicos: um estudo piloto da fase I e um estudo da fase II, destinados a explorar e demonstrar a exequibilidade, segurança e eficácia dos auto-transplantes de mucosa olfactiva na reparação das lesões traumáticas crónicas e severas da medula espinal.

Estes estudos permitiram demonstrar que a técnica é realizável, razoavelmente segura e potencialmente benéfica.

Não houve mortalidade. As complicações mais importantes foram o agravamento da condição neurológica na sensibilidade em 2 doentes, num deles após um quadro de meningite asséptica. A maior parte dos doentes melhoraram a sua condição neurológica e muitos registaram o aparecimento de actividade motora voluntária abaixo do nível da lesão, evidência positiva de conectividade neural e do efeito das células estaminais na recuperação neurológica.

Apesar das melhorias neurológicas terem sido limitadas, tiveram um impacto importante na qualidade de vida dos doentes, permitindo, entre outras coisas, deambular com canadianas e talas, deambular com andarilhos e ajuda, dar passos com ajuda, mover as pernas para diante sem ajudas

utilizando canadianas ou realizar transferências da cadeira de rodas em doentes que não eram capazes destes gestos no pré-operatório.

Não se registaram queixas nasais importantes no período do pós-operatório. Todos os doentes recuperaram o olfacto em menos de 3 meses.

## **RESUMO**



## **RESUMO:**

O objectivo principal dos estudos descritos nesta dissertação foi descrever a anatomia cirúrgica da região olfactiva, determinar a área de distribuição da mucosa olfactiva nas fossas nasais e estudar as células estaminais nela presentes para fundamentar e desenvolver uma técnica cirúrgica destinada à sua colheita por via transnasal endoscópica. O objectivo secundário foi avaliar a exequibilidade, segurança e eficácia da utilização da mucosa olfactiva na reparação das lesões traumáticas crónicas e severas da medula espinal.

As investigações incluíram a dissecação endoscópica e estudos morfométricos da região olfactiva de cadáveres recentes, o exame histológico de espécimes de um banco de peças anatómicas da região olfactiva e a cultura de células estaminais olfactivas obtidas a partir de amostras de indivíduos sem patologia naso-sinusal. Realizaram-se ainda estudos clínicos experimentais nos quais se transplantou a mucosa olfactiva colhida das fossas nasais na medula espinal de doentes com lesões traumáticas da medula espinal.

Os estudos foram realizados num hospital de nível terciário com afiliação universitária, o Hospital de Egas Moniz do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental: em serviços clínicos (Serviço de Otorrinolaringologia) ou em unidades vocacionadas para a investigação (Unidade de Microcirurgia, Unidade de Neuropatologia). Parte dos estudos foram ainda realizados em locais externos à instituição, como o Serviço de Patologia Forense da Delegação de Lisboa do Instituto de Medicina Legal e a ECBio, I&D em Biotecnologia, S.A.

Demonstrou-se que a região olfactiva pode ser abordada sistematicamente por técnica endoscópica. Demonstrou-se a área de distribuição da mucosa olfactiva nas fossas nasais e concebeu-se uma técnica para sua colheita. Isolaram-se e quantificaram-se as células estaminais da mucosa olfactiva e colaborou-se na invenção de um método destinado à sua cultura e proliferação, que poderá ter valor na utilização das células cultivadas em outras patologias. Demonstrou-se ainda que, no tratamento dos doentes

com lesões traumáticas crónicas da medula espinal, a transplantação de mucosa olfactiva autóloga é realizável, razoavelmente segura e potencialmente benéfica.

**PALAVRAS-CHAVE:**

Anatomia e histologia regionais; Antropometria; Cavidade nasal; Células estaminais do adulto; Colheita de tecidos e órgãos; Cultura de células; Endoscopia; Lesões da medula espinal; Mucosa olfactiva; Procedimentos cirúrgicos otorrinolaringológicos; Transplantação autóloga.

## **ABSTRACT**



## **ABSTRACT:**

The primary objective of these studies was to describe the anatomical features of the olfactory region, to examine the distribution of olfactory mucosa across the nasal cavities and to study the olfactory stem cells, in order to develop a surgical procedure aimed at the harvesting of the olfactory mucosa by endoscopic techniques. The secondary objective of the studies was to determine the feasibility, safety and efficacy of transplanting olfactory mucosa autografts into patients with traumatically injured spinal cords.

The investigations included endoscopic dissections and morphometric studies using fresh cadavers, histological examination of autopsy specimens of the olfactory organ and the culture of olfactory stem cells harvested from donors without nasal and sinus pathology. Clinical studies also included the transplantation of olfactory mucosa obtained via endoscopic biopsy into the spinal cord of patients with traumatically injured spinal cord.

Studies were performed in clinical services (otolaryngology) and research centers (Microsurgery Training Center and Unit of Neuropathology) of a tertiary medical referral center with university affiliation. Part of the studies was performed in external facilities, namely the Department of Forensic Medicine of the National Institute of Legal Medicine and the privately-held company ECBio, I&D em Biotecnologia, S.A.

Cadaveric dissections showed that olfactory region can be systematically approached by endoscopic techniques. The area of distribution of the olfactory mucosa was demonstrated and a surgical technique was designed for the harvesting of this tissue. Cell culture studies isolated and quantified olfactory stem cells and an invention providing a new process for the culture and proliferation of these cells promise its therapeutic use in other conditions. It was demonstrated that the transplantation of olfactory mucosa autografts into patients with traumatically injured spinal cords is feasible, relatively safe and possibly beneficial.

**KEY-WORDS:**

Adult stem cells; Anatomy & Histology, regional; Anthropometry; Autologous transplantation; Cell culture techniques; Endoscopy; Nasal cavity; Olfactory mucosa; Otorhinolaryngologic Surgical Procedures; Spinal cord injuries; Tissue and Organ Harvesting.

## **REFERÊNCIAS**



- Anderson, K., S. Aito, M. Atkins, F. Biering-Sorensen, S. Charlifue, A. Curt, J. Ditunno, C. Glass, R. Marino, R. Marshall, M. J. Mulcahey, M. Post, G. Savic, G. Scivoletto e A. Catz (2008). "Functional recovery measures for spinal cord injury: an evidence-based review for clinical practice and research." J Spinal Cord Med **31**(2): 133-44.
- Ang-Lee, M. K., J. Moss e C. S. Yuan (2001). "Herbal medicines and perioperative care." JAMA **286**(2): 208-16.
- Ankel-Simons, F. (2000). Primate anatomy: an introduction. New York, Academic Press.
- Ash, J. E. e M. Raum (1956). Atlas of otolaryngic pathology. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology.
- ASIA (2002). International standards for neurological classification of spinal cord injury, rev. Chicago, American Spinal Cord Association.
- ASIA (2003). International standards for neurological classification of spinal cord injury, rev. Chicago, American Spinal Cord Association.
- Axel, R. (2005). "Scents and sensibility: a molecular logic of olfactory perception (Nobel lecture)." Angew Chem Int Ed Engl **44**(38): 6110-27.
- Barber, P. C. e D. Dahl (1987). "Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in normal and transected rat olfactory nerve." Exp Brain Res **65**(3): 681-5.
- Barnett, S. C., C. L. Alexander, Y. Iwashita, J. M. Gilson, J. Crowther, L. Clark, L. T. Dunn, V. Papanastassiou, P. G. Kennedy e R. J. Franklin (2000). "Identification of a human olfactory ensheathing cell that can effect transplant-mediated remyelination of demyelinated CNS axons." Brain **123 ( Pt 8)**: 1581-8.
- Barraud, P., S. Stott, K. Mollgard, M. Parmar e A. Bjorklund (2007). "In vitro characterization of a human neural progenitor cell coexpressing SSEA4 and CD133." J Neurosci Res **85**(2): 250-9.
- Bartolomei, J. C. e C. A. Greer (2000). "Olfactory ensheathing cells: bridging the gap in spinal cord injury." Neurosurgery **47**(5): 1057-69.
- Biacabe, B., P. Faulcon, L. Amanou e P. Bonfils (2004). "Olfactory cleft disease: an analysis of 13 cases." Otolaryngol Head Neck Surg **130**(2): 202-8.
- Bianco, J. I., C. Perry, D. G. Harkin, A. Mackay-Sim e F. Feron (2004). "Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose." Glia **45**(2): 111-23.

