

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS
DA POLPA DE DENTE HUMANO:
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS FUNCIONAIS EM
MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA.**

DANIELE PINHEIRO DE FREITAS

Salvador – Bahia
2011

Daniele Pinheiro de Freitas

**Células-tronco Mesenquimais Derivadas da Polpa de
Dente Humano: Caracterização e Estudos
Funcionais em Modelo Experimental de Epilepsia**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – CPqGM – como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos

**Salvador – Bahia – Brasil
2011**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

F866c Freitas, Daniele Pinheiro de
Células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente humano: caracterização e estudos funcionais em modelo experimental de epilepsia [manuscrito] / por Daniele Pinheiro de Freitas. - 2011.
71 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

1. Células-tronco. 2. Polpa Dentária. 3. Epilepsia. I. Título.

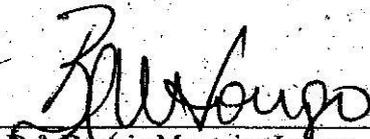
CDU 57.086.83:616.314

**“CÉLULAS – TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA POLPA DE DENTE HUMANO:
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS FUNCIONAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA.”**

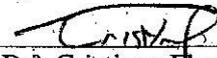
DANIELE PINHEIRO DE FREITAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr.^a Beatriz Monteiro Longo
Professora Adjunta
UNIFESP/SP



Dr.^a Cristiane Flora Villarreal
Professora Permanente
UFBA/BA

*“Aquele que se faz por amor
está sempre além do bem e do mal”*

Friedrich Nietzsche

*Dedico esse trabalho
aos meus pais Magno e Naldete
pelo exemplo, amor e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar presente em minha vida.

Aos meus pais e irmãos por me fazerem sentir a essência de uma família.

À Dr Ricardo Ribeiro dos Santos pela oportunidade e orientação.

À Dra Milena Botelho Pereira Soares, pelo apoio na realização deste trabalho.

À Zaquer Susana Costa-Ferro pelo auxílio fundamental.

À Marcos Maurício Leal pela disponibilidade e ajuda na realização dos experimentos.

Aos amigos que deram sua contribuição em etapas importantes para realização deste trabalho, em especial Bruno Solano, Carine Azevedo, Carla Kaneto, Elisalva Guimarães, Gabriela Cruz, Thiago Carvalho e Sissi Furtado.

À equipe do biotério especialmente Cristina Aragão, Fagner Amaral e Renato Carvalho.

À todos os amigos do CBTC e do Leti que estiveram presentes.

Um agradecimento especial a amiga Luciana Pedreira por todo carinho e pelo grande apoio sempre.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz pelo aprendizado proporcionado com o programa de pós-graduação em Biotecnologia.

À todos que de alguma forma contribuíram no âmbito profissional ou pessoal para a finalização deste trabalho e por mais uma etapa vencida.

*“É melhor o imprevisto que impulsiona
do que o certo que basta.
Porque o que basta termina onde basta,
e não basta!
E nada que se pareça com isso
merece ser o sentido da vida.”*

Fernando Pessoa

Resumo

Terapia celular é o conjunto de métodos e abordagens tecnológicas com a utilização de células no tratamento de doenças. A terapia com células-tronco tem despertado grande interesse na comunidade científica devido à capacidade que essas células indiferenciadas têm de preservar sua própria população e de se diferenciar em células dos diversos tecidos. Encontrar a fonte de célula-tronco apropriada para uso terapêutico depende de diversos fatores, como a sua capacidade de proliferação e estabilidade citogenética, assim como suas características fenotípicas e seu potencial de diferenciação. A epilepsia é uma desordem neurológica que acomete de 1 a 3% da população mundial. É caracterizada pela presença de crises espontâneas recorrentes (CER) e possui seu tratamento clínico baseado no emprego de drogas anti-epilépticas (DAES). O uso de células tronco apresenta-se como uma alternativa ao tratamento desta patologia. Este trabalho tem como objetivos caracterizar as células-tronco mesenquimais de polpa de dente decíduo humano e avaliar seu papel terapêutico no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por lítio-pilocarpina em ratos Wistar. As células da polpa de dente humano utilizadas nesse estudo foram submetidas à avaliação fenotípica, do seu potencial de diferenciação, e da estabilidade cromossômica. Para verificar os efeitos terapêuticos das células-tronco de polpa de dente em modelo experimental de epilepsia os animais foram divididos nos seguintes grupos: SE-salina (n=10), que no transplante recebeu solução salina; SE-CDLH1 (n=13) que recebeu células-tronco de polpa de dente humano (10^7 células/animal), SE-CMO (n=8) que recebeu células mononucleares de medula óssea (10^7 células/animal) e o grupo controle (n=10) que não foi submetido ao *status epilepticus* (SE). As células foram transplantadas por via intraperitoneal. Foram realizadas análises, em diferentes espaços de tempo para avaliar migração celular por imunofluorescência e as crises espontâneas recorrentes. Para avaliar alterações de memória foi estudado o desempenho dos animais no labirinto aquático de Morris (LAM). As CDLH1 apresentaram estabilidade cromossômica (até a 8ª passagem); características imunofenotípicas de células mesenquimais, com alta expressão de CD105, CD73, CD 44, CD90, CD166, CD54, OCT-4, e STRO-1; capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas. As CDLH1 migraram para o cérebro e baço dos ratos. Dos resultados terapêuticos observou-se a redução das crises espontâneas recorrentes nos animais tratados após 30 dias do SE e transplante, mas as células não foram capazes de bloquear essas crises (observado 60 dias pós-SE). Obtendo-se os mesmos resultados com o transplante de CMO. Já no estudo da memória não houve diferença estatística na latência de escape nos animais dos grupos

epilépticos (tratado e não-tratado). Os animais do grupo controle (não epilético), apresentaram retenção de memória em relação aos animais dos grupos SE-salina e SE-CDLH1. Novos estudos devem ser realizados para que se possa estabelecer a utilização ideal das células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente humano em relação às necessidades terapêuticas da epilepsia.

Palavras-chaves: Células-tronco, polpa de dente humano e Epilepsia.

Abstract

Cell therapy is the set of methods and technological approaches to the use of cells in treating diseases. The stem cell therapy has aroused great interest in the scientific community due to the capacity of these undifferentiated cells in preserving its own population and to differentiate into cells of various tissues. Finding the source of stem cells suitable for therapeutic use depends on various factors such as their ability to proliferate and cytogenetic stability, as well as their phenotypic characteristics and their potential of differentiation. Epilepsy is a neurological disorder that affects 1-3% of world population. It is characterized by recurrent spontaneous seizures (RSS) and has its medical treatment based on use of antiepileptic drugs (AEDs). The use of stem cells is an alternative treatment for this pathology. This work aims to characterize the mesenchymal stem cells from human deciduous dental pulp and evaluate its therapeutic role in the model of temporal lobe epilepsy induced by lithium-pilocarpine in rats. The cells of the human dental pulp used in this study were subjected to phenotypic analysis of their potential of differentiation and chromosomal stability. To verify the therapeutic effects of stem cells from dental pulp in experimental epilepsy, the animals were divided into the following groups: SE-Saline (n = 10) transplanted with saline; SE-CDLH1 (n = 13) who received stem cells from human dental pulp (10^7 cells / animal), SE-CMO (n = 8) who received bone marrow mononuclear cells (10^7 cells / animal) and the control group (n = 10) who did not undergo status epilepticus (SE). The cells were transplanted by intraperitoneal route. Analyses were performed in different time to assess cell migration by immunofluorescence and recurrent spontaneous seizures. To evaluate changes in memory we studied the performance of the animals in the Morris water maze, after cell transplantation. Stem cells analyzed showed chromosomal stability (up to 8th passage); immunophenotypic characteristics of mesenchymal cells with high expression of CD105, CD73, CD 44, CD90, CD166, CD54, OCT-4, and STRO-1; ability to differentiate into adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages. The CDLH1 migrated throughout the brain and spleen of mice. The therapeutic results observed the reduction of recurrent spontaneous seizures in treated animals after 30 days of transplantation and SE, but cells were not able to block these seizures (observed 60 days post-SE). The same results were obtained with the transplantation of BMC. In the study of memory there was no statistical difference in escape latency of the epileptic groups (treated and untreated). Animals of control group (non epileptic) showed memory retention in comparison to groups saline-SE and SE-CDLH1. Further studies should be conducted so that we can determine the optimal use of

mesenchymal stem cells derived from human dental pulp in relation to the therapeutic needs of the epilepsy.

Keys word: Stem cells, human dental pulp and Epilepsy.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AVC	Acidente vascular cerebral
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CDLH1	Células de Dente de Leite Humano 1
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais de Laboratório
CER	Crises espontâneas recorrentes
CMO	Células mononucleares de medula óssea
CT	Células-tronco
CTM	Células-tronco mesenquimais
DAES	Drogas anti-epilépticas
DH	Doença de Huntington
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DP	Doença de Parkinson
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ELT	Epilepsia do lobo temporal
EM	Esclerose múltipla
GTG	Giemsa-tripsina-giemsa
i.p.	intraperitoneal
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
LAM	Labirinto aquático de Morris
Li-Pilo	Lítio-pilocarpina

MO	Medula óssea
MS	Metilescopolamina
N-S-L-O	Norte, sul, leste, oeste
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldeído
SBF	Soro bovino fetal
SE	<i>Status epilepticus</i>
SNC	Sistema nervoso central
TGF β 3	<i>Tissue growth factor</i>
UNICAMP	Universidade de Campinas

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Evidência de plasticidade de células-tronco adultas	18
Figura 2: Esquema de diferenciação de CTM em linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica	20
Figura 3: Isolamento de CTM da polpa dentária	31
Figura 4: Delineamento do cultivo celular das células CDLH1	32
Figura 5: Esquema com os grupos experimentais.....	36
Figura 6: Esquema do delineamento experimental	37
Figura 7: Obtenção de células mononucleares de medula óssea (CMO).....	39
Figura 8: Demonstração do controle das crises espontâneas recorrentes (CER).....	41
Figura 9: Fotos do Labirinto Aquático de Morris.....	43
Figura 10: Acúmulo lipídico intracelular observado em CDLH1, 5ª passagem.....	45
Figura 11: Cultura de CDLH1 em diferenciação osteogênica, 6ª passagem.....	46
Figura 12: Cultura de CDLH1 em diferenciação condrogênica, 5ª passagem.....	46
Figura 13: Análise por Citometria de Fluxo.....	47
Figura 14: Imunofluorescência das células-tronco da polpa de dente humano.....	47
Figura 15: Cariótipo da CDLH1 observado na 3ª(A), 6ª(C) e 8ª(B) passagens.....	49
Figura 16: Migração de células-tronco da polpa de dente humano marcadas com cell tracker Green CMFDA.....	50
Figura 17: Resultado das crises espontâneas recorrentes 30 dias após transplante.....	51
Figura 18: Resultado das crises espontâneas recorrentes 60 dias após transplante.....	52
Figura 19: Efeito do transplante de células CDLH1 sobre a memória espacial em ratos SE induzido.....	53
Figura 20: Efeito do transplante das CDLH1 sobre retenção de memória espacial.....	54
Figura 21: Trajetórias durante 60s do treino de um animal.....	54
Tabela 1: Citometria de fluxo e imunofenotipagem das CTM de polpa de dente.....	48

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1- Células-tronco.....	16
1.1- Células-tronco embrionárias.....	17
1.2- Células-tronco adultas.....	17
1.2.1- Células-tronco mesenquimais.....	19
1.2.2- Células-tronco de medula óssea.....	20
1.2.3- Células-tronco da polpa de dente humano.....	21
2- Distúrbios do Sistema Nervoso.....	22
2.1- Epilepsia.....	23
2.1.1- Epilepsia do lobo temporal.....	24
2.1.2- Tratamento.....	25
3- Células-tronco e epilepsia.....	26
4- Modelo experimental e epilepsia.....	26
4.1- Modelo lítio-pilocarpina.....	27
OBJETIVOS.....	29
Geral.....	29
Específicos.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
1- Animais experimentais.....	30
2- Isolamento das células.....	30
3- Cultivo celular.....	31
4- Diferenciação.....	32
4.1- Diferenciação adipogênica.....	32
4.2- Diferenciação osteogênica.....	33
4.3- Diferenciação condrogênica.....	33
5- Caracterização celular.....	34

5.1- Citometria de fluxo.....	34
5.2- Imunofluorescência.....	34
6- Análise citogenética.....	35
7- Delineamento dos experimentos.....	35
8- Indução da epilepsia pelo modelo lítio pilocarpina.....	37
9- Cultivo e preparação das células mesenquimais para transplante.....	38
10- Obtenção e preparo das células mononucleares de medula óssea.....	38
11- Avaliação da migração celular após o transplante.....	39
12- Estudo das crises espontâneas recorrentes (CER).....	40
13- Versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM).....	41
13.1- Treino da versão espacial do Labirinto Aquático de Morris.....	43
14- Análise dos dados e estatística.....	44
RESULTADOS.....	45
1- Diferenciação Adipogênica, Osteogênica e Condrogênica.....	45
2- Caracterização celular por Citometria de Fluxo e Imunofluorescência.....	47
3- Análise citogenética.....	49
4- Migração das células CDLH1 nos ratos submetidos ao SE.....	50
5- Efeito das CDLH1 e CMO sobre as crises espontâneas recorrentes em ratos SE Li- pilo induzida.....	51
6- Efeito das células de polpa de dente humano sobre o teste de memória no (LAM).....	52
DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

Introdução

Células-tronco são geralmente definidas como células indiferenciadas, que têm capacidade única de auto-renovação e diferenciação em multi-linhagens. Originam células progenitoras capazes de regenerar um tecido após uma lesão e podem ser classificadas como embrionárias e adultas de acordo com sua origem (FRESHNEY, 2005).

Diversas são as fontes de células-tronco adultas e diversos são os estudos em torno da sua plasticidade. Células-tronco têm sido isoladas da polpa de dentes permanentes humanos, da polpa de dentes decíduos e também do ligamento periodontal. O tecido pulpar de dentes humanos tem sido descrito como fonte de células-tronco multipotentes que apresentam eficiência clonogênica e capacidade de se auto-renovar e de se diferenciar em tipos celulares diversos. Estas células-tronco vêm sendo estudadas como terapia em engenharia de tecidos (GRONTHOS *et al.*, 2000; MIURA *et al.*, 2003).

A epilepsia compreende uma categoria de síndromes caracterizadas por crises espontâneas e recorrentes (CER) e o seu desenvolvimento é resultado de um insulto prejudicial inicial (McNAMARA, 1994). A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma predominante em pacientes adultos, ocorre em 50% a 60% dos portadores de epilepsia. Seu tratamento é sintomático e baseado em fármacos antiepilépticos. Outra opção de tratamento é a cirurgia, mas, traz riscos de perda de funções cerebrais (LOSCHER, 2002). Por isso, torna-se fundamental que novas alternativas terapêuticas sejam estudadas dentre elas a terapia com células-tronco.

Por sua capacidade de auto-renovação, por sua plasticidade e pelo fácil acesso para coleta e obtenção as células-tronco da polpa de dente podem ser uma alternativa ao tratamento da epilepsia. Em estudos prévios da nossa equipe observou-se o efeito terapêutico das células mononucleares de medula óssea reduzindo as manifestações das crises na epilepsia experimental. No presente trabalho foi realizada uma avaliação das características fenotípicas e funcionais das células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente humano e seus efeitos no tratamento da epilepsia induzida por lítio-pilocarpina, comparando com os efeitos do transplante de células mononucleares de medula óssea (CMO).

Revisão da Literatura

1- Células-tronco

Células-tronco são células progenitoras capazes de se diferenciar em células de tecidos adultos especializados. Em relação às outras células do organismo, apresentam três características peculiares: são células indiferenciadas e não-especializadas, podem se multiplicar mantendo-se indiferenciadas por longo período (tanto *in vivo* quanto *in vitro*), de forma que poucas células são capazes de originar muitas populações semelhantes; e, diante de estímulos específicos, possuem a capacidade de se diferenciar em células maduras e funcionais de um tecido particular. Elas possuem a propriedade de divisão assimétrica, ou seja, originam células precursoras com capacidade restrita de diferenciação a um determinado tecido, ao mesmo tempo em que repõem a população de células-tronco com a produção de células indiferenciadas (auto-renovação) (ZAGO, 2006).

Em 1945 iniciaram-se os estudos experimentais com células-tronco em camundongos irradiados após populações civis terem sido expostas a doses letais de radiação. Em 1956 alguns estudos demonstraram que o transplante de medula óssea protege esses animais contra os efeitos da radiação. Diversos outros estudos foram desenvolvidos, aumentando as perspectivas de uso dos diferentes tipos celulares para fins terapêuticos (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007a).

Terapia celular é o conjunto de métodos e abordagens tecnológicas com a utilização de células no tratamento de doenças como: diabetes melito, câncer, pneumopatias, doenças genéticas, cardíacas e neurodegenerativas. A terapia celular com células-tronco tem despertado maior interesse na comunidade científica devido à capacidade que essas células indiferenciadas possuem de preservar sua própria população e de diferenciar-se em células dos diversos tecidos (ZAGO, 2005).

Inúmeras são as fontes de células-tronco e encontrar a mais apropriada para uso terapêutico depende da investigação de diversos fatores como suas características fenotípicas, potencial de diferenciação, sua capacidade de proliferação e estabilidade citogenética, quando expandidas *in vitro*. As células-tronco são classificadas como embrionárias ou adultas de acordo com sua fonte e estágio de desenvolvimento (DAN *et al.*, 2008).

1.1- Células-tronco embrionárias

As células-tronco embrionárias têm sua origem em embriões mamíferos no estágio de blastocisto, onde as células da massa interna, que vão originar todos os tecidos do indivíduo adulto, ainda estão indiferenciadas e podem estabelecer uma linhagem celular pluripotente. Possuem capacidade de se multiplicar em cultura sem perder a pluripotência e é possível induzir sua diferenciação em diversos tipos celulares específicos, o que faz das células-tronco embrionárias uma ferramenta de pesquisa poderosa e fonte promissora, quase ilimitada, de tecidos para transplante no tratamento de diferentes doenças (PEREIRA, 2006). As células-tronco embrionárias são pluripotentes e potencialmente capazes de regenerar tecidos lesados para medicina regenerativa. No entanto, sua viabilidade, segurança e eficiência devem ser testadas em modelos animais antes que aplicações clínicas sejam realizadas (PAU & WOLF, 2004).

Em 1998 Thomson e colaboradores reportaram, pela primeira vez, métodos de derivação e manutenção de células-tronco embrionárias humanas (PERA & TROUNSON, 2004). Atualmente a maior parte das linhagens de células-tronco embrionárias humanas é derivada a partir de embriões criopreservados após ciclos de fertilização *in vitro* (CHEN *et al*, 2005). Segundo Lerou e colaboradores (2008), outra fonte de células-tronco embrionárias humanas é proveniente de embriões que nem são transferidos e nem sobreviveriam ao processo de criopreservação, devido à baixa qualidade morfológica e incapacidade de resultar em gestações viáveis.

