

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Matheus Pippi da Rosa

**ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA
POLPA DENTÁRIA CANINA EM CÉLULAS PROGENITORAS
NEURAS**

Santa Maria, RS
2018

Matheus Pippi da Rosa

**ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA
DENTÁRIA CANINA EM CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Cirurgia e clínica de pequenos animais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Daniel Curvello de Mendonça Müller

Coorientador: Prof. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho

Santa Maria, RS
2018

Ficha Catalográfica

da Rosa, Matheus
ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA
DENTÁRIA CANINA EM CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIAS / Matheus
da Rosa.- 2018.
33 p.; 30 cm

Orientador: Daniel Curvello de Mendonça Müller
Coorientador: Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2018

1. Células-tronco 2. Diferenciação celular 3. Polpa
dentária canina 4. terapia celular 5. medicina
regenerativa I. Curvello de Mendonça Müller, Daniel II.
Tadeu Lemos Pinto Filho, Saulo III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo

autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável
Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Matheus Pippi da Rosa

**ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA
DENTÁRIA CANINA EM CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Cirurgia e clínica de pequenos animais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2018:

Daniel Curvello de Mendonça Müller, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Luciana Maria Fontanari Krause, Dra. (UNIFRA)

Rafael Almeida Fighera, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora Medianeira por mais esta graça alcançada.

A minha mãe, Carmem, por todo amor, carinho, dedicação e sacrifícios pessoais que possibilitaram toda minha caminhada até aqui.

A mulher que eu escolhi como companheira, Juliana Germano Ferst, agradeço por todo amor, companheirismo, amizade, cumplicidade, crença e ajuda empenhada, em cada nova etapa de nossas vidas. Meu sincero amor.

A Mariangela e Júlio Ferst, por me receberem em sua família, por todos os ensinamentos, apoio e carinho.

A minha irmã, Michele, juntamente com meu cunhado Antônio Junior, pela disposição em ajudar-me, torcida e dar-me minha amada afilhada Helena.

A meu primo, Augusto, que considero irmão, por todos os momentos de amizade, descontração e apoio que sempre demonstrou por mim, te amo primo.

A minha avó, Nelcinda, pelo exemplo de força e fé na vida, por ser o pilar de nossa família, obrigado por ser minha segunda mãe.

A meu orientador, Daniel Müller, pela oportunidade e confiança em mim depositada, obrigado por todos os ensinamentos.

A meu coorientador, Saulo Pinto Filho, por toda a orientação, dedicação e sábios conselhos. Agradeço por ser sobretudo, meu amigo, sempre disposto a ajudar e oferecer sua sinceridade nas palavras. Obrigado Doutor.

Ao professor Ney Luis Pippi, por todas as conquistas e realizações em nosso Hospital Veterinário, sem as quais, a realização deste trabalho não seria possível.

A minha colega de laboratório e futura colega de pós-graduação, Emanuelle Degregori, por toda ajuda, empenho e extrema dedicação nas diferentes etapas do presente trabalho.

Agradeço a UFSM, por ter disponibilizado minha formação e especialização, ao PPGMV, em especial a Maria da Rosa, pelo exemplar trabalho e desempenho em sua função, sempre disposta a ajudar.

RESUMO

ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA CANINA EM CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIAS

Autor: Matheus Pippi da Rosa
Orientador: Daniel Curvello de Mendonça Müller
Coorientador: Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho

O desenvolvimento de pesquisas que promovam o entendimento dos mecanismos da neurogênese é de fundamental importância para o tratamento de muitas doenças neurológicas degenerativas em humanos e animais. Contudo, a obtenção de células-tronco neurais para isolamento e cultivo *in vitro*, necessita coleta de tecidos vitais para o paciente. A restrição ao acesso destes tecidos, bem como limitações na prática experimental, tem incentivado pesquisadores a buscar alternativas utilizando o potencial de diferenciação apresentado por células-tronco encontradas no indivíduo adulto. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar a capacidade de diferenciação das células-tronco da polpa dentária canina em células progenitoras neurais, quando estimuladas *in vitro*, assim como quantificar a obtenção e viabilidade das células indiferenciadas, ao longo de três passagens em cultura celular. Foram isoladas células pulpares de dois cães, com aproximadamente dez meses de idade, que apresentaram óbito em decorrência de traumatismo automotivo. As células foram expandidas durante três passagens em cultura celular, onde foram realizadas avaliações de viabilidade e obtenção celular. Posteriormente, foram expostas a cultivo em meio indutor a diferenciação neural. O perfil imunofenotípico pós-indução, foi avaliado utilizando testes de citometria de fluxo e imunocitoquímica fluorescente. Após sete dias de cultura indutora neural, foram observadas formações de agrupamentos celulares esféricos, condizentes com neuroesferas. Após 14 dias, foi possível verificar elevada expressão de marcadores neurais anti-*nestina* e anti-GFAP, sugerindo que as células-tronco indiferenciadas da polpa dentária canina são capazes de apresentar diferenciação neural, mediante estímulos adequados. A polpa dentária canina demonstrou elevada capacidade em fornecer células-tronco indiferenciadas altamente viáveis.

Palavras-chave: neuroesfera, polpa dentária, terapia celular

ABSTRACT

ISOLATION AND DIFFERENTIATION OF CANINE DENTAL PULP STEM CELLS IN NEURAL PROGENITOR CELLS.

Author: Matheus Pippi da Rosa
Advisor: Daniel Curvello de Mendonça Müller
Coorientator: Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho

The development of research that promotes the understanding of the mechanisms of neurogenesis is important for the treatment of many degenerative neurological diseases in humans and animals. However, obtaining neural stem cells for isolation and in vitro culture requires the collection of tissues vital to the patient. The restriction of access of these tissues and limitations in experimental practice has encouraged researchers to seek alternatives using the differentiation potential presented in stem cells of the adult individual. The aim of the study was to verify the differentiation capacity of canine dental pulp stem cells in neural progenitor cells when stimulated in vitro, and quantify the attainment and viability of the undifferentiated cells, during three cell culture passages. Dental pulp cells were isolated from two dogs, with ten months age around, that died due to automobile trauma. Cells were expanded for three days in cell culture and cell number and cell viability evaluations were performed. Subsequently, neural differentiation was performed in induction medium culture. The post-induction immunophenotypic profile was evaluated using flow cytometry and fluorescent immunocytochemistry tests. Spherical cell groupings, consistent with neurospheres, were observed seven days after. It was possible to verify high expression of anti-nestin and anti-GFAP neural markers after 14 days, suggesting that the undifferentiated dental pulp canine stem cells are able to present neural differentiation, through appropriate stimuli. Dental pulp canine has been shown to be highly capable of delivering viable undifferentiated stem cells.

Key words: neurospher, dental pulp, cell therapy

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO ₂	Gás carbônico
CT	Célula-tronco
CTIPD	Célula-tronco indiferenciada da polpa dentária
CTIPDC	Célula-tronco indiferenciada da polpa dentária canina
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTPDC	Célula-tronco da polpa dentária canina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
NPC	Célula-tronco neural
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
VCC	Vírus da cinomose canina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CINOMOSE CANINA.....	13
2.2 CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS.....	14
2.3 CÉLULAS-TRONCO INDIFERENCIADAS DA POLPA DENTÁRIA	15
3. CAPÍTULO 1	17
4. CONCLUSÃO.....	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

Quando em 1839, o fisiologista Theodor Schwann lançou as bases da teoria celular, muitos estudiosos ficaram intrigados com a possibilidade de uma única célula embrionária ser capaz de dar origem aos mais de 200 tipos celulares distintos formadores do ser humano. Conseqüentemente, iniciou-se estudos na tentativa de entender o processo de diferenciação dessas “células mãe”, com a finalidade de tratar doenças ou até mesmo formar tecidos complexos. Contudo, naquela época, a manipulação de células embrionárias humanas foi considerada inapropriada devido questões éticas e religiosas, que regem as normativas da pesquisa com células-tronco até os dias atuais. Entre os anos de 1930 e 1960, observou-se que algumas células hematopoiéticas encontradas no indivíduo adulto, originavam-se de uma mesma célula em comum, as então chamadas “células-tronco”. Tratando-se de um tecido adulto, não houve impedimento para o desenvolvimento destas pesquisas. No final da década de 1950, foi realizado com sucesso, o primeiro transplante de medula óssea em seres humanos, que consiste na transferência de células-tronco do sistema hematopoiético entre indivíduos de mesma espécie. Nos anos seguintes, foram descobertas técnicas de cultivo celular em laboratório, sequenciamento e manipulação do material genético, fatos que permitiram a exploração de inúmeras pesquisas a nível celular.