- Biedlingmaier, J. F., P. Whelan, G. Zoarski e M. Rothman (1996). "Histopathology and CT analysis of partially resected middle turbinates." Laryngoscope **106**(1 Pt 1): 102-4.
- Brewer, G. J. (1995). "Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus." J Neurosci Res **42**(5): 674-83.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, E. K. Evege e P. J. Price (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-76.
- Burns, A. S., B. S. Lee, J. F. Ditunno, Jr. e A. Tessler (2003). "Patient selection for clinical trials: the reliability of the early spinal cord injury examination." J Neurotrauma **20**(5): 477-82.
- Cajal, S. R. (1890). "Origen y terminación de las fibras nerviosas olfatorias." Gaceta Sanitária de Barcelona **3**: 1-21.
- Calof, A. L. e D. M. Chikaraishi (1989). "Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro." Neuron **3**(1): 115-27.
- Calof, A. L., J. S. Mumm, P. C. Rim e J. Shou (1998). "The neuronal stem cell of the olfactory epithelium." J Neurobiol **36**(2): 190-205.
- Cappabianca, P., A. Alfieri e E. de Divitiis (1998). "Endoscopic endonasal transsphenoidal approach to the sella: towards functional endoscopic pituitary surgery (FEPS)." Minim Invasive Neurosurg **41**(2): 66-73.
- Cappabianca, P., G. Frank, E. Pasquini, E. De Divitiis e F. Calbucci (2003). Extended endoscopic endonasal transphenoidal approaches to the suprasellar region, planun sphenoidale and clivus. Endoscopic endonasal transphenoidal surgery. E. De Divitiis e P. Cappabianca. New York, Springer-Verlag: 176-187.
- Carpenter, M. K., M. S. Inokuma, J. Denham, T. Mujtaba, C. P. Chiu e M. S. Rao (2001). "Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells." Exp Neurol **172**(2): 383-97.
- Carter, L. A., J. L. MacDonald e A. J. Roskams (2004). "Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype." J Neurosci **24**(25): 5670-83.
- Carvalho, A. V., C. Lima, V. Basto, C. Cunha, P. Escada, H. Cruz e P. Cruz (2007). Adult human neural stem/progenitor cells from the olfactory epithelium and olfactory lamina

propria, isolation method, proliferation and differentiation in serum free culture medium and utilization for transplantation. Portugal. **WO/020611**.

Carvalho, A. V., C. Lima, V. Basto, C. Cunha, P. Escada, H. Cruz e P. Cruz (2007). Adult human neural stem/progenitor cells from the olfactory epithelium and olfactory lamina propria, isolation method, proliferation and differentiation in serum free culture medium and utilization for transplantation. Portugal. **WO/2007/020611**.

Chen, X., H. Fang e J. E. Schwob (2004). "Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium." J Comp Neurol **469**(4): 457-74.

Choi, D., D. Li, S. Law, M. Powell e G. Raisman (2008). "A prospective observational study of the yield of olfactory ensheathing cells cultured from biopsies of septal nasal mucosa." Neurosurgery **62**(5): 1140-4; discussion 1144-5.

Clarkson, E. D., W. M. Zawada, F. S. Adams, K. P. Bell e C. R. Freed (1998). "Strands of embryonic mesencephalic tissue show greater dopamine neuron survival and better behavioral improvement than cell suspensions after transplantation in parkinsonian rats." Brain Res **806**(1): 60-8.

Clemente, M. A. (2005). Combined microscopic and endoscopic technique (COMET surgery). Sinus surgery. Endoscopic and microscopic approaches. H. L. Levine e M. A. Clemente. New York, Thieme Medical Publishers, Inc.

Clerico, D. M., W. C. To e D. C. Lanza (2003). Anatomy of the human nasal passages Handbook of olfaction and gustation. R. L. Doty. New York, Marcel Dekker, Inc.: 1-16.

Cleveland, D. W. e K. F. Sullivan (1985). "Molecular biology and genetics of tubulin." Annu Rev Biochem **54**: 331-65.

Coon, H. G. (1999). Medium for culturing human olfactory neurons. USA. **US/5910443**.

Corti, S., M. Nizzardo, M. Nardini, C. Donadoni, F. Locatelli, D. Papadimitriou, S. Salani, R. Del Bo, S. Ghezzi, S. Strazzer, N. Bresolin e G. P. Comi (2007). "Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression." Exp Neurol **205**(2): 547-62.

Coskun, V., H. Wu, B. Bianchi, S. Tsao, K. Kim, J. Zhao, J. C. Biancotti, L. Hutnick, R. C. Krueger, Jr., G. Fan, J. de Vellis e Y. E. Sun (2008). "CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(3): 1026-31.

Cribb, A., S. Wainwright, C. Williams, B. Farsides e M. Michael (2008). "Towards the applied: the construction of ethical positions in stem cell translational research." Med Health Care Philos **11**(3): 351-61.

- Curt, A., H. J. Van Hedel, D. Klaus e V. Dietz (2008). "Recovery from a spinal cord injury: significance of compensation, neural plasticity, and repair." J Neurotrauma **25**(6): 677-85.
- Damm, M., J. Vent, M. Schmidt, P. Theissen, H. E. Eckel, J. Lotsch e T. Hummel (2002). "Intranasal volume and olfactory function." Chem Senses **27**(9): 831-9.
- Davies, S. J., M. T. Fitch, S. P. Memberg, A. K. Hall, G. Raisman e J. Silver (1997). "Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system." Nature **390**(6661): 680-3.
- Davis, W. E., J. Templer e D. S. Parsons (1996). "Anatomy of the paranasal sinuses." Otolaryngol Clin North Am **29**(1): 57-74.
- Denef, J. F., A. C. Cordier, M. Mesquita e S. Haumont (1979). "The influence of fixation procedure, embedding medium and section thickness on morphometric data in thyroid gland." Histochemistry **63**(2): 163-71.
- Dinis, P. B. e A. Gomes (1997). "Sinusitis and asthma: how do they interrelate in sinus surgery?" Am J Rhinol **11**(6): 421-8.
- Ditunno, J. F., Jr. (1992). "Functional assessment measures in CNS trauma." J Neurotrauma **9 Suppl 1**: S301-5.
- Ditunno, J. F., Jr., P. L. Ditunno, V. Graziani, G. Scivoletto, M. Bernardi, V. Castellano, M. Marchetti, H. Barbeau, H. L. Frankel, J. M. D'Andrea Greve, H. Y. Ko, R. Marshall e P. Nance (2000). "Walking index for spinal cord injury (WISCI): an international multicenter validity and reliability study." Spinal Cord **38**(4): 234-43.
- Doty, R. L. (1991). Olfactory dysfunction in neurodegenerative disorders. Smell and taste in Health and disease. T. V. Getchell, R. L. Doty, L. M. Bartoshuk e J. B. J. Snow. New York, Raven Press: 735-751.
- Doty, R. L. e A. Mishra (2001). "Olfaction and its alteration by nasal obstruction, rhinitis, and rhinosinusitis." Laryngoscope **111**(3): 409-23.
- Doty, R. L., P. Shaman, S. L. Applebaum, R. Giberson, L. Siksorski e L. Rosenberg (1984). "Smell identification ability: changes with age." Science **226**(4681): 1441-3.
- Doucette, R. (1991). "PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve." J Comp Neurol **312**(3): 451-66.
- Douek, E. (1974). The sense of smell and its abnormalities. Edinburgh, Churchill Livingstone.