1.2- Células-tronco adultas

Células-tronco adultas, como todas as outras, possuem a propriedade de auto-renovação: fazem cópias idênticas de si por longos períodos de tempo; e também podem dar origem a tipos de células maduras com morfologia característica e funções especializadas. Normalmente, as células-tronco geram um tipo de célula intermediária antes de se tornarem totalmente diferenciadas. Essas células em estágio intermediário são chamadas de células progenitoras ou precursoras, encontradas em tecidos fetais ou adultos, parcialmente diferenciadas e que se dividem dando origem a grupos diferenciados. Essas células geralmente atingem a diferenciação por uma via de desenvolvimento celular particular, porém já se sabe que esta característica não é tão definitiva como uma vez pensou-se (WINSLOW, 2001).

Segundo relatos, as células-tronco adultas podem assumir características de células que se desenvolvem a partir da mesma camada germinativa primária ou de camadas diferentes (Figura 1). Muitos experimentos que envolvem a plasticidade demonstram que células-tronco derivadas da medula óssea, que é proveniente da mesoderme podem se diferenciar em outros tecidos provenientes da mesma camada, tais como: do músculo esquelético, do músculo cardíaco e do fígado; mas também foi relatado capacidade de diferenciação em tecido neural, que é derivado de camada embrionária diferente: a ectoderme (BRAZELTON, 2000).

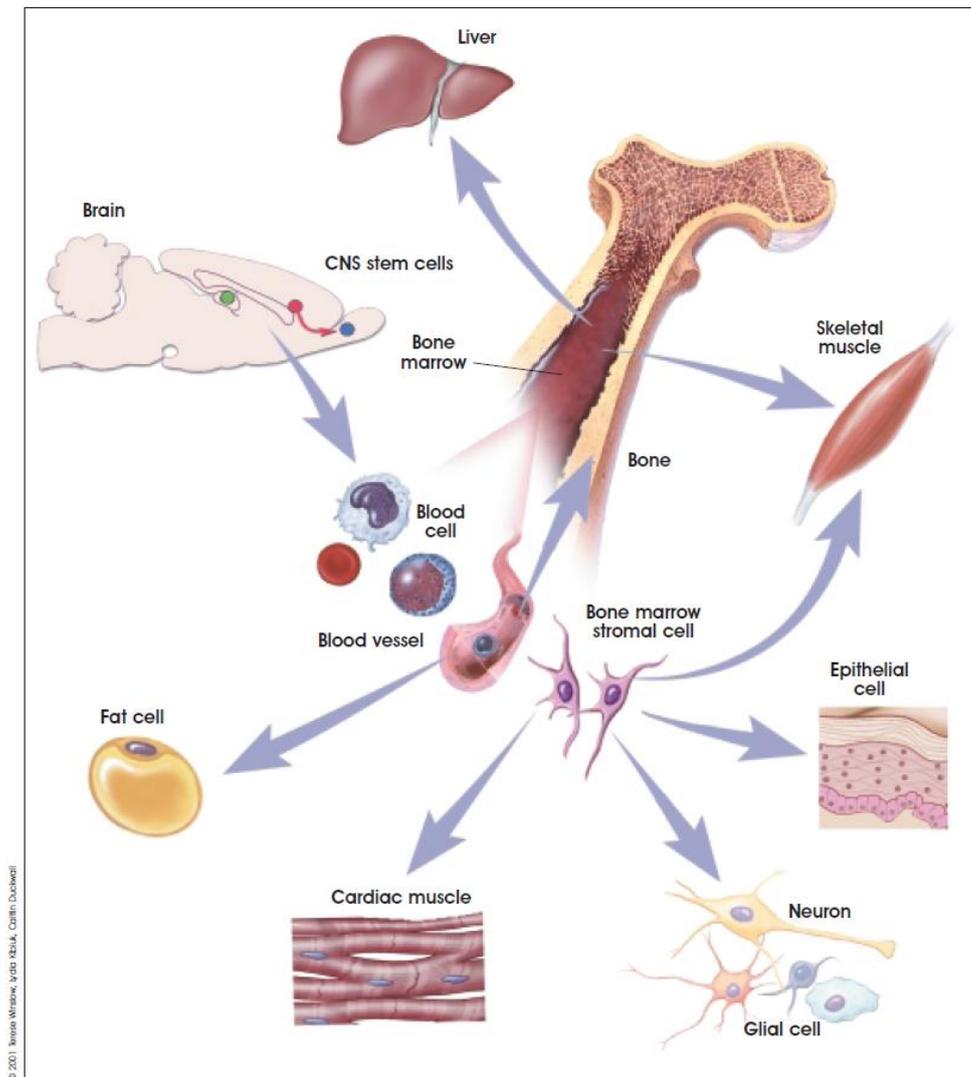


Figura 1: Evidência de plasticidade de células-tronco adultas (WINSLOW, 2001).

Dentre os principais tipos de células-tronco adultas identificadas temos as células-tronco mesenquimais (CTM), que atuam no reparo e homeostase em vários tecidos do corpo.

São capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, mas não em todas as células do organismo.

1.2.1- Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM) podem ser extraídas de diversos órgãos, expandidas em cultura como uma população aderente de células e induzidas a se diferenciar em múltiplos tipos celulares (BAKSH *et al.*, 2004; DOCHEVA *et al.*, 2007).

As CTM expressam alguns marcadores, que não são específicos de células mesenquimais, mas que as caracterizam imunofenotipicamente. As CTM adultas não expressam CD45, CD34, CD14 e CD11 (marcadores hematopoiéticos); nem CD80, CD86 e CD40 (moléculas co-estimulatórias); e nem CD31, CD18 e CD56 (moléculas de adesão). Podem expressar CD105, CD73, CD44, CD90, CD71 e STRO-1; assim como as moléculas de adesão CD106, CD166, ICAM-1 e CD29. Existe uma variação na expressão desses marcadores de acordo com o tipo de tecido, o método de isolamento e cultura das células e da espécie de origem. Além das caracterizações fenotípicas e morfológicas para identificação das populações de células supostamente mesenquimais, avalia-se também a capacidade de se induzir a diferenciação *in vitro* em adipócitos, osteócitos e condrócitos (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

Baseada na observação de que as CTM podem passar por diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, surgiu a tentativa do uso de células mesenquimais para reparo tecidual *in vivo* (KRAMPERA *et al.*, 2006).

Aproximadamente um terço das CTM se diferencia com sucesso nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica (Figura 2) (PITTENGER *et al.*, 1999). A diferenciação *in vitro* em uma determinada linhagem celular requer o tratamento das células com uma mistura de fatores específicos. O meio basal, a densidade celular, a organização espacial, fatores de crescimento e citocinas são fundamentais no sucesso da diferenciação (MANNELLO & TONTI, 2007).

CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL: DIFERENCIAÇÃO

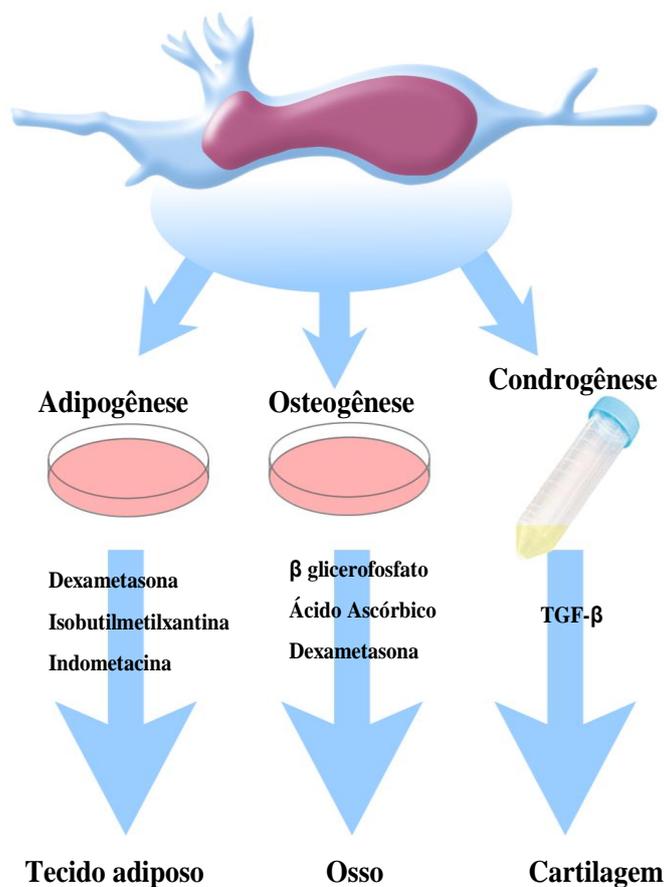


Figura 2: Esquema de diferenciação de CTM em linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica (PITTENGER, 1999).

A princípio a primeira fonte de células-tronco mesenquimais identificada foi a medula óssea (MO). Recentemente propuseram que as CTM poderiam ser encontradas em uma grande variedade de tecidos, senão todos tecidos corporais. Já existem relatos de isolamento de células mesenquimais de sangue do cordão umbilical, do subendotélio da veia umbilical, da veia safena, da carótida fetal, da artéria umbilical, do fígado e do pâncreas fetais, das gônadas, das fâscias musculares, da pele, dos pericitos retinianos, da placenta, do tecido adiposo e da polpa dentária, dentre outras fontes (COVAS, 2006).

1.2.2- Células-tronco de medula óssea

Na medula óssea três populações de células-tronco podem ser observadas: as hematopoiéticas, as mesenquimais (estromais) e provavelmente células progenitoras

endoteliais (SHI *et al.*, 1998). As hematopoiéticas são responsáveis pelo tecido sanguíneo e as células mesenquimais encontram-se imersas no estroma medular e podem dar origem a diferentes tipos celulares (KÖRBLING *et al.*, 2003).

As células mononucleares de medula óssea (CMO) compreendem as células hematopoiéticas e as não-hematopoiéticas, ambas possuem plasticidade, potencial de auto-renovação e diferenciação e por isso tem sido sugerido a utilização de CMO em terapia celular (WAKSMAN & BAFFOUR, 2003).

Foi demonstrado por Krause e colaboradores (2001) que o transplante de células da medula óssea pode resultar na completa e permanente reconstituição dos tecidos hematopoiéticos e que essas células podem se diferenciar em células epiteliais do fígado, baço, trato gastrintestinal, pele e pulmões. Outros estudos demonstraram que células da medula óssea possuem capacidade de se diferenciar em microglia e astrócitos após transplante em camundongo (HICKEY & KIMURA, 1998; EGLITIS & MEZEY, 1997) e alguns trabalhos reportaram células de medula óssea expressando marcadores neuronais (MEZEY *et al.*, 2000; BRAZELTON *et al.*, 2000).

1.2.3- Células-tronco da polpa de dente humano

O dente se desenvolve na maxila e mandíbula dos mamíferos, variando a morfologia de acordo com a espécie e a localização, mas a estrutura se mantém similar sendo formado por: esmalte, cemento e dentina (juntos formam o tecido mineralizado que reveste a polpa), a polpa (formada por tecido conjuntivo vascularizado, com diferentes tipos celulares) e o periodonto (fixa os dentes nos ossos maxilares e mandibulares) (YEN & SHARPE, 2008).

A polpa dentária, que é derivada de componentes ectodérmicos e mesenquimais é dividida em quatro camadas: a primeira, mais externa, composta de odontoblasto produzindo dentina; a segunda camada, pobre em células e rica em matriz extracelular; a terceira camada contém células progenitoras com plasticidade e pluripotência; e a camada mais interna, que compreende a área vascular e o plexo nervoso (D`AQUINO *et al.*, 2008).

Em 2000, Gronthos e colaboradores especularam que a polpa de dente adulta deveria, assim como a medula óssea, possuir uma população de células-tronco. Isolaram células da polpa de dente humano (terceiro molar) e comparadas com as células-tronco de medula óssea apresentaram heterogeneidade, multipotencialidade, capacidade de proliferação e de formação de colônias *in vitro*. Em seguida a polpa de dente decíduo humano (dente de leite) foi também descoberta como uma rica fonte de CTM, capaz de se proliferar e diferenciar, podendo reparar

estruturas dentárias danificadas, induzir regeneração óssea e possivelmente tratar tecidos neurais lesados e ser utilizada em terapia de doenças degenerativas (MIURA *et al.*, 2003).

Por não serem órgãos vitais, devido ao fácil acesso e por ser um tecido que normalmente seria descartado, tornaram-se um atrativo para utilização em terapia celular. A extração do tecido pulpar é altamente eficiente, o local de coleta é fácil e as células possuem ampla capacidade de diferenciação e interatividade com biomateriais, tornando ideal para reconstrução de tecidos (D'AQUINO *et al.*, 2008). A bioengenharia baseada nas células-tronco apresenta-se como técnica promissora para odontologia regenerativa acreditando-se que poderão no futuro ser utilizada na regeneração de dentes danificados e na substituição de implantes metálicos (YOU-YOUNG *et al.*, 2007). As suas limitações estão no risco de contaminação durante a coleta e a restrita quantidade de células inicialmente disponível para terapia (GRONTHOS *et al.*, 2002).

Foi demonstrado que CTM da polpa dentária possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação em adipócitos, têm potencial de regeneração óssea pela sua expressão de marcadores ósseos (GRONTHOS *et al.*, 2002) e habilidade de regenerar a polpa e a dentina composta de matriz mineralizada (GRONTHOS *et al.*, 2000). Essas células *in vivo* são recrutadas para a polpa dentária e diferenciam-se em odontoblastos podendo reconstituir a dentina em reposta a lesões teciduais (SHI & GRONTHOS, 2003).

As células-tronco da polpa dentária podem ser criopreservadas por longos períodos e surgiram propostas de criopreservação do tecido pulpar ou da unidade dentária trazendo opções para criação de criobancos de células o que favoreceria sua utilização clínica (D'AQUINO *et al.*, 2008; PERY *et al.*, 2008; WOODS *et al.*, 2009).

Alguns estudos nos últimos anos demonstraram que, além da capacidade de diferenciação em osteócitos, odontoblastos e adipócitos, as células-tronco da polpa de dente se diferenciam em outras linhagens como a neurais (ISHKITIEV *et al.*, 2010; SOUZA, 2008; HUANG *et al.*, 2008) Terapias voltadas à engenharia de tecidos utilizando essas células-tronco, têm surgido como estratégias de grande potencial na odontologia e na medicina regenerativa atual.

2- Distúrbios do sistema nervoso

O sistema nervoso central (SNC), ao contrário de muitos outros tecidos, tem capacidade muito limitada para a auto-reparação. Células nervosas maduras não têm a capacidade de se regenerar, mas células-tronco neurais endógenas existem no cérebro de

adultos porém têm capacidade muito limitada para gerar novos neurônios funcionais, em resposta a uma lesão (SRIVASTAVA *et al.*, 2008).

Diferentes tipos celulares estão afetados em doenças neurológicas distintas e levando-se em consideração a complexidade do SNC humano, uma recuperação funcional significativa implica recuperação das sinapses, suporte glial, irrigação sanguínea, além da reposição dos neurônios (MARIE & OBA-SHINJO, 2006)

Existem poucos recursos terapêuticos para as doenças e lesões traumáticas do SNC. Dentre os possíveis tratamentos, as células-tronco vêm sendo consideradas como uma opção, devido à sua capacidade de diferenciação em tipos de neurônios específicos ou de glia, o que poderá substituir as células perdidas em uma determinada doença ou lesão neurológica (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007b).

A fonte ideal de células-tronco para substituir os neurônios e glia perdidos em doenças neurológicas permanece indeterminada. Portanto, as características mais factíveis de serem exploradas terapeuticamente a curto e médio prazo vêm sendo investigadas. Isto envolve o tropismo que as células-tronco adultas apresentam pelas áreas de lesão e a produção de diversos fatores tróficos capazes de melhorar funcionalmente os neurônios, promovendo maior sobrevivência dos mesmos, diminuindo a inflamação e aumentando a vasculogênese (CHOPP & LI, 2002).

O transplante de células-tronco e a mobilização de células-tronco endógenas têm sido estudados como potencial terapia para várias distúrbios que afetam o sistema nervoso, tais como a esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Huntington (DH), doença de Parkinson (DP), acidente vascular cerebral (AVC), esclerose múltipla (EM), lesão medular, degeneração muscular e epilepsia (MARIE & OBA-SHINJO, 2006).

2.1- Epilepsia

A epilepsia é uma desordem neurológica que acomete de 1 a 3% da população mundial e é caracterizada pela presença de crises convulsivas espontâneas e recorrentes (CER) oriundas de uma atividade elétrica anormal, sincrônica e excessiva, com tendência a se repetir ao longo da vida (DA COSTA *et al.*, 1998) É um transtorno freqüente em todo o mundo, porém, em maior número nos países subdesenvolvidos. Afeta todas as idades e pode estar associada a uma série de problemas cognitivos, psiquiátricos e sociais (ELGER & SCHMIDT, 2008).

As crises epilépticas podem ser desencadeadas por disfunções metabólicas, tumores, traumas, doenças infecciosas e doenças vasculares, apesar de na maioria das vezes a sua etiologia permanecer desconhecida. A epileptogênese é o termo que descreve o processo desde o dano tecidual ao desenvolvimento da epilepsia crônica (MELO *et al.*, 2002). Três fatores causais são os mais considerados: predisposição individual, presença de lesão epileptogênica cerebral e alterações elétricas ou bioquímicas cerebrais (McNAMARA, 1994).

Qualquer processo que provoca a alteração da estrutura (macroscópica ou microscópica) ou da função dos neurônios cerebrais predispõe à epilepsia. Houve várias tentativas de classificar as crises e síndromes epilépticas, mas a classificação só foi padronizada com a adoção da classificação de crises epilépticas pela International League Against Epilepsy (ILAE), em 1981, e a classificação das epilepsias e síndromes epilépticas, em 1989 pela ILAE (SHNEKER & FOUNTAIN, 2003; ENGEL, 2001). Essa classificação baseia-se nas semelhanças em relação à idade de início, ao tipo de crise, sinais clínicos ou neurológicos associados, padrões eletroencefalográficos, histórico familiar e prognóstico (ENGEL, 2006).

As manifestações clínicas das crises epilépticas iniciam de modo abrupto e se apresentam de formas variáveis, podendo ocorrer sinais motores, sensitivos, autonômicos e alterações do estado de consciência (FISHER, 2005). A ocorrência de crises epilépticas prolongadas ou repetidas em intervalo curto que resulta num estado contínuo e duradouro é denominada *status epilepticus* (SE) (BARTOLOMEI *et al.*, 1999).

A epilepsia é tratável e o uso de drogas antiepilépticas (DAES) é a principal forma de tratamento. Estudos têm apontado que a frequência e severidade das crises são menos danosas que as conseqüências psicossociais da epilepsia (SALGADO & SOUZA, 2003).

2.1.1- Epilepsia do Lobo Temporal

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum em pacientes adultos (ENGEL *et al.*, 1989). Estima-se que a ELT possua uma prevalência entre 50% a 60% dos portadores de epilepsia. É comum o relato de perda de memória, podendo apresentar aumentos progressivos desta perda com a elevação da frequência das crises epilépticas (HENDRIKS *et al.*, 2004).

