



Isolamento e diferenciação das células-tronco da polpa dentária canina em células progenitoras neurais

[Isolation and differentiation of canine dental pulp stem cells in neural progenitor cells]

M.P. Rosa¹, E.B. Degregori¹, J.G. Ferst¹, M.M. Pillat², K. Bertolin²,
J.R.M. Souza¹, L.K. Bello¹, S.T.L. Pinto Filho², D.C.M. Müller²

¹Programa de pós-graduação - Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS

²Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a capacidade de diferenciação das células-tronco da polpa dentária canina em células progenitoras neurais bem como quantificar obtenção e viabilidade celular, durante três passagens em cultura. As células foram extraídas da polpa dentária de dois cadáveres caninos, com aproximadamente dez meses de idade, que foram a óbito em decorrência de traumatismo automotivo. Após três subculturas, realizou-se avaliação da viabilidade celular por quantificação em câmara de Neubauer. A partir disso, induziu-se diferenciação neural em meio de cultura neurobasal (Gibco™), com células aderidas ao plástico ou suspensas em placas tratadas com agarose. Após sete e 14 dias em cultivo indutor, observou-se morfologia e perfil imunofenotípico utilizando citometria de fluxo e imunocitoquímica fluorescente. Aos 14 dias as células apresentaram alto grau de expressão para marcadores anti-*nestina* e *anti-gliial fibrillary acidic protein* (anti-GFAP). Anteriormente, obteve-se ao 25º dia, média de 18x10⁶ células viáveis indiferenciadas oriundas do tecido pulpar. Sugere-se que as células-tronco indiferenciadas da polpa dentária canina apresentem índices satisfatórios de diferenciação em células progenitoras neurais, aderidas ou suspensas em cultura. A polpa dentária dos dentes decíduos caninos, fornece células indiferenciadas viáveis em quantidade adequada.

Palavras-chave: neuroesferas, citometria de fluxo, terapia celular, desmielinização

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the differentiation capacity of canine tooth pulp stem cells in neural progenitor cells as well as to quantify the attainment and viability during three culture passages. The cells were extracted from the dental pulp of two canine cadavers, with approximately ten months of age, which died due to automotive trauma. After three subcultures, cell viability evaluation was performed by Neubauer chamber quantification. Neural differentiation was induced in neurobasal culture medium (Gibco™), with cells adhered to the plastic or suspended in agarose-treated plates. After seven and 14 days in inducer culture, morphology and immunophenotypic profile were observed using flow cytometry and fluorescent immunocytochemistry. At 14 days the cells had a high degree of expression for anti-*nestin* and *anti-gliial fibrillary acidic* (anti-GFAP) markers. Previously, an average of 18x10⁶ undifferentiated viable cells from the pulp tissue were obtained on the 25th day. It is suggested that the undifferentiated canine pulp stem cells present satisfactory differentiation indices in neural progenitor cells, adhered or suspended in culture. The dental pulp of deciduous canine teeth provides viable undifferentiated cells in adequate quantity.

Keywords: neurospheres, flow cytometry, cell therapy, demyelination

INTRODUÇÃO

Evidências da neurogênese contínua no encéfalo adulto humano e em algumas espécies de animais domésticos, foram amplamente descritas anteriormente (Goldman e Nottebohm, 1983; Milward *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 1998; Kornack e Rakic, 1999; Van Praag *et al.*, 1999). As células progenitoras neurais (NPCs), foram isoladas do encéfalo adulto, nas zonas subgranular do hipocampo e subventriculares dos ventrículos laterais. Contudo, a neurogênese humana manifesta declínio eminente após o primeiro ano de vida (Sanai *et al.*, 2011). O isolamento e cultivo das NPCs, proporciona incentivo para compreensão dos mecanismos de formação e maturação neural. Esta percepção possibilita pesquisas para tratamento de doenças neurodegenerativas e desordens desmielinizantes como Parkinson, Huntington, Alzheimer, esclerose múltipla e epilepsia (Oliver-De La Cruz *et al.*, 2014; Behnan *et al.*, 2017). Devido à dificuldade na consecução de fonte de células tronco neurais, novas alternativas para obtenção tem sido instigadas.

