

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Paulo Henrique Utumi

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE
POLPA DENTÁRIA E CORDÃO UMBILICAL DE CÃES
Characterization of mesenchymal stem cells derived of dental pulp and
umbilical cord of dogs**

CURITIBA

2019

Paulo Henrique Utumi

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE
POLPA DENTÁRIA E CORDÃO UMBILICAL DE CÃES
Characterization of mesenchymal stem cells derived of dental pulp and
umbilical cord of dogs**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Clínica e Cirurgia Veterinária, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Ademar Villanova Jr.

CURITIBA

2019

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
FORMATO DA DISSERTAÇÃO/ TESE	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	1
Medicina regenerativa na veterinária	1
Células-tronco	2
Células-tronco mesenquimais	3
<i>Células-tronco de polpa dentária</i>	4
<i>Fluconazol</i>	5
<i>Células-tronco de cordão umbilical</i>	6
Referências	8
CAPÍTULO 2	14
Caracterização das células-tronco mesenquimais derivadas de polpa dentária e cordão umbilical de cães	14
Resumo	15
Introdução.....	16
Materiais e Métodos	17
Coleta e isolamento das MSC.....	17
Diferenciação	19
Caracterização imunofenotípica.....	20
Ensaio de formação de colônias	20
Ensaio de proliferação.....	21
Resultados.....	21
Cultivo, isolamento e diferenciação	21
Caracterização imunofenotípica.....	23
Ensaio de proliferação e de unidades formadoras de colônias	25
Discussão	26
Conclusão.....	28
Conflito de interesses.....	28
Financiamento	29
Agradecimentos.....	29
Referências	30
CAPÍTULO 3	33
Cytotoxicity of fluconazole on canine dental pulp-derived stem cells	33
Abstract	34

Introduction.....	35
Methods.....	36
Sample Collection	36
Cell isolation and expansion	37
Characterization of cDPSCs	37
Cell proliferation assay	38
Cell toxicity analysis	38
Statistical analysis	38
Resultados.....	39
Cell isolation and expansion	39
cDPSC characterization	39
Cell proliferation assay	39
Cellular toxicity	39
Discussion	40
Conclusion.....	41
Acknowledgements	42
Funding statement.....	42
Conflicts of interest.....	42
References	43
TABLES.....	47
FIGURES.....	48
CAPÍTULO 4	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
ANEXOS.....	54

*“Ao verme que primeiro roeu as frias carnes do meu cadáver
dedico como saudosa lembrança estas memórias póstumas.”*

‘Memórias Póstumas de Brás Cubas’

Machado de Assis.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Doralice Bertholazo da Silva Utumi e Paulo Kazuo Utumi agradeço a boa educação, os exemplos e por nunca terem medido esforços para me fazer chegar onde estou.

Ao meu orientador Dr. Jose Ademar Villanova Jr. pela orientação e por toda a experiência que me passou durante esses anos.

A todo o pessoal do Laboratório Experimental de Cultivo Celular (LECC) que sempre me ajudaram em todas as análises, além de me fornecer vários materiais que precisei para a execução da presente dissertação.

À Dra. Alexandra Cristina Senegaglia que sempre esteve lá quando precisei tirando todas as minhas dúvidas, me dando muitas dicas e me ajudando com as análises, além de ter aberto as portas do laboratório para que eu pudesse fazer meu mestrado.

À Dra. Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto que me auxiliou muito, me ajudando e tirando minhas dúvidas sempre que precisei.

À Leticia Fracaro minha querida namorada pelos anos juntos e por toda a ajuda que me deu durante a execução da dissertação.

Ao Felipe Yukio Ishikawa Fragoso e a Dayane Mayumi Miyazaki pela amizade e por me ajudarem em várias partes práticas deste estudo.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia, principalmente ao Seigo Nagashima, Ana Paula Camargo e Marina Azevedo, pela amizade e por me ajudarem muito na preparação e interpretação das lâminas.

À minha querida “irmãzinha” Janaina Balardini pela amizade que contruímos durante o mestrado, e a pequena Lana.

À toda equipe da Clínica Veterinária Escola (CVE) da PUCPR principalmente à Amanda Stephany R. de Freitas Silveira, Andressa Vieira, Daniele M. Santana, Fernanda Amorelli V. da Silva e Guilherme F. de Campos, pela amizade e auxílio na obtenção das polpas dentárias.