As células-tronco são classificadas, basicamente, em embrionárias ou adultas, de acordo com a fase de desenvolvimento do indivíduo de que foram coletadas (PITTINGER *et al.*, 1999). Outra classificação, diz respeito ao seu potencial de diferenciação celular, sendo classificadas em cinco categorias distintas: a) totipotentes, capazes de se diferenciarem em todos os tecidos que formam o indivíduo e seus anexos fetais, tais células são encontradas na fase de zigoto; b) pluripotentes, presentes na massa celular interna do blastocisto e capazes de se diferenciarem em células dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma); c) multipotentes, diferenciam-se em vários tipos de células de um mesmo folheto embrionário; d) oligopotentes, capazes de se diferenciar em poucas células de um mesmo folheto embrionário; e) unipotentes, diferenciam-se em um único tipo celular de seu folheto embrionário primordial (YARAK e OKAMOTO, 2010). As células-tronco adultas foram classificadas inicialmente, em hematopoiéticas e somáticas. Após

subsequentes estudos e a popularização das técnicas de imunofenotipagem, constatou-se que existem distinções entre os grupos de células progenitoras presentes nos mamíferos adultos. Atualmente, as células-tronco adultas são subdivididas em cinco grupos distintos: mesenquimais, estromais, hematopoiéticas, somáticas e neurais. Recentemente, estudos demonstraram que as células-tronco indiferenciadas contidas na polpa dentária canina (CTIPDCs), não apresentam os mesmos marcadores fenotípicos do grupo das células mesenquimais do qual fazem parte (DISSANAYAKA *et al.*, 2011). Esta evidência sugere novas possibilidades devido ao amplo potencial de diferenciação apresentado por este grupo de células pulpares humanas, quando estimuladas *in vitro*, são capazes de apresentar diferenciação osteogênica, adipogênica, condrogênica, odontoblastogênica e neurogênica (BATOULI *et al.*, 2003; LAINO *et al.*, 2006). A pesquisa utilizando células-tronco da polpa dentária canina é bastante recente e visa basicamente, regeneração odontológica (NAKASHIMA, 1990). Neste contexto, nosso grupo procurou investigar o potencial de neurodiferenciação expresso por este grupo celular.

Na rotina clínica veterinária de cães, doenças neurodegenerativas primárias como mielopatia degenerativa dos cães, ceroidlipofuscinose neuronal e epilepsia ocorrem com frequência relativamente baixa, contudo, lesões traumáticas, neoplasmas e principalmente lesões neurodegenerativas secundárias a infecções, apresentam elevada taxa de ocorrência. A infecção neurológica causada pelo vírus *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae*, causador da cinomose canina, representa a principal alteração neurológica observada nesta espécie (FENNER, 2004). Esta infecção viral pode causar a morte em cães de todas as idades ou gerar sequelas neurológicas irreversíveis, devido a desmielinização dos axônios neuronais, que compromete significativamente a qualidade de vida dos pacientes caninos (CORRÊA, 1992).

O desenvolvimento de pesquisas utilizando o potencial de neurodiferenciação apresentado pelas células-tronco indiferenciadas da polpa dentária humana, aparenta ser viável na espécie canina, fornecendo fonte alternativa de obtenção de células-tronco neurais (NPCs), sem a necessidade de coleta de tecido encefálico. A melhor compreensão dos mecanismos da neurogênese canina na vida adulta, somado ao possível potencial de diferenciação neural das células-tronco da polpa dentária (CTPD) apresentado em outras espécies, pode contribuir em futuras pesquisas no tratamento das alterações neurológicas encontradas em cães. Desta forma, o objetivo

deste estudo foi avaliar a capacidade de diferenciação das CTIPDC em células progenitoras neurais (NPCs), quando estimuladas *in vitro*, bem como caracterizar e quantificar a obtenção e viabilidade das células indiferenciadas, no decorrer de três passagens em cultura celular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, tem-se desenvolvido diversos estudos utilizando células-tronco (CT), na tentativa de desenvolver tratamentos para doenças neurológicas degenerativas na medicina humana. Tais pesquisas demonstram o grande potencial que essas células apresentam e a ampla possibilidade ação no tratamento de doenças degenerativas como Parkinson, Alzheimer, entre outras. Contudo, o número de pesquisas envolvendo células-tronco na terapia neurológica em medicina veterinária, ainda é limitado, restringindo-se a lesões vertebrais e de nervos periféricos. Com a finalidade de exemplificar os mecanismos de lesões neurológicas infecciosas e expor a possível potencialidade terapêutica das CTIPDC, o presente trabalho baseou-se na fisiopatologia da cinomose canina.

2.1 CINOMOSE CANINA

A cinomose canina é uma doença infectocontagiosa, causada por um *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae* (FENNER, 2004). Acomete cães de todas as raças e idades, apresentando maior incidência em animais jovens não imunizados. A transmissão da doença ocorre tanto por aerossóis e gotículas contaminadas oriundos do sistema respiratório, quanto por fezes, urina e secreções do sistema excretor canino (CORRÊA, 1992). Após o contato com o epitélio respiratório superior, o vírus da cinomose canina (VCC) replica-se no interior dos macrófagos regionais sendo disseminado por via linfática até os linfonodos brônquicos e tonsilas (VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005). No período de quatro a seis dias subsequentes a infecção, o vírus pode ser encontrado na medula óssea, timo, baço, linfonodos mesentéricos, células estomacais, células de Küpffer e células mononucleares ao redor dos vasos pulmonares (MANGIA e PAES, 2008). Estima-se que entre o oitavo e décimo dia pós-infecção, o VCC adentre o sistema nervoso central (SNC) da maioria ou até da totalidade dos cães infectados, com intensidade de sinais clínicos neurológicos variáveis ou ausentes (KRAKOWKA *et al.*, 1987). A ocorrência das manifestações clínicas neurológicas pode se manifestar juntamente com os sinais clínicos sistêmicos, posteriormente ou até meses depois, de maneira isolada (GREENE e APPEL, 2006). A evolução da apresentação sistêmica da doença para a forma neurológica pode ser

explicada devido a falha do organismo em combater a infecção no sistema nervoso central (SUMMERS *et al.*, 1995).

O VCC utiliza múltiplos sítios para adentrar o SNC, sendo o endotélio vascular, a via inicial mais provável, por meio da infiltração viral na forma livre ou em complexos formados por vírus-IgG-plaquetas (MORO *et al.*, 2004). O epitélio vascular infectado, passa a liberar moléculas de adesão, promovendo o margejamento e recrutamento de leucócitos para o interior do SNC na tentativa de eliminar a infecção. O vírus passa a infectar astrócitos e oligodendrócitos, promovendo elevado grau de replicação viral em seus espaços intracelulares. O líquido cérebro-espinhal também é considerado um meio importante de disseminação e entrada do VCC no SNC (VANDEVELDE *et al.*, 1985).