Gronthos *et al.* (2002), descreveram o potencial de diferenciação das células-tronco da polpa dentária (CTPDs) humana em células neurais, proporcionando a aquisição deste grupo celular, prescindindo óbito do indivíduo doador. Quando as CTPDs se encontram indiferenciadas, exercem funções na nutrição dentária e realizam diferenciação em odontoblastos durante a fase de formação dental (Liu *et al.*, 2006). As CTPDs foram isoladas de dentes pré-molares e caninos decíduos de cães, evidenciando excelente capacidade de proliferação *in vitro* e características imunofenotípicas. Os mesmos pesquisadores ratificaram seu potencial de diferenciação, obtendo regeneração do tecido odontológico (Dissanayaka *et al.*, 2011; Aramburu *et al.*, 2014). Contudo, se desconhece a capacidade de diferenciação neural destas células na espécie canina.

A patologia veterinária, apresenta algumas desordens neurodegenerativas, tais como mielopatia degenerativa dos cães, ceroidolipofuscinose neuronal, epilepsia, traumatismos e neoplasias que detém fisiopatologias semelhantes as encontradas na medicina humana, (Gilliam *et al.*, 2015; De Guzzi *et al.*, 2017). Porém, alterações neurais

secundárias a doenças infecciosas específicas, como aquelas causadas pelo vírus da cinomose canina, são comumente relatadas como uma das principais causas de morte ou motivo para eutanásia na rotina clínica veterinária (Figuera *et al.*, 2014). Neste contexto, acredita-se que a diferenciação das CTPDs canina (CTPDC), em NPCs, seja capaz de servir como modelo experimental para o desenvolvimento de pesquisas futuras para o tratamento de algumas das alterações neurológicas desta espécie. O presente estudo buscou verificar a capacidade de diferenciação das CTPDC em NPCs, após estímulo *in vitro*, bem como quantificar a obtenção e viabilidade das células indiferenciadas, ao longo de três passagens em cultura celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente estudo, coletou-se os dentes caninos decíduos superiores persistentes de dois cadáveres caninos machos, oriundos da rotina cirúrgica do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais não apresentavam raça definida, tinham idade aproximada de dez meses, com óbito decorrente de traumatismo automobilístico.

Duas horas após a constatação do óbito dos animais doadores, executou-se as exodontias utilizando instrumental ortodôntico. O tecido dental foi acondicionado individualmente em tubos cônicos contendo 10ml de solução balanceada de Hank's acrescida de 1% de penicilina, estreptomicina e 1% de anfotericina B (Sigma Aldrich®, USA), impossibilitando a proliferação de agentes contaminantes. Em capela de fluxo laminar, realizou-se limpeza minuciosa da superfície dental, com auxílio de brocas odontológicas, retirando completamente os resquícios de ossos alveolares e sujidades. Posteriormente, os dentes foram depositados em tubos cônicos contendo 5ml de álcool 70% e 5ml de iodo 10%, permanecendo nesta solução por 30 minutos.

Utilizando broca odontológica, sulcos circulares, de aproximadamente 3mm de profundidade foram confeccionados na base da coroa dental. O fracionamento do dente na porção medial, permitiu acesso a cavidade pulpar. A polpa dentária foi coletada e acondicionada em placa

de Petri, contendo solução balanceada de Hank's, evitando ressecamento tecidual.