Clinicamente a ELT é caracterizada pelo desenvolvimento gradativo das crises parciais complexas, ocorrendo ou não generalizações secundárias, com perda neuronal e comprometimento do desempenho cognitivo progressivo- crises espontâneas recorrentes

(CER) (ENGEL, 1996). As alterações comportamentais dependem do tipo de neurônio envolvido na geração da crise. Nas crises generalizadas, todos os neurônios corticais estão envolvidos no evento. Já nas crises parciais, que envolvem o córtex do lobo temporal, uma seqüência relativamente fixa de eventos pode ser observada, as crises originam-se em uma área sensorial desencadeando sensações sinalizadoras de *déjà vu* e comprometendo a memória e consciência do paciente quando envolve hipocampo e amígdala (NAFFAH-MAZZACORATTI, 1998)

As crises ocorrem no lobo temporal, principalmente na amígdala, hipocampo e giro hipocampal. As manifestações iniciais são representadas por crises parciais simples com desconfortos epigástricos associados a distúrbios comportamentais. As crises parciais complexas também estão presentes com perda de consciência associada a automatismos gestuais e orofaciais (PEDROSO, 2005).

O relato de perda de memória em pessoas com ELT é um achado importante, podendo apresentar aumentos progressivos mediante elevação da frequência de crises epiléticas (HENDRIKS *et al.*, 2004). Essa disfunção é proporcional ao grau de atrofia das estruturas mesiais, sobretudo do hipocampo (YACUBIAN, 1998).

2.1.2- Tratamento

A epilepsia possui seu tratamento clínico baseado no emprego de drogas anti-epiléticas (DAES), que são agonistas GABAérgicos como os benzodiazepínicos, carbamazepinas, tiagabina, valproatos, que possuem a sua adequação de uso de acordo com a gravidade do estado do paciente (GUERREIRO, 2006).

Aproximadamente 30% dos pacientes submetidos a tratamentos com fármacos antiepiléticos tornam-se refratários, continuam apresentando as crises e são encaminhados para tratamento cirúrgico. No entanto essa intervenção pode levar a perdas nas funções cerebrais (LOSHER, 2002).

Esses tratamentos visam à diminuição ou a eliminação das crises, porém, os problemas decorrentes do dano neurológico coexistente e das dificuldades psicossociais dificilmente serão abolidos apenas com medicamentos ou tratamento cirúrgico. Portanto torna-se fundamental novas alternativas e estratégias terapêuticas como a terapia gênica e o transplante de células-tronco vem sendo estudadas (VENTURIN, 2008).

3- Células-tronco e epilepsia

Transplantes de células-tronco demonstraram um potencial de redução das crises espontâneas recorrentes em modelos experimentais de epilepsia, com o uso de células neurais (CHU *et al.*, 2004; SHETTY & HATTIANGADY, 2007) e de células mononucleares de medula óssea de camundongo (COSTA-FERRO *et al.*, 2010). Além disso, o uso de células neurais fetais (ZAMAN *et al.*, 2000), células liberadoras de adenosina (HUBER *et al.*, 2001) e células produtoras de GABA (GERNET *et al.*, 2002) também vem sendo estudadas na epilepsia. Precusores neurais derivados de células-tronco embrionárias de camundongos foram transplantados no hipocampo de ratos epiléticos (RUSCHENSCHMIDT *et al.*, 2005).

Diversas são as estratégias terapêuticas que envolvem transplante de células-tronco na epilepsia e as CTM derivadas da polpa de dente, por sua pluripotencialidade e capacidade de diferenciação, podem apresentar-se como uma alternativa ao tratamento dos distúrbios epiléticos.

4- Modelo experimental de epilepsia

A utilidade de um modelo experimental é determinada pelo grau de semelhança com um fenômeno natural e pela capacidade deste em representar com fidelidade os eventos naturais. Muitas pesquisas passaram a se desenvolver em animais de laboratório para aumentar os conhecimentos acerca da epilepsia no ser humano (PALLUD, 2008).

Para que um modelo experimental seja classificado como um modelo de epilepsia ele deve demonstrar a presença de atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos e clinicamente, apresentar uma atividade semelhante àquelas observadas durante uma crise epilética (LOUIS *et al.*, 1987)

A lesão cerebral induzida pelo *status epilepticus* (SE) nesses modelos pode ser considerada como equivalente a um evento epileptogênico (ou seja, capaz de gerar epilepsia) no ser humano, como por exemplo, uma convulsão febril (MATHERN *et al.*, 1996).

Nos principais modelos experimentais da epilepsia do lobo temporal a aplicação de convulsivante químico (pilocarpina ou cainato) ou a estimulação elétrica, desencadeia episódios agudos de SE, que são então interrompidos deixando os animais com aparência normal por um período que varia de duas semanas a meses. Ao final desse tempo passam a desenvolver CER que persistem por toda a vida (COULTER *et al.*, 2002).

Os modelos experimentais de epilepsia buscam oferecer novas informações para o entendimento deste distúrbio do sistema nervoso central. Apesar do freqüente aparecimento de diferentes modelos experimentais, poucos resistem a um exame rigoroso e à prova do tempo, pois o modelo experimental mimetiza algumas das características desta ou daquela forma de epilepsia (MELLO *et al.*, 1986).

4.1- Modelo lítio-pilocarpina

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico, derivado de plantas (*Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*) e o modelo experimental com injeção de pilocarpina foi primeiramente descrito por Turski e colaboradores (1983). Este modelo de pilocarpina, associado ou não ao lítio, representa bem as principais características clínicas e neuropatológicas da epilepsia do lobo temporal humana. A injeção de Li-Pilo (Lítio e Pilocarpina) induz um SE inicial que gera lesões neuronais no sistema límbico, no mesencéfalo, no córtex cerebral, tálamo e substância negra levando à reorganização do circuito e crises epilépticas espontâneas (LEROY *et al.*, 2003).

O lítio tem sido acrescentado por potencializar a habilidade da pilocarpina de induzir SE, elevando a morte neuronal por envolvimento na regulação da síntese dos receptores dopaminérgicos e colinérgicos muscarínicos. O modelo Li-pilo evita efeitos colaterais colinomiméticos periféricos associados a altas dosagens de pilocarpina e reduz a mortalidade (DE BRUIN *et al.*, 2000).

Esse modelo pode ser dividido em três fases: a aguda, imediatamente após a injeção de pilocarpina, onde o animal atinge o SE e permanece em crise por no mínimo 30 minutos; a fase latente, sem a presença de crises, aproximadamente após 15 dias do SE; e uma fase crônica, onde ocorrem crises recorrentes de origem límbica com uma freqüência constante ao longo dos meses (PEDROSO, 2005).

O modelo de Li-pilo tem sido amplamente utilizado. Dependendo do objetivo dos experimentos, os pesquisadores usam diferentes dosagens de pilocarpina, diferentes procedimentos de pré-tratamento, e espécies de animal. Além disso, a duração da SE induzido pela pilocarpina e as drogas utilizadas para bloqueá-lo também sofrem variação. Estes protocolos variados contribuem para os diversos achados obtidos em diferentes estudos experimentais da epilepsia (CURIA, 2008).

Em estudos prévios realizados por nossa equipe foi observado o efeito positivo das células mononucleares de medula óssea na epilepsia experimental induzida por lítio-

pilocarpina, os animais transplantados com CMO não desenvolveram crises quando avaliados 22-28 dias após o SE.

Por sua capacidade de auto-renovação e plasticidade e pela facilidade de obtenção, as células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente podem apresentar-se como uma alternativa ao tratamento da epilepsia. Nesse estudo foi realizada uma investigação das características fenotípicas e funcionais das células-tronco de polpa de dente humano e seu efeito no tratamento da epilepsia comparando com o efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea (CMO).

Objetivos

Geral:

Caracterizar as células-tronco da polpa de dente decíduo humano e avaliar seu papel terapêutico no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por lítio-pilocarpina em ratos Wistar.

Específicos:

- Verificar as características fenotípicas, potencial de diferenciação e estabilidade cromossômica das células-tronco mesenquimais obtidas a partir de dente decíduo humano;
- Avaliar a capacidade de migração das células transplantadas, por via intraperitoneal, ao foco da lesão;
- Avaliar os efeitos da terapia com células-tronco de polpa de dente humano no modelo experimental de epilepsia, observando as crises espontâneas recorrentes e comparando com o tratamento com células mononucleares de medula óssea;
- Avaliar a memória espacial dos animais através do desempenho no labirinto aquático de Morris (LAM) após o transplante das células.

Material e métodos

1- Animais experimentais

Para a realização dos estudos, utilizaram-se ratos (*Rattus norvegicus*) adultos, da linhagem WISTAR com 40-45 dias de idade, pesando entre 110-130 gramas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) – UNICAMP. Os animais foram mantidos no Biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular em micro-isoladores com ventilação individual das gaiolas, recebendo água e ração à vontade, sob o fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro, à $21^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}$ e 55-65% de umidade relativa do ar.

Para comparar o efeito do transplante das células mesenquimais derivadas da polpa de dente humano, foram utilizadas células mononucleares de medula óssea (CMO) obtidas de 7 camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6 EGFP, com idade entre 45-60 dias, mantidos e criados sob as mesmas condições dos ratos.

O máximo de precaução foi deliberado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos “Principles of laboratory animal care” (NIH publication N° 85-23, revisado 1996). Este trabalho foi submetido à COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Hospital São Rafael (n° 02/10).

2- Isolamento das células

O isolamento das células-tronco da polpa de dente decíduo utilizadas neste projeto foi padronizado em experimentos prévios realizados pela equipe do nosso laboratório na Fiocruz-Ba. Conforme ilustrado na figura 3, as unidades marcadas na radiografia foram selecionadas para a exodontia e a cirurgia foi realizada em duas etapas em um intervalo de 15 dias com um controle rigoroso da cadeia asséptica. O tecido pulpar foi extraído do interior do dente com lâminas endodônticas em fluxo laminar e acondicionado em garrafas de cultura, em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - GibcoBRL) com 10% de SBF (soro bovino fetal) (Hyclone - USA) e 50 mg/ml de gentamicina (DMEM completo). Após a confluência da população de células aderentes, a cultura foi tripsinizada e uma parte das células foi

separada para criopreservação. Essa linhagem isolada foi denominada CDLH1 (Células de Dente de Leite Humano 1).



Figura 3. Isolamento de CTM da polpa dentária. A) Unidades marcadas na radiografia foram selecionadas para a exodontia, B) Arcada dentária e C) Extração do tecido pulpar do interior do dente.

3- Cultivo celular

Uma amostra da linhagem CDLH1 que estava acondicionada em criotubos a -196°C (em nitrogênio líquido) foi descongelada, as células foram processadas e mantidas em garrafas de cultivo celular estéreis de 25 cm^2 contendo DMEM com 10% SBF e $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ gentamicina (Sigma) e incubadas em estufas com 5% CO_2 e temperatura de 37°C . As células em cultivo após atingirem 80-90% de confluência foram lavadas com salina estéril e submetidas a uma solução de tripsina 0,05% (Sigma) para que as ligações das células com a matriz extracelular sejam desfeitas. Após a tripsinização as células ressuspensas em 1 ml de meio completo foram contadas em câmara de Neubauer, a viabilidade celular foi observada pelo protocolo de *Trypan Blue* (GibcoBRL). Esse processo se repete algumas vezes durante o cultivo e a expansão. As células foram utilizadas para a expansão de novas subculturas (passagens), criopreservação de alíquotas reservas, em ensaios de diferenciação, caracterização por citometria de fluxo e imunofenotipagem e para transplante em modelos experimentais (Figura 4).

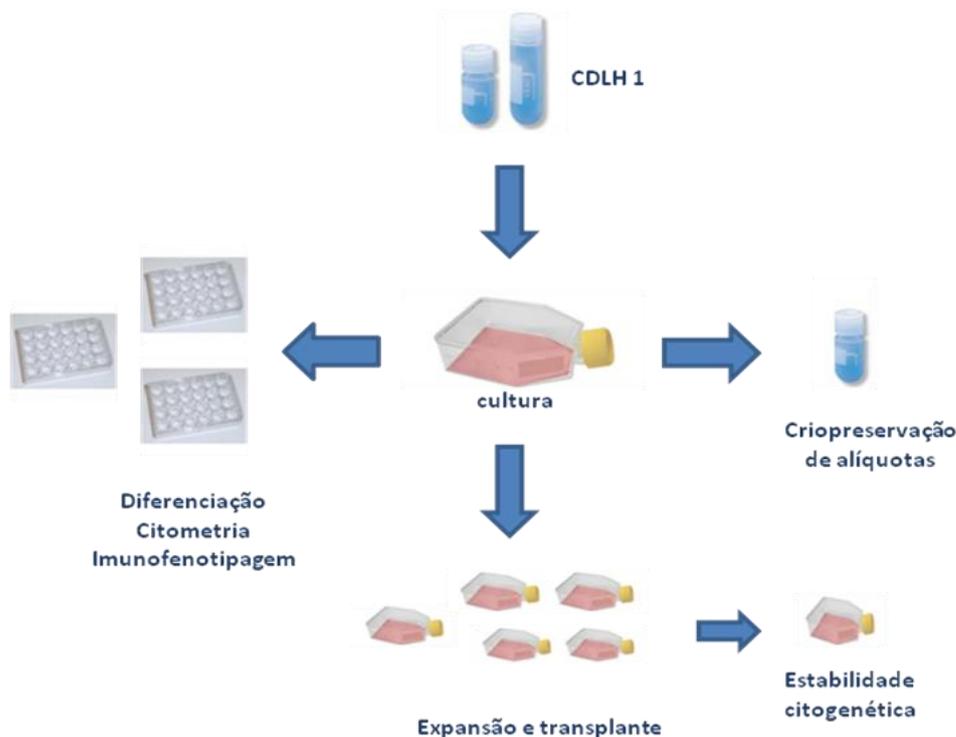


Figura 4: Delineamento do cultivo celular das células CDLH1.

4- Diferenciação

Foi investigada a capacidade de diferenciação das CTM da polpa de dente decíduo em adipócitos, osteócitos e condrócitos, com a utilização de meio suplementado com fatores indutores de diferenciação específicos.

4.1- Diferenciação adipogênica

Dez mil células foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas, em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após atingirem 50-60% de confluência todo o meio de cultivo foi removido e substituído pelo meio de indução adipogênica StemPro *Adipogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Em todos os experimentos foi mantido um grupo controle cultivado em meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Metade do meio de cultura era trocado a cada dois dias. A evolução da diferenciação foi acompanhada em microscópio invertido.

Para observar a deposição de gordura, após quinze dias em cultivo, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram coradas pelo método de Sudan II: fixadas

em paraformaldeído a 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavados em água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. A seguir, foram coradas com solução de Sudan II escarlate por 5 minutos e então lavadas com álcool 70%. Finalmente, as células foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos.

4.2- Diferenciação osteogênica

Para diferenciação osteogênica 5×10^3 células foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas, em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. Em seguida, as células foram estimuladas, por até 14 dias, com meio de diferenciação StemPro *Osteogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Em todos os experimentos foi mantido um grupo controle cultivado em meio DMEM suplementado com 10% SBF. Metade do meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

A deposição de cálcio foi observada através da coloração pelo método de Von Kossa. Após fixação em paraformaldeído 4% por 15 minutos e lavagem com água destilada, as células foram mantidas no escuro em presença de nitrato de prata a 5% por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada e expostas a lâmpada de 100 W por 1 hora e 15 minutos, lavadas em tiosulfato de sódio a 5% e então contra-coradas com Hematoxilina de Harris. As células diferenciadas em osteoblastos e seus controles foram coradas e o resultado da diferenciação foi observado através de microscópio óptico.

4.3- Diferenciação condrogênica

Cem mil células foram cultivadas com meio DMEM e 10% SBF em placas de 24 poços com lamínulas. Após atingirem confluência entre 40-50% todo meio foi substituído pelo meio de diferenciação constituído por DMEM suplementado com 100µg/mL de piruvato de sódio (Vetec), 40 µg/mL de prolina, 50 µg/mL de ácido ascórbico L-2 fosfato (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL de BSA (Bovine Serum Albumine), 1 x insulina-tranferrina-selenium *plus* (Sigma- Aldrich), 100 nM de dexametasona (Sigma- Aldrich) e 10 ng/mL de TGFβ3 (Sigma-Aldrich). O grupo controle foi cultivado com meio DMEM suplementado com 10% SBF. O meio era trocado duas vezes por semana. Após 21 dias, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% (Electron Microscopy Sciences) por 30 minutos, lavadas com PBS (*Phosphate buffered saline*) e coradas com solução de *Alcian Blue* (Gibco) em HCl 0,1N por 30 minutos. Em seguida as células foram lavadas 3 vezes com solução de HCl 0,1N, foi

adicionada água destilada para a neutralização da acidez e as estruturas foram visualizadas em microscópio óptico.

5- Caracterização celular

5.1- Citometria de fluxo

Para a detecção de antígenos de superfície e antígenos intracelulares, as células aderentes, na 6ª passagem, foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer imediatamente após seu desprendimento. Em seguida, elas foram lavadas com salina e $5,0 \times 10^5$ células foram incubadas a 4°C durante 30 minutos com os seguintes anticorpos diluídos 1:100 : CD90 FITC/ CD34 PE/ CD54 PE-CY5/ CD45 APC/ CD105 FITC/ CD166 PE/ CD117 PE-CY5/ CD45 APC/ CD44 FITC/ CD73 PE/ CD45 APC/ CD31 FITC/CD133 PE/ CD45 APC/ OCT 4 / 7- STRO-1. O excesso de anticorpo foi removido por lavagens sucessivas com salina. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA) utilizando o programa CellQuest. Pelo menos 50.000 eventos foram coletados e analisados. Células não marcadas com anticorpos foram utilizadas como controle.

5.2- Imunofluorescência

Células CDLH1 na 6ª passagem foram utilizadas para caracterização fenotípica por imunofluorescência. As células foram tripsinizadas das garrafas e semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro 13 mm (KNITTEL Glase, Braunschweig, Alemanha). Após 24 horas de aderência foi realizado procedimento de marcação. O meio de cultura foi retirado e lavagens sucessivas com PBS foram realizadas. As células foram fixadas com PFA 4% durante 20 minutos. Em seguida foram realizadas duas lavagens dos poços com PBS durante 3 minutos. Após remoção do PBS, os poços submetidos a marcações para antígenos nucleares foram incubados com Triton X-100 0,1% durante 10 minutos para permeabilização celular. Em seguida, foi realizado bloqueio com PBS/BSA 5% durante 30 minutos e incubados *overnight* com os anticorpos primários.

Os seguintes anticorpos foram utilizados nas respectivas diluições: Anti-CD44 (1:100, Zymed), Anti-CD34 (1:100, Zymed), Anti-CD45 (1:100, BioSource), Anti-CD90 (1:100, BD Biosciences), Anti-CD105 (1:100, BD Biosciences), Anti-CD73 (1:100, BD Biosciences), Anti-

CD117 (1:100, Abcam), Anti-CD133 (1:25, Abcam), Anti- α Miosina (1:100, Sigma Aldrich), Anti-Cytokeratin 18 (1:100, Santa Cruz Biotechnology), Anti-SSEA-1 (1:50, Chemicon), Anti-SSEA-4 (1:50, Chemicon), Anti-TRA-1 60 (1:50, Chemicon), Anti-TRA-1 81 (1:50, Chemicon), Anti-Collagen type I (1:50, Santa Cruz Biotechnology), Anti-GFAP (1:200, DAKO), Anti-Mielina (1:100, Zymed), Anti-NeuN (1:50, Chemicon).