- Doyle, K. L., M. Khan e A. M. Cunningham (2001). "Expression of the intermediate filament protein nestin by sustentacular cells in mature olfactory neuroepithelium." J Comp Neurol **437**(2): 186-95.
- Draf, W. (1978). Endoskopie der Nasennebenhöhlen. Berlin, Springer.
- Draf, W. (1983). Endoscopy of the paranasal sinuses. New York, Springer.
- Duvvuri, U., C. H. Snyderman e A. B. Kassam (2004). "Trans-sphenoidal approach to petrous apex lesions: a case series." Skull Base **14**(Suppl1): 23-24.
- Escada, P., C. Capucho, C. Lima, J. Pratas\_Vital e J. Madeira\_da\_Silva (2007). "Transplantes autólogos de mucosa olfactiva em doentes traumatizados da medula espinal." Clínica e Investigação em Otorrinolaringologia **1**(3): 128-138.
- Escada, P., C. Capucho e J. Madeira\_da\_Silva (2008). "Diagnóstico diferencial da "cefaleia sinusal". O papel do otorrinolaringologista." Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. **46**(4): 251-256.
- Escada, P., C. Lima, J. Pratas-Vital, A. Hasse-Ferreira, C. Capucho e J. D. Peduzzi (2005). Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. XVIII IFOS World Congress. Roma, Itália.
- Escada, P. e J. Madeira\_da\_Silva (2008). "Anatomia endoscópica e relevância cirúrgica da região olfactiva." Clínica e Investigação em Otorrinolaringologia **2**(3): 256-267.
- Escada, P. A., C. Lima e J. Madeira da Silva (2009). "The human olfactory mucosa." Eur Arch Otorhinolaryngol **266**(11): 1675-80.
- Ésquilo, Sófocles e Eurípidas (1993). Prometeu Acorrentado, Ajax e Alceste. Rio de Janeiro, Jorge Zahar Editor.
- Farbman, A. I. (1990). "Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls?" Trends Neurosci **13**(9): 362-5.
- Fawcett, J. W., A. Curt, J. D. Steeves, W. P. Coleman, M. H. Tuszynski, D. Lammertse, P. F. Bartlett, A. R. Blight, V. Dietz, J. Ditunno, B. H. Dobkin, L. A. Havton, P. H. Ellaway, M. G. Fehlings, A. Privat, R. Grossman, J. D. Guest, N. Kleitman, M. Nakamura, M. Gaviria e D. Short (2007). "Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: spontaneous recovery after spinal cord injury and statistical power needed for therapeutic clinical trials." Spinal Cord **45**(3): 190-205.
- Fechner, R. E. (2002). "A brief history of head and neck pathology." Mod Pathol **15**(3): 221-8.

- Feron, F., A. Mackay-Sim, J. L. Andrieu, K. I. Matthaei, A. Holley e G. Sicard (1999). "Stress induces neurogenesis in non-neuronal cell cultures of adult olfactory epithelium." Neuroscience **88**(2): 571-83.
- Feron, F., C. Perry, J. Cochrane, P. Licina, A. Nowitzke, S. Urquhart, T. Geraghty e A. Mackay-Sim (2005). "Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury." Brain **128**(Pt 12): 2951-60.
- Feron, F., C. Perry, J. J. McGrath e A. Mackay-Sim (1998). "New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **124**(8): 861-6.
- Fisch, U. e D. Mattox (1988). Microsurgery of the skull base. New York, Thieme Medical Publishers, Inc.
- Fisch, U. e J. May (1994). Timpanoplasty, mastoidectomy and stapes surgery. New York, Thieme Medical Publishers, Inc.
- Fisher, C. G., V. K. Noonan, D. E. Smith, P. C. Wing, M. F. Dvorak e B. K. Kwon (2005). "Motor recovery, functional status, and health-related quality of life in patients with complete spinal cord injuries." Spine **30**(19): 2200-7.
- Fontanarosa, P. B. e C. D. DeAngelis (2002). "Basic science and translational research in JAMA." JAMA **287**(13): 1728.
- Frank, G. e E. Pasquini (2003). Approach to the cavernous sinus. Endoscopic endonasal transphenoidal surgery. E. De Divitiis e P. Cappabianca. Wien, New York, Springer-Verlag: 159-175.
- Frederiksen, K., P. S. Jat, N. Valtz, D. Levy e R. McKay (1988). "Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS." Neuron **1**(6): 439-48.
- Friedman, M., R. Landsberg e H. Tanyeri (2000). "Middle turbinate medialization and preservation in endoscopic sinus surgery." Otolaryngol Head Neck Surg **123**(1 Pt 1): 76-80.
- Garg, H. G., B. T. Thompson e C. A. Hales (2000). "Structural determinants of antiproliferative activity of heparin on pulmonary artery smooth muscle cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(5): L779-89.
- Ge, Y., T. Tsukatani, T. Nishimura, M. Furukawa e T. Miwa (2002). "Cell death of olfactory receptor neurons in a rat with nasosinusitis infected artificially with Staphylococcus." Chem Senses **27**(6): 521-7.

- Gomez, G., N. E. Rawson, C. G. Hahn, R. Michaels e D. Restrepo (2000). "Characteristics of odorant elicited calcium changes in cultured human olfactory neurons." J Neurosci Res **62**(5): 737-49.
- Graziadei, G. A. e P. P. Graziadei (1979). "Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy." J Neurocytol **8**(2): 197-213.
- Graziadei, P. P. (1973). "Cell dynamics in the olfactory mucosa." Tissue Cell **5**(1): 113-31.
- Graziadei, P. P. e G. A. Graziadei (1979). "Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons." J Neurocytol **8**(1): 1-18.
- Graziadei, P. P. e A. G. Monti Graziadei (1983). "Regeneration in the olfactory system of vertebrates." Am J Otolaryngol **4**(4): 228-33.
- Gudziol, V., J. Lotsch, A. Hahner, T. Zahnert e T. Hummel (2006). "Clinical significance of results from olfactory testing." Laryngoscope **116**(10): 1858-63.
- Haaland, P. D. (1989). Experimental design in biotechnology. New York, Marcel Dekker.
- Hadley, K., R. R. Orlandi e K. J. Fong (2004). "Basic anatomy and physiology of olfaction and taste." Otolaryngol Clin North Am **37**(6): 1115-26.
- Hahn, C. G., L. Y. Han, N. E. Rawson, N. Mirza, K. Borgmann-Winter, R. H. Lenox e S. E. Arnold (2005). "In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium." J Comp Neurol **483**(2): 154-63.
- Hahn, I., P. W. Scherer e M. M. Mozell (1993). "Velocity profiles measured for airflow through a large-scale model of the human nasal cavity." J Appl Physiol **75**(5): 2273-87.
- Halpern, B. P. (1982). "Environmental factors affecting chemoreceptors: an overview." Environ Health Perspect **44**: 101-5.
- Harness, E. T., N. Yozbatiran e S. C. Cramer (2008). "Effects of intense exercise in chronic spinal cord injury." Spinal Cord **46**(11): 733-7.
- Hashimoto, A., T. Onodera, H. Ikeda e H. Kitani (2000). "Isolation and characterisation of fetal bovine brain cells in primary culture." Res Vet Sci **69**(1): 39-46.
- Hashimoto, R., V. Senatorov, H. Kanai, P. Leeds e D. M. Chuang (2003). "Lithium stimulates progenitor proliferation in cultured brain neurons." Neuroscience **117**(1): 55-61.

- Hawkes, C. H. e R. C. Doty (2009). The neurology of olfaction. Cambridge, Cambridge University Press.
- Hempstead, J. L. e J. I. Morgan (1985). "Monoclonal antibodies reveal novel aspects of the biochemistry and organization of olfactory neurons following unilateral olfactory bulbectomy." J Neurosci **5**(9): 2382-7.
- Hempstead, J. L. e J. I. Morgan (1985). "A panel of monoclonal antibodies to the rat olfactory epithelium." J Neurosci **5**(2): 438-49.
- Hodges, P. J. e P. C. Kam (2002). "The peri-operative implications of herbal medicines." Anaesthesia **57**(9): 889-99.
- Holbrook, E. H., L. J. DiNardo e R. M. Costanzo (2001). "Olfactory epithelium grafts in the cerebral cortex: an immunohistochemical analysis." Laryngoscope **111**(11 Pt 1): 1964-9.
- Holbrook, E. H., D. A. Leopold e J. E. Schwob (2005). "Abnormalities of axon growth in human olfactory mucosa." Laryngoscope **115**(12): 2144-54.
- Holcomb, J. D., S. Graham e A. Calof (1996). "Neuronal homeostasis in mammalian olfactory epithelium: a review. ." Am J Rhinol **10**(3): 125-134.
- Hombach-Klonisch, S., S. Panigrahi, I. Rashedi, A. Seifert, E. Alberti, P. Pocar, M. Kurpisz, K. Schulze-Osthoff, A. Mackiewicz e M. Los (2008). "Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications." J Mol Med **86**(12): 1301-14.
- Hong, S. C., D. A. Leopold, P. J. Oliverio, M. L. Benson, D. Mellits, S. A. Quaskey e S. J. Zinreich (1998). "Relation between CT scan findings and human sense of smell." Otolaryngol Head Neck Surg **118**(2): 183-6.
- Hornung, D. E. (2006). "Nasal anatomy and the sense of smell." Adv Otorhinolaryngol **63**: 1-22.
- Hornung, D. E. e D. A. Leopold (1999). "Relationship between uninasal anatomy and uninasal olfactory ability." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **125**(1): 53-8.
- Hosemann, W. G., R. K. Weber, R. E. Keerl e V. J. Lund (2000). Minimally invasive endonasal sinus surgery. Stuttgart, New York, Thieme.
- Huang, H., L. Chen, H. Wang, H. Xi, C. Gou, J. Zhang, F. Zhang e Y. Liu (2006). "Safety of fetal olfactory ensheathing cell transplantation in patients with chronic spinal cord injury. A 38-month follow-up with MRI." Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi **20**(4): 439-43.