O isolamento celular foi realizado por meio de digestão enzimática, utilizando 1ml de solução de colagenase tipo I 0,5% (Sigma Aldrich®, USA), por tecido pulpar. O material foi disposto em tubos cônicos e mantidos em imersão de água, a 37°C, durante 60 minutos. Ao final deste período, em capela de fluxo laminar, adicionou-se 3ml de meio de cultivo celular em cada tubo, composto por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina e 1% e anfotericina B, neutralizando a ação da colagenase. O material foi levado a centrifugação por 10 minutos em velocidade de 3.900rpm. Posteriormente, verificou-se a formação de precipitado ao fundo do tubo cônico. A porção sobrenadante de cada tubo, foi substituída por 3ml de meio de cultura, promovendo solubilização do precipitado. Os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos, a 1.500rpm. Repetidamente, a porção líquida foi descartada e adicionou-se 5ml de meio de cultura celular junto ao precipitado nos tubos. O conteúdo foi solubilizado e transferido para duas garrafas de cultura com 25cm² de área de cultivo.

As garrafas foram mantidas em estufa de cultivo celular, com temperatura constante de 37°C e suplemento de 5% de gás carbônico (CO₂). O meio de cultura foi substituído em sua totalidade, a cada três dias, quando também foram realizadas as análises visuais de proliferação celular. Após atingir de 80% de confluência, foram executadas técnicas de expansão celular conforme literatura prévia (Dissanayaka *et al.*, 2011; Aramburu *et al.*, 2014). Padronizou-se a utilização de 1x10⁴/cm² células viáveis de área, para a expansão celular. A quantificação e viabilidade, em cada subcultura, foram avaliadas em câmara de contagem, utilizando técnica padrão.

Quando as células atingiram a terceira subcultura, o total de células viáveis obtidas foi contabilizado individualmente para cada animal doador. Coletou-se 4x10⁶ células pertencentes ao doador 1, para realização da indução neural. Esta fração celular foi subdividida em quatro grupos: animal 1 Indução, denominado G1.7, onde as avaliações foram realizadas aos sete dias após a

indução neurogênica; animal 1 Controle 7, denominado C1.7 onde as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM e avaliação aos sete dias; animal 1 Indução, denominado G1.14, com avaliações após 14 dias de cultivo indutor; animal 1 controle 14, denominado C1.14, células cultivadas em meio de cultura DMEM e avaliação aos 14 dias. As células pertencentes ao doador 2, foram igualmente coletadas e subdivididas formando os grupos: G2.7; C2.7; G2.14 e C2.14.

As células de todos os grupos foram acondicionadas em placas de cultura de seis poços, com superfície de poliestireno. Cada poço recebeu 3ml de meio de cultura neurobasal (Gibco™) acrescido com 2% de suplemento de cultura neural B-27 (Gibco™). As substituições de meio foram feitas a cada três dias, até o momento das avaliações de cada grupo. Paralelamente, foram separadas 4x10⁶ de cada um dos doadores, as quais foram acondicionadas em poços com superfícies de cultura tratadas com solução de agarose 1,5%, com a finalidade de impedir a aderência celular. A divisão dos grupos manteve o padrão utilizado nas células cultivadas aderidas e com mesmo período de avaliações. Entretanto, estes grupos foram submetidos somente a citometria de fluxo e registro fotográfico de formação de neuroesferas. Esta subdivisão gerou os grupos: G3.7; G4.7; C3.7; C4.7; G3.14; G4.14; C3.14 e C4.14.

As células de todos os grupos foram preparadas para realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo, com fixação ou suspensão em solução de 4% de paraformaldeído (PFA) (Sigma Aldrich®, USA), durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 20 minutos, em solução de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) (Sigma Aldrich®, USA), acrescida de 3% de SFB. Adicionou-se 0,1% de Triton x-100 (Gibco™). Sequencialmente, adicionou-se anticorpos primários anti-nestina (Gibco™, USA), produzido em camundongo, na diluição de 1:1000. Após 30 minutos de incubação a 25°C, as células foram lavadas com solução de PBS e incubadas durante 30 minutos, com anticorpos secundários IgG anti-camundongo conjugados a fluoróforos Alexa Fluor® 488. Finalmente, as células foram lavadas, suspensas em 500ml de PBS e retidas em tubos de citometria. A análise

foi realizada em equipamento de citometria de fluxo (FAX Verse BD®).