No dia seguinte, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante 3 minutos, seguida de duas lavagens de PBS por mais 3 minutos. Subseqüentemente foi realizada a incubação com os anticorpos secundários específicos diluídos a 1:200 em solução de PBS/BSA 1%: Anti-mouse IgG conjugado a Texas Red (Molecular Probes), Anti-rabbit IgG conjugado a Alexa Fluor 568 (Molecular Probes) ou Estreptavidina conjugada a Alexa Fluor 568 (Molecular Probes). Faloidina 488 (Molecular Probes) foi diluída a 1:50 na mesma solução que os anticorpos secundários. Os poços foram incubados com a solução contendo anticorpos secundários e faloidina durante 1 hora a 4°C. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante 3 minutos e mais duas lavagens de PBS também por 3 minutos. As lâminas foram montadas com meio de montagem VectaShield (Dako) contendo DAPI para coloração nuclear.

6- Análise citogenética

As CTM, após extração e isolamento na terceira, sexta e oitava passagens foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Células em divisão celular ativa foram bloqueadas na metáfase com colchicina a 16 μ g/mL (Cultilab), destacadas da superfície de crescimento com tripsina a 0,25% (Cultilab) e subseqüentemente infladas pela exposição à solução hipotônica de KCl a 0,075 M (Merck). As células foram fixadas em solução 3:1 de metanol e ácido acético. A análise citogenética dos cromossomas metafásicos foi realizada pelo bandeamento GTG (giemsa-tripsina-giemsa) e as imagens foram capturadas no microscópio BX61 (Olympus), com o programa BandView da Applied.

7- Delineamento dos experimentos

Neste estudo avaliou-se o efeito das CDLH1 em ratos epiléticos que foram transplantados duas horas após o SE. Como em estudos prévios realizados por nossa equipe foi observado o efeito das células mononucleares de medula óssea na epilepsia experimental

induzida um grupo foi transplantando com essas células para comparar os resultados e a via de transplante.

O modelo para a indução da epilepsia foi o Lítio-pilocarpina. Os animais foram distribuídos em dois subgrupos: **A) grupo Pilocarpina** e **B) grupo controle**. Os animais do grupo pilocarpina (n=31), após receberem diazepam para bloquear o SE, foram divididos em três grupos: SE-salina, que no transplante recebeu solução salina (n=10); SE-CDLH1 que recebeu células-tronco de polpa de dente humano (n=13) e SE-CMO que recebeu células mononucleares de medula óssea (n=8). O grupo controle constou de animais não submetidos ao SE (n=10) (Figura 5).

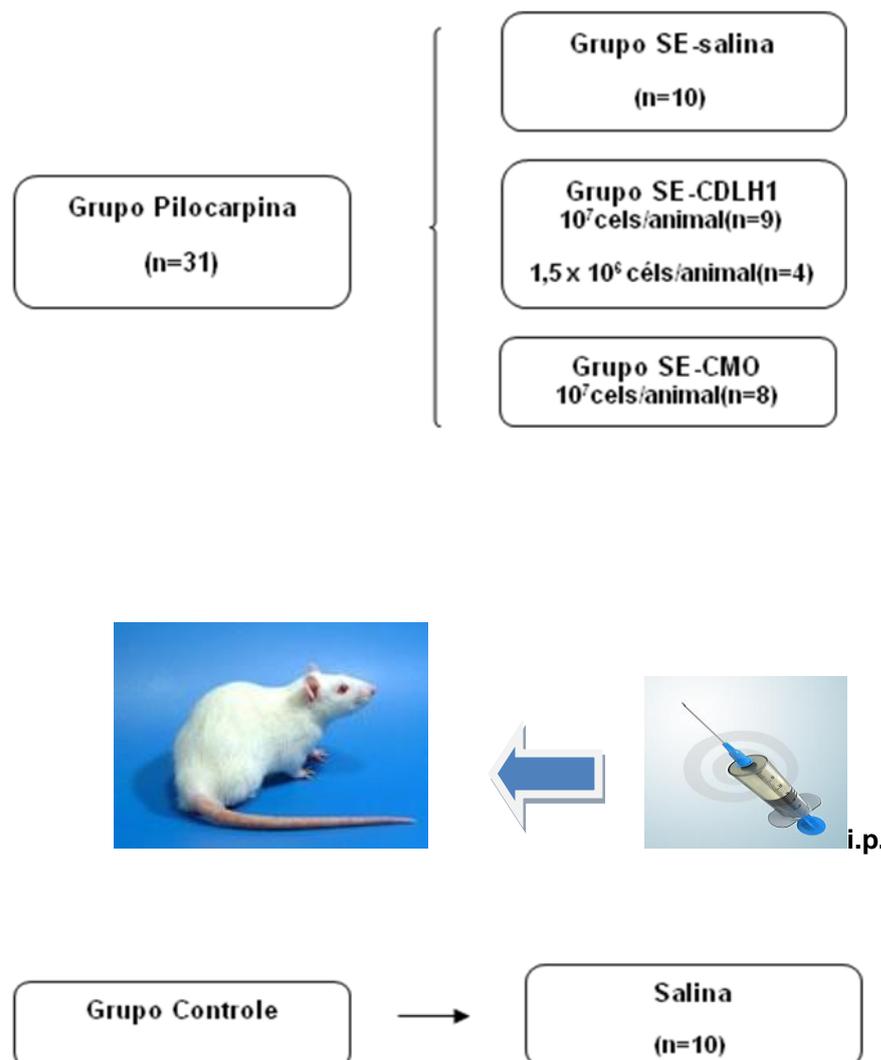


Figura 5: Esquema com os grupos experimentais. Na indução do SE: grupo Pilocarpina são animais que receberam Li-pilo e Controle são animais que receberam solução salina. No transplante: SE-salina (receberam solução salina), SE-CDLH1 (receberam células-tronco de polpa de dente humano), SE-CMO (receberam células mononucleares de medula óssea e Controle-salina (receberam solução salina).

Foram realizados protocolos experimentais, em diferentes espaços de tempo para avaliar: migração celular por imunofluorescência (48 e 72h após o transplante de células), quantificação das crises por vídeo-monitoramento (30 e 60 dias após SE), e alteração de memória no Labirinto Aquático de Morris (LAM) (60 dias após SE), como observado na Figura 6.

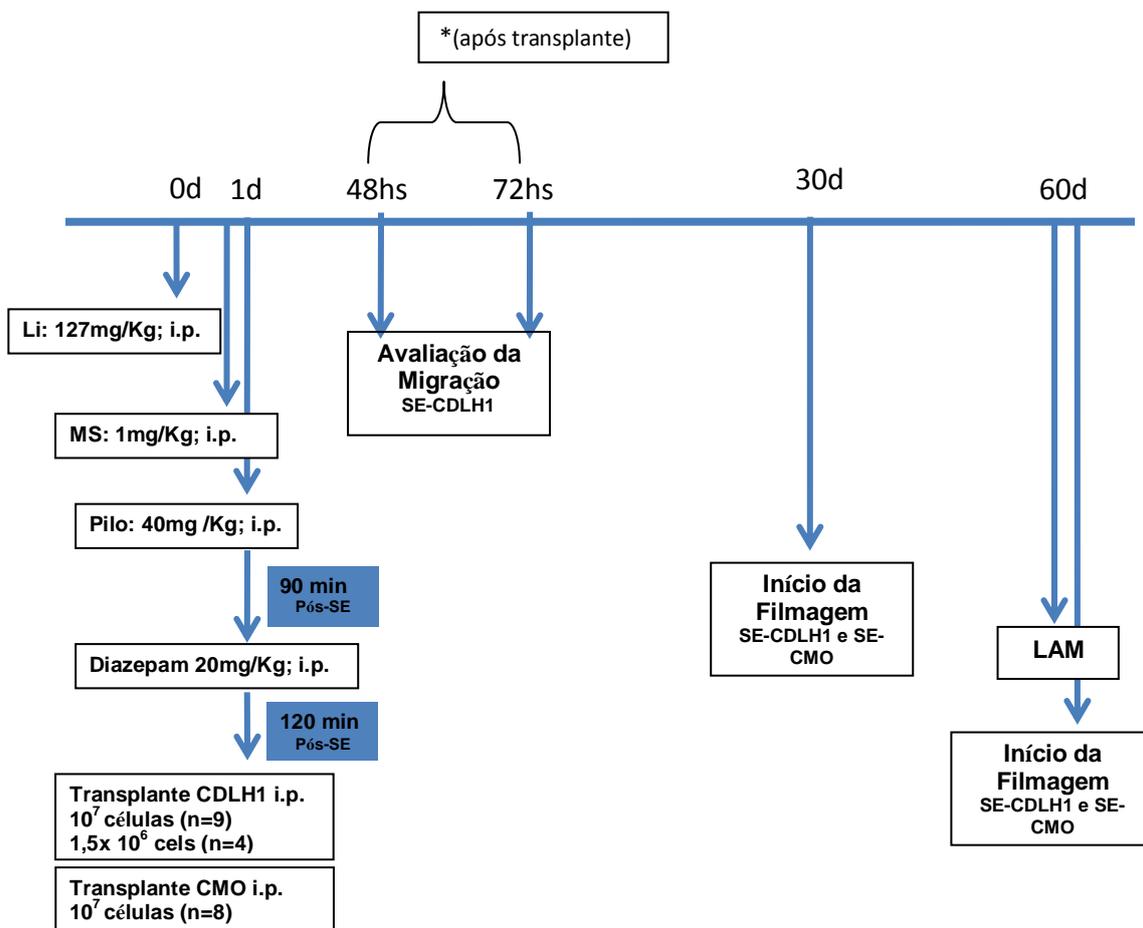


Figura 6: Esquema do delineamento experimental. Li: lítio; MS: metilescopolamina; Pilo: pilocarpina, CDLH1: células de dente de leite humano 1; CMO: células mononucleares de medula óssea; i.p.: intraperitoneal. Avaliação da migração: avaliação por (imunofluorescência), Início da filmagem: para avaliar crises recorrentes e LAM: estudo da memória no LAM (Labirinto Aquático de Morris).

8- Indução da epilepsia pelo modelo lítio e pilocarpina

Os animais receberam cloreto de lítio na dose de 127mg/Kg 20-24 horas antes da administração da pilocarpina e receberam uma dose de metilescopolamina (MS) (1mg/kg em 0.9% de NaCl) injetada intraperitonealmente (i.p), 30 minutos antes da administração da pilocarpina, que induz o SE. O pré-tratamento com metilescopolamina foi aplicado com o objetivo de atenuar as manifestações periféricas da pilocarpina. Decorridos 30 minutos da administração da metilescopolamina, o grupo epiléptico recebeu 40mg/kg de cloridrato de

pilocarpina via i.p, conforme protocolo publicado (CLIFFORD *et al.*, 1987), o início do SE foi considerado quando os animais atingiram grau V da escala de Racine (RACINE, 1972), seguida de convulsões tônico-clônicas sustentadas por mais de cinco minutos. A partir deste momento iniciou-se a observação comportamental destes animais que permaneceram em caixas de acrílico transparentes. Aproximadamente 90 minutos após a instalação do SE, (PRIEL *et al.*, 1996), foi injetado 20mg/kg de diazepam i.p. para interromper as crises (MELLO, 1993). Os animais, durante os dois dias seguintes, receberam doses diárias de 1mL de HIDRAFIX Solução Oral Concentrada (NYCOMED PHARMA), para controlar a desidratação provocada pela indução do SE. Os animais dos grupos controle receberam tratamento semelhante, porém com doses de solução salina.

9- Cultivo e preparação das células mesenquimais para transplante

As células-tronco mesenquimais obtidas de polpa de dente humano foram cultivadas em garrafas plásticas aderentes, com meio DMEM (GibcoBRL) suplementado com 10% soro bovino fetal (HYCLONE) e gentamicina. As características funcionais e fenotípicas das células foram avaliadas por diferenciação celular, citometria de fluxo, imunofluorescência e análise citogenética em passagens anteriores.

Células CDLH1, após expansão *in-vitro*, foram isoladas na 5ª passagem e transplantadas com traçador Cell Tracker Green CMFDA (Invitrogen) para teste de migração celular. As células foram tripsinizadas, ressuspensas em 1,0 mL de meio DMEM com 3 µL do marcador. Foram então incubadas por 30 minutos, lavadas e incubadas novamente por mais 30 minutos. Em seguida as células foram lavadas em solução salina. 10^3 células foram colocadas em placa de petri com lamínula (Mat Tek, Ashland, MA- USA) para observação do traçador em microscópio de fluorescência. Foram então transplantadas, via i.p., $1,5 \times 10^6$ células/animal (n=4) em 200 µL de solução salina. As CDLH1 isoladas na 7ª passagem foram transplantadas (via intraperitoneal, i.p.) a uma concentração de 10^7 células/animal em 200 µL de solução salina, em 8 animais SE induzido (grupo SE-CDLH1).

10- Obtenção e preparo das células mononucleares de medula óssea

As células mononucleares da medula óssea (CMO) foram obtidas dos ossos longos (fêmur, tíbia e úmero) dos camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6 EGFP e preparadas para o transplante. Os animais foram anestesiados (ketamina e xilazina) e sacrificados, as epífises dos ossos foram removidas, possibilitando a lavagem das cavidades ósseas. As CMO foram

então coletadas com auxílio de uma agulha fina, realizando-se lavagens com PBS heparinizado para maximizar a obtenção de células (Figura 7).



Figura 7: Obtenção de células mononucleares de medula óssea (CMO). **A e B:** separação dos ossos longos; **C:** lavagem das cavidades ósseas; **D:** suspensão das células mononucleares.

O material coletado foi submetido a etapas de suspensão e centrifugação e em seguida a camada de células mononucleares foi obtida por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL - Amersham Biosciences) na proporção de 1:1 (Ficoll: suspensão de células). Após centrifugação (2.000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente, sem freio) o anel de células na interface Ficoll-células foi coletado, a contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada utilizando *Trypan Blue* (GibcoBRL). Aliquotas de 200µL de solução salina contendo 10^7 células mononucleares foram transplantadas por animal (via intraperitoneal, i.p.) em 8 animais SE induzido (grupo SE-CMO).

11-Avaliação da migração celular após o transplante

Alguns animais transplantados foram sacrificados após 48h (n=2) e 72h (n=2) para avaliação da migração celular. Os animais foram anestesiados com 400µl de solução de ketamina (20%) e xilazina (5%), por via intraperitoneal, ou o suficiente para estabelecimento de plano anestésico, verificando reflexos pelo pinçamento dos dedos das patas traseiras. A perfusão foi realizada a partir de abertura da cavidade torácica, inserção de uma agulha no

ventrículo esquerdo, secção do átrio direito e estabelecimento do fluxo das soluções através de bomba de perfusão (GE). Inicialmente foi realizada uma perfusão com 250mL de solução salina 0,9% contendo heparina e, em seguida, com 250mL de PFA 4%. Os órgãos (baço e cérebro) dos animais foram retirados, pós-fixados em PFA 4% *overnight*, colocados em solução de sacarose 30% até estabelecimento do equilíbrio de densidades, colocados em Tissue Tek OCT (FK Biotec- BR) e congelados através de um processo de rebaixamento criostático com álcool isopropílico em vapor de nitrogênio líquido.

Os órgãos congelados foram seccionados em criostato (Leika 1850 UV) para realização de reações de imunofluorescência. Cortes de cérebro de 20µm foram fixados em PFA 4% por 15 minutos, lavados duas vezes em PBS, submetidos ao bloqueio com PBS/BSA 5% durante 30 minutos e incubadas *overnight*. Foram utilizados como anticorpos primários anti-GFAP (DAKO) diluído a 1:400, NeuN (CHEMICON) diluído a 1:400 e CD11b/c (BD, mouse anti-rat) diluído a 1:400, em solução de PBS/BSA 1%. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos com PBS/Tween 0,05%, seguido de duas lavagens com PBS também por 5 minutos. Em seguida foi realizada a incubação com os anticorpos secundários anti-rabbit IgG conjugado a Alexa Fluor 568 (Molecular Probes) diluído a 1:200, Streptavidina 568 (Molecular Probes) diluído 1:200 e anti-mouse IgG conjugado a Texas Red (Molecular Probes) diluído a 1:200 em solução de PBS/BSA 1%. As lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário durante 1 hora a 4°C. Foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante 3 minutos e mais duas lavagens de PBS também por 3 minutos. As lâminas foram montadas com meio de montagem VectaShield (Dako) contendo DAPI para coloração nuclear. Cortes de baço (20µm) foram fixados em PFA 4% por 15 minutos, lavados duas vezes em PBS e montadas com meio de montagem VectaShield (Dako) contendo DAPI para coloração nuclear.

As células transplantadas foram detectadas nos tecidos por análise de microscopia de fluorescência em microscópio confocal FluoView 1000 (Olympus) a partir da visualização de células emissoras de fluorescência de comprimento de onda 517nm utilizando o laser 473nm.

12- Estudo das crises espontâneas recorrentes (CER)

Para avaliar o efeito do transplante das CDLH1 e CMO sobre as CER foram analisadas as manifestações comportamentais dos animais com filmagens em dois tempos: passados 30 e 60 dias da indução do SE. Para a vídeo-monitoramento foi usado uma câmera

sensível a luz preta e branca (Nova Digital. Model SS1224). Os animais foram vídeo-monitorados por 7 dias pelo período de 8 horas por dia (período claro). 24 ratos foram distribuídos em caixas, cada uma com 4 animais, divididos em grupos SE-CDLH1 (n=8), SE-CMO (n=8) e SE-salina (n=8).

Os animais foram deixados em caixas de frente transparente, mantidos em seu ambiente e com o auxílio da câmera foi possível monitorar a frequência e o tipo das crises epilépticas, que foram quantificadas posteriormente. As crises com manifestações comportamentais visíveis foram identificadas e graduadas conforme Racine (1972). (Figura 8).