- Huang, H., L. Chen, H. Wang, B. Xiu, B. Li, R. Wang, J. Zhang, F. Zhang, Z. Gu, Y. Li, Y. Song, W. Hao, S. Pang e J. Sun (2003). "Influence of patients' age on functional recovery after transplantation of olfactory ensheathing cells into injured spinal cord injury." Chin Med J (Engl) **116**(10): 1488-91.
- Huard, J. M., S. L. Youngentob, B. J. Goldstein, M. B. Luskin e J. E. Schwob (1998). "Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells." J Comp Neurol **400**(4): 469-86.
- "The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition." (2004). Cephalalgia **24 Suppl 1**: 9-160.
- Iwatsuki, K., T. Yoshimine, H. Kishima, M. Aoki, K. Yoshimura, M. Ishihara, Y. Ohnishi e C. Lima (2008). "Transplantation of olfactory mucosa following spinal cord injury promotes recovery in rats." Neuroreport **19**(13): 1249-52.
- Jafek, B. W. (1983). "Ultrastructure of human nasal mucosa." Laryngoscope **93**(12): 1576-99.
- Jafek, B. W., P. M. Eller, E. W. Johnson, M. R. Linschoten e S. Sheikali (1997). Hystopathology of olfactory mucosa. Rhinologic diagnosis and treatment. T. V. McCaffrey. New York, Stuttgart, Thieme: 1-28.
- Jafek, B. W., E. W. Johnson, P. M. Eller e B. Murrow (1997). Olfactory mucosal biopsy and related histology. Taste and smell disorders. A. M. Seiden. New York, Stuttgart, Thieme: 107-127.
- Jafek, B. W., B. Murrow, R. Michaels, D. Restrepo e M. Linschoten (2002). "Biopsies of human olfactory epithelium." Chem Senses **27**(7): 623-8.
- Jang, W., S. L. Youngentob e J. E. Schwob (2003). "Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methyl bromide lesion." J Comp Neurol **460**(1): 123-40.
- Jankowski, R., J. Auque, C. Simon, J. C. Marchal, H. Hepner e M. Wayoff (1992). "Endoscopic pituitary tumor surgery." Laryngoscope **102**(2): 198-202.
- Jankowski, R., D. Pigret e F. Decroocq (1997). "Comparison of functional results after ethmoidectomy and nasalization for diffuse and severe nasal polyposis." Acta Otolaryngol **117**(4): 601-8.
- Jho, H. D., R. L. Carrau e Y. Ko (1996). Endoscopic pituitary surgery. Neurosurgical Operative Atlas. R. H. Wilkins e S. S. Rengachary. Park Ridge, American Association of Neurological Surgeons: 1-12.

- Jiang, Y. e M. Oblinger (1992). "Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development." J Cell Sci **103**(3): 643-651.
- Joe, J. K., S. Y. Ho e E. Yanagisawa (2000). "Documentation of variations in sinonasal anatomy by intraoperative nasal endoscopy." Laryngoscope **110**(2 Pt 1): 229-35.
- Jones, N. e D. Rog (1998). "Olfaction: a review." J Laryngol Otol **112**(1): 11-24.
- Kato, T., O. Honmou, T. Uede, K. Hashi e J. D. Kocsis (2000). "Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord." Glia **30**(3): 209-18.
- Kennedy, D. W. (1985). "Functional endoscopic sinus surgery. Technique." Arch Otolaryngol **111**(10): 643-9.
- Kennedy, D. W., P. Shaman, W. Han, H. Selman, D. A. Deems e D. C. Lanza (1994). "Complications of ethmoidectomy: a survey of fellows of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery." Otolaryngol Head Neck Surg **111**(5): 589-99.
- Kennedy, D. W., S. J. Zinreich, A. E. Rosenbaum e M. E. Johns (1985). "Functional endoscopic sinus surgery. Theory and diagnostic evaluation." Arch Otolaryngol **111**(9): 576-82.
- Kern, R. C. (2000). "Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa." Laryngoscope **110**(7): 1071-7.
- Ketcham, A. S., R. H. Wilkins, J. M. Vanburen e R. R. Smith (1963). "A Combined Intracranial Facial Approach to the Paranasal Sinuses." Am J Surg **106**: 698-703.
- Key, B. (1998). "Molecular development of the olfactory nerve pathway." Ann N Y Acad Sci **855**: 76-82.
- Keyhani, K., P. W. Scherer e M. M. Mozell (1995). "Numerical simulation of airflow in the human nasal cavity." J Biomech Eng **117**(4): 429-41.
- Keyhani, K., P. W. Scherer e M. M. Mozell (1997). "A numerical model of nasal odorant transport for the analysis of human olfaction." J Theor Biol **186**(3): 279-301.
- Kim, H. U., S. S. Kim, S. S. Kang, I. H. Chung, J. G. Lee e J. H. Yoon (2001). "Surgical anatomy of the natural ostium of the sphenoid sinus." Laryngoscope **111**(9): 1599-602.
- Kim, K. S., Y. S. Choi, H. J. Kim e J. H. Yoon (2003). "The risk of olfactory disturbance from conchal plate injury during ethmoidectomy." Am J Rhinol **17**(5): 307-10.

- Kim, S. S., J. G. Lee, K. S. Kim, H. U. Kim, I. H. Chung e J. H. Yoon (2001). "Computed tomographic and anatomical analysis of the basal lamellas in the ethmoid sinus." Laryngoscope **111**(3): 424-9.
- Kirshblum, S., S. Millis, W. McKinley e D. Tulsy (2004). "Late neurologic recovery after traumatic spinal cord injury." Arch Phys Med Rehabil **85**(11): 1811-7.
- Klueber, K. M., F. J. Roisen e C. L. Lu (2003). Adult human olfactory stem cell. USA. **WO/03064601**.
- Koppe, T., H. Nagai e K. W. Alt (1999). The paranasal sinuses of higher primates: development, function and evolution. Chicago, Quintessence Publishing.
- Lammertse, D., M. H. Tuszynski, J. D. Steeves, A. Curt, J. W. Fawcett, C. Rask, J. F. Ditunno, M. G. Fehlings, J. D. Guest, P. H. Ellaway, N. Kleitman, A. R. Blight, B. H. Dobkin, R. Grossman, H. Katoh, A. Privat e M. Kalichman (2007). "Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: clinical trial design." Spinal Cord **45**(3): 232-42.
- Landis, B. N., T. Hummel, M. Hugentobler, R. Giger e J. S. Lacroix (2003). "Ratings of overall olfactory function." Chem Senses **28**(8): 691-4.
- Lane, A. P., G. Gomez, T. Dankulich, H. Wang, W. E. Bolger e N. E. Rawson (2002). "The superior turbinate as a source of functional human olfactory receptor neurons." Laryngoscope **112**(7 Pt 1): 1183-9.
- Lang, J. (1988). Klinische Anatomie der Nase, Nasenhöhle und Nebenhöhlen. Grundlagen für Diagnostik und Operation. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Lang, J. (1989). Clinical anatomy of the nose, nasal cavity and paranasal sinuses. New York, Georg Thieme Verlag.
- Lanza, D. C., D. A. Deems, R. L. Doty, D. Moran, D. Crawford, J. C. Rowley, 3rd, A. Sajjadian e D. W. Kennedy (1994). "The effect of human olfactory biopsy on olfaction: a preliminary report." Laryngoscope **104**(7): 837-40.
- Lanza, D. C., D. T. Moran, R. L. Doty, J. Q. Trojanowski, J. H. Lee, J. C. Rowley, 3rd, D. Crawford e D. W. Kennedy (1993). "Endoscopic human olfactory biopsy technique: a preliminary report." Laryngoscope **103**(7): 815-9.
- Larsen, P. L., P. K. Tingsgaard, J. Harcourt, G. Sofsrud e M. Tos (1998). "Nasal polyps and their relation to polyps/hypertrophic polypoid mucosa in the paranasal sinuses: a macro-, endo-, and microscopic study of autopsy materials." Am J Rhinol **12**(1): 45-51.