A disseminação viral nos tecidos do SNC ocorre quando o sistema imune do animal falha na tentativa de combater a infecção (MANGIA e PAES, 2008). O VCC passa então, a causar destruição dos astrócitos e oligodendrócitos provocando intensa encefalite com desmielinização multifocal, considerada lesão clássica da cinomose (SILVA *et al.*, 2009). A desmielinização dos neurônios pode causar o surgimento de apatia, ataxia, paraplegia, tetraplegia, atrofia muscular, hiperestesia, mioclonia, tremor, convulsões e coma (CORRÊA, 1992; GREENE e APPEL, 2006; TIPOLD *et al.*, 1992). O óbito ocorre em grande parte dos animais acometidos pelo VCC, devido a complicações causadas nos diferentes sistemas do organismo ou pela realização de eutanásia em decorrência das lesões neurológicas com grande comprometimento a qualidade de vida do animal. A encefalite causada pelo VCC foi apontada como a principal causa de morte ou razão para realização de eutanásia de cães submetidos a necropsia na mesorregião do centro ocidental rio-grandense (FIGHERA *et al.*, 2014).

2.2 CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIAS

Durante as últimas duas décadas, estudos comprovaram a existência de células-tronco neurais no SNC de algumas espécies de aves e mamíferos primatas adultos, porém, não foram encontrados relatos da identificação de tais células no encéfalo de cães até o momento da realização deste estudo (ERIKSSON *et al.*, 1998; GOLDMAN e NOTTEBOHM, 1983; KORNACK e RAKIC, 1999; VAN PRAAG *et al.*, 1999). Contudo, em humanos, o processo de neurogênese, aparenta sofrer um

grande declínio após o primeiro ano de vida. Este grupo celular pode ser encontrado em dois sítios específicos do SNC das espécies descritas, a zona subgranular, localizada no hipocampo e a zona subventricular dos ventrículos laterais (ALVAREZ *et al.*, 2002; ERIKSSON *et al.*, 1998).

As células progenitoras neurais apresentam capacidade de autorrenovação e diferenciação em neurônios e diferentes linhagens celulares gliais, incluindo astrócitos e oligodendrócitos. Foi evidenciado reposição de mielina em modelos de camundongos induzidos a desmielinização dos axônios, demonstrando a possibilidade de possíveis tratamentos de doenças desmielinizantes em outras espécies (MILWARD *et al.*, 1997). Quando isoladas *in vitro* e cultivadas em meio neurobasal, as NPCs tendem a formar agrupamentos celulares conhecidos como *clusters*, sendo que recentemente, esses agrupamentos neurais receberam a denominação de neuroesferas. As células agrupadas apresentam expressão de nestina em seu citoplasma, e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em sua membrana, evidências de sua origem neural e marcador de células astrocíticas, respectivamente (MILWARD *et al.*, 1997; SCHWINDT *et al.*, 2009). No entanto, não se conhece o motivo pelo qual as NPCs encontradas no encéfalo adulto apresentam baixa habilidade regenerativa tecidual após injúrias nos tecidos do SNC (DE PAULA *et al.*, 2005).

A obtenção das NPCs consiste no isolamento por meio de digestão enzimática do tecido hipotalâmico derivado de embriões ou do encéfalo adulto após a morte do indivíduo, não sendo possível a realização de autotransplante (NUNES *et al.*, 2003).

2.3 CÉLULAS-TRONCO INDIFERENCIADAS DA POLPA DENTÁRIA

As células tronco indiferenciadas da polpa dentária (CTIPD), podem ser encontradas na cavidade pulpar dental, tanto nos dentes decíduos quanto na fase de formação da dentição permanente (WANG *et al.*, 2013). Apresentam origem na migração de células oriundas da crista neural durante o desenvolvimento embrionário, possivelmente influenciando no padrão fenotípico e potencial de diferenciação destas células (TATULLO *et al.*, 2015). Durante o desenvolvimento dental, as CTIPD realizam diferenciação odontoblastogênica e participam da nutrição do tecido odontóide, processo fundamental para formação da dentina. Embora o tecido dental não apresente as mesmas características de reparação do tecido ósseo, algum grau de

formação de dentina é observado após fraturas dentais. Este processo ocorre por meio da diferenciação das CTIPD em dentina secundária desorganizada, com função de proteger a cavidade pulpar e manter a vitalidade dental (LIU *et al.*, 2006).

Estudos anteriores demonstram que este grupo celular é facilmente isolado a partir do tecido encontrado na cavidade pulpar dentária humana (BATOULI *et al.*, 2003; GRONTHOS *et al.*, 2000; NAKASHIMA, 2005; NAKASHIMA e AKAMINE, 2005; NAKASHIMA e REDDI, 2003; SHI *et al.*, 2001). Recentemente, autores relataram a presença das CTIPD em dentes pré-molares e dentes caninos decíduos de cães jovens, padronizando técnicas de isolamento e padrão imunofenotípico expresso por elas (ARAMBURU *et al.*, 2014; DISSANAYAKA *et al.*, 2011).

As células-tronco indiferenciadas da polpa dentária canina, apresentam morfologia fibroblastóide, capacidade de autorrenovação e algum grau de plasticidade. São classificadas como células progenitoras multipotentes, contudo, quando estimuladas *in vitro*, são capazes de diferenciar-se em tecidos de diferentes origens embrionárias como, odontoblastos, adipócitos, neurônios e células da glia (DISSANAYAKA *et al.*, 2011).

Atualmente, um grande número de estudos utilizando células-tronco mesenquimais (CTM) tem sido desenvolvidos demonstrando a atividade imunomodulatória e grande capacidade em regenerar tecidos somáticos que tais células apresentam (MÜLLER *et al.*, 2013; OLSSON *et al.*, 2008; PINTO FILHO *et al.*, 2015). As CTMs apresentaram também, algum grau de diferenciação neural quando aplicadas diretamente no SNC (GRONTHOS *et al.*, 2000). Contudo, acredita-se que as CTIPDC apresentam elevada capacidade de diferenciação em células progenitoras neurais, devido sua origem embrionária. Estas células demonstram ainda, algumas características imunofenotípicas comuns as CTM, como expressão de marcadores positivos STRO-1, CD146, CD34 e Nanog, porém diferem-se das mesenquimais por apresentarem marcação negativa para os CDs 73 e 105 (DISSANAYAKA *et al.*, 2011).

Considerando a fácil obtenção do tecido dentário sem comprometimento da vida do paciente e as características demonstradas pelas CTIPDC, acreditamos que este estudo seja capaz de promover diferenciação neural, bem como servir como modelo para o melhor entendimento dos processos da neurogênese canina.

3. CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA CANINA EM CÉLULAS PROGENITORAS NEURAS

Matheus P. da Rosa, Emanuelle B. Degregori, Juliana G. Ferst, Micheli M. Pillat,
Kalyne Bertolin, João R. M. de Souza, Lucas K. Bello, Saulo T. L. Pinto Filho, Daniel
C. M.Müller

Artigo Será Submetido a Revista Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Fevereiro de 2018

1 ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA
2 CANINA EM CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIIS.

3
4 ISOLATION AND DIFFERENTIATION OF CANINE DENTAL PULP STEM CELLS IN
5 NEURAL PROGENITOR CELLS.