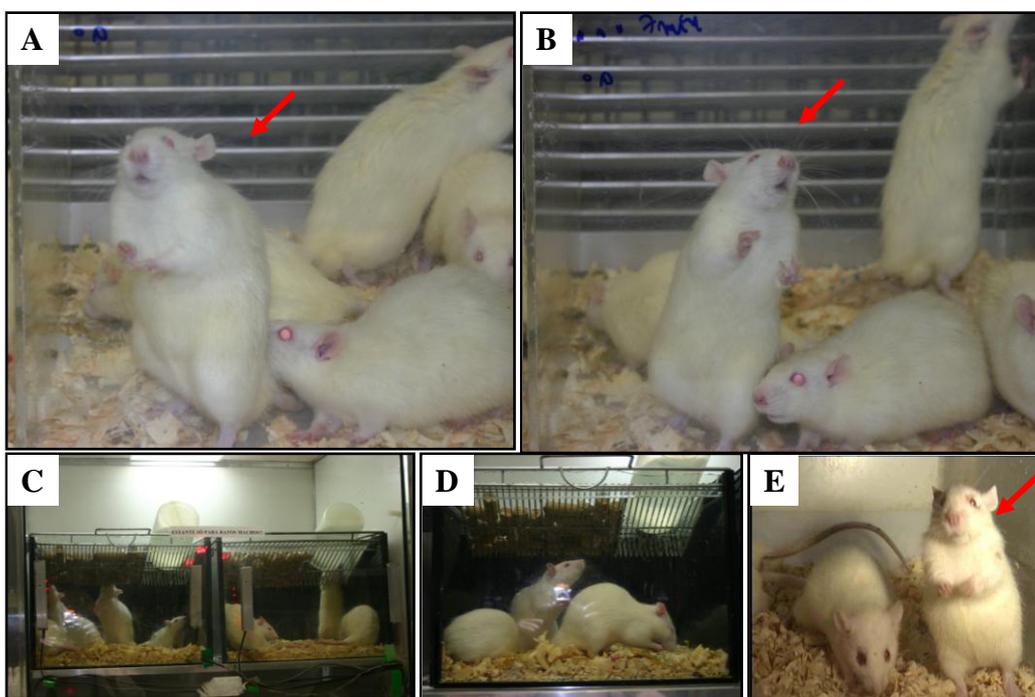


Figura 8: Demonstração do controle das crises espontâneas recorrentes (CER). Disposição das caixas durante o vídeo-monitoramento (C e D). Em A, B e E a seta (vermelha) indica um dos animais em crise (grau de Racine V).

13- Versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM)

O aprendizado pode ser mensurado observando a mudança de desempenho numa tarefa através do treino repetitivo, o que pode ser observado nas suas “curvas de aprendizado” (STEWART & MORRIS, 1993).

Dentre os diversos procedimentos e aparelhos desenvolvidos para avaliar o desempenho de animais em labirintos, o teste de aprendizagem espacial no labirinto aquático, introduzido em 1981 por Richard Morris (MORRIS *et al.*, 1982), vem se destacando nos

estudos da memória (GALLAGHER *et al.*, 1993). Neste teste os animais, por exemplo, podem aprender as relações espaciais que existem entre os objetos do ambiente e utilizar essas relações para formar um mapa cognitivo espacial, que é utilizado para encontrar o local desejado.

O tratamento com lítio e pilocarpina leva a atrofia hipocampal e, sabido é que, o hipocampo desempenha um papel fundamental na formação e evocação de distintos tipos de memória incluindo aquelas com alto conteúdo emocional e de localização espacial (O'KEEFE & NADEL, 1978).

Nesta tarefa o animal aprende a localizar uma plataforma submersa numa piscina utilizando, para isto, dicas espaciais distribuídas na sala de treino. Supõe-se que durante o aprendizado desta tarefa o animal forme um mapa cognitivo do entorno que lhe permite achar a plataforma que fica armazenada como engrama em neurônios hipocampais conhecidos como células de lugar. Nesse estudo os animais foram treinados no labirinto aquático de Morris como descrito em Santos, 1999.

Para a realização da tarefa do LAM, utilizou-se um tanque circular preto (130 cm de diâmetro e 55cm de altura) com 25cm de água a 21-24°C. O tanque é virtualmente dividido em quatro quadrantes, sendo que no centro de um desses quadrantes posicionou-se uma plataforma de acrílico pintada de preto, quadrada (20cm de lado), contendo a superfície superior áspera. Esta plataforma encontrava-se fixamente submersa a 1cm abaixo do nível da água. (Figura 9).

Dicas visuais, na forma de cartazes com cores e padrões geométricos bastante diferentes, estavam dispostas em três paredes da sala e eram visíveis pelo animal de qualquer ponto dentro do tanque. A exclusão das pistas proximais e ênfase nas pistas distais força o uso pelo rato de estratégias de mapeamento espacial para a localização da plataforma de escape submersa (O'KEEFE & NADEL, 1978) (Figura 9).

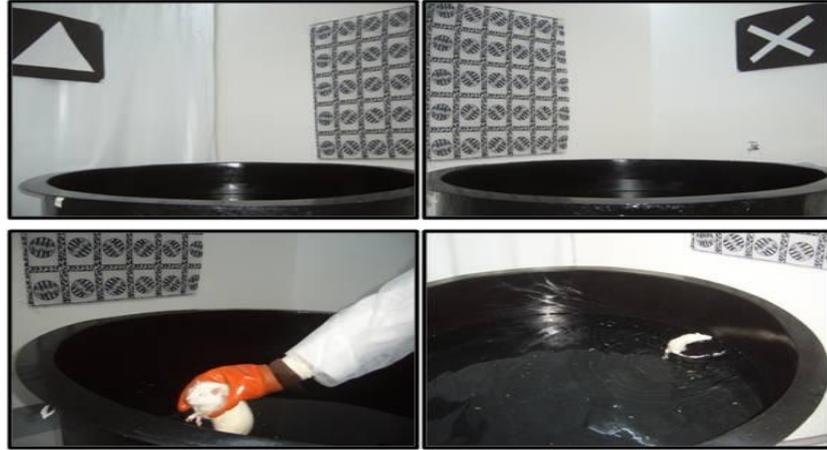


Figura 9: Fotos do Labirinto Aquático de Morris.

13.1-Treino da versão espacial do Labirinto Aquático de Morris

O treino compreende 5 (cinco) sessões de oito tentativas seqüenciais com teto de 60 segundos cada. O intervalo entre cada tentativa consiste no tempo que o rato permanece sobre a plataforma, seja após encontrá-la espontaneamente ou após ser conduzido a ela pelo experimentador após o teto. Este intervalo é de 60 segundos após as tentativas. Uma tentativa consiste primeiramente em colocar o animal na água com o focinho voltado para a parede da piscina, e em seguida, ao ser logo liberado, o animal nada livremente até encontrar a plataforma submersa, na qual sobe como forma de evitar sua permanência na água. Após encontrá-la, o rato permanece sobre a plataforma, de onde pode observar tranquilamente as pistas externas. Quando o animal não encontra a plataforma até o tempo de teto, é então conduzido cuidadosamente até ela. Em cada tentativa, o animal é largado de uma posição cardinal (norte, sul, leste ou oeste) diferente, executando largadas cruzadas, isto é, N-S-L-O. Este procedimento visa a forçar o uso de estratégias de mapeamento espacial (O'KEEFE & NADEL, 1978). A sessão inteira, no caso dos ratos controles, dura aproximadamente 20 minutos para cada animal.

O teste é feito 24 horas após o final da sessão de treino, onde o animal é largado de uma única determinada posição, sendo esta a mais distante do local em que se encontra a plataforma na sessão de treino.

Durante o teste, a plataforma não está presente. A medida utilizada como retenção de memória é o tempo que o animal permanece no quadrante onde se encontra a plataforma na sessão de treino (teste de transferência).

Além da latência de escape, há várias outras medidas que podem ser utilizadas para avaliar a retenção da memória no LAM (STEWART & MORRIS, 1993), como a distância de escape (distância percorrida pelo rato do ponto da largada até o local da plataforma de escape), direcionalidade (ângulo entre a primeira direção do trajeto do animal após a largada, e a direção da reta unindo o local de largada e o local da plataforma), a velocidade de deslocamento, e número de cruzamentos sobre o local da plataforma durante a sessão de teste (STEWART & MORRIS, 1993).

14- Análise dos dados e estatística

Para analisar o efeito das CDLH1 e CMO sobre as CER, foi realizada a comparação entre os grupos através do teste *t* de Student e ANOVA de uma via seguido de pós-teste Tukey. Para os dados do LAM foi realizada ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni e ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey.

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o software Graph-Pad Prisma (Versão 4.00, GraphPad Software Inc., EUA). Os dados estão expressos na forma de média \pm erro padrão ou média \pm desvio padrão. Valores de *p* menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

1- Diferenciação Adipogênica, Osteogênica e Condrogênica

As culturas de CDLH1 apresentaram diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica (5ª passagem), condrogênica (5ª passagem), e osteogênica (6ª passagem).

As células mantidas em contato com meio de diferenciação adipogênica por 14 dias apresentaram acúmulo intracelular com aspecto lipídico observado em microscópio e para avaliação da morfologia das células em processo de diferenciação foram realizadas colorações histoquímicas com solução de Sudan II (Figura 10).

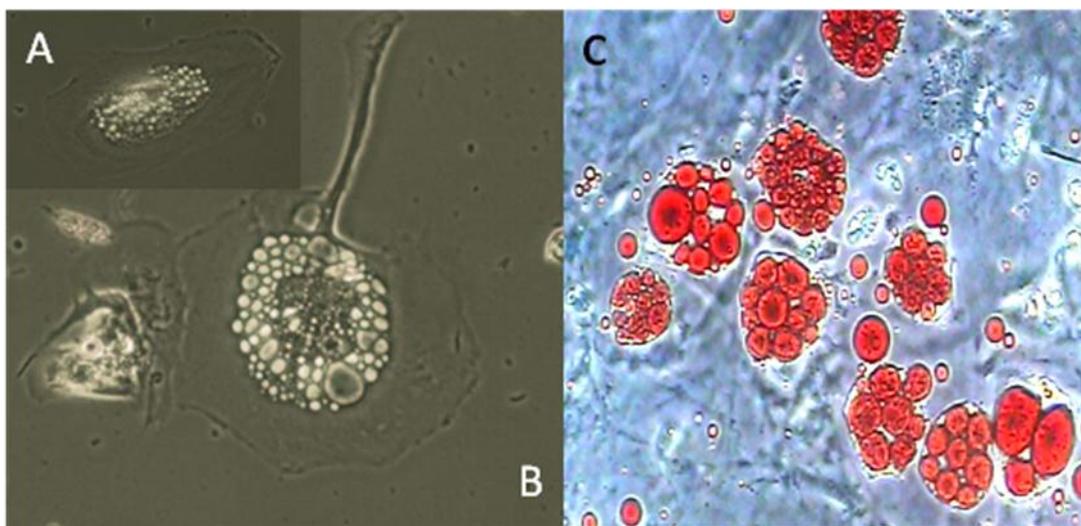


Figura 10: Acúmulo lipídico intracelular observado em CDLH1, 5ª passagem. **A.** 100x; **B.** 200x; e **C.** Adipócitos corados com solução de Sudan II (200x).

Após aproximadamente dez dias de cultura em meio de diferenciação osteogênica foram observadas espículas nas culturas de CDLH1. As células diferenciadas em osteoblastos foram coradas pelo método de Von Kossa e apresentaram resultado positivo. Culturas controle também foram coradas para confirmar resultados (Figura 11).

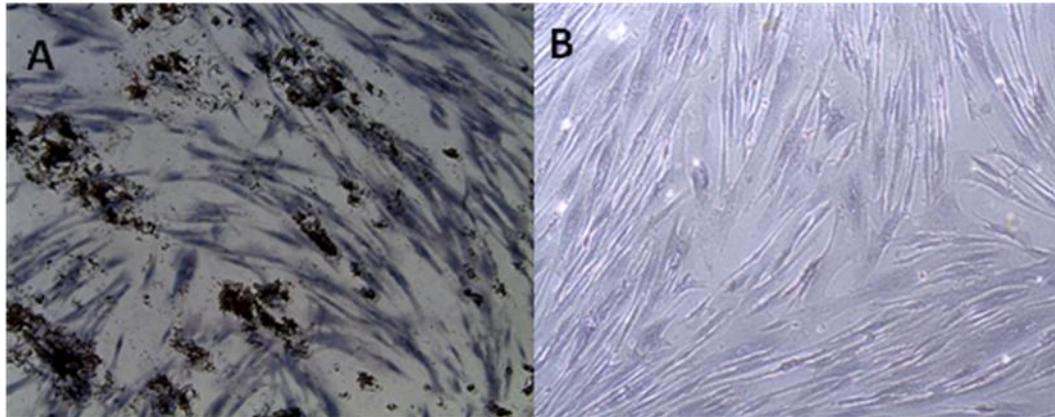


Figura 11: Cultura de CDLH1 em diferenciação osteogênica, 6ª passagem. **A.** Detecção de depósitos de cálcio pelo método de Von Kossa. **B.** Cultura de CDLH1, sem indução osteogênica. Observadas por microscopia óptica, 100X.

Quinze dias após contato com meio de diferenciação condrogênica, pôde-se observar o início da formação de aglomerações celulares. Completados 21 dias em cultura as células em diferenciação condrogênica foram coradas com solução de *Alcian Blue*. Em microscopia as CDLH1 apresentaram-se positivas para diferenciação condrogênica. As células coradas em azul (condrócitos) indicam síntese de proteoglicanos (Figura 12). As células do controle também foram submetidas à solução corante para confirmar que não houve diferenciação espontânea, permanecendo negativas.

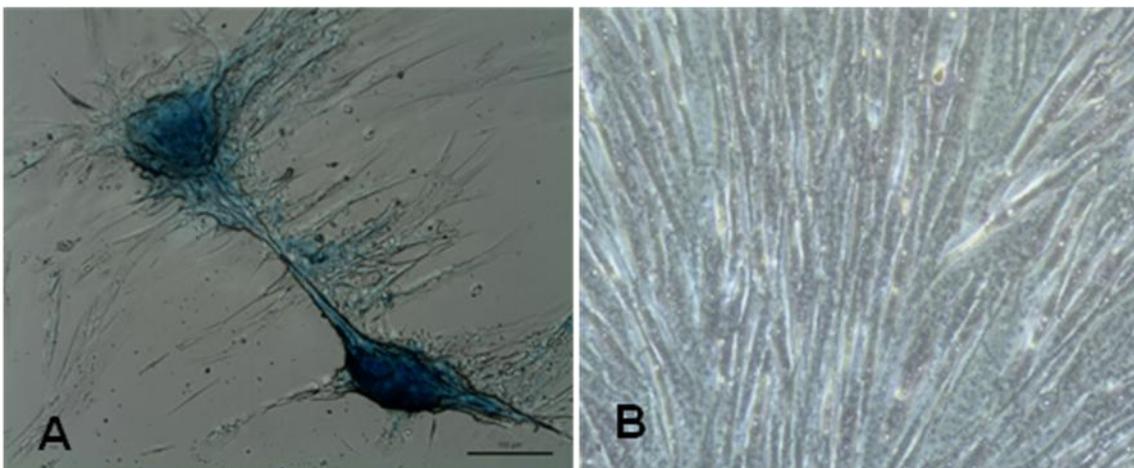


Figura 12: Cultura de CDLH1 em diferenciação condrogênica, 5ª passagem. **A.** Coloração azul indicando presença de condrócitos (200X). **B.** células controle, negativas para diferenciação condrogênica (100X). Observadas por microscopia óptica.

2- Caracterização Celular por Citometria de Fluxo e Imunofluorescência

A expressão de marcadores de superfície característicos de células-tronco mesenquimais foi investigada por citometria de fluxo (Figura 13) e imunofluorescência (Figura 14) que permitem a análise da expressão de determinado marcador em uma célula, assim como da intensidade de marcação em cada célula.

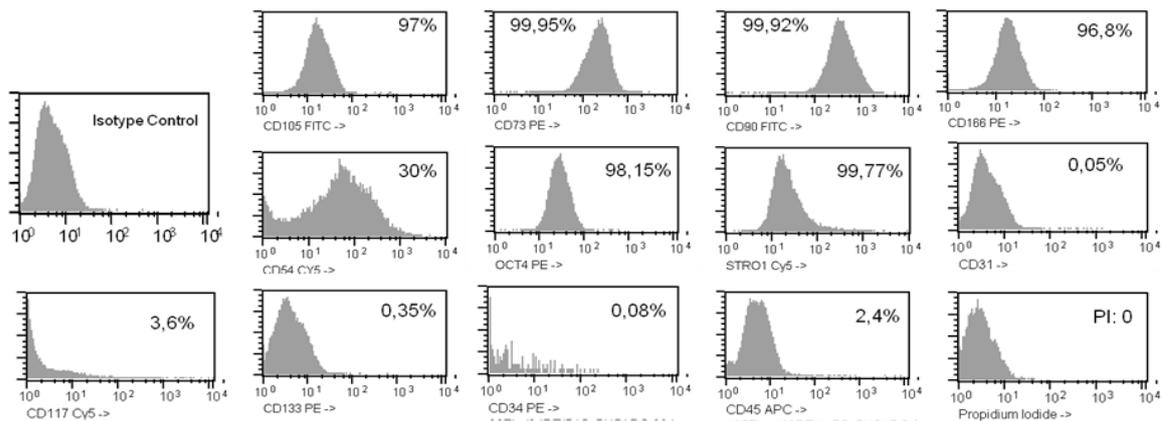


Figura 13: Análise por Citometria de Fluxo. Expressão dos marcadores de superfície em cultura de células-tronco da polpa de dente humano na 6ª passagem.

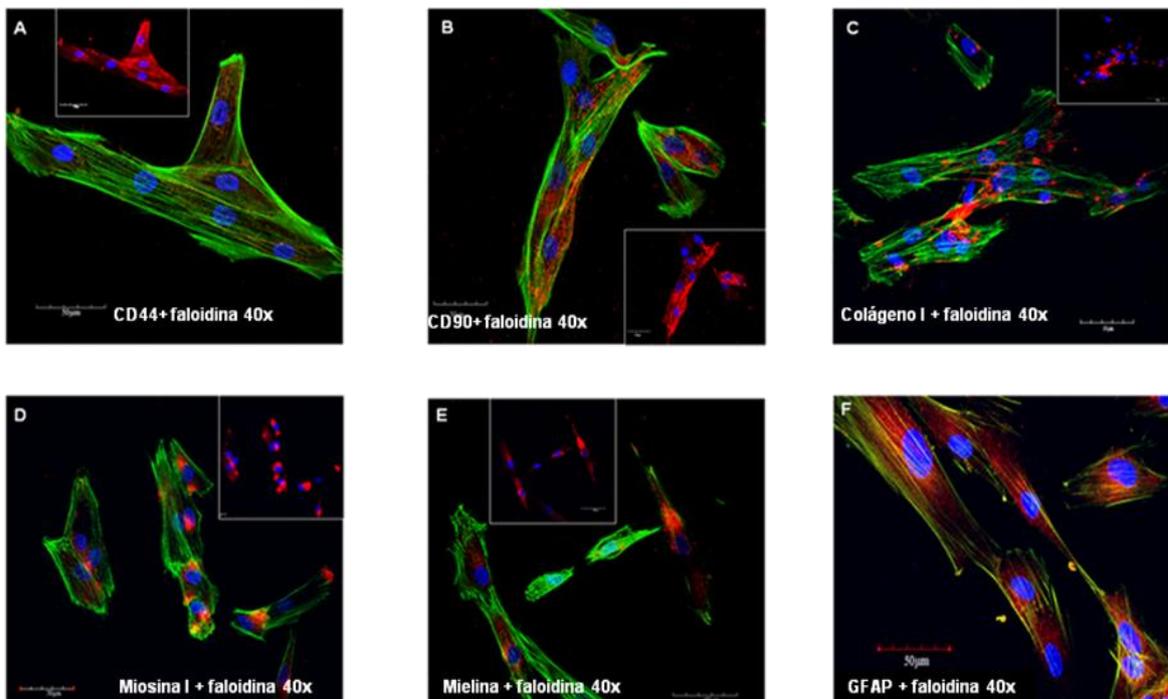


Figura 14: Imunofluorescência das células-tronco da polpa de dente humano. Mostrando a expressão de marcadores como CD44 e CD90 (A, B) e outros marcadores como miosina, mielina, GFAP e Colágeno (C, D, E e F)- 6ª passagem. Actina F marcada com faloidina 488 (verde) e núcleos contra-corados com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) (azul).