- Le\_Gros\_CLark, W. E. (1959). The antecedents of man. Edinburgh, Edinburgh University Press.
- Lee, A., J. D. Kessler, T. A. Read, C. Kaiser, D. Corbeil, W. B. Huttner, J. E. Johnson e R. J. Wechsler-Reya (2005). "Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum." Nat Neurosci **8**(6): 723-9.
- Lee, S. H., H. H. Lim, H. M. Lee, H. J. Park e J. O. Choi (2000). "Olfactory mucosal findings in patients with persistent anosmia after endoscopic sinus surgery." Ann Otol Rhinol Laryngol **109**(8 Pt 1): 720-5.
- Lee, V. M. e S. K. Pixley (1994). "Age and differentiation-related differences in neuron-specific tubulin immunostaining of olfactory sensory neurons." Brain Res Dev Brain Res **83**(2): 209-15.
- Leopold, D. A. (1988). "The relationship between nasal anatomy and human olfaction." Laryngoscope **98**(11): 1232-8.
- Leopold, D. A., T. Hummel, J. E. Schwob, S. C. Hong, M. Knecht e G. Kobal (2000). "Anterior distribution of human olfactory epithelium." Laryngoscope **110**(3 Pt 1): 417-21.
- Levine, H. L. e M. A. Clemente (2005). Sinus surgery. Endoscopic and microscopic approaches. New York, Thieme Medical Publishers, Inc.
- Li, C., R. L. Doty, D. W. Kennedy e D. M. Yousem (2003). Evaluation of the olfactory deficits by structural medical imaging. Handbook of olfaction and gustation. R. L. Doty. New York, Marcel Dekker, Inc.: 593-613.
- Lima, C., P. Escada, J. Pratas-Vital, C. Branco, C. A. Arcangeli, G. Lazzeri, C. A. Maia, C. Capucho, A. Hasse-Ferreira e J. D. Peduzzi (2009). "Olfactory Mucosal Autografts and Rehabilitation for Chronic Traumatic Spinal Cord Injury." Neurorehabil Neural Repair.
- Lima, C. e J. Pratas-Vital (1987). Autoenxertos de mucosa olfactiva em lesões traumáticas completas da medula espinal em cobaias.
- Lima, C., J. Pratas-Vital, P. Escada, A. Hasse-Ferreira, C. Capucho e J. D. Peduzzi (2006). "Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study." J Spinal Cord Med **29**(3): 191-203; discussion 204-6.
- Lima, C., J. Pratas-Vital, P. Escada, A. Hasse-Ferreira e J. D. Peduzzi (2004). Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: from rats to humans. 2004 International Campaign for cures of spinal cord injury paralysis: spinal cord injury clinical trials workshop  
Vancouver, Canadá.

- Lipschitz, D. L. e W. C. Michel (2002). "Amino acid odorants stimulate microvillar sensory neurons." Chem Senses **27**(3): 277-86.
- Liu, N., C. B. Shields e F. J. Roisen (1998). "Primary culture of adult mouse olfactory receptor neurons." Exp Neurol **151**(2): 173-83.
- Lovell, M. A., B. W. Jafek, D. T. Moran e J. C. Rowley, 3rd (1982). "Biopsy of human olfactory mucosa. An instrument and a technique." Arch Otolaryngol **108**(4): 247-9.
- Lowhagen, P., B. B. Johansson e C. Nordborg (1994). "The nasal route of cerebrospinal fluid drainage in man. A light-microscope study." Neuropathol Appl Neurobiol **20**(6): 543-50.
- Lu, J., F. Feron, S. M. Ho, A. Mackay-Sim e P. M. Waite (2001). "Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats." Brain Res **889**(1-2): 344-57.
- Lund, V. J. (2008). "Editorial: Nervous about noses?" Rhinology **46**(3): 161-162.
- Lund, V. J. e G. K. Scadding (1994). "Objective assessment of endoscopic sinus surgery in the management of chronic rhinosinusitis: an update." J Laryngol Otol **108**(9): 749-53.
- Mackay-Sim, A. e M. I. Chuahb (2000). "Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway." Prog Neurobiol **62**(5): 527-59.
- Mackay-Sim, A., F. Feron, J. Cochrane, L. Bassingthwaighe, C. Bayliss, W. Davies, P. Fronek, C. Gray, G. Kerr, P. Licina, A. Nowitzke, C. Perry, P. A. Silburn, S. Urquhart e T. Geraghty (2008). "Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial." Brain.
- Madeira da Silva, J. e V. Ribeiro (1982). "Síndrome rino-sino-brônquico." Boletim da Sociedade Portuguesa de Otorrinolaringologia e Bronco-Esofagologia **XX**: 59-62.
- Maienschein, J., M. Sunderland, R. A. Ankeny e J. S. Robert (2008). "The ethos and ethics of translational research." Am J Bioeth **8**(3): 43-51.
- Marincola, F. M. (2003). "Translational Medicine: A two-way road." J Transl Med **1**(1): 1.
- Maroon, J. C. (2005). "Skull base surgery: past, present, and future trends." Neurosurg Focus **19**(1): E1.
- Marshall, C. T., Z. Guo, C. Lu, K. M. Klueber, A. Khalyfa, N. G. Cooper e F. J. Roisen (2005). "Human adult olfactory neuroepithelial derived progenitors retain telomerase activity and lack apoptotic activity." Brain Res **1045**(1-2): 45-56.

- Martin, R. D. (1990). Primate origins and evolution: a phylogenetic reconstruction. Princeton, New Jersey, Princeton University Press.
- Masaki, M. e Y. Tanaka (1998). "Nasal polyps in the olfactory cleft." Laryngoscope **108**(8 Pt 1): 1243-6.
- McDonald, J. W., D. Becker, C. L. Sadowsky, J. A. Jane, Sr., T. E. Conturo e L. M. Schultz (2002). "Late recovery following spinal cord injury. Case report and review of the literature." J Neurosurg **97**(2 Suppl): 252-65.
- McLean, M. e J. W. Prothero (1991). "Three-dimensional reconstruction from serial sections. V. Calibration of dimensional changes incurred during tissue preparation and data processing." Anal Quant Cytol Histo **13**(4): 269-78.
- Menco, B. P. e E. E. Morrison (2003). Morphology of the mammalian olfactory epithelium: form, fine structure, function and pathology. Handbook of olfaction and gustation. R. L. Doty. New York, Marcel Dekker, Inc.: 17-49.
- Messam, C. A., J. Hou e E. O. Major (2000). "Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody." Exp Neurol **161**(2): 585-96.
- Messerklinger, W. (1978). Endoscopy of the nose. Baltimore, Urban & Schwarzenberg.
- Mizrak, D., M. Brittan e M. R. Alison (2008). "CD133: molecule of the moment." J Pathol **214**(1): 3-9.
- Montani, G., S. Tonelli, R. Elsaesser, J. Paysan e R. Tirindelli (2006). "Neuropeptide Y in the olfactory microvillar cells." Eur J Neurosci **24**(1): 20-4.
- Moore, W. J. (1981). The mammalian skull. Cambridge, Cambridge University Press.
- Moran, D. T., B. W. Jafek, P. M. Eller e J. C. Rowley, 3rd (1992). "Ultrastructural histopathology of human olfactory dysfunction." Microsc Res Tech **23**(2): 103-10.
- Moran, D. T., J. C. Rowley, 3rd e B. W. Jafek (1982). "Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell." Brain Res **253**(1-2): 39-46.
- Moran, D. T., J. C. Rowley, 3rd, B. W. Jafek e M. A. Lovell (1982). "The fine structure of the olfactory mucosa in man." J Neurocytol **11**(5): 721-46.
- Morgenstein, K. M. e M. K. Krieger (1980). "Experiences in middle turbinectomy." Laryngoscope **90**(10 Pt 1): 1596-603.