A análise imunocitoquímica por fluorescência, foi realizada em cultivos celulares paralelos aos grupos cultivados aderidos a superfície de cultivo. As células foram cultivadas em placas de 24 poços, com fundo revestido por lamínulas tratadas com laminina (20µg/ml). As análises ocorreram nos dias sete e 14 pós-tratamento. As células foram fixadas de forma semelhante ao ensaio de citometria de fluxo, contudo, além dos anticorpos primários e secundários anti-nestina, foram adicionados anticorpos primários anti-GFAP (DAKO®, USA) produzidos em camundongo e realizada marcação dos núcleos celulares, adicionando solução de DAPI (0,3µg/ml) (Sigma Aldrich®, USA). Para este teste, os anticorpos primários e secundários foram incubados durante duas horas e uma hora, respectivamente. As análises foram obtidas em equipamento de microscopia de fluorescência (PALM MicroBeam Zeiss®).

A mensuração da viabilidade e obtenção celular foi realizada nas três expansões do cultivo celular das CTPDC. Foram utilizados métodos padrões de avaliação em câmara de contagem celular (Sprada *et al.*, 2015). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA seguido do teste TUKEY, quando comparado mais de dois grupos. Os dados foram testados para normalidade pelo teste de Sahpiro-Wilk e normalizados quando necessário. Considerou-se

nível de significância $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* JMP7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

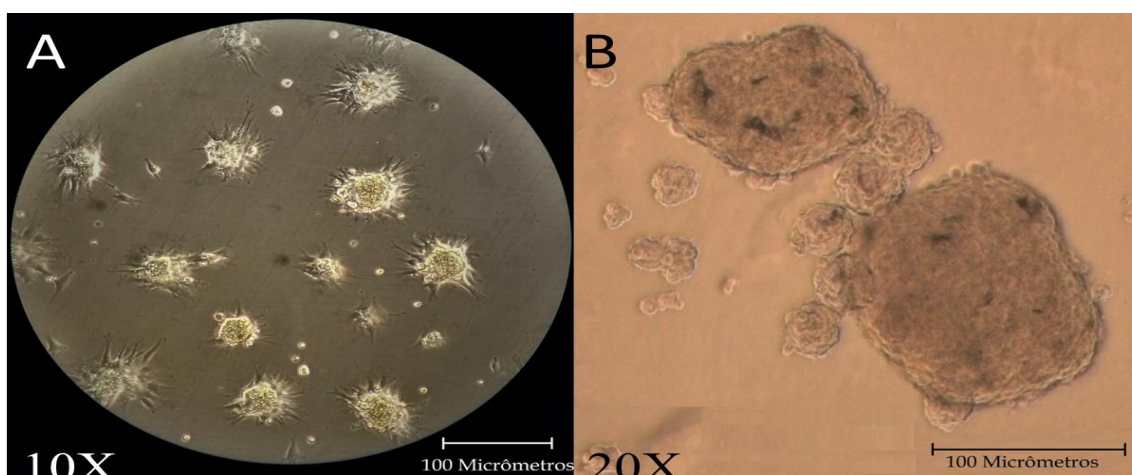


Figura 1. Imagem microscópica da formação de neuroesferas aderidas, originárias da polpa dentária canina, após quatro dias de cultivo indutor, aumento de 10 vezes (A) e formação de neuroesfera suspensa após 48 horas, aumento de 20 vezes (B).

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. Enquanto que, ao avaliar aos 14 dias, a expressão média de anti-*nestina* 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 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. Isto sugere que as células avaliadas, positivas para o referido marcador, podem pertencer aos grupos neurais, tipo B, tipo C ou tipo A (Sulman *et al.*, 2008).

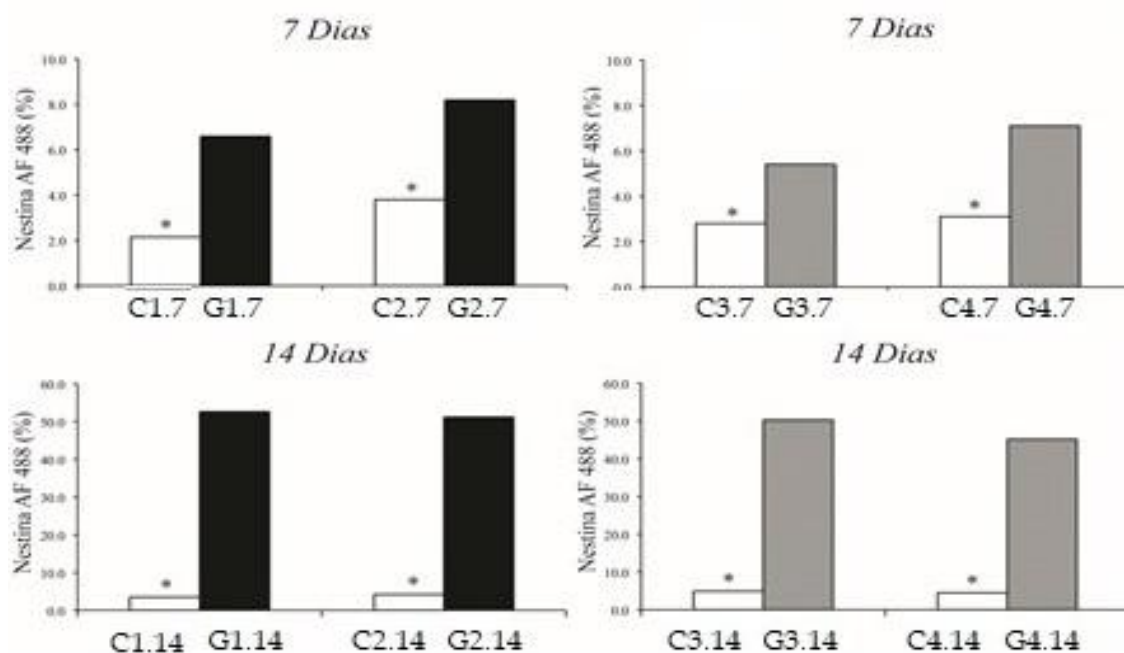


Figura 2. Resultados da citometria de fluxo para expressão de marcadores anti-*nestina* em cultivos de indução neural das células da polpa dentária de dois caninos. Resultados dos grupos cultivados aderidos C1.7; G1.7; C2.7 e G2.7 aos sete dias (A); resultado dos grupos cultivados em suspensão C3.7;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

A avaliação imunocitoquímica fluorescente corroborou os resultados encontrados na citometria de fluxo, evidenciando grupos celulares com a coloração verde, positivos exclusivamente para *nestina* e áreas de positividade comuns ao marcador GFAP com coloração vermelha, incluído neste teste. A positividade para DAPI evidenciou a formação das neuroesferas por meio da marcação dos núcleos agrupados, na coloração azul (Fig. 3A e 3E). Segundo Vescovi *et al.* (2006), a expressão de GFAP está associada a células-tronco neurais

primordiais, classificadas como tipo B. Assim, sugere-se que regiões da neuroesfera com dupla marcação, evidenciam fases primordiais de diferenciação das NPCs, enquanto áreas positivas exclusivamente para *nestina*, remetem a NPCs com maior grau de diferenciação, pertencendo aos tipos C e/ou A (Fig. 3). As NPCs primordiais, ou tipo B, podem ser encontradas no encéfalo adulto, apresentam multipotencialidade para diferenciação em neurônios e células da glia. Mediante à estímulos adequados, sofrem divisão assimétrica, formando uma célula

igualmente indiferenciada e outra com maior grau de especificidade, as células do tipo C (Bergström e Forsberg-Nilsson, 2012). As células neurais tipo C, apresentam baixo grau de potencialidade, podendo dar origem apenas a neuroblastos, denominados células tipo A, que nada mais são que neurônios imaturos. Vescovi et al. (2006), demonstraram que as NPCs

cultivadas em forma de neuroesferas e submetidas a estímulos adequados, são capazes de expressar todos os marcadores citados acima, bem como originar astrócitos, oligodendrócitos e neurônios. Tais características, corroboram a possibilidade da utilização das neuroesferas em terapias futuras.

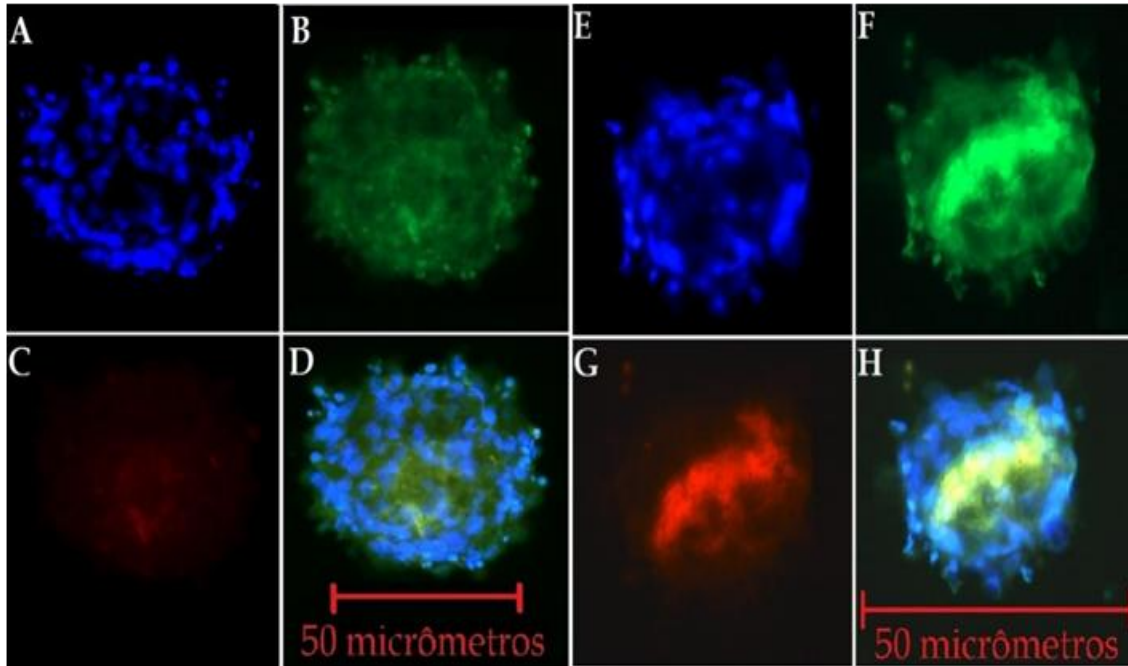


Figura 3. Imunocitoquímica fluorescente realizada em neuroesferas, oriundas de células da polpa dentária do canino (doador 1), no sétimo dia de indução neural (A, B, C e D) e realizadas em neuroesferas oriundas do animal um, no 14º dia (E, F, G e H). Coloração de DAPI (A e E); fluoróforo anti-nestina (B e F); fluoróforo anti-GFAP (C e G); *marge* de sobreposição dos marcadores evidenciando áreas distintas de expressão (D e H).

A avaliação da viabilidade celular das CTPDC, de ambos os animais, demonstrou elevado índice de obtenção de células viáveis ao longo das três subculturas (animal 1= 94,9%; animal 2= 94,16%). Após 25 dias, foram obtidas $15,9 \times 10^6$ e $20,2 \times 10^6$ células indiferenciadas, dos dentes caninos de ambos doadores, 1 e 2 respectivamente (Tab. 1 e 2). Karaöz et al. (2010), relataram índices de viabilidade semelhantes em culturas de células obtidas da

polpa dentária humana, sugerindo semelhança no padrão celular entre estas espécies. Sprada et al. (2015), também demonstraram padrões aproximados de crescimento e viabilidade de células-tronco mesenquimais adipoderivadas caninas, o que evidencia as características semelhantes das CTIPDC e CTMs, não só em aspecto morfológico e padrões imunofenotípicos, mas também relativo aos valores de crescimento, proliferação e viabilidade celular.