Citometria de fluxo revelou células com alta expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais como CD105, CD73, CD 44, CD90, CD166, CD54, OCT-4, e STRO-1. Esses marcadores celulares, bem como CK18, α -miosina, mielina, GFAP, NeuN e colágeno I, foram positivos por imunofluorescência. A expressão foi baixa para CD117, CD133, CD31, CD34 e CD45 (Tabela 1). As análises foram realizadas na 6ª passagem.

Tabela 1: Citometria de fluxo e imunofenotipagem das CTM de polpa de dente. Expressão dos marcadores de superfície em células cultivadas na 6ª passagem.

MARCADORES	FLUORESCÊNCIA	CITOMETRIA
CD 44	++	50,2%
CD 90	+++	99,92%
CD 73	++	99,95%
CK18	++	NR
α MIOSINA	+++	NR
SSEA 1	-	NR
SSEA 4	+	NR
TRA 1 60	+	NR
TRA 1 80	+	NR
CD 34	-	0,08%
CD 45	-	2,4%
CD 105	++	97%
CD 117	+	3,6%
CD 133	+	0,35%
NeuN	++	NR
GFAP	++	NR
MIELINA	+++	NR
COLÁGENOI	+++	NR
CD 166	NR	96,8%
CD 54	NR	30%
OCT 4	NR	98,15%
STRO-1	NR	99,77%
CD 31	NR	0,05%
PI	NR	0

(+)-: intensidade da expressão na imunofluorescência.

Porcentagens: número de células positivas para moléculas selecionadas

NR: análise não realizada.

3- Análise citogenética

A análise citogenética por bandeamento G demonstrou que houve a manutenção do cariótipo diplóide após o cultivo das CTM. Foram analisadas 20 metáfases de cada passagem. Anormalidades estruturais cromossômicas, tais como translocação, inversão e deleção, não foram observadas com essa técnica. As células mantiveram estabilidade cromossômica como pode ser observado na figura 15. Um cariótipo diplóide normal (46, XY) foi observado na cultura de células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente (CDLH1) de doador do sexo masculino (Figura 15).

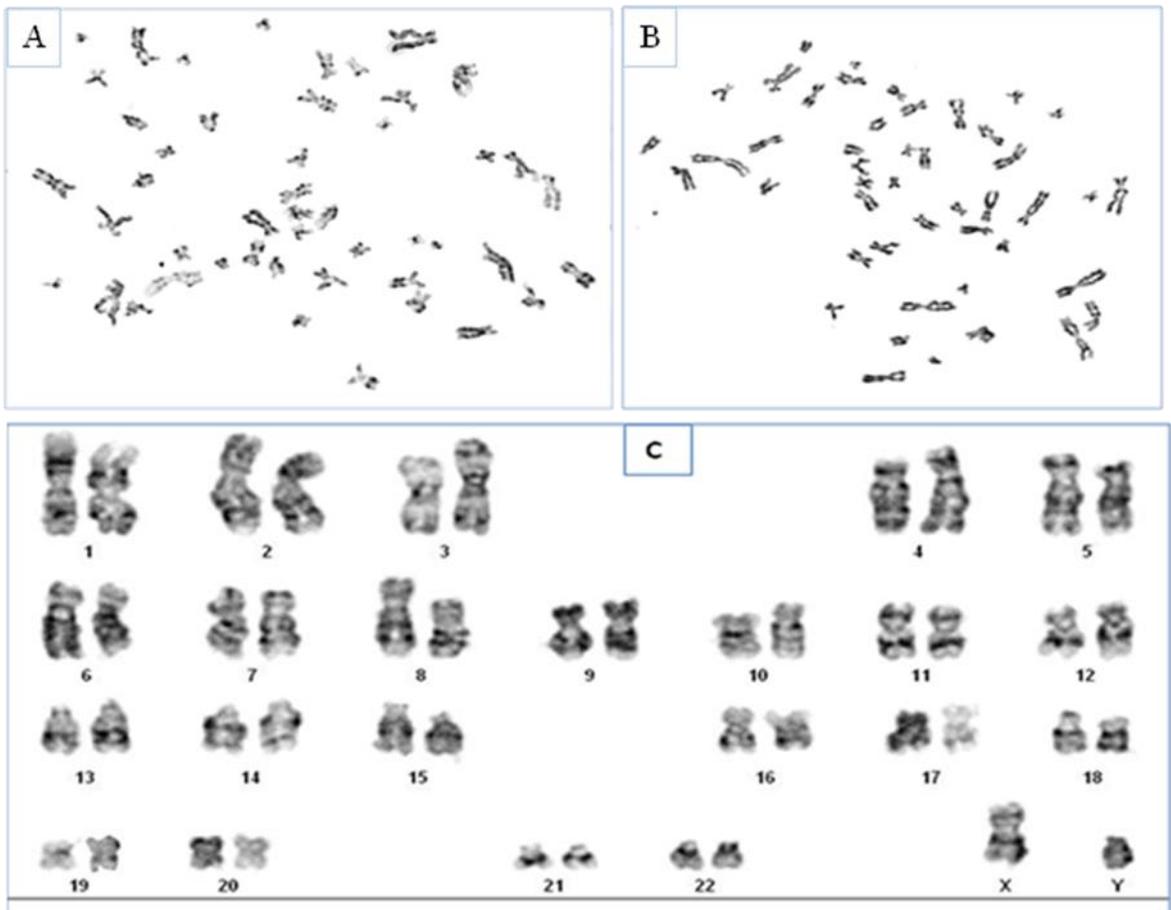


Figura 15: Cariótipo da CDLH1 observado na 3ª(A), 6ª(C) e 8ª(B) passagens.

4- Migração das células CDLH1 nos ratos submetidos ao SE

A presença de células CDLH1 marcadas com o traçador verde (Cell Tracker Green CMFDA- Invitrogen) pôde ser observada no baço dos animais 48 e 72horas após o transplante (Figura 16). Este achado demonstra que as células transplantadas por via intraperitoneal foram capazes de atingir a corrente sanguínea e se distribuir sistemicamente. Entretanto, poucas células foram visualizadas no cérebro dos animais 48 e 72horas após o transplante. Estas células foram localizadas em regiões periventricular, córtex e hipocampo. Nos tempos avaliados não foi encontrada colocalização com marcadores de astrócitos (GFAP), microglia (CD11b) ou neurônios (Neu N) (Figura 16).

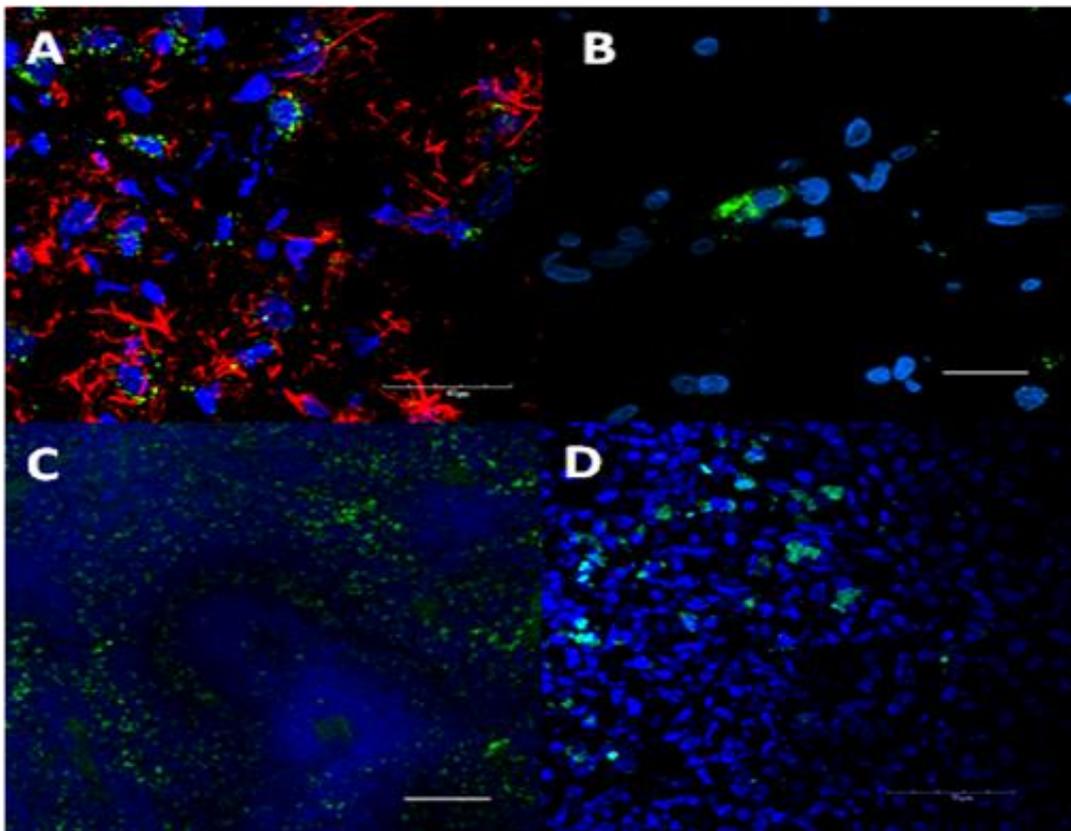


Figura 16: Migração de células-tronco da polpa de dente humano marcadas com cell tracker Green CMFDA. Células encontradas no cérebro 48h (A, 400x) e 72h (B, 400x) após o transplante, e no baço 48h após o transplante (C, 200x, D, 400x). CDLH1 marcadas com cell tracker são visualizadas em verde, astrócitos marcados com anti-GFAP (vermelho, figuras A e B) e núcleos contra-corados com DAPI.

5- Efeito das CDLH1 e CMO sobre as crises espontâneas recorrentes em ratos SE Li-pilo induzida.

Durante o SE os ratos que receberam Li-pilo e desenvolveram crises classe IV e V da escala de Racine (Racine, 1972) foram monitorados por 90 min e os que desenvolveram crises em um valor menor na escala foram excluídos. Nos animais utilizados no estudo, observou-se que a média de latência para a primeira crise foi de $34,17 \pm 3,03$ minutos. Após 30 dias do SE e transplante os animais dos grupos SE-salina, SE-CDLH1 e SE-CMO foram vídeo-monitorados por sete dias. No video monitoramento a média de CER por semana, Classe IV na escala de Racine, do grupo SE- Salina foi $16,67 \pm 2,33$, do grupo SE-CDLH1 foi $1,6 \pm 0,4$ e do grupo SE-CMO foi $3,33 \pm 0,33$ (Figura 17).

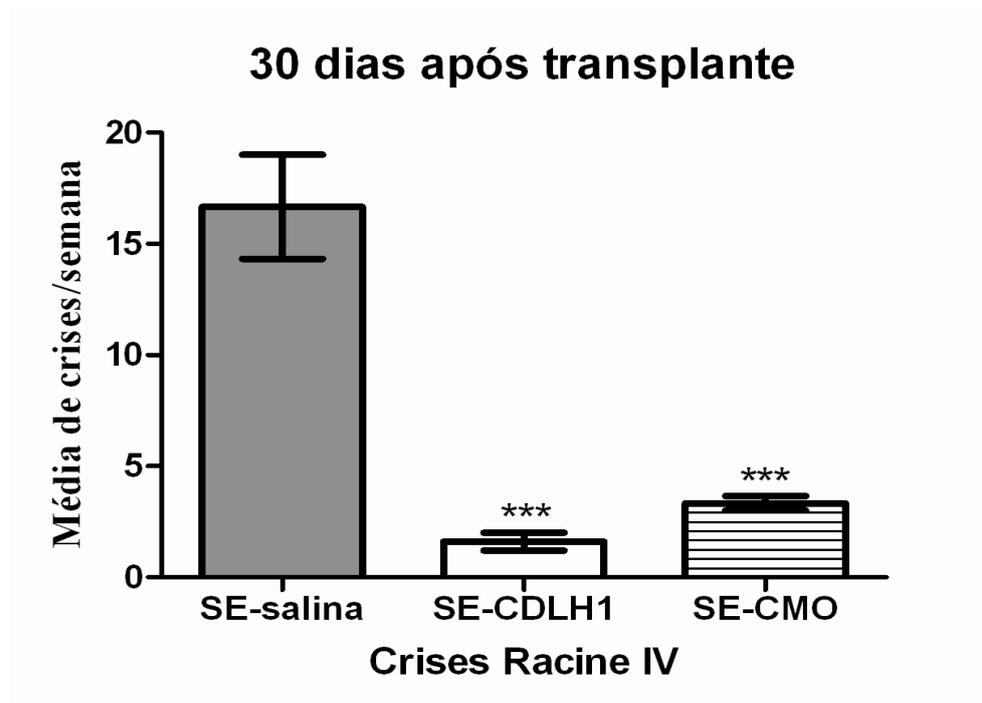


Figura 17: Resultado das crises espontâneas recorrentes 30 dias após transplante. Dados representados pela média da semana \pm SEM $p < 0,001$. {Grupo SE-salina (n=8) x SE-CDLH1(n=8)/ grupo SE-salina (n=8) x SE-CMO (n=8)}.

Após 60 dias do SE e transplante os animais foram novamente vídeo-monitorados por sete dias. No video monitoramento a média de CER por semana, classe V na escala de Racine, do grupo SE- Salina foi $3,2 \pm 1,5$, do grupo SE-CDLH1 foi $3,0 \pm 0,4$ e do grupo SE-CMO foi $3,33 \pm 0,33$ (Figura 18).

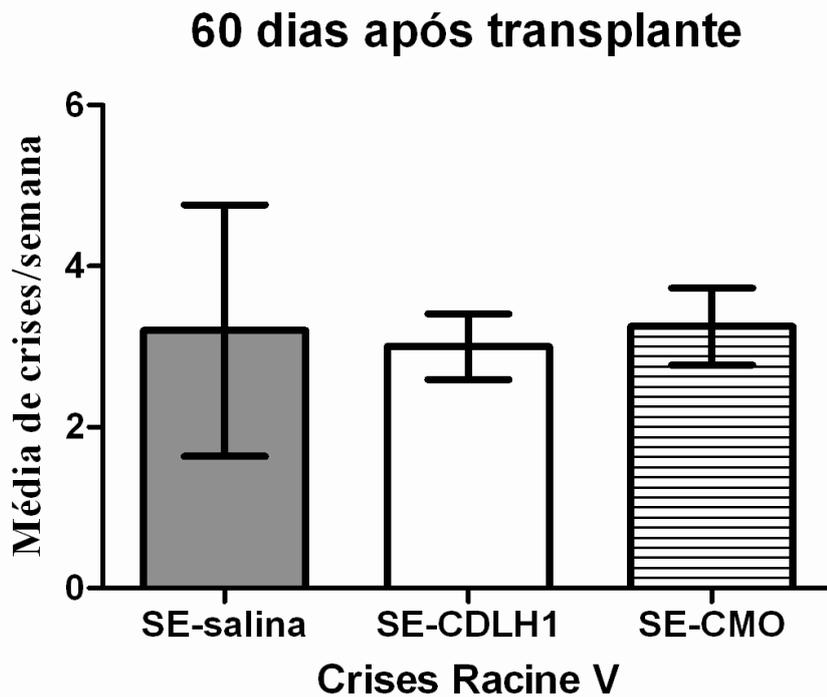


Figura 18: Resultado das crises espontâneas recorrentes 60 dias após transplante. Dados representados pela média da semana \pm SEM . {Grupo SE-salina (n=8) x SE-CDLH1(n=8)/ grupo SE-salina (n=8) x SE-CMO (n=8)}.

6- Efeito das células de polpa de dente humano sobre o teste de memória no (LAM)

Para analisar o efeito do transplante das CDLH1 pela via intraperitoneal sobre a aquisição da memória espacial, ratos controles e epiléticos foram treinados no LAM.

Na avaliação dos dados do treino pelo teste de Bonferroni pós ANOVA de duas vias, não houve diferença estatística entre os grupos epiléticos ao se analisar a latência de escape (tempo gasto para encontrar a plataforma) dos animais de ambos os grupos (SE-CDLH1 e SE-salina), ver figura 19.

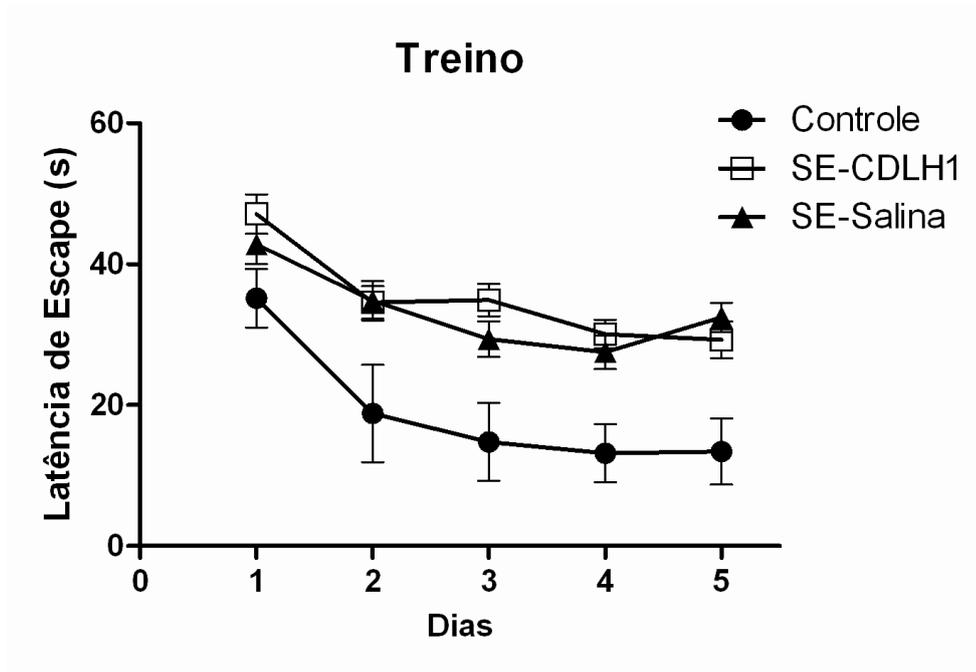


Figura 19: Efeito do transplante de células CDLH1 sobre a memória espacial em ratos SE induzido. Média do escape de latência durante os 5 dias de treino no LAM. Dados apresentados em média \pm erro padrão. Ratos controles (n=10), SE-salina (n=10) e SE-CDLH1(n=9).