- Morrison, E. E. e R. M. Costanzo (1990). "Morphology of the human olfactory epithelium." J Comp Neurol **297**(1): 1-13.
- Moulton, D. G. e L. M. Beidler (1967). "Structure and function in the peripheral olfactory system." Physiol Rev **47**(1): 1-52.
- Murdoch, B. e A. J. Roskams (2007). "Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology." J Mol Histol **38**(6): 581-99.
- Murrell, W., G. R. Bushell, J. Livesey, J. McGrath, K. P. MacDonald, P. R. Bates e A. Mackay-Sim (1996). "Neurogenesis in adult human." Neuroreport **7**(6): 1189-94.
- Murrell, W., F. Feron, A. Wetzig, N. Cameron, K. Splatt, B. Bellette, J. Bianco, C. Perry, G. Lee e A. Mackay-Sim (2005). "Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa." Dev Dyn **233**(2): 496-515.
- Murrell, W., A. Wetzig, M. Donnellan, F. Feron, T. Burne, A. Meedeniya, J. Kesby, J. Bianco, C. Perry, P. Silburn e A. Mackay-Sim (2008). "Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease." Stem Cells **26**(8): 2183-92.
- Naessen, R. (1970). "The identification and topographical localisation of the olfactory epithelium in man and other mammals." Acta Otolaryngol **70**(1): 51-7.
- Naessen, R. (1971). "An enquiry on the morphological characteristics and possible changes with age in the olfactory region of man." Acta Otolaryngol **71**(1): 49-62.
- Nakagawa, T., T. Aiba, H. Shiotani, K. Tomiyama e Y. Nakai (1996). "Apoptosis in the normal olfactory epithelium of the adult guinea pig." Eur Arch Otorhinolaryngol **253**(6): 371-3.
- Nakashima, T., C. P. Kimmelman e J. B. Snow, Jr. (1984). "Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium." Arch Otolaryngol **110**(10): 641-6.
- Nakashima, T., C. P. Kimmelman e J. B. Snow, Jr. (1985). "Immunohistopathology of human olfactory epithelium, nerve and bulb." Laryngoscope **95**(4): 391-6.
- Nakashima, T., C. P. Kimmelman e J. B. Snow, Jr. (1985). "Olfactory marker protein in the human olfactory pathway." Arch Otolaryngol **111**(5): 294-7.
- Neary, J. T., Q. Zhu, Y. Kang e P. K. Dash (1996). "Extracellular ATP induces formation of AP-1 complexes in astrocytes via P2 purinoceptors." Neuroreport **7**(18): 2893-6.
- Negus, V. (1958). The comparative anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. Edinburgh, Livingston.

- Newman, M. P., F. Feron e A. Mackay-Sim (2000). "Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium." Neuroscience **99**(2): 343-50.
- Nibu, K., G. Li, X. Zhang, N. E. Rawson, D. Restrepo, K. Kaga, L. D. Lowry, W. M. Keane e J. L. Rothstein (1999). "Olfactory neuron-specific expression of NeuroD in mouse and human nasal mucosa." Cell Tissue Res **298**(3): 405-14.
- Nibu, K., T. Sasaki, N. Kawahara, M. Sugawara, T. Nakatsuka e A. Yamada (1998). "Complications of craniofacial surgery for tumors involving the anterior cranial base." Neurosurgery **42**(3): 455-61; discussion 461-2.
- Nickell, W. T. (1997). Basic anatomy and physiology of olfaction. Taste and smell disorders. A. M. Seiden. New York, Stuttgart, Thieme: 20-37.
- Nordin, S. e A. Bramerson (2008). "Complaints of olfactory disorders: epidemiology, assessment and clinical implications." Curr Opin Allergy Clin Immunol **8**(1): 10-5.
- Orlandi, R. R., D. C. Lanza, W. E. Bolger, D. M. Clerico e D. W. Kennedy (1999). "The forgotten turbinate: the role of the superior turbinate in endoscopic sinus surgery." Am J Rhinol **13**(4): 251-9.
- Osada, T., M. Ichikawa e R. M. Costanzo (1995). "Is nestin a marker for chemosensory precursor cells?" Brain Res **683**(2): 254-7.
- Othman, M., C. Lu, K. Klueber, W. Winstead e F. Roisen (2005). "Clonal analysis of adult human olfactory neurosphere forming cells." Biotech Histochem **80**(5-6): 189-200.
- Padua, F. G. e R. L. Voegels (2008). "Severe posterior epistaxis-endoscopic surgical anatomy." Laryngoscope **118**(1): 156-61.
- Paik, S. I., M. N. Lehman, A. M. Seiden, H. J. Duncan e D. V. Smith (1992). "Human olfactory biopsy. The influence of age and receptor distribution." Archives of Otolaryngology -- Head and Neck Surgery **118**(7): 731-8.
- Paik, S. I., M. N. Lehman, A. M. Seiden, H. J. Duncan e D. V. Smith (1992). "Human olfactory biopsy. The influence of age and receptor distribution." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **118**(7): 731-8.
- Peduzzi-Nelson, J. D. (2002). Hearing on Cloning (Congressional Testimony delivered on April 10, 2002). S. T. United States Senate Committee on Commerce. Washington.
- Peduzzi-Nelson, J. D. (2003). Hearing on Adult and Non-Embryonic Stem Cell Research (Congressional Testimony delivered on June 12, 2003). S. T. United States Senate Committee on Commerce. Washington.

- Peduzzi-Nelson, J. D. (2004). Hearing on Adult Stem Cell Research (Congressional Testimony delivered on July 14, 2004). S. T. United States Senate Committee on Commerce. Washington.
- Perry, C., A. Mackay-Sim, F. Feron e J. McGrath (2002). "Olfactory neural cells: an untapped diagnostic and therapeutic resource. The 2000 Ogura Lecture." Laryngoscope **112**(4): 603-7.
- Pinna, F. (2008). Distribuição do neuroepitélio olfatório em concha média e superior em cadáveres humanos. Departamento de Otorrinolaringologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil. **Tese de Doutorado**.
- Polyzonis, B. M., P. M. Kafandaris, P. I. Gigis e T. Demetriou (1979). "An electron microscopic study of human olfactory mucosa." J Anat **128**(Pt 1): 77-83.
- Preston, S. L., M. R. Alison, S. J. Forbes, N. C. Direkze, R. Poulson e N. A. Wright (2003). "The new stem cell biology: something for everyone." Mol Pathol **56**(2): 86-96.
- Pribitkin, E. D. e G. Boger (2001). "Herbal therapy: what every facial plastic surgeon must know." Arch Facial Plast Surg **3**(2): 127-32.
- Price, J. e L. Thurlow (1988). "Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer." Development **104**(3): 473-82.
- Pruszk, J., K. C. Sonntag, M. H. Aung, R. Sanchez-Pernaute e O. Isacson (2007). "Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations." Stem Cells **25**(9): 2257-68.
- Radice, B. (1973). Who's who in the ancient world. A handbook to the survivors of the greek and roman classics. London, Penguin Books.
- Ramer, L. M., E. Au, M. W. Richter, J. Liu, W. Tetzlaff e A. J. Roskams (2004). "Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury." J Comp Neurol **473**(1): 1-15.
- Ramon-Cueto, A. e J. Avila (1998). "Olfactory ensheathing glia: properties and function." Brain Res Bull **46**(3): 175-87.
- Rawson, N. E., J. G. Brand, B. J. Cowart, L. D. Lowry, E. A. Pribitkin, V. M. Rao e D. Restrepo (1995). "Functionally mature olfactory neurons from two anosmic patients with Kallmann syndrome." Brain Res **681**(1-2): 58-64.
- Rawson, N. E. e G. Gomez (2002). "Cell and molecular biology of human olfaction." Microsc Res Tech **58**(3): 142-51.