6
7 Matheus Pippi da Rosa *; Emanuelle Bortolloto Degregori , Juliana Germano Ferst , Micheli
8 Mainardi Pillat , Kalyne Bertolin , João Ricardo Malheiros de Souza , Lucas Krush Bello ,
9 Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho , Daniel Curvello de Mendonça Müller

10 Programa de pós-graduação em medicina veterinária UFSM

11 Programa de pós-graduação em Bioquímica UFSM

12
13 RESUMO

14 O objetivo do presente estudo foi verificar a capacidade de diferenciação das células-
15 tronco da polpa dentária canina em células progenitoras neurais e quantificar a obtenção e
16 viabilidade destas células durante três passagens em cultura. As células foram extraídas da
17 polpa dentária de dois cadáveres caninos, de aproximadamente dez meses de idade, que foram
18 a óbito em decorrência de trauma automotivo. Após três passagens de culturas expansoras, foi
19 realizado quantificação do total de células viáveis. As mesmas foram induzidas a diferenciação
20 neural em meio de cultura neurobasal (Gibco™), aderidas ao plástico ou suspensas em placas
21 tratadas com agarose. A validação da diferenciação celular foi realizada no 7º dia e 14º dia,
22 através de avaliação da morfologia celular e perfil imunofenotípico, utilizando citometria de
23 fluxo e imunocitoquímica fluorescente. Após 14 dias, as células apresentaram elevado grau de
24 expressão para marcadores anti-nestina e anti-GFAP. No 25º dia do cultivo de expansão, foram
25 obtidas em média 18×10^6 células viáveis indiferenciadas de cada tecido pulpar. Conclui-se que
26 as células-tronco indiferenciadas da polpa dentária canina apresentaram índices satisfatórios de
27 diferenciação em células progenitoras neurais, quando cultivadas aderidas ou em suspensão. A
28 polpa dentária dos dentes decíduos caninos, forneceu grande número de células indiferenciadas
29 e amplamente viáveis.

30 Palavras-chave: neuroesferas, polpa dentária, terapia celular

31
32 ABSTRACT

33 The objective of the present study was to verify the differentiation capacity of canine
34 tooth pulp stem cells in neural progenitor cells and to quantify the attainment and viability of

35 these cells during three culture passages. The cells were extracted from the dental pulp of two
36 canine corpses, with approximately ten months of age, which died due to automotive trauma.
37 After three passages of expander cultures, the total number of viable cells was quantified. They
38 were induced to neural differentiation in neurobasal culture media (Gibco™), adhered to the
39 plastic or suspended in agarose-treated plates. The cell differentiation was validated on the 7th
40 day and 14th day, by means of evaluation of cell morphology and immunophenotypic profile,
41 using flow cytometry and fluorescent immunocytochemistry. After 14 days, the cells had a high
42 degree of expression for anti-nestin and anti-GFAP markers. On the 25th day of the expansion
43 culture, an average of 18×10^6 undifferentiated viable cells from each pulp tissue were
44 obtained. It was concluded that the undifferentiated stem cells of the canine pulp presented
45 satisfactory indices of differentiation in neural progenitor cells, when cultivated adhered or in
46 suspension. The dental pulp of deciduous canine teeth provided a large number of
47 undifferentiated and widely viable cells.

48 Key words: neurospheres, dental pulp, cell therapy

49

50 INTRODUÇÃO

51 Evidências da neurogênese contínua no encéfalo adulto de humanos e algumas espécies
52 de animais domésticos, foram amplamente descritas por pesquisadores anteriormente
53 (Goldman e Nottebohm, 1983; Milward *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 1998; Kornack e Rakic,
54 1999; Van Praag *et al.*, 1999). As células progenitoras neurais (NPCs), foram isoladas do
55 encéfalo adulto, nas zonas subventriculares dos ventrículos laterais e zona subgranular do
56 hipocampo. Contudo, a neurogênese humana apresenta grande declínio após o primeiro ano de
57 vida (Sanai *et al.*, 2011).

58 O isolamento e cultivo das NPCs, fornece incrementos para melhor compreensão dos
59 mecanismos de formação e maturação neural, possibilitando pesquisas para o tratamento de
60 doenças neurodegenerativas e desordens desmielinizantes como Parkinson, Huntington,
61 Alzheimer, esclerose múltipla e epilepsia (Oliver-De La Cruz *et al.*, 2014; Behnan *et al.*, 2017).
62 Entretanto, a dificuldade na obtenção de cadáveres doadores incentivou a busca por alternativas
63 para obtenção das células-tronco neurais. Gronthos *et al.* (2002), descreveram o potencial de
64 diferenciação das células-tronco da polpa dentária (CTPDs) humana em células neurais,
65 permitindo a obtenção deste grupo celular, sem a necessidade de óbito do indivíduo doador.
66 Quando as CTPDs encontram-se indiferenciadas, exercem funções na nutrição dentária e
67 realizam diferenciação em odontoblastos durante a fase de formação dental (Liu *et al.*, 2006).

68 As CTPDs foram posteriormente isoladas de dentes pré-molares e dentes caninos
69 decíduos de cães, evidenciando excelente capacidade de proliferação *in vitro* e suas
70 características imunofenotípicas. Foi verificado ainda, o potencial de induzi-las a diferenciação
71 para regeneração de tecido odontológico (Dissanayaka *et al.*, 2011; Aramburu *et al.*, 2014).
72 Contudo, se desconhece a capacidade de diferenciação neural destas células na espécie canina.

73 A patologia veterinária, apresenta desordens neurodegenerativas, com fisiopatologias
74 semelhantes as encontradas na medicina humana, como ocorre na mielopatia degenerativa dos
75 cães, ceroidolipofuscinose neuronal, Epilepsia, traumatismos e neoplasmas (Gilliam *et al.*,
76 2015; De Guzzi *et al.*, 2017). Porém, as alterações neurais secundárias a doenças infecciosas,
77 como aquelas causadas pelo vírus da cinomose canina, são comumente relatadas como as
78 principais causas de morte ou motivo para eutanásias na rotina clínica veterinária (Fighera *et*
79 *al.*, 2014). Neste contexto, acredita-se que a diferenciação das CTPDs canina em NPCs, seja
80 capaz de servir como modelo experimental para o desenvolvimento de pesquisas futuras no
81 tratamento de algumas das alterações neurológicas desta espécie. O presente estudo buscou
82 verificar a capacidade de diferenciação das CTPDs canina em células progenitoras neurais,
83 quando estimuladas *in vitro*, bem como quantificar a obtenção e viabilidade das células
84 indiferenciadas, ao longo de três passagens de cultura celular.

85

86 MATERIAL E MÉTODOS

87 Para a realização do presente estudo, foi coletado material dentário de cadáveres de dois
88 cães, oriundos da rotina cirúrgica do Hospital Veterinário Universitário da UFSM. Os animais
89 não apresentavam raça definida, tinham idade aproximada de dez meses, e foram a óbito em
90 decorrência de traumatismo automobilístico. Os dentes caninos decíduos superiores
91 persistentes do lado esquerdo, foram selecionados para a coleta.

92 Utilizando material ortodôntico, ambas as exodontias foram realizadas após duas horas
93 da constatação do óbito dos animais. Os Dentes foram acondicionados individualmente, em
94 tubos cônicos contendo 10 ml de solução balanceada de Hank's acrescida de 1% de penicilina
95 e estreptomicina e 1% de anfotericina B (Sigma Aldrich®,USA), com a finalidade de impedir
96 a proliferação de agentes contaminantes. No interior da capela de fluxo laminar e com auxílio
97 de brocas odontológicas, foi realizada limpeza minuciosa de toda superfície dental, retirando
98 completamente os resquícios de ossos alveolares e sujidades. Os dentes foram depositados
99 novamente em tubos cônicos, porém, contendo 10 ml de solução composta por 5 ml de álcool
100 70% e 5 ml de iodo 10%, onde foram mantidos por duas horas.

101 Utilizando broca odontológica, foram criados sulcos circulares, de aproximadamente 3
102 mm de profundidade, na região da base da coroa dental, com a finalidade de permitir o
103 fracionamento do dente na porção medial, obtendo acesso a cavidade pulpar. A polpa dentária
104 foi coletada utilizando pinça histológica ponta fina. O material pulpar foi acondicionado em
105 placa de Petri, contendo solução balanceada de Hank's para evitar ressecamento tecidual.

106 O isolamento celular foi realizado por meio de digestão enzimática utilizando 1 ml de
107 solução de 0,5% colagenase tipo I, por tecido pulpar. O material foi acondicionado em tubos
108 cônicos e mantidos em imersão de água, a 37°C, durante 60 minutos. Ao final deste período, os
109 tubos foram transferidos para o interior da capela de fluxo laminar, onde foram adicionados 3
110 ml de meio de cultura em cada tubo, composto por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (meio
111 DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina
112 e 1% e anfotericina B, com a finalidade de neutralizar a ação da colagenase. O material foi
113 levado a centrifugação durante 10 minutos em velocidade de 3.900 rpm. Ao final do
114 procedimento, foi possível verificar a formação de precipitado ao fundo do tubo cônico. A
115 porção sobrenadante de cada tubo, foi substituída por 3 ml de meio de cultura promovendo
116 solubilização do precipitado. Os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos, porém,
117 em velocidade de 1.500 rpm. Novamente a porção líquida foi descartada e adicionado 5 ml de
118 meio de cultura celular junto ao precipitado contido em cada tubo cônico. O conteúdo foi
119 solubilizado e transferido para duas garrafas de cultura de 25cm de superfície de cultivo.

120 As garrafas foram acondicionadas em estufa de cultivo celular, com temperatura
121 constante de 37°C e suplemento de 5% de gás carbônico (CO₂). O meio de cultura era
122 substituído em sua totalidade, a cada três dias, quando também foram realizadas as análises
123 visuais de crescimento celular. Após obtenção de 80% de confluência, foram realizadas técnicas
124 de passagem de cultura celular conforme descritas por Dissanayaka *et al.* (2011); Aramburu *et*
125 *al.*(2014). O número de células obtidas em cada passagem, bem como grau de viabilidade
126 celular, foram avaliados em câmara de contagem, utilizando em técnica padrão. Padronizou-se
127 a utilização de 1x10⁴ células viáveis por centímetro quadrado de área, para a expansão celular
128 a cada passagem.

129 Quando se alcançou a terceira passagem de cultura, o total de células viáveis obtidas foi
130 contabilizado individualmente para cada animal. Foram coletadas 4x10⁶ células pertencentes
131 ao doador nº 1, para realização das induções neurais. Esta fração celular foi subdividida em
132 quatro, formando os grupos: animal 1 Indução, denominado G1.7, onde as avaliações foram
133 realizadas aos 7 dias após a indução neurogênica; animal 1 Controle 7, denominado C1.7 onde
134 as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM e avaliação aos 7 dias; animal 1 Indução,

135 denominado G1.14, com avaliações após 14 dias de cultivo indutor; animal 1 controle 14,
136 denominado C1.14, células cultivadas em meio de cultura DMEM e avaliação aos 14 dias. As
137 células pertencentes ao doador nº 2, foram igualmente coletadas e subdivididas formando os
138 grupos: G2.7; C2.7; G2.14 e C2.14

139 As células de todos os grupos foram acondicionadas em placas de cultura de 6 poços,
140 com superfície de poliestireno. O meio de cultura indutor, foi composto por 3 ml de meio
141 neurobasal (Gibco™) suplementado com 2% de B27 (Gibco™) para cada poço. Foram
142 realizadas trocas de meio a cada três dias, até a realização das avaliações de acordo com cada
143 grupo.

144 Paralelamente, foram separadas 4×10^6 de cada um dos doadores, porém, foram
145 acondicionadas em placas com superfícies de cultura tratadas com solução de 1,5% de agarose,
146 com a finalidade de impedir a aderência celular. A divisão dos grupos manteve o padrão
147 utilizado nas células cultivadas aderidas e com mesmo período de avaliações, entretanto, estes
148 grupos foram submetidos somente a citometria de fluxo e registro fotográfico de formação de
149 neuroesferas. Esta subdivisão gerou os grupos: G3.7; G4.7; C3.7; C4.7; G3.14; G4.14; C3.14 e
150 C4.14.

151 Para realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo, as células de todos os
152 grupos foram fixadas suspensas em solução de 4% de paraformaldeído (PFA), durante 20
153 minutos a 4°C. Posteriormente as amostras foram incubadas por 20 minutos, em solução de
154 *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) (Sigma Aldrich®, USA), acrescida de 3% de SFB.
155 Adicionou-se ainda, 0,1% de triton x-100 (Gibco™). Sequencialmente, foram adicionados os
156 anticorpos primários anti-nestina (Gibco™, USA), produzido em camundongo, na diluição de
157 1:1000. Após 30 minutos de incubação em temperatura de 25°C, as células foram lavadas com
158 solução de PBS e incubadas por 30 minutos com os anticorpos secundários IgG anti-
159 camundongo conjugados a fluoróforos Alexa Fluor® 488. Finalmente, as células foram lavadas,
160 ressuspensas em 500ml de PBS e acondicionadas em tubos de citometria. A análise foi
161 realizada em equipamento de citometria de fluxo (FAX Verse BD®).

162 A análise imunocitoquímica por fluorescência, foi realizada em cultivos celulares
163 paralelos dos grupos cultivados aderidos a superfície de cultivo. Foram cultivados em placas de
164 24 poços, com fundo revestido por lamínulas tratadas com laminina (20µg/ml). As células
165 analisadas nos dias 7 e 14 pós-tratamento, foram fixadas de modo semelhante ao ensaio de
166 citometria de fluxo, contudo, além dos anticorpos primários e secundários anti-nestina, foram
167 adicionados anticorpos primários anti-GFAP (DAKO®, USA) produzidos em camundongo e
168 realizada marcação dos núcleos celulares, adicionando solução de DAPI (Sigma Aldrich®,

169 USA, 0,3 µg/ml). Para este teste, os anticorpos primários e secundários foram incubados
170 durante duas horas e uma hora, respectivamente. As análises foram obtidas em equipamento de
171 microscopia de fluorescência (PALM MicroBeam Zeiss®)

172 A mensuração da viabilidade e obtenção celular foi realizada nas três passagens do
173 cultivo celular das células-tronco da polpa dentária canina (CTPDC). Foram utilizados métodos
174 padrões de avaliação em câmara de contagem celular (Sprada *et al.*, 2015).

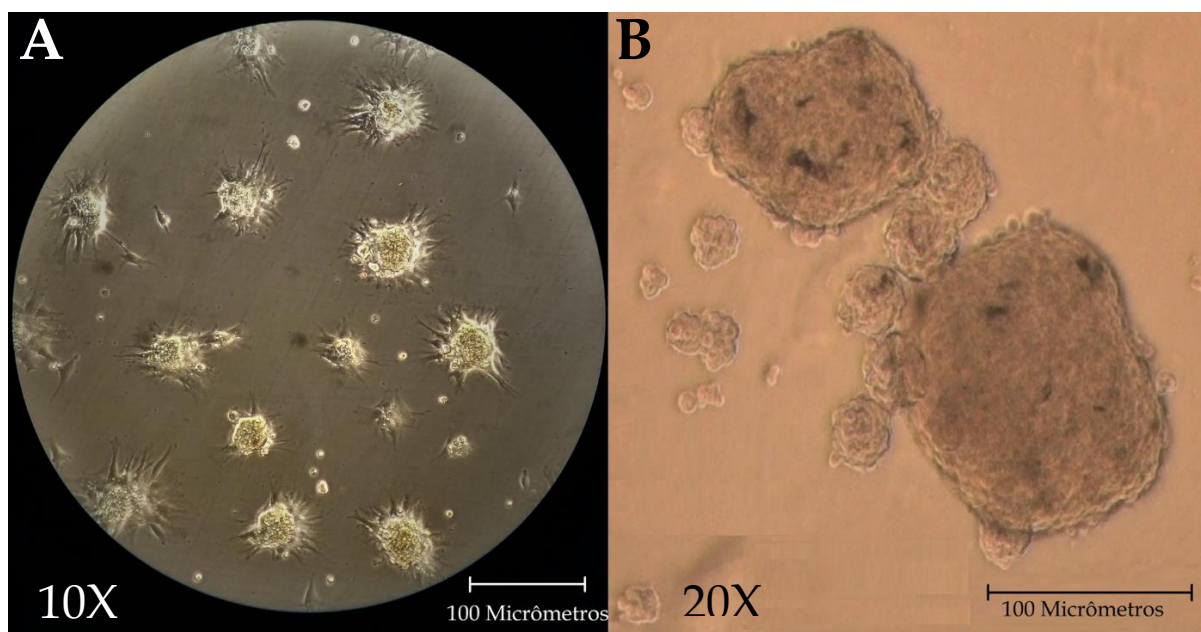
175 As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA seguido do teste TUKEY, quando
176 comparado mais de dois grupos. Os dados foram testados para normalidade pelo teste de
177 Shapiro-Wilk e normalizados quando necessário. Considerou-se nível de significância $P < 0,05$.
178 Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* JMP7.