A retenção da memória foi avaliada 24 horas após a última sessão de treino em uma sessão de teste sem reforço (sem a plataforma). Esses dados foram avaliados por ANOVA de 1 via e pós-teste de Tukey. Observou-se que não houve diferença estatística no tempo de permanência dos animais no quadrante onde se encontrava a plataforma quando comparados os animais dos grupos SE-salina e SE-CDLH1. Os animais controle (não epiléticos) apresentaram retenção de memória em relação aos animais com SE (SE-salina e SE-CDLH1), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Figura 20).

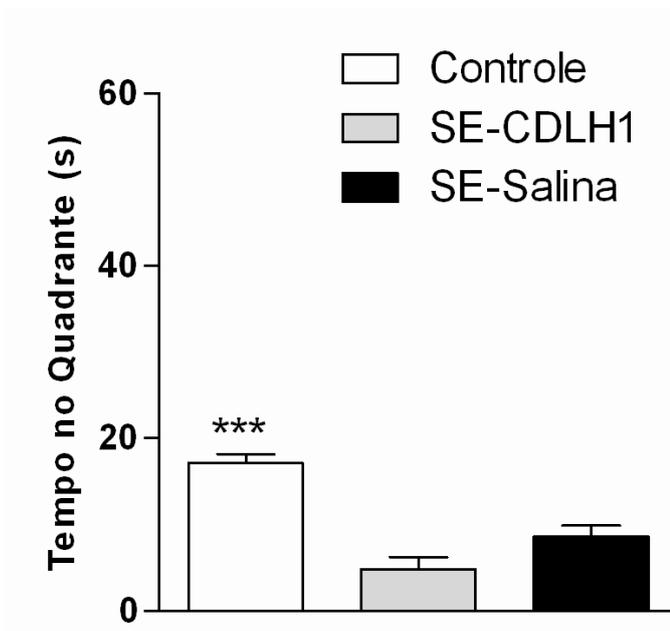


Figura20: Efeito do transplante das CDLH1 sobre retenção de memória espacial. Média de tempo no quadrante durante 60 segundos de teste, 24h após último treino. Dados representados pela média \pm SEM $p < 0,001$ (controle x grupos SE [(SE-salina (n=10) x SE-CDLH1 (n=9)]).

Os treinos e os testes dos animais foram monitorados pelo programa *Any-Maze Vídeo Tracking System*, versão 4.73 (Stoelting.co) onde cada animal teve suas trajetórias registradas e os resultados puderam ser facilmente acessados como exemplificado na figura 21.

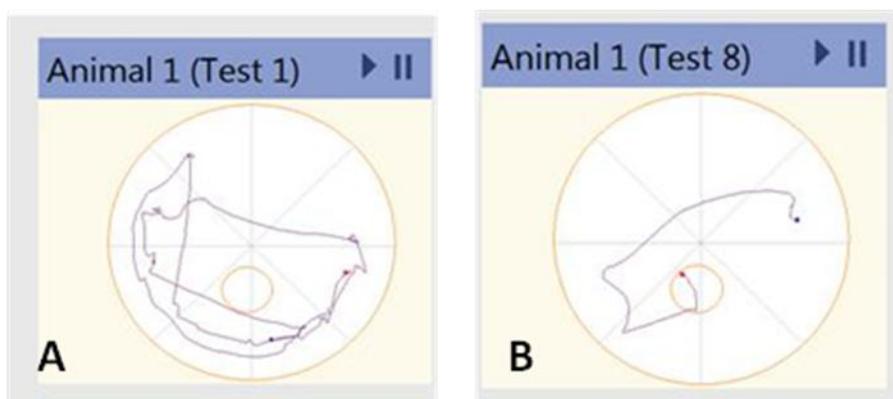


Figura 21: Trajetórias durante 60s do treino de um animal. **A.** 1ª tentativa; **B.** 8ª tentativa.

Discussão

Nesse estudo, foram utilizadas células-tronco mesenquimais de polpa de dente humano obtidas de dente decíduo. Diversos achados da literatura afirmam o potencial de proliferação, capacidade de diferenciação em osteócitos, condrócitos, adipócitos, células musculares, hepatócitos e linhagens neurais assim como confirmam a utilização dessas células na regeneração tecidual (YEN & YELICK, 2010; YALVAC, *et al.*, 2009; YOU-YOUNG *et al.*, 2007; KIRALY, *et al.*, 2009; GANDIA *et al.*, 2008). Por isso optou-se por caracterizar uma linhagem de células-tronco de polpa de dente decíduo, isolada previamente em nosso laboratório, e investigar seu efeito terapêutico em modelo experimental de epilepsia induzida por lítio-pilocarpina.

O dente é um dos mais acessíveis órgãos para obtenção de células-tronco (YEN & SHARPE, 2008). Essas células são facilmente cultivadas e criopreservadas, mantendo sua plasticidade e potencial de diferenciação. Portanto, é possível então a obtenção de uma população de células-tronco autólogas que após criopreservadas podem ser armazenadas e com isso favorecem a criação de criobancos para propósitos terapêuticos.

O isolamento das células mesenquimais dentárias sofre as mesmas dificuldades que qualquer outra célula-tronco adulta. A maioria dos protocolos de isolamento, cultura e caracterização das células da polpa de dente segue o estabelecido por Gronthos e colaboradores em 2000. Os meios mais utilizados no cultivo de células aderentes tem sido o α -MEM e o DMEM suplementados com soro bovino fetal (WOLFE *et al.*, 2008; PITTENGER, 2008). O utilizado nessa pesquisa foi o DMEM com 10% SBF, as condições de cultivo foram padrão e estável, os resultados da proliferação e o perfil morfológico das células foram satisfatórios e condizentes com o observado nos diversos estudos citados acima.

Células-tronco adultas como as hematopoiéticas na medula óssea e as mesenquimais de cordão umbilical vem sendo vastamente estudadas e têm sido definidas como células clonogênicas, com capacidade de auto-renovação e diferenciação em multi-linhagens. As células-tronco de polpa de dente também vêm demonstrando essas características. No entanto, quando uma nova linhagem é estabelecida é difícil prever seu valor futuro por isso as células precisam ser caracterizadas nas primeiras passagens e periodicamente, nas passagens seguintes (FRESHNEY, 2005). Esses dados devem ser armazenados com a criopreservação de pequenas alíquotas a cada caracterização.

Para caracterizar a linhagem de células-tronco utilizadas nesse estudo (CDLH1), após descongelamento e cultivo, elas foram submetidas a procedimentos para: confirmação da espécie de origem; determinar se ocorreu instabilidade cromossômica, transformação ou formação de tumores; observar se expressam marcadores de células-tronco mesenquimais e sua capacidade de migração.

Uma das características mais marcantes das células-tronco mesenquimais humanas é a habilidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos (REGER *et al.*, 2008; PITTENGER, 2008; CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; GRONTHOS, 2000). Para induzir a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das células de polpa de dente decíduo, protocolos com meio basal acrescido de estímulos específicos foi utilizado. Após determinado período de tempo em contato com os meios de diferenciação, as células, em resposta aos estímulos, mudaram sua morfologia fibroblastóide.

As células-tronco de polpa de dente humano foram capazes de se diferenciar nas três linhagens. O acúmulo intracelular de lipídios indicou a presença de adipócitos confirmada pela coloração com o método Sudan II. A deposição de cálcio foi observada pelo método de Von Kossa. Aglomerações celulares indicando a presença de condrócitos realizando síntese de proteoglicanos foi confirmada pelas células coradas em azul pela solução de *Alcian Blue*.

O perfil imunofenotípico das CTM foi determinado a partir da análise de um conjunto de marcadores mais expressos nestas células, entretanto esses marcadores não são específicos, ocorrendo em outros tipos celulares (COVAS, 2006; CHAMBERLAIN *et al.*, 2007). Segundo trabalhos sobre células-tronco mesenquimais derivadas de dente geralmente ocorre a expressão de antígenos de superfície para os anticorpos anti-CD117, anti-STRO-1, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD90 e não expressam os marcadores hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 (GRONTHOS, 2000; SHI *et al.*, 2005; GAGARI *et al.*, 2006).

A caracterização imunofenotípica realizada por citometria de fluxo e imunofluorescência nas CTM da polpa de dente humano revelou células com alta expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais como CD105, CD73, CD44, CD90, CD166, CD54 e STRO-1 e baixa expressão para CD133, CD31, CD34 e CD45. A expressão de CD117 foi baixa como também foi relatado em cultura de diferentes células mesenquimais por Meirelles e colaboradores (2006) e Hong e colaboradores (2005).

Segundo Miura e colaboradores (2003) as células-tronco provenientes de dentes decíduos são imaturas e muito heterogêneas, apresentam importantes características embrionárias e forte expressão de marcadores de células-tronco embrionárias como a proteína OCT-4, SSEA, CD105, TRA-1-60 e TRA-1-81(RIEKSTINA *et al.*, 2009). Esses marcadores

foram positivos na célula em estudo, bem como CK18, α -miosina, mielina, GFAP, NeuN e colágeno I, demonstrando a heterogeneidade das células-tronco da polpa de dente humano utilizadas no estudo.

A análise cromossômica é o critério mais característico e bem definido para identificação de linhagens celulares relacionando-as com espécie e sexo de onde são derivadas e para detecção de instabilidade genética (BOCHKOV *et al.*, 2007; FRESHNEY, 2005; MEISNER & JOHNSON, 2008). Segundo DRAPER e colaboradores (2004) cultivo de células em longo prazo, manipulação como tripsinização e congelamento diminui a pluripotência e aumenta a chance do surgimento de aneuploidias. Na análise do cariótipo das CDLH1 nenhuma alteração estrutural nem numérica foi observada em seus cromossomos até a oitava passagem, sendo assim confirmada sua estabilidade cromossômica.

A capacidade de migração das células-tronco mesenquimais para um local com lesão, diferenciando-se e regenerando tecidos ou produzindo fatores de crescimento ou outros fatores que irão agir contra a inflamação vem sendo demonstrada em diversos estudos (LEE *et al.*, 2007; GANDIA *et al.*, 2008; HOEHN *et al.*, 2002). O tecido com lesão expressa receptores específicos que facilita a migração, adesão e infiltração das CTM ao local da lesão como ocorre com o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

A investigação por imunofluorescência das células CDLH1, marcadas com o traçador *Cell Tracker Green* demonstrou a migração ao baço dos animais, 48 e 72 horas após o transplante. Demonstrando assim que as células transplantadas por via intraperitoneal foram capazes de atingir a corrente sanguínea e migrar sistemicamente. As células foram visualizadas no cérebro dos animais em pouca quantidade, 48 e 72 horas após o transplante. Estas células foram localizadas nas regiões periventricular, córtex e hipocampo e nos tempos avaliados não foi encontrada colocalização com marcadores de astrócitos (GFAP), microglia (CD11b) ou neurônios (Neu N). Outros estudos onde poucas células migraram para o cérebro demonstraram melhora funcional como os de Chen e colaboradores (2001) e Vendrame e colaboradores (2004) que descreveram a terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais humanas em ratos com desordens neurológicas e isquemia.

Considerando que o tamanho das CTM são maiores que o tamanho dos capilares sanguíneos Furlani e colaboradores (2009) levantaram a hipótese de que as células mesenquimais não seriam adequadas ao transplante intravascular. Muitos são os relatos de transplante de CTM por esta via, no entanto alguns autores demonstraram que a maior parte

das células ficam retidas no pulmão, e algumas no coração, fígado e baço (BARBASH *et al.*, 2003; CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; TOMA *et al.*, 2009).

Gordon e colaboradores (2008) relataram melhora clínica em modelo experimental de encefalomielite alérgica após transplante via intraperitoneal de células-tronco mesenquimais humanas. No estudo de Parekkadan e colaboradores (2008) após transplante via intraperitoneal de CTM derivadas da medula óssea, pouca quantidade de células foi encontrada no local da lesão, no entanto, houve melhora na enteropatia autoimune estudada, eles acreditam que devido ao efeito parácrino. Optamos por transplantar as células por via intraperitoneal e estudar os efeitos na epilepsia induzida em modelo animal.

Para avaliar o efeito terapêutico das células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente decíduo humano foi utilizado modelo de epilepsia em ratos. Modelo animal com ratos vem sendo o mais utilizado em pesquisas biomédicas (BUGOS *et al.*, 2009), pois esses animais permitem importantes manipulações experimentais e exibem características fisiológicas similares aos humanos, por isso foram escolhidos nesse estudo. Os ratos oferecem oportunidades para entendimento de doenças humanas permitindo o desenvolvimento de novas terapias e diversos trabalhos utilizam o transplante de células-tronco humanas em modelos experimentais com ratos (HOEHN *et al.*, 2002; HONMA *et al.*, 2006; DE PAULA *et al.* 2009; NOMURA *et al.*, 2005).

Para a indução da epilepsia foi utilizado o modelo Lítio-pilocarpina que segundo Coulter e colaboradores (2002) é o que reproduz melhor a epilepsia de lobo temporal humana por apresentarem crises espontâneas recorrentes precedidas por uma fase de latência e suas alterações neuropatológicas são muito semelhantes às encontradas em indivíduos com epilepsia do lobo temporal. No período de latência que dura em média 14 a 15 dias (LEITE & CAVALHEIRO, 1995) o animal permanece sem crises comportamentais e a partir daí surgem crises espontâneas e recorrentes caracterizando a fase crônica. A duração do período de latência varia de acordo com o protocolo aplicado (dose de pilo, peso do animal, aplicação do diazepam, etc) (CURIA *et al.*, 2008).

Os animais com *status epilepticus* induzido por Li-pilo receberam as CTM derivadas de polpa de dente na fase aguda, que antecede o período de latência, quando surgem as primeiras crises. Após 30 dias do SE e transplante os animais foram vídeo-monitorados por 7 dias e da análise desses vídeos pode-se afirmar que os animais que receberam transplante das CDLH1 apresentaram diminuição das CER. O grupo SE-CDLH1 apresentou menos crises durante a semana que o grupo SE-salina, que não recebeu transplante.

Em estudos prévios realizados por nossa equipe (COSTA-FERRO *et al.*, 2010; CUNHA, 2009) foi observado o efeito benéfico das células mononucleares de medula óssea e do sangue de cordão umbilical humano, transplantadas por via intravenosa, na epilepsia experimental induzida. A fim de comparar os resultados terapêuticos e a via de transplante, um grupo de animais recebeu células mononucleares de medula óssea (via i.p.) nas mesmas condições que o grupo SE-CDLH1. Os resultados encontrados foram semelhantes: após o período de vídeo-monitoramento demonstrou-se que o grupo SE-CMO também apresentou menor quantidade de CER em comparação ao grupo SE-salina, 30 dias pós-SE e transplante.

Inicialmente, ambos os grupos de animais transplantados com células-tronco inibiram as manifestações das crises. Porém, num período mais tardio (60 dias após SE e transplante), em nova avaliação em relação à média de crise na semana, os animais apresentaram crises sem diferença estatística entre os grupos.

Os resultados obtidos decorridos os 30 dias de SE indicaram que o transplante de células-tronco (CDLH1 e CMO) foi eficiente na redução das crises no modelo estudado e estão de acordo com os encontrados previamente por Chu e colaboradores (2004). Eles transplantaram células-tronco neuronais humanas um dia após SE e entre 28-35 dias após SE observaram redução das CER. Costa-Ferro e colaboradores (2010) usando células mononucleares de camundongos também obtiveram resultados positivos: animais transplantados avaliados entre 15-28 dias após SE não desenvolveram crises, no entanto quando observados entre 120-127 dias após SE alguns animais apresentaram CER.

Estudos experimentais demonstram que as CERs, *per se* podem induzir inflamação no cérebro (VEZZANI *et al.*, 2011). Segundo estudos revisados por Li e colaboradores (2011) em modelo experimental de epilepsia a expressão de citocinas inflamatórias como IL1 β está aumentado no córtex e no hipocampo. Vários mediadores inflamatórios também têm sido detectados em tecido cerebral de pacientes com epilepsia refratária (VEZZANI *et al.*, 2011). O fato de ter ocorrido manifestações das crises num momento tardio, mesmo que em menor quantidade, mas sem diferença entre os grupos, pode estar relacionado com o número de células transplantadas, a via de transplante e a fase de transplante. Assim como a manifestação das crises pode ter sido adiada por algum efeito das células transplantadas na modulação de citocinas inflamatórias, o que requer estudos posteriores.

De acordo com estudos experimentais as crises recorrentes podem causar várias fisiopatologias, dentre elas morte neuronal em várias regiões, principalmente no hipocampo (O'KEEFE & NADEL, 1978). É bastante provável que o deterioro mnemônico produzido pelo tratamento com lítio e pilocarpina seja devido à essa perda neuronal progressiva que

acontece no hipocampo (SANTOS, 1999). Para verificar se as CTM de polpa de dente humano são capazes de reverter esse *déficit* de memória nos animais com SE induzido e a incapacidade dos mesmos em formar novas memórias, eles foram treinados na tarefa do labirinto aquático de Morris, que é usado para testar aprendizagem hipocampo-dependente, incluindo aquisição de memória espacial (STEWART & MORRIS, 1993).

Durante o treino no LAM o período de latência (tempo gasto para encontrar a plataforma) dos animais com SE induzido e transplantados (SE-salina, SE-CDLH1) foi maior que o dos animais não epiléticos, esses resultados não apresentaram significância estatística. No teste realizado 24 horas após a última sessão de treino, os animais não epiléticos apresentaram retenção de memória em relação aos SE induzidos e transplantados (SE-salina, SE-CDLH1), sendo estatisticamente significativa. Diante dos resultados acima se pode afirmar que as células-tronco derivadas da polpa de dente decíduo humano não influenciam na retenção de memória relacionada à aprendizagem do labirinto aquático de Morris.

Os dados obtidos nesse trabalho demonstraram que o transplante de células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente humano apresentou potencial terapêutico em modelo experimental de epilepsia induzido por lítio-pilocarpina. No entanto mais estudos devem ser conduzidos para esclarecer seus mecanismos de ação, o número de doses necessárias, o momento ideal do tratamento, a quantidade de células a ser transplantada, a fim de estabelecer a utilização que melhor se adeque às necessidades inerentes a esta patologia.

Conclusões

Dos resultados obtidos neste estudo pode-se relatar as seguintes conclusões:

- As células-tronco obtidas a partir do dente decíduo humano possuem características fenotípicas e funcionais de células-tronco mesenquimais e apresentaram estabilidade cromossômica até a última passagem avaliada (8ª passagem).
- As CTM de polpa de dente são capazes de atingir a corrente sanguínea e migrar ao cérebro dos animais com *status epilepticus* induzido, após transplante via intraperitoneal.
- O transplante de células-tronco de polpa de dente humano foi capaz de reduzir a manifestação das crises espontâneas recorrentes em animais com epilepsia induzida por lítio-pilocarpina, após 30 dias do SE e transplante. O mesmo resultado foi obtido nos animais transplantados com células mononucleares de medula óssea.
- Na avaliação do desempenho no labirinto aquático de Morris os animais transplantados não apresentaram nenhuma melhora em relação aos animais epiléticos não tratados.