- Rawson, N. E., G. Gomez, B. Cowart, J. G. Brand, L. D. Lowry, E. A. Pribitkin e D. Restrepo (1997). "Selectivity and response characteristics of human olfactory neurons." J Neurophysiol **77**(3): 1606-13.
- Restrepo, D., Y. Okada, J. H. Teeter, L. D. Lowry, B. Cowart e J. G. Brand (1993). "Human olfactory neurons respond to odor stimuli with an increase in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>." Biophys J **64**(6): 1961-6.
- Reynolds, B. A. e S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-10.
- Rietze, R. L., H. Valcanis, G. F. Brooker, T. Thomas, A. K. Voss e P. F. Bartlett (2001). "Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain." Nature **412**(6848): 736-9.
- Robinson, A. M., D. B. Conley, M. J. Shinnars e R. C. Kern (2002). "Apoptosis in the aging olfactory epithelium." Laryngoscope **112**(8 Pt 1): 1431-5.
- Roisen, F. J., K. M. Klueber, C. L. Lu, L. M. Hatcher, A. Dozier, C. B. Shields e S. Maguire (2001). "Adult human olfactory stem cells." Brain Res **890**(1): 11-22.
- Rosenthal, N. (2003). "Prometheus's vulture and the stem-cell promise." N Engl J Med **349**(3): 267-74.
- Roskams, A. J., X. Cai e G. V. Ronnett (1998). "Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat." Neuroscience **83**(1): 191-200.
- Ruff, R. L., L. McKerracher e M. E. Selzer (2008). "Repair and neurorehabilitation strategies for spinal cord injury." Ann N Y Acad Sci **1142**: 1-20.
- Saberi, H., P. Moshayedi, H. R. Aghayan, B. Arjmand, S. K. Hosseini, S. H. Emami-Razavi, V. Rahimi-Movaghar, M. Raza e M. Firouzi (2008). "Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: an interim report on safety considerations and possible outcomes." Neurosci Lett **443**(1): 46-50.
- Sanna, M., E. Saleh, A. Russo e A. Taibah (1995). Atlas of temporal bone and lateral skull base surgery. New York, Thieme Medical Publishers, Inc.
- Sanna, M., H. Sunose, F. Mancini, A. Russo e A. Taibah (2003). Middle ear and mastoid surgery. Stuttgart, George Thieme Verlag.

- Sato, T. J., G. Murakami, H. Tsubota, M. Isobe, K. Akita e A. Kataura (2000). "Morphometric study of the medial aspect of the human maxillary sinus with special reference to the nasal fontanelle." Auris Nasus Larynx **27**(2): 121-30.
- Savina, C., L. M. Donini, R. Anzivino, M. R. De Felice, L. De Bernardini e C. Cannella (2003). "Administering the "AHSP Questionnaire" (appetite, hunger, sensory perception) in a geriatric rehabilitation care." J Nutr Health Aging **7**(6): 385-9.
- Schwartz, P. H., P. J. Bryant, T. J. Fuja, H. Su, D. K. O'Dowd e H. Klassen (2003). "Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex." J Neurosci Res **74**(6): 838-51.
- Schwob, J. E., K. E. Szumowski, D. A. Leopold e P. Emko (1993). "Histopathology of olfactory mucosa in Kallmann's syndrome." Ann Otol Rhinol Laryngol **102**(2): 117-22.
- Schwob, J. E., K. E. Szumowski e A. A. Stasky (1992). "Olfactory sensory neurons are trophically dependent on the olfactory bulb for their prolonged survival." J Neurosci **12**(10): 3896-919.
- Schwob, J. E., S. L. Youngentob e R. C. Mezza (1995). "Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion." J Comp Neurol **359**(1): 15-37.
- Seiden, A. M. (1997). The initial assessment of patients with taste and smell disorders. Taste and smell disorders. A. M. Seiden. New York, Stuttgart, Thieme.
- Seiden, A. M. (1997). Olfactory loss secondary to nasal and sinus pathology. Taste and smell disorders. A. M. Seiden. New York, Stuttgart, Thieme: 52-71.
- Sethi, D. S., D. P. Lau, L. W. Chee e V. Chong (1998). "Isolated sphenoid recess polyps." J Laryngol Otol **112**(7): 660-3.
- Shahinian, H. K. (2008). Endoscopic skull base surgery. A comprehensive guide with illustrative cases. Los Angeles, Humana Press.
- Shahinian, H. K., M. Kabil, R. Jarrahy e M. P. Thill (2008). Endoscopic skull base surgery. A comprehensive guide with illustrative cases. Totowa, New Jersey, Humana Press, Springer.
- Shingo, T., C. Gregg, E. Enwere, H. Fujikawa, R. Hassam, C. Geary, J. C. Cross e S. Weiss (2003). "Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin." Science **299**(5603): 117-20.
- Sittel, C., H. E. Eckel, G. M. Sprinzl e E. Stennert (1997). "Plastination of the larynx for whole-organ sectioning." Eur Arch Otorhinolaryngol **254 Suppl 1**: S93-6.

- Smith, T. D. e K. P. Bhatnagar (2004). "Microsmatic primates: reconsidering how and when size matters." Anat Rec B New Anat **279**(1): 24-31.
- Smith, T. D., K. P. Bhatnagar, P. Tuladhar e A. M. Burrows (2004). "Distribution of olfactory epithelium in the primate nasal cavity: are microsmia and macrosmia valid morphological concepts?" Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **281**(1): 1173-81.
- Spicer, S. S. (1993). "Advantages of histochemistry for the study of cell biology." Histochem J **25**(8): 531-47.
- Stammler, H. (1991). Functional endoscopic sinus surgery. Philadelphia, Decker.
- Stammler, H. R. e D. W. Kennedy (1995). "Paranasal sinuses:anatomic terminology and nomenclature. The Anatomic Terminology Group." Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl **167**: 7-16.
- Steeves, J. D., D. Lammertse, A. Curt, J. W. Fawcett, M. H. Tuszynski, J. F. Ditunno, P. H. Ellaway, M. G. Fehlings, J. D. Guest, N. Kleitman, P. F. Bartlett, A. R. Blight, V. Dietz, B. H. Dobkin, R. Grossman, D. Short, M. Nakamura, W. P. Coleman, M. Gaviria e A. Privat (2007). "Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury (SCI) as developed by the ICCP panel: clinical trial outcome measures." Spinal Cord **45**(3): 206-21.
- Sullivan, K. F. (1988). "Structure and utilization of tubulin isotypes." Annu Rev Cell Biol **4**: 687-716.
- Sykova, E., A. Homola, R. Mazanec, H. Lachmann, S. L. Konradova, P. Kobylka, R. Padr, J. Neuwirth, V. Komrska, V. Vavra, J. Stulik e M. Bojar (2006). "Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury." Cell Transplant **15**(8-9): 675-87.
- Tamaki, S., K. Eckert, D. He, R. Sutton, M. Doshe, G. Jain, R. Tushinski, M. Reitsma, B. Harris, A. Tsukamoto, F. Gage, I. Weissman e N. Uchida (2002). "Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain." J Neurosci Res **69**(6): 976-86.
- Tarasenko, Y. I., J. Gao, L. Nie, K. M. Johnson, J. J. Grady, C. E. Hulsebosch, D. J. McAdoo e P. Wu (2007). "Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior." J Neurosci Res **85**(1): 47-57.
- Terrier, G. (1991). Rhinosinusal endoscopy. Diagnosis and surgery. Milano, Zanbon Group.
- Thornton, R. S. (1996). "Middle turbinate stabilization technique in endoscopic sinus surgery." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **122**(8): 869-72.