179

180 RESULTADOS E DISCUSSÃO

181 As CTPDC investigadas no presente estudo, induzidas a diferenciação neurogênica, *in*
182 *vitro*, demonstraram elevada capacidade de diferenciação em células progenitoras neurais,
183 evidenciada pela elevada expressão de imunomarcadores neurais. Quando cultivadas aderidas,
184 apresentaram ligeiras mudanças estruturais 24 horas após o início da indução. Foi observada
185 menor taxa de proliferação das células em meio neurobasal indutor, quando comparada ao meio
186 de cultura simples. Contudo, foram visualizadas formações de colônias celulares em período de
187 48 horas de cultivo indutor, em culturas aderidas e não aderidas. Após o quarto dia, foi possível
188 observar alterações morfológicas substanciais, migração celular e formação de agrupamentos
189 esferoides (Fig. 1A), muito semelhantes as neuroesferas isoladas de tecido encefálico humano
190 já descritas anteriormente, demonstrando indícios da plasticidade das células aqui estudadas
191 (Svendsen *et al.*, 1998).

192 As CTPD canina induzidas em suspensão, apresentaram agrupamento 48 horas após o
193 início do cultivo, mantendo formato esferoide característico de células suspensas (Fig. 1 B). A
194 validação do processo de diferenciação celular das CTPDC em NPCs, foi realizada por meio
195 de avaliação do padrão de expressão gênica das células induzidas.



196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

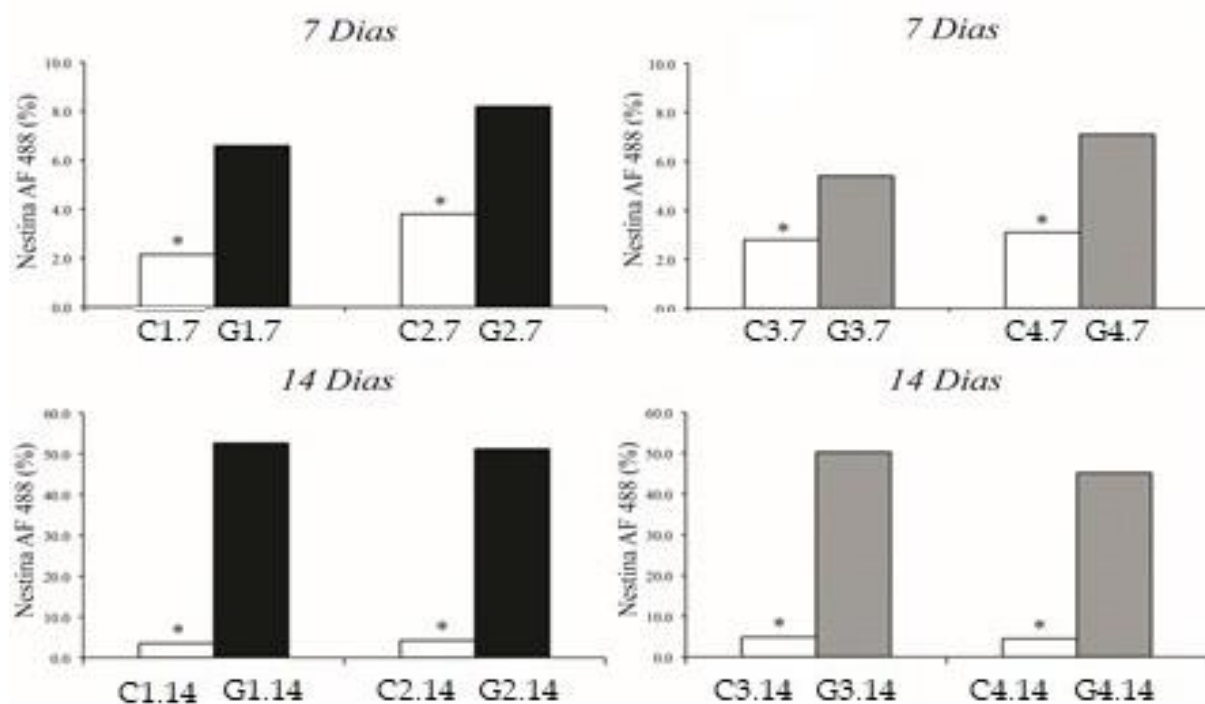
213

Figura 1. Imagem microscópica da formação de neuroesferas aderidas, após quatro dias de cultivo indutor, aumento de 10 vezes (A) e formação de neuroesfera suspensa após 48 horas, aumento de 20 vezes (B).

Os resultados da citometria de fluxo, demonstraram variações estatísticas significativas na expressão de marcadores anti-nestina entre os diferentes intervalos de tempo de avaliação ($P < 0,001$). As células cultivadas aderidas apresentaram expressão média anti-nestina de 7,4% aos sete dias. Quando avaliadas aos 14 dias, a expressão anti-nestina média foi de 51,9%. A média das células cultivadas em suspensão que expressaram marcadores anti-nestina foi de 6,25% aos sete dias e 47,75% aos 14 dias (Fig. 2). Contudo, não houve diferença estatística entre os métodos de cultivo indutor aderido ou em suspensão, tanto em sete dias quanto em 14 dias.

A expressão de marcadores anti-nestina evidenciada no presente estudo, apresenta concordância com a caracterização das células-tronco neurais descrita na literatura, indicando que as células avaliadas, positivas para o referido marcador, podem pertencer aos grupos neurais, tipo B, tipo C ou tipo A, positivas para nestina (Sulman *et al.*, 2008).

214



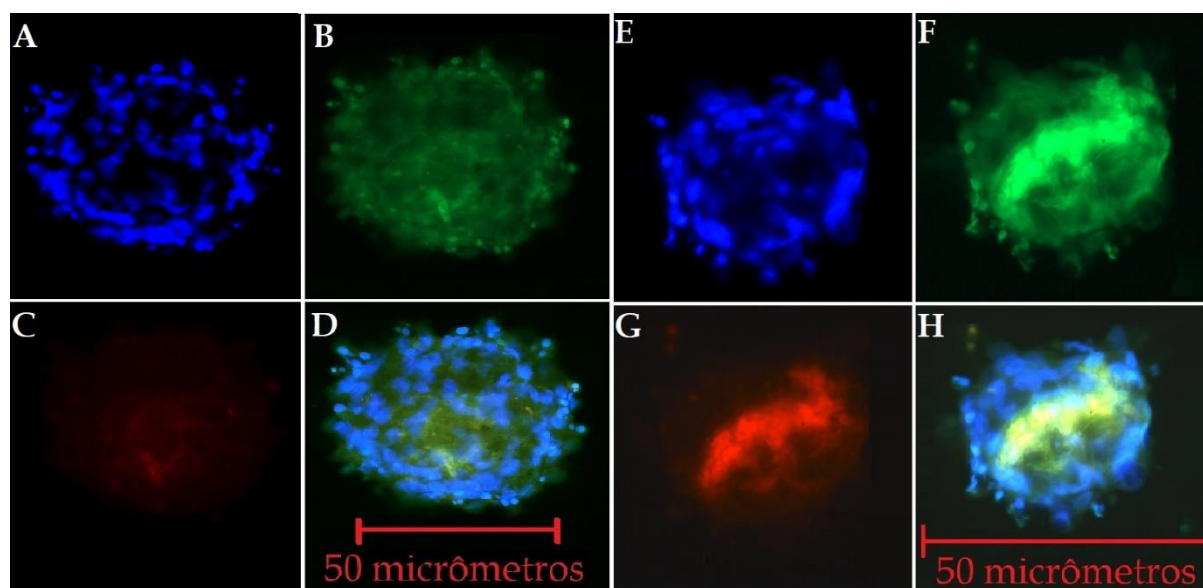
215 Figura 2. Resultados da citometria de fluxo para expressão de marcadores anti-nestina em cultivos de
 216 indução neural das células da polpa dentária de dois cães. Resultados dos grupos cultivados aderidos
 217 C1.7; G1.7; C2.7 e G2.7 aos 7 dias (A); resultado dos grupos cultivados em suspensão C3.7; G3.7; C4.7
 218 e G4.7 aos 7 dias (B). Resultados dos grupos cultivados aderidos C1.14; G1.14; C2.14 e G2.14 aos 14
 219 dias (C); resultados dos grupos cultivados em suspensão C3.14; G3.14; C4.14 e G4.14 aos 14 dias de
 220 cultivo indutor (D).

221

222 A avaliação imunocitoquímica fluorescente corroborou os resultados encontrados na
 223 citometria de fluxo evidenciando grupos celulares com a coloração verde, positivos
 224 exclusivamente para nestina e áreas de positividade comuns ao marcador *glial fibrillary acidic*
 225 *protein* (GFAP) com coloração vermelha, incluído neste teste. A positividade para DAPI
 226 evidenciou a formação das neuroesferas por meio da marcação dos núcleos agrupados, na
 227 coloração azul (Fig.3A e 3E). Segundo Vescovi *et al.* (2006), a expressão de GFAP está
 228 associada a células-tronco neurais primordiais, classificadas como tipo B. Assim, sugere-se que
 229 regiões da neuroesfera com dupla marcação, evidenciam fases primordiais de diferenciação das
 230 NPCs enquanto áreas positivas exclusivamente para nestina, remetem a NPCs com maior grau
 231 de diferenciação, pertencendo aos tipos C e/ou A (Fig.3). As NPCs primordiais, ou tipo B,
 232 podem ser encontradas no encéfalo adulto, apresentam multipotencialidade para diferenciação
 233 em neurônios e células da glia. Mediante à estímulos adequados, sofrem divisão assimétrica,
 234 formando uma célula igualmente indiferenciada e outra com maior grau de especificidade, as

235 células do tipo C (Bergström e Forsberg-Nilsson, 2012). As células neurais tipo C, apresentam
 236 baixo grau de potencialidade, podendo dar origem apenas a neuroblastos, denominados células
 237 tipo A, que nada mais são que neurônios imaturos. Vescovi *et al.* (2006) demonstraram que as
 238 NPCs cultivadas em forma de neuroesferas e mediante a estímulos adequados, são capazes de
 239 expressar todos os marcadores citados acima, bem como originar astrócitos, oligodendrócitos e
 240 neurônios. Tais características, corroboram a possibilidade da utilização das neuroesferas em
 241 terapias futuras.

242



243 Figura 3. Imunocitoquímica fluorescente realizada em neuroesferas, oriundas de células do animal um,
 244 no 7º dia de indução neural (A, B, C e D) e realizadas em neuroesferas oriundas do animal um, no 14º
 245 dia (E, F, G e H). Coloração de DAPI (A e E); fluoróforo anti-*nestina* (B e F); fluoróforo anti-GFAP (C
 246 e G); *marge* de sobreposição dos marcadores evidenciando áreas distintas de expressão (D e H).

247

248 A avaliação da viabilidade celular das CTPDC, de ambos animais, demonstrou elevado
 249 índice de obtenção de células viáveis ao longo das três passagens de cultura (animal 1= 94,9%;
 250 animal 2=94,16%). Após 25 dias, foram obtidas $15,9 \times 10^6$ e $20,2 \times 10^6$ células indiferenciadas,
 251 dos dentes caninos dos animais 1 e 2, respectivamente (Tab. 1 e 2). Karaöz *et al.* (2010),
 252 relataram índices de viabilidade semelhantes em culturas de células obtidas da polpa dentária
 253 humana, sugerindo semelhança no padrão celular entre estas espécies. Sprada *et al.* (2015),
 254 também demonstraram padrões aproximados de crescimento e viabilidade de células-tronco
 255 mesenquimais obtidas do tecido adiposo canino, o que evidencia as características semelhantes
 256 das CTIPDC e CTMs, não só em aspecto morfológico e padrões imunofenotípicos, mas também
 257 relativo aos valores de crescimento, proliferação e viabilidade celular.

258

259 Tabela 1. Obtenção e viabilidade de CTPDC do doador nº 1, durante três passagens de cultura
260 celular.

Passagem	Células obtidas	Células Viáveis	Porcentagem
1º passagem	1.550.000	960.000	91,0%
2º passagem	4.365.000	4.205.880	96,0%
3º passagem	16.340.000	15.964.180	97,7%
Total	16.340.000	15.964.180	Média 94,9%

261

262

263 Tabela 2. Obtenção e viabilidade de CTPDC do doador nº 2, durante três passagens de cultura
264 celular.

Passagem	Células obtidas	Células Viáveis	Porcentagem
1º passagem	1.105.000	972.000	88,0%
2º passagem	4.520.000	4.397.240	97,2%
3º passagem	20.780.000	20.230.920	97,3%
Total	20.780.000	20.230.920	Média 94,16%

265

266 CONCLUSÃO

267 As células-tronco indiferenciadas da polpa dentária canina, quando estimuladas *in vitro*,
268 apresentaram capacidade de migração e formação de neuroesferas, assim como índices
269 satisfatórios de diferenciação em células progenitoras neurais. A polpa dentária dos dentes
270 caninos decíduos, forneceu grande número de células indiferenciadas e amplamente viáveis.

271

272 REFERÊNCIAS

273

274 ARAMBURU, J. S.; TREICHEL, T. L. E.; FILHO, S. T. L. P. et al. Isolation of Stem Cells from Pulp
275 Deciduous Teeth Dog. *Journal of Dentistry, Oral Disorders & Therapy*, v.2, n.3, p.1-2, 2014.

276

277 BEHNAN, J.; STANGELAND, B.; LANGELLA, T. et al. Identification and characterization of a new
278 source of adult human neural progenitors. *Cell Death & Disease*, v.8, n.8, p.e2991, 2017.

279 BERGSTRÖM, T.; FORSBERG-NILSSON, K. Neural stem cells: brain building blocks and beyond.
280 *Upsala journal of medical sciences*, v.117, n.2, p.132-142, 2012.

281

282 DE GUZZI, R. F.; FORMENTON, M. R.; COLOMBA, K. P. et al. Mielopatia degenerativa em cães:
283 um desafio na medicina veterinária e na reabilitação animal. *Revista Unimar Ciências*, v.23,
284 n.1-2, p. 11-16, 2017.

285

286 DISSANAYAKA, W. L.; ZHU, X.; ZHANG, C.; JIN, L. Characterization of dental pulp stem cells
287 isolated from canine premolars. *Journal of endodontics*, v.37, n.8, p.1074-1080, 2011.