Às médicas veterinárias Kelly Mello do Hospital Veterinário Clinivet, Alexandra Justino da Silva da Casa do Produtor e Monica Correia do Amaral da Clínica Veterinária Progênie, pelo auxílio na obtenção das polpas dentárias e cordões umbilicais caninos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por quatro capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução que contextualiza temas relacionados a presente dissertação e seus objetivos.

O capítulo 2 é um artigo científico completo formatado nas normas da revista *Veterinary Microbiology*, elaborado a partir da revisão bibliográfica sobre o tema, descrição da metodologia utilizada, análises dos dados e resultados obtidos, bem como discussão dos mesmos. O artigo científico intitulado “*Cytotoxicity of fluconazole on canine dental pulp-derived stem cells*”, descreve se a inclusão do fluconazol no meio de coleta de dentes caninos afeta a viabilidade e a capacidade de diferenciação das células-tronco derivadas da polpa dentária canina.

O capítulo 3 é um artigo científico completo formatado nas normas da revista *Stem Cells International*, elaborado a partir da revisão bibliográfica sobre o tema, descrição da metodologia utilizada, análises dos dados e resultados obtidos, bem como discussão dos mesmos. O artigo científico intitulado “Caracterização das células-tronco mesenquimais derivadas de polpa dentária e cordão umbilical de cães” possui uma comparação entre duas fontes de células-tronco mesenquimais ainda pouco exploradas no campo da medicina veterinária.

O capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões gerais, considerações finais e sugestões para estudos futuros.

RESUMO

O campo de medicina regenerativa para animais de companhia vem crescendo nos últimos anos. As células-tronco mesenquimais (MSC) podem ser definidas como células-tronco adultas, multipotentes, com capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares. A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) estabeleceu critérios mínimos para definir MSC. As MSC podem ser isoladas de diferentes fontes como: polpa dentária e cordão umbilical. A polpa dentária contém uma população de células-tronco com localização perivascular e potencial de diferenciação em múltiplas linhagens semelhante à MSC obtidas a partir de outros tecidos. O fluconazol é um composto antifúngico usado isoladamente ou em combinação com outras drogas, por ter um amplo espectro. Ele exerce sua atividade antifúngica inibindo a síntese de ergosterol fúngico em um dos passos finais de sua biossíntese. Portanto, ele pode ser usado na coleta de dentes e na cultura de células-tronco de polpa dentária. Outra fonte de MSC utilizada é o cordão umbilical, onde sua coleta é menos invasiva, não gera riscos ao paciente e seu material normalmente seria descartado. O objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar e avaliar o potencial de proliferação e formação de colônias das células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente canina (cDPSCs) e do tecido do cordão umbilical de cães (cUCSC). Foram coletadas três amostras de polpa dentária e três de cordão umbilical. As amostras foram dissociadas mecanicamente e isoladas por digestão enzimática usando colagenase tipo II. As células foram expandidas e foi realizada a diferenciação para as linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. Para diferenciação osteogênica, o meio foi trocado três vezes por semana, em seguida as células foram coradas com Alizarina Red evidenciando os cristais de cálcio. Para diferenciação adipogênica, o meio foi trocado três vezes por semana e então as células foram coradas com Oil Red evidenciando os vacúolos lipídicos. Para a diferenciação condrogênica o meio foi trocado três vezes por semana e foram coradas com azul de toluidina evidenciando os mucopolissacarídeos. Para o ensaio clonogênico foram plaqueadas 300 células/poço em placas de seis poços e cultivadas durante nove dias, em seguida as colônias foram coradas com violeta cristal para serem contadas. Para o ensaio de proliferação, foram plaqueadas 1×10^4 células/poço em placa de seis poços, então a cada cinco dias foi realizada a dissociação enzimática e as células foram contadas em câmara de Neubauer. As cDPSC e cUCSC apresentaram aderência ao plástico e morfologia fibroblastoide após cultivo de acordo com os critérios mínimos da ISCT. Tanto as cDPSCs quanto as cUCT apresentaram potencial de diferenciação para as três linhagens (osteogênica, adipogênica e condrogênica). As cUCSC apresentaram maior taxa de proliferação ($p=0.0414$) e número de unidades formadora de colônia ($p=0.0002$) quando comparada as cDPSC na passagem três. Conclui-se que as cDPSC e cUCSC apresentaram as características de células-tronco mesenquimais e que as cUCSC até a passagem três possuem uma maior taxa de proliferação e maior quantidade de unidades formadoras de colônias que as cDPSC, podendo ser utilizadas na terapia celular.

Palavras-chave: Isolamento, diferenciação, unidade formadora de colônias, proliferação, polpa dentária, cordão umbilical.

ABSTRACT

The field of regenerative medicine for pets has been growing in recent years. Mesenchymal stem cells (MSCs) can be defined as adult, multipotent stem cells with the ability to differentiate into several cell types. The International Society of Cell Therapy (ISCT) has set minimum criteria for defining MSCs. These MSCs can be isolated from different sources such as: dental pulp and umbilical cord. The dental pulp contains a population of stem cells (DPSC) with perivascular location and differentiation potential in multiple lineages similar to MSCs obtained from other tissues. Fluconazole is an antifungal compound used alone or in combination with other drugs because it has a large spectrum. It exerts its antifungal activity by inhibiting ergosterol fungal synthesis in one of the final steps of its biosynthesis. Therefore, it can be used in teeth collection and stem cell culture of dental pulp. Another source of MSCs used is umbilical cord. The collection is less invasive, painful and with lower mortality when compared to collection of the bone marrow. The aim were isolate, characterize and evaluate the potential of proliferation and colonies formation of mesenchymal stem cells derived from dental pulp (cDPSC) and umbilical cord tissue of dogs (cUCSC). Three samples of dental pulp and umbilical cord were collected. The samples were mechanically dissociated and isolated by enzymatic digestion using type II collagenase and cultivate with IMDM and fetal bovine serum. The differentiation was made for adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages. For osteogenic differentiation, the medium was changed three times per week for seven days, then the cells were stained with Alizarin Red evidencing calcium crystals. For adipogenic differentiation, the medium was changed three times per week for 21 days, then the cells were stained with Oil Red evidencing lipid vacuoles. For chondrogenic differentiation the medium was changed three times at week for 21 days, then stained with toluidine blue evidencing mucopolysaccharides. For clonogenic assay, 300 cells/well were plated in 6-well plates and cultured for nine days, then colonies were stained with crystal violet and counted. For proliferation assay, 10,000 cells/well were plated in six-well plate, enzymatic dissociation was performed every five days and cells were counted in a hemocytometer. The cDPSC and cUCSC showed adherence to the plastic and fibroblastoid morphology after culture according to guidelines of the ISCT. In addition, they also shown differentiation potential for the three lineages: osteogenic, adipogenic and chondrogenic. The cUCSC presented higher number of colony forming units when compared to cDPSC at third passage. Regarding proliferation, cUCT presented a higher rate when compared to cDPSCs at third passage. In conclusion, cDPSC and cUCSC showed characteristics of mesenchymal stem cells and cUCSC at third passage had a higher rate of proliferation and more of colony-forming units in comparison to cDPSC, can be used in cell therapy.

Keywords: Isolation, diferentiation, colony forming units, proliferation, dental pulp, umbilical cord.

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

Medicina regenerativa na veterinária

O campo de medicina regenerativa para animais de companhia vem crescendo nos últimos anos. Os estudos baseados em terapia celular vêm cada vez mais sendo vistos como estudos clínicos, ao contrário de pré-clínicos como são usualmente vistos em estudos de medicina regenerativa humana.

Devido ao impacto da terapia celular na medicina veterinária ser menor em comparação com seu impacto na medicina humana, a caracterização de células-tronco (CT) de diversos tecidos de várias espécies seguida por um número crescente de estudos pré-clínicos, levou ao uso relativamente disseminado das CT em terapias celulares na medicina veterinária clínica (VOLK e THEORET, 2013).

Existem diversos estudos demonstrando o potencial das células-tronco como terapia. As células foram estudadas em grande número de doenças do sistema musculoesquelético e não musculoesquelético (Gugjoo et al., 2019). Cuervo et al. (2014) comparou um tratamento com células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC) com um tratamento com fatores de crescimento rico em plaquetas em cães com osteoartrite e demonstraram que as células-tronco apresentaram melhor desempenho. Em um outro estudo de ruptura parcial do ligamento cruzado cranial, o tratamento com ADSC e células-tronco de medula óssea (BMSC) juntamente com plasma rico em plaquetas apresentaram resultados promissores. Dos 13 pacientes, nove cães tinham cicatrizado totalmente CCL consistente com marcada neovascularização e um padrão de fibra normal nas áreas anteriores de ruptura (Canapp et al., 2016). Pogue et al (2013), utilizou ADSC por via venosa coronária retrógrada em casos de cardiomiopatia dilatada oculta. A terapia pareceu ser segura, mas o tempo médio de sobrevivência não mudou após a terapia celular. Como esse era um estudo piloto, eles demonstraram que precisariam de estudos adicionais para melhorar a eficácia clínica dessas células. Besalti et al. (2015) demonstrou resultados promissores em cães com lesão medular com o tratamento de BMSC. Além disso, as células-tronco já foram estudadas em cães com outros

problemas como diabetes (Gautam et al., 2016), meningoencefalomielite (Zeira et al., 2015), lesão renal aguda (Lee, et al., 2017), sempre com uma melhora na condição ou um aumento na expectativa de vida.

Mesmo que diversos estudos estejam sendo desenvolvidos utilizando as CT na medicina veterinária (ARNHOLD e WENISCH, 2015; OLSEN et al., 2018), é necessária a padronização de métodos de isolamento, cultivo e caracterização a fim de gerar uma melhor qualidade no produto final.

Células-tronco

As CT são definidas como células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e diferenciação em linhagens celulares específicas (KRAUSE et al., 2001; FORTIER, 2005; MELTON; COWEN, 2009; NAGAYA et al., 2014).

São classificadas pela sua origem e pelo seu potencial de diferenciação. Quanto a sua origem, as CT podem ser classificadas como embrionárias, adultas e pluripotentes induzidas (iPS). As CT embrionárias são células derivadas da massa interna do blastocisto, que podem se proliferar indefinidamente e preservar sua pluripotência. Estas células são muito promissoras pela sua capacidade, porém, problemas como o desenvolvimento de tumores e rejeição imunológica dificultam a utilização dessas células (CARVALHO e GOLDENBERG, 2012; GONÇALVES et al., 2014). As CT adultas têm sido tradicionalmente consideradas necessárias para manter renovação celular dos tecidos e órgãos, sendo que cada tecido tem uma população residente de células-tronco específicas (WOBUS e BOHELER, 2005; FORTIER, 2005; GONÇALVES et al., 2014). As iPS são células somáticas que foram reprogramadas para um estado semelhante ao de células embrionárias (pluripotentes), isso é feito por meio da inserção de genes como OCT-4, SOX2 e RFL-4 utilizando vetores virais (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006).

Quanto ao seu potencial, as CT são classificadas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As totipotentes são capazes de dar origem a todos os folhetos embrionários e também aos anexos embrionários, uma propriedade apresentada pelo zigoto até o estágio de oito células da mórula (WOBUS e BOHELER, 2005; GONÇALVES et al., 2014). As células pluripotentes são capazes de formar tecidos de todas as camadas

embrionárias (endoderme, mesoderme e ectoderme), exceto os anexos embrionários, e as células multipotentes podem dar origem a um subconjunto mais restrito de linhagens celulares (FORTIER, 2005; GONÇALVES et al., 2014).

Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (MSC) foram inicialmente descritas por Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina, (1970) e podem ser definidas como CT adultas, multipotentes, com potencial imunomodulador e capazes de dar origem a diversos tipos celulares (CAPLAN, 2009). As MSC têm o potencial de diferenciação em vários tipos celulares como adipócitos, condrócitos, osteoblastos, mioblastos, entre outras (PITTENGER et al., 1999; KANG et al., 2006; WANG et al., 2006; ANTONITSIS et al., 2007; CAPLAN, 2009).

Essas células apresentam localização perivascular (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008), podem ser isoladas, expandidas em cultura e caracterizadas *in vitro* (PITTENGER; MARTIN, 2004; REBELATTO et al., 2008; MUSHAHARY et al., 2017). As MSC podem ser isoladas de diversas fontes como: sangue periférico (CAO; DONG, 2005), medula óssea (LEE et al, 2004), pulmão (GRIFFITHS; BONNET; JANES, 2005), coração (BELTRAMI et al, 2003), placenta, âmnio, cordão umbilical, sangue do cordão umbilical (HASS et al 2011), tecido ósseo (NOTH et al., 2002), polpa de dente (SHI et al., 2005), pele (CRIGLER et al., 2007), tecido adiposo (ZUK et al., 2002; FRASER et al, 2006), entre outros. Dentre essas fontes, a medula óssea, geralmente é utilizada no tratamento de doenças hematológicas, é a fonte mais estudada de células-tronco adultas. Sua coleta é um procedimento doloroso e de baixo rendimento celular (0,01% a 0,001%) (STOCCHERO e STOCCHERO, 2011; BAER e GEIGER, 2012, LECHANTEUR et al., 2016).

Para a padronização da definição das MSC humanas, a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT), propôs três critérios mínimos: as MSC devem ser células aderentes ao plástico quando cultivadas, apresentar a expressão de alguns marcadores de superfície (CD105, CD73 e CD90) e a expressão reduzida de outros marcadores (CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II), e devem ser capazes de se diferenciar *in*

vitro em pelo menos três linhagens celulares (osteoblastos, adipócitos e condroblastos) (DOMINICI et al., 2006).

Células-tronco da polpa dentária

A polpa dentária contém uma população de células-tronco com localização perivascular e potencial de diferenciação em múltiplas linhagens semelhante à MSC obtidas a partir de outros tecidos. As células-tronco derivadas de polpa dentária humana (DPSC) normalmente são isoladas de terceiros molares e dentes decíduos que usualmente são descartados, não sendo necessária uma cirurgia extra para sua obtenção (ISOBE et al., 2015).

As DPSC humanas apresentaram alto número de unidades formadoras de colônias, alta taxa de proliferação, quando comparadas com MSCs derivadas de medula óssea, e maior tempo de sobrevivência sem apresentar sinais de senescência (ISOBE et al., 2015). Estas células têm a capacidade de se diferenciar em células semelhantes a neurônios e secretar fatores neurotróficos como a neurotrofina (SAKAI et al., 2012; LUO et al., 2018). Além disso, elas expressam marcadores neuronais mesmo antes de induzidas a diferenciação neuronal (FOUDAH et al., 2014). Isso faz das DPSC excelentes candidatas para estudos com doenças e traumas neuronais. Um estudo realizado por Sakai et al. (2012) demonstrou que as DPSC humanas conseguiram promover a recuperação locomotora em ratos com transecção completa da medula espinhal. Além disso, este trabalho demonstrou que os ratos que foram submetidos ao transplante de DPSC, tiveram melhor recuperação motora do que aqueles que receberam células-tronco derivadas de medula óssea (BMSC).

Para cães não é comum a retirada do terceiro molar como em humanos. As células-tronco de polpa dentária de cão (cDPSC) podem ser isoladas mais facilmente de dentes caninos de cães (Figura 1) devido a apresentarem uma raiz única facilitando a extração desses dentes se comparados aos molares e pré-molares que possuem três raízes em cães, que são inseridas no osso maxilar ou mandíbula (Wiggs e Lobprise, 1997).

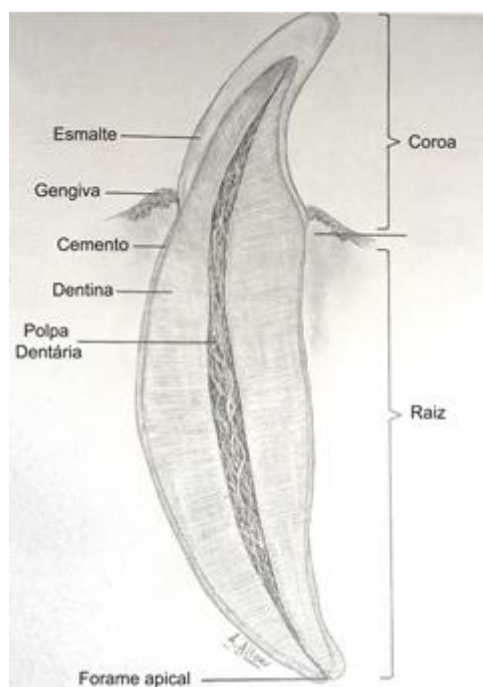


Figura 1. Representação da estrutura de um dente canino de cão demonstrando a localização da polpa dentária. Adaptado do livro *Canine Surgery*, pag. 314.

Como os cães raramente são submetidos à higiene bucal rigorosa e rotineira, as placas bacterianas se formam mais facilmente. A exposição dos dentes a vários contaminantes pode dificultar o isolamento e a expansão dos DPSCs caninos *in vitro*. Frias et al. (2018) identificaram fungos de levedura dos gêneros *Candida* e *Malassezia* na mucosa bucal de cães. Santin et al. (2013) mostraram que *M. pachydermatis* e *Candida spp.* fazem parte da microbiota normal de diferentes regiões da cavidade bucal canina, sendo isoladas em maior proporção de animais afetados pela halitose, sugerindo que esses fungos têm papel importante no comprometimento da saúde bucal de cães.

Fluconazol

Para evitar que contaminações bacterianas no cultivo celular, é comumente utilizados antibióticos como penicilina e estreptomicina. Para prevenção de contaminações fúngicas são utilizados alguns fungicidas, como a amphotericina B (Palossari et al, 2000), porém não é tão comum.

O fluconazol é um