- Thurauf, N., M. Gjuric, G. Kobal e H. Hatt (1996). "Cyclic nucleotide-gated channels in identified human olfactory receptor neurons." Eur J Neurosci **8**(10): 2080-9.
- Tohyama, T., V. M. Lee, L. B. Rorke, M. Marvin, R. D. McKay e J. Q. Trojanowski (1992). "Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells." Lab Invest **66**(3): 303-13.
- Tome, M., S. L. Lindsay, J. S. Riddell e S. C. Barnett (2009). "Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa." Stem Cells **27**(9): 2196-208.
- Trojanowski, J. Q., P. D. Newman, W. D. Hill e V. M. Lee (1991). "Human olfactory epithelium in normal aging, Alzheimer's disease, and other neurodegenerative disorders." J Comp Neurol **310**(3): 365-76.
- Trotier, D., J. L. Bensimon, P. Herman, P. Tran Ba Huy, K. B. Doving e C. Eloit (2007). "Inflammatory obstruction of the olfactory clefts and olfactory loss in humans: a new syndrome?" Chem Senses **32**(3): 285-92.
- Turgut, S., Y. Gumusalan, Y. Arifoglu e A. Sinav (1996). "Endoscopic anatomic distances on the lateral nasal wall." J Otolaryngol **25**(6): 371-4.
- Tuszynski, M. H., J. D. Steeves, J. W. Fawcett, D. Lammertse, M. Kalichman, C. Rask, A. Curt, J. F. Ditunno, M. G. Fehlings, J. D. Guest, P. H. Ellaway, N. Kleitman, P. F. Bartlett, A. R. Blight, V. Dietz, B. H. Dobkin, R. Grossman e A. Privat (2007). "Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP Panel: clinical trial inclusion/exclusion criteria and ethics." Spinal Cord **45**(3): 222-31.
- Uchida, N., D. W. Buck, D. He, M. J. Reitsma, M. Masek, T. V. Phan, A. S. Tsukamoto, F. H. Gage e I. L. Weissman (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14720-5.
- Unlu, H. H., I. Tekdemir, M. Ersoy, R. Caylan, K. Arinci e Y. Nalca (1994). "Morphometric evaluation of paranasal sinuses for endoscopic sinus surgery." Ann Anat **176**(2): 193-9.
- Uraih, L. C. e R. R. Maronpot (1990). "Normal histology of the nasal cavity and application of special techniques." Environ Health Perspect **85**: 187-208.
- Vawter, M. P., J. Basaric-Keys, Y. Li, D. S. Lester, R. S. Lebovics, K. P. Lesch, H. Kulaga, W. J. Freed, T. Sunderland e B. Wolozin (1996). "Human olfactory neuroepithelial cells: tyrosine phosphorylation and process extension are increased by the combination of IL-1beta, IL-6, NGF, and bFGF." Exp Neurol **142**(1): 179-94.

- Vent, J., A. M. Robinson, M. J. Gentry-Nielsen, D. B. Conley, R. Hallworth, D. A. Leopold e R. C. Kern (2004). "Pathology of the olfactory epithelium: smoking and ethanol exposure." Laryngoscope **114**(8): 1383-8.
- Viktorov, I. V., E. A. Savchenko e V. P. Chekhonin (2007). "Spontaneous neural differentiation of stem cells in culture of human olfactory epithelium." Bull Exp Biol Med **144**(4): 596-601.
- von Brunn, A. (1892). "Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der menschlichen Nasenhöhle." Arch Mikr Anat **39**: 632-651.
- Wang, B., J. Han, Y. Gao, Z. Xiao, B. Chen, X. Wang, W. Zhao e J. Dai (2007). "The differentiation of rat adipose-derived stem cells into OEC-like cells on collagen scaffolds by co-culturing with OECs." Neurosci Lett **421**(3): 191-6.
- Watanabe, K., K. Kondo, N. Takeuchi, K. Nibu e K. Kaga (2006). "Age-related changes in cell density and the proliferation rate of olfactory ensheathing cells in the lamina propria of postnatal mouse olfactory mucosa." Brain Res **1116**(1): 82-92.
- Welge-Luessen, A., R. Hauser, N. Schmid, L. Kappos e R. Probst (2003). "Endonasal surgery for contact point headaches: a 10-year longitudinal study." Laryngoscope **113**(12): 2151-6.
- Welge-Luessen, A., T. Hummel, T. Stojan e M. Wolfensberger (2005). "What is the correlation between ratings and measures of olfactory function in patients with olfactory loss?" Am J Rhinol **19**(6): 567-71.
- Wigand, M. E. (1989). Endoskopische Chirurgie der Nasennebenhöhlen und der vorderen Schädelbasis. Stuttgart, Thieme.
- Williams, P. L. e R. Warnick (1975). Functional neuroanatomy of man. Philadelphia, WB Saunders Co.
- Winstead, W., C. T. Marshall, C. L. Lu, K. M. Klueber e F. J. Roisen (2005). "Endoscopic biopsy of human olfactory epithelium as a source of progenitor cells." Am J Rhinol **19**(1): 83-90.
- Wirz, M., G. Colombo e V. Dietz (2001). "Long term effects of locomotor training in spinal humans." J Neurol Neurosurg Psychiatry **71**(1): 93-6.
- Witt, M., K. Bormann, V. Gudziol, K. Pehlke, K. Barth, A. Minovi, A. Hahner, H. Reichmann e T. Hummel (2009). "Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease." Mov Disord **24**(6): 906-14.

- Wolozin, B., T. Sunderland, B. B. Zheng, J. Resau, B. Dufy, J. Barker, R. Swerdlow e H. Coon (1992). "Continuous culture of neuronal cells from adult human olfactory epithelium." J Mol Neurosci **3**(3): 137-46.
- Wolozin, B. L. e H. G. Coon (1999). Human olfactory neuron cultures to diagnose Alzheimer's disease. USA. **US/5869266**.
- Wu, J. C., W. C. Huang, Y. A. Tsai, Y. C. Chen e H. Cheng (2008). "Nerve repair using acidic fibroblast growth factor in human cervical spinal cord injury: a preliminary Phase I clinical study." J Neurosurg Spine **8**(3): 208-14.
- Xiao, M., K. M. Klueber, C. Lu, Z. Guo, C. T. Marshall, H. Wang e F. J. Roisen (2005). "Human adult olfactory neural progenitors rescue axotomized rodent rubrospinal neurons and promote functional recovery." Exp Neurol **194**(1): 12-30.
- Xiao, M., K. M. Klueber, J. Zhou, Z. Guo, C. Lu, H. Wang e F. J. Roisen (2007). "Human adult olfactory neural progenitors promote axotomized rubrospinal tract axonal reinnervation and locomotor recovery." Neurobiol Dis **26**(2): 363-74.
- Xue, T., L. Qiao, J. Qiu, L. Lu, D. Zha e L. Wei (2008). "Proliferation, multipotency and neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitor cells derived from the olfactory neuroepithelium of the adult rat." Cell Biol Int **32**(8): 950-8.
- Yamagishi, M., S. Hasegawa e Y. Nakano (1988). "Examination and classification of human olfactory mucosa in patients with clinical olfactory disturbances." Arch Otorhinolaryngol **245**(5): 316-20.
- Yan, J., L. Xu, A. M. Welsh, G. Hatfield, T. Hazel, K. Johe e V. E. Koliatsos (2007). "Extensive Neuronal Differentiation of Human Neural Stem Cell Grafts in Adult Rat Spinal Cord." PLoS Med **4**(2): e39.
- Yoon, S. H., Y. S. Shim, Y. H. Park, J. K. Chung, J. H. Nam, M. O. Kim, H. C. Park, S. R. Park, B. H. Min, E. Y. Kim, B. H. Choi, H. Park e Y. Ha (2007). "Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial." Stem Cells **25**(8): 2066-73.
- Yu, S., J. Z. Zhang, C. L. Zhao, H. Y. Zhang e Q. Xu (2004). "Isolation and characterization of the CD133+ precursors from the ventricular zone of human fetal brain by magnetic affinity cell sorting." Biotechnol Lett **26**(14): 1131-6.

- Zhang, J. e D. M. Webb (2003). "Evolutionary deterioration of the vomeronasal pheromone transduction pathway in catarrhine primates." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8337-41.
- Zhang, X., J. Cai, K. M. Klueber, Z. Guo, C. Lu, M. Qiu e F. J. Roisen (2005). "Induction of oligodendrocytes from adult human olfactory epithelial-derived progenitors by transcription factors." Stem Cells **23**(3): 442-53.
- Zhang, X., J. Cai, K. M. Klueber, Z. Guo, C. Lu, W. I. Winstead, M. Qiu e F. J. Roisen (2006). "Role of transcription factors in motoneuron differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors." Stem Cells **24**(2): 434-42.
- Zhang, X., K. M. Klueber, Z. Guo, J. Cai, C. Lu, W. I. Winstead, M. Qiu e F. J. Roisen (2006). "Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors." Brain Res **1073-1074**: 109-19.
- Zhang, X., K. M. Klueber, Z. Guo, C. Lu e F. J. Roisen (2004). "Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium." Exp Neurol **186**(2): 112-23.
- Zietlow, R., E. L. Lane, S. B. Dunnett e A. E. Rosser (2008). "Human stem cells for CNS repair." Cell Tissue Res **331**(1): 301-22.