- 288
289 ERIKSSON, P. S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T. et al. Neurogenesis in the adult human
290 hippocampus. *Nature Medicine*, v.4, n.11, p.1313-1317, 1998.
291
- 292 FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, M. C. et al. Causas de morte e razões para eutanásia de
293 cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004).
294 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.4, p.223-230, 2014.
295
- 296 GILLIAM, D.; KOLICHESKI, A.; JOHNSON, G. et al. Golden Retriever dogs with neuronal ceroid
297 lipofuscinosis have a two-base-pair deletion and frameshift in CLN5. *Molecular genetics and*
298 *metabolism*, v.115, n.2, p.101-109, 2015.
299
- 300 GOLDMAN, S. A.; NOTTEBOHM, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a
301 vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy*
302 *of Sciences*, v.80, n.8, p.2390-2394, 1983.
303
- 304 GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells.
305 *Journal of dental research*, v.81, n.8, p.531-535, 2002.
306
- 307 KARAÖZ, E.; DOĞAN, B. N.; AKSOY, A. et al. Isolation and in vitro characterisation of dental
308 pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and cell biology*, v.133, n.1, p.95-112, 2010.
309
- 310 KORNACK, D. R.; RAKIC, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult
311 macaque monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.96, n.10, p.5768-5773,
312 1999.
313
- 314 LIU, H.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Dental pulp stem cells. *Methods Enzymol*, v.419, p.99-113,
315 2006.
316
- 317 MILWARD, E. A.; LUNDBERG, C. G.; GE, B. et al. Isolation and transplantation of multipotential
318 populations of epidermal growth factor-responsive, neural progenitor cells from the canine
319 brain. *Journal of Neuroscience Research*, v.50, n.5, p.862-871, 1997.
320
- 321 OLIVER-DE LA CRUZ, J.; CARRIÓN-NAVARRO, J.; GARCÍA-ROMERO, N. et al. SOX2+ cell
322 population from normal human brain white matter is able to generate mature oligodendrocytes.
323 *PLoS One*, v.9, n.6, p.e99253, 2014.
324
- 325 SANAI, N.; NGUYEN, T.; IHRIE, R. A. et al. Corridors of migrating neurons in the human brain
326 and their decline during infancy. *Nature*, v.478, n.7369, p.382-386, 2011.
327
- 328 SPRADA, A. G.; ROSA, M. P. D.; MACHADO, A. K. et al. Toxicity and oxidative stress of canine
329 mesenchymal stromal cells from adipose tissue in different culture passages. *Pesquisa*
330 *Veterinária Brasileira*, v.35, p.15-20, 2015.
331
- 332 SULMAN, E.; ALDAPE, K.; COLMAN, H. Brain tumor stem cells. *Current Problems in Cancer*,
333 v.32, n.3, p.124-142, 2008.
334
- 335 SVENDSEN, C. N.; TER BORG, M. G.; ARMSTRONG, R. J. et al. A new method for the rapid and
336 long term growth of human neural precursor cells. *Journal of neuroscience methods*, v.85, n.2,
337 p.141-152, 1998.

338

339 VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and
340 neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience*, v.2, n.3, p.266-270, 1999.

341

342 VESCOVI, A. L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B. A. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer*,
343 v.6, n.6, p.425-436, 2006.

4. CONCLUSÃO

As células-tronco indiferenciadas da polpa dentária canina, quando estimuladas *in vitro*, apresentaram capacidade de migração e formação de neuroesferas, assim como índices satisfatórios de diferenciação em células progenitoras neurais. A polpa dentária dos dentes caninos decíduos, forneceu grande número de células indiferenciadas e amplamente viáveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, A. B., et al. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. **Brain research bulletin**, v.57, n.6, p.751-758. 2002.
- ARAMBURU, J. S., et al. Isolation of Stem Cells from Pulp Deciduous Teeth Dog. **Journal of Dentistry, Oral Disorders & Therapy**, v.2, n.3, p.1-2. 2014.
- BATOULI, S., et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. **Journal of dental research**, v.82, n.12, p.976-981. 2003.
- CORRÊA, C.N.M. Cinomose. In: CORRÊA, W.M.; CORRÊA C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 655-670.
- DE PAULA, S., et al. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v.15, n.4, p.263-9. 2005.
- DISSANAYAKA, W. L., et al. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. **Journal of endodontics**, v.37, n.8, p.1074-1080. 2011.
- ERIKSSON, P. S., et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature medicine**, v.4, n.11. 1998a.
- ERIKSSON, P. S., et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med**, v.4, n.11, p.1313-7. 1998b.
- FENNER, W.R. Doenças do cérebro. In: ETTINGER S.J.; FELDMAN E.C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Vol.1, p.586-638.
- FIGHERA, R. A., et al. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.4, p.223-230. 2014.
- GOLDMAN, S. A.; F. NOTTEBOHM. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.80, n.8, p.2390-2394. 1983.
- GREENE, C.E.; APPEL M.J. Canine distemper, In: GREENE C.E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3ª ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 25-41.
- GRONTHOS, S., et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, n.25, p.13625-13630. 2000.
- KORNACK, D. R.; P. RAKIC. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.10, p.5768-5773. 1999.

KRAKOWKA, S., et al. Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.17, n.1-4, p.471-482. 1987.

LAINO, G., et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. **Journal of Craniofacial Surgery**, v.17, n.3, p.511-515. 2006.

LIU, H., et al. Dental pulp stem cells. **Methods Enzymol**, v.419, p.99-113. 2006.

MANGIA, S. H.; A. C. PAES. Neuropatologia da cinomose. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.3, p.416-427. 2008.

MILWARD, E. A., et al. Isolation and transplantation of multipotential populations of epidermal growth factor-responsive, neural progenitor cells from the canine brain. **J Neurosci Res**, v.50, n.5, p.862-871. 1997.

MORO, L., et al. Apoptose na desmielinização da cinomose canina (revisão de literatura). **Bioscience Journal**, v.20, n.2. 2004.

MÜLLER, D. C. M., et al. Fração total de células mononucleares intra-articular em cães submetidos à reconstrução do ligamento cruzado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.309-316. 2013.

NAKASHIMA, M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. **Arch Oral Biol**, v.35, n.7, p.493-497. 1990.

NAKASHIMA, M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. **Cytokine & growth factor reviews**, v.16, n.3, p.369-376. 2005.

NAKASHIMA, M.; A. AKAMINE. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. **Journal of endodontics**, v.31, n.10, p.711-718. 2005.

NAKASHIMA, M.; A. H. REDDI. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. **Nature biotechnology**, v.21, n.9, p.1025. 2003.

NUNES, M. C., et al. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. **Nature medicine**, v.9, n.4, p.439-447. 2003.

OLSSON, D. C., et al. Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2403-2412. 2008.

PINTO FILHO, S. T. L., et al. Proliferação e viabilidade de células-tronco derivadas do omento maior, tecido adiposo perirrenal e bolsa adiposa interescapular em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinária e Zootecnia**, v.22, n.4, p.607-618. 2015.

PITTINGER, M. F., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p.143-147. 1999.

SCHWINDT, T. T., et al. Effects of FGF-2 and EGF removal on the differentiation of mouse neural precursor cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, p.443-452. 2009.

SHI, S., et al. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. **Bone**, v.29, n.6, p.532-539. 2001.

SILVA, M. C., et al. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.643-652. 2009.

SUMMERS, B. A., et al. Inflammatory diseases of the central nervous system. In: SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. **Veterinary neuropathology**. St. Louis: Mosby, 1995. P.102-110.

TATULLO, M., et al. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v.9, n.11, p.1205-1216. 2015.

TIPOLD, A., et al. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v.33, n.10, p.466-470. 1992.

VAN PRAAG, H., et al. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature neuroscience**, v.2, n.3, p.266-270. 1999.

VANDEVELDE, M.; A. ZURBRIGGEN. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta neuropathologica**, v.109, n.1, p.56-68. 2005.

VANDEVELDE, M., et al. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. **Acta neuropathologica**, v.67, n.3, p.211-218. 1985.

WANG, Y., et al. Preliminary Study on Dental Pulp Stem Cell-mediated Pulp Regeneration in Canine Immature Permanent Teeth. **Journal of endodontics**, v.39, n.2, p.195-201. 2013.

YARAK, S.; O. K. OKAMOTO. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, p.647-656. 2010.