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

Subcultura	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%

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

Subcultura	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%

CONCLUSÃO

Sugere-se que a polpa dentaria canina, oriunda de dentes caninos decíduos, seja fonte adequada para obtenção de grandes quantidades de células-tronco indiferenciadas viáveis, que mediante a estímulos *in vitro*, são capazes de diferenciar-se em células progenitoras neurais.

REFERÊNCIAS

- ARAMBURU, J.S.; TREICHEL, T.L.E.; PINTO FILHO, S.T.L. *et al.* Isolation of stem cells from pulp deciduous teeth dog. *J. Dent. Oral Disorders Ther.*, v.2, p.1-2, 2014.
- BEHNAN, J.; STANGELAND, B.; LANGELLA, T. *et al.* Identification and characterization of a new source of adult human neural progenitors. *Cell Death Dis.*, v.8, p.e2991, 2017.
- BERGSTROM, T.; FORSBERG-NILSSON, K. Neural stem cells: brain building blocks and beyond. *Upsala J. Med. Sci.*, v.117, p.132-142, 2012.
- DE GUZZI, R.F.; FORMENTON, M.R.; COLOMBA, K.P. *et al.* Mielopatia degenerativa em cães: um desafio na medicina veterinária e na reabilitação animal. *Rev. Unimar Ciênc.*, v.23, p.11-16, 2017.
- DISSANAYAKA, W.L.; ZHU, X.; ZHANG, C.; JIN, L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J. Endod.*, v.37, p.1074-1080, 2011.
- ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T. *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.*, v.4, p.1313-1317, 1998.
- FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SILVA, M.C. *et al.* Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesoregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). *Pesqu. Vet. Bras.*, v.28, p.223-230, 2014.
- GILLIAM, D.; KOLOCESKI, A.; JOHNSON, G. *et al.* Golden retriever dogs with neuronal ceroid lipofuscinosis have a two-base-pair deletion and frameshift in CLN5. *Mol. Genet. Metabol.*, v.115, p.101-109, 2015.
- GOLDMAN, S.A.; NOTTEBOHM, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.80, p.2390-2394, 1983.
- GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W. *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.*, v.81, p.531-535, 2002.
- KAARAARAZ, E.; DOGAN, B.N.; AKSOY, A. *et al.* Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem. Cell Biol.*, v.133, p.95-112, 2010.
- KORNACK, D.R.; RAKIC, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.96, p.5768-5773, 1999.
- LIU, H.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Dental pulp stem cells. *Methods Enzymol.*, v.419, p.99-113, 2006.
- MILWARD, E.A.; LUNDBERG, C.G.; GE, B. *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, p.862-871, 1997.
- OLIVER-DE LA CRUZ, J.; CARRION-NAVARRO, J.; GARCÍA-ROMERO, N. *et al.* SOX2+ cell population from normal human brain white matter is able to generate mature oligodendrocytes. *PLoS One*, v.9, p.e99253, 2014.
- SANAI, N.; NGUYEN, T.; IHRIE, R.A. *et al.* Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, v.478, p.382-386, 2011.

SPRADA, A.G.; ROSA, M.P.D.; MACHADO, A.K. *et al.* Toxicity and oxidative stress of canine mesenchymal stromal cells from adipose tissue in different culture passages. *Pesqu. Vet. Bras.*, v.35, p.15-20, 2015.

SULMAN, E.; ALDAPE, K.; COLMAN, H. Brain tumor stem cells. *Curr. Probl. Cancer*, v.32, p.124-142, 2008.

SVENDSEN, C.N.; TER BORG, M.G.; ARMSTRONG, R.J. *et al.* A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J. Neurosci. Methods*, v.85, p.141-152, 1998.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.*, v.2, p.266-270, 1999.

VESCOVI, A.L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B.A. Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer*, v.6, p.425-436, 2006.