Referências

- BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 8, n. 3, p. 301-316, 2004.
- BARBASH, I. M.; CHOURAQUI, P.; BARON, J.; *et al.* Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. **Circulation**, 108: 863-868, 2003.
- BARTOLOMEI F. *et al.* development of focal chronic epilepsy following focal status epilepticus in adult patients. **Neurophysiologie Clinique**. 29: 271-6, 1999.
- BOCHKOV, N. P.; VORONINA, E. S.; KOSYAKOVA, N. V.; LIEHR, T. *et al.* Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. **Bulletin of experimental biology and medicine**, 143(1): 122-126, 2007.
- BRAZELTON, T.R.; ROSSI, F. M.; KESHET, G. I. *et al.* From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science**. 290 (5497): 1775-9, 2000.
- BUGOS, O.; BHIDE, M.; ZILKA, N. Beyond the rat models of human neurodegenerative disorders. **Cell Mol Neurobiol**, 29: 859-869, 2009.
- CHAMBERLAIN, G; FOX, J.; ASHTON, B.; *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features an potencial horning. **Stem Cell**. 25: 2739-2749, 2007.
- CHEN, H.; QIAN, K., *et al.* The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores. **Human Reproduction**, v.20, n.8, p.2201-2206, 2005.
- CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurology**. 1:92-100, review: 2002
- CHU, K.; KIM, M.; JUNG, K-H.; *et al.* Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. **Brain Research**, 1023: 213– 221, 2004.
- CLIFFORD, B. D. *et al.* The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**. 23(3): 953-68, 1987
- COSTA-FERRO, Z. S. M. Transplante de células mononucleares de medula óssea na epilepsia experimental induzida por lítio e pilocarpina em ratos. Tese de doutorado.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, departamento de Fisiologia, pp159. Porto Alegre, RS-BR. 2008. Disponível em: www.ufrgs.br

- COSTA-FERRO, Z. S. M.; VITOLA, A. S.; PEDROSO, M. F. *et al.* Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. **Seizure**, 19: 84-92, 2010.
- COULTER, D.A.; McINTYRE, D.C.; LOSCHER, W. Animal models of limbic epilepsies: What can they tell us? **Brain Pathology**, 12: 240–256, 2002.
- COVAS, D. T. Células-tronco mesenquimais *in*: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células tronco: A nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, cap 3. p.35-48, 2006.
- CUNHA, F. B. Efeitos do transplante de células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano na epilepsia experimental. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pp78. Feira de Santana, BA-BR. 2009.
- CURIA, G.; LONGO, D. BIAGINI, G. *et al.* The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, 172: 143-157, 2008.
- DA COSTA, J. C.; PALMINI, A.; YACUBIAN, E. M. T.; *et al.* **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: Aspectos clínicos e cirúrgicos**. Lemos editorial. v.1 3:149-161. São Paulo. 1998
- DAN, Y.Y., YEOH, G.C. *et al.* Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 23, n. 5, p. 687-698, 2008.
- D'AQUINO, R.; PAPACCIO, G.; LAINO, G.; *et al.* Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. **Stem Cell**, 2008.
- DE BRUIN, V. M.; MARINHO, M. M.; DE SOUSA, F. C.; *et al.* Behavioral and neurochemical alterations after lithium–pilocarpine administration in young and adult rats: a comparative study. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 65(3): 547-551, 2000.
- DE PAULA, S.; VITOLA, A. S.; GREGGIO, S.; *et al.* Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. **Pediatric Research**, 65(6): 631-635, 2009.
- DOCHEVA, D.; *et al.* Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. **J. Cell Mol. Med.**, v. 11, n. 1, 21-38, 2007.
- DRAPER, J. S.; SMITH, K.; GOKHALE, P. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, 22(1): 53-54, 2004.
- EGLITIS, M. A.; MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94(8): 4080-5, 1997.

- EICHENBAUN, H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. **Nature Reviews Neuroscience**, 1: 41-50, 2000.
- ELGER, C.E.; SCHMIDT, D. Modern management of epilepsy; a practical approach. **Epilepsy and Behavior**. 12. 501-539, 2008.
- ENGEL J.; BABB, T.L.; CRANDALL, P.H. Surgical treatment of epilepsy: opportunities for research into basic mechanisms of human brain function. **Acta Neurochirug. Suppl.**; 46:3-8, 1989.
- ENGEL JR, J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE task force on classification and terminology. **Epilepsia**, 42(6): 796-803, 2001
- ENGEL JR, J. ILAE classification of epilepsy syndromes. **Epilepsy Research**, 70S: S5-S10, 2006.
- ENGEL JR, J. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, 26: 141-150, 1996.
- FISHER R.S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and The International Bureau of Epilepsy (IBE). 46(4): 470-2, 2005.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cell**: A manual for basic technique. Wiley-Liss. 5ed. p672, 2005.
- FURLANI, D.; UGURLUCAN, M.; ONG, L. *et al.* Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. **Microvascular Research**, 77: 370-376, 2009.
- GAGARI, E.; RAND, M. K.; TAYARI, L. *et al.* Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, in human oral mesenchymal cells. **Eur J Oral Sci**, 114:409-415, 2006.
- GALLAGHER, M. et al. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris Water Maze. **Behavioral Neuroscience**. v.10(4): 618-626, 1993.
- GANDIA, C.; ARMINÁN, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M. *et al.* Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. **Stem cells**, 26: 638-645, 2008.
- GERNET, M.; THOMPSON, K. W.; LÖSCHER, W.; TOBIN, A. J. Genetically engineered GABA-producing cells demonstrate anticonvulsant effects and long-term transgene expression when transplanted into the central piriform cortex of rats. **Experimental Neurology**, 176: 183-192, 2002.

- GORDON, D.; PAVLOVSKA, G.; GLOVER, C. P. *et al.* Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. **Neurosci Lett**, 448(1): 71–73, 2008.
- GRONTHOS, S; MANKANI, M. BRAHIM, J.; *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 97 (25): 13625-13630, 2000.
- GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J. Dent. Res.**, 81(8): 531-535, 2002.
- GUERREIRO, C. A. M. História do Surgimento e Desenvolvimento das Drogas Antiepilépticas. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**; 12(1 suppl. 1):18-21, 2006.
- GUIMARÃES, E.T. Isolamento, caracterização, diferenciação e uso terapêutico de células-tronco adultas obtidas da polpa dentária murina. Tese de doutorado. Universidade Federal da Bahia, departamento de Patologia, pp144. Salvador, BA-BR. 2010.
- HENDRIKS M.P.; ALDENKAMP A.P; ALPHERTS W.C.; *et al.* Relationships between epilepsy-related factors and memory impairment. **Acta Neurol Scand**, 110(5): 291-300, 2004.
- HICKEY, W.F.; KIMURA, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. **Science** 239: 290-292, 1998.
- HOEHN, M.; KUSTERMANN, E.; BLUNK, J. *et al.* Monitoring of implanted stem cell migration *in vivo*? A highly resolved *in vivo* magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. **PNAS** 99 (25): 16267-16272, 2002.
- HONG, S. H.; GANG, E. J.; JEONG, J. A.; *et al.* *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 330: 1153-1161, 2005.
- HONMA, T.; HONMOU, O.; LIHOSHI, S. *et al.* Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. **Exp Neurol**, 199(1): 56-66, 2006.
- HUANG, A. H.; SNYDER, B. R.; CHENG, P.H. *et al.* Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. **Stem cells**, 26(10): 2654-2663, 2008.
- HUBER, A.; PADRUN, V; DE´GLON, N. *et al.* Grafts of adenosine-releasing cells suppress seizures in kindling epilepsy. **PNAS** 98(13): 7611-7616, 2001.
- ISHKITIEV, N. *et al.* Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features *in vitro*. **Journal of endodontics**. v.36, n.3: 469-474, 2010.
- IZQUIERDO, I. Memória. Artmed, Porto Alegre. pp 95, 2002.

- KIRALY, M.; PORCSALMY, B.; PATAKI, A. *et al.* Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. **Neurochemistry International**, 55: 323-332, 2009.
- KÖRBLING, M.; ESTROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. **Bone Marrow Transplantation**, 32: S23-S24, 2003.
- KRAMPERA, M. *et al.* Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**. 395: 678-683. 2006.
- KRAUSE D. S.; THEISE, N. D.; COLLECTOR M. I., HENEGARIU O. *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell** 105: 369-77, 2001.
- LEE, K. H.; SUM-KIM, H.; CHOI, J. S. *et al.* Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats. **Acta Neurobiol Exp**, 67: 13-22, 2007.
- LEITE, J. P.; CAVALHEIRO, E. A. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. **Epilepsy Research**, 20: 93-104, 1995.
- LEROU, P. H.; YABUUCHI, K. *et al.* Derivation and maintenance of human embryonic stem cells from poor-quality in vitro fertilization embryos. **Nature Protocols**, 3(5): 923-933, 2008.
- LEROY, C. *et al.* In the lithium-pilocarpine model of epilepsy, brain lesions are not linked to changes in blood-brain barrier permeability: an autoradiographic study in adult and developing rats. **Experimental Neurology**. 182: 361-372, 2003.
- LI, G.; BAVER, S. NOWAK, M. *et al.* Cytokines and epilepsy. **Seizure: Eur. J. Epilepsy**, 2011. doi: 10.1016/j.seizure.2010.12.005
- LOSCHER, W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. **Trends in Pharmacological Sciences**, 23(3): 113-118, 2002.
- LOUIS, E.D. *et al.* Experimental models of chronic focal epilepsy: a critical review of four models. **The Yale Journal of Biol. and Med.** 60: 255-272, 1987
- MANNELLO, F., TONTI, G.A. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! **Stem Cells**, 25(7): 1603-1609, 2007.
- MARIE, S.K.N.; OBA-SHINJO, S.M. Célula-tronco no sistema nervosa central; potencial terapêutico. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu; cap 11, p.145-158, 2006.

- MATHERN, G.W. et al. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. **Epilepsy Research**. 26: 151-161, 1996.
- McNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, 14(6): 3413-3425, 1994.
- MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, 119: 2204-2213, 2006
- MEISNER, L. F.; JOHNSON, J. A. Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. **Methods**, 45: 133-141, 2008.
- MELLO et al. Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. **Neurobiologia**. 49(3): 231-68. 1986.
- MELLO L.E. et al. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy; cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**. 34(6): 985-95, 1993.
- MELO *et al.* Crises epilépticas, Artmed. Porto Alegre. 2002.
- MENDEZ-OTERO, R. *et al.* Introdução às células-tronco. In: MORALES, M.M. **Terapias avançadas: células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada a saúde**. São Paulo: Atheneu, cap 1, p. 3-23, 2007a..
- MENDEZ-OTERO, R.; FREITAS, G.R. et al. Terapias celulares em neurologia. In: MORALES, M.M. **Terapias avançadas: células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada a saúde**. São Paulo: Atheneu, cap 5, p. 55-71, 2007b.
- MEZEY, E.; CHANDROSS, K. J.; HARTA, G. *et al.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science** 209: 1779-82, 2000.
- MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M. *et al.* SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **PNAS** 100(10): 5807-5812, 2003.
- MORFINI, G.A. et al. Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. **The journal of neuroscience**. 29(41): 12776-12786, 2009.
- MORRIS, G.M.; GARRUD, P.; RAWLINS J.N.P. *et al.* Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 297: 681-683, 1982.
- MORRIS RG, HAGAN JJ, RAWLINS JN. Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. **Q J Exp Psychol B.**; 38(4):365-395, 1986.
- NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Alterações neuroquímicas associadas às epilepsias do lobo temporal *in* DA COSTA, J. C. *et al.* **Fundamentos neurobiológicos das**

epilepsias – Aspectos clínicos e cirúrgicos. V.1. São Paulo: Lemos editorial, 75-100, 1998.

- NOMURA, T.; HONMOU, O.; HARADA, K *et al.* I. V. Infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. **Neuroscience**, 136(1): 161-169, 2005.
- O'KEEFE J & NADEL L. The Hippocampus as a Cognitive Map, **Clarendon Press**, Oxford. 1978.
- PALLUD, J. et al. Animal models to develop surgery of focal **epilepsies**. **Neurochirurgie**. 54(3): 128-34, 2008
- PAREKKADAN, B.; TILLES, A.; YARMUSH, M. L. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory t cells. **Stemcells**, 26: 1913-1919, 2008.
- PAU, K-Y. F.; WOLF, D. P. Derivation and characterization of monkey embryonic stem cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, n.41, 2004.
- PEDROSO, M.F. Epilepsia experimental e fármacos antiepilépticos: efeito na memória espacial e na potenciação de longa duração induzida *in vitro*. **Dissertação de mestrado** apresentada ao curso de pós-graduação em neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre- RS. pp78. 2005. Disponível em: www.ufrgs.br
- PERA, M. F.; TROUNSON, A. Human embryonic stem cells: prospects for development. **The Company of Biologists**, v.131, p.5515-5525, 2004.
- PEREIRA, L.V. Células-tronco embrionárias e clonagem terapêutica. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu; cap 2, p. 21-34, 2006.
- PERRY, B. C.; ZHOU, D.; WU, X. *et al.* Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. **Tissue Engineering: Part C**, 14(2): 146-156, 2008.
- PITTENGER, M. F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow *in*: PROCKOP, D. J.; PHINNEY, D. G.; BUNNELL, A. B. **Mesenchymal stem cells: Methods and protocols**. Humana Press, cap 2. p.27-43, 2008.
- PITTENGER, M.F.; *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284: 143-147, 1999.
- PRIEL, M.R. et al. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research**. 26:115-121, 1996.
- RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II motor seizures. **Eletroenceph Clin Neurophysiol**. 32: 281-294, 1972.

- REGER, R. L.; TUCKER, A. H.; WOLFE, M.R. Differentiation and characterization of human MSCs *in* PROCKOP, D. J.; PHINNEY, D. G.; BUNNELL, A. B. **Mesenchymal stem cells: Methods and protocols**. Humana Press, cap 7. p.93-107, 2008.
- RIEKSTINA, U.; CAKSTINA, J.; PARFEJEVS, V. *et al.* Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow adipose tissue, heart and dermis. **Stem cell rev rep**, 22: 2009.
- ROCH C., LEROY C.; NEHLIG, A. NAMER, I. J.; Predictive value of cortical injury for the development of temporal lobe epilepsy in 21-day-old rats: an MRI approach using the lithium-pilocarpine model. **Epilepsia**, 43(10): 1129-1136, 2002.
- RUSCHENSCHMIDT, C.; KOCH, P. G.; BRUSTLE. O. *et al.* Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats. **Epilepsia**, 46 (5):174-183, 2005.
- SALGADO P.C.B.; SOUZA E.A.P. Variáveis psicológicas envolvidas na qualidade de vida de portadores de epilepsia. **Estudos de psicologia**. 8(1) 163-168, 2003. Disponível em: redalyc.uaemex.mx/pdf/261/26180118.
- SANTOS, A. M. G. D. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. **Técnicas para o sistema nervoso**, 131-239, 1999.
- SHETTY, A. K.; HATTIANGADY, B. Prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy. **Stem cells**, 25: 2396-2407, 2007.
- SHI, Q.; RAFIL, S.; WU M. H. *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. **Blood**, 92: 362-367, 1998.
- SHI, S.; BARTOLD, P.M.; MIURA, M. *et al.* The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthod Craniofacial Res**, 8: 191–199, 2005.
- SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **Journal of bone and mineral research**, 18(4): 696-704, 2003.
- SHNEKER, B.F.; FOUNTAIN, N. B. Epilepsy. **Disease- a month**. 49, 426-478, 2003.
- SOUZA, L. M. Caracterização de células-tronco de polpa dental humana obtida de dentes decíduos e permanentes. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, departamento de Ciências da Saúde, pp111. Brasília, DF-BR. 2008. Disponível em: <http://repositorio.bce.unb.br/handle/10482/1683>.
- SRIVASTAVA, A.S. *et al.* Potentials of ES cell therapy in neurodegenerative diseases. **Current Pharmaceutical Design**. v.14 (36): 3873-3879, 2008.
- STEWART, C.A.; MORRIS R.G.M. The water maze. In: SAGHAL, E.A. **Behavioural Neuroscience**. A practical approach. v.1 Oxford, NY, Tokyo, 107-122, 1993.

- SVEEN, O. B; HAWES, R. R. Differentiation of new odontoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. **Arch Oral Biol**, 13(12): 1399-1409, 1968.
- TOMA, C.; WAGNER, W. R.; BOWRY, S. *et al.* Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. **Circ. Res.** 104; 398-402, 2009.
- TURSKI, W.A. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research.** 8(3): 315-333, 1983.
- VENDRAME, M.; CASSADY, J.; NEWCOMB, J. *et al.* Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. **Stroke**, 35: 2390-2395, 2004.
- VENTURIN, G. T. Efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea na frequência de crises e no desempenho cognitivo de ratos com epilepsia induzida por lítio-pilocarpina. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, departamento de Neurociências, pp92. Porto Alegre, RS-BR. 2008. Disponível em: www.lume.ufrgs.br
- VEZZANI, A.; FRECH, J. BARTFAI, T. *et al.* The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v 7: 31-40, 2011.
- WAKSMAN, R.; BAFFOUR, R.; Bone marrow and bone marrow derived mononuclear stem cells therapy for the chronically ischemic myocardium. **Cardiovascular Radiation Medicine**, 4: 164–168, 2003.
- WINSLOW T. **Stem cell**: scientific progress and future research directions. National Institute of health. Dep. Of health and human services. cap 4, 23-42. 106p, 2001.
- WOLFE, M.; POCHAMPALLY, R.; SWANEY, W. *et al.* Isolation and culture of bone marrow-derived human multipotent stromal cells (hMSCs) *in*: PROCKOP, D. J.; PHINNEY, D. G.; BUNNELL, A. B. **Mesenchymal stem cells**: Methods and protocols. Humana Press, cap 1: 2-26, 2008.
- WOODS, E. J.; PERRY, B. C.; HOCKEMA, J. J. *et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. **Cryobiology**, 59(2): 150–157, 2009.
- YACUBIAN, E. M. T. Contribuição da semiologia das crises parciais ao diagnóstico topográfico das epilepsias. In: DA COSTA, J. C.; PALMINI, A.; YACUBIAN, E. M. T.; *et al.* **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias**: Aspectos clínicos e cirúrgicos. Lemos editorial. v.1 163-172. São Paulo. 1998
- YALVAC M. E.; RIZVANOV, A. A.; KILIC, E. *et al.* Potencial role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. **Curr Pharm Des**, 15(33): 3908-3916, 2009.

- YEN, A. H-H.; SHARPE, P.T. Stem cells and tooth tissue engineering. **Cell Tissue Res**, 331: 359-372, 2008.
- YEN, A. H-H.; YELICK, P. C. Dental tissue regeneration – A mini-review. **Gerontology**, 57: 85-94, 2010.
- YOU-YOUNG, J. O.; HEE-JUNG, L. *et al.* Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. **Tissue Engineering**, 13(04): 767-773, 2007.
- ZAGO, M. A. Células-tronco: origens e propriedades. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco: A nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu; cap 1, p. 3-20, 2006.
- ZAGO, M. A. Terapia com células-tronco. Fundamentos, oportunidades e obstáculos. **Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão**, 8(4): 145-150, 2005.
- ZAMAN, V.; TURNER, D. A.; SHETTY, A. K. Survival of grafted fetal neural cells in kainic acid lesioned CA3 region of adult hippocampus depends upon cell specificity. **Experimental Neurology**, 161: 535–561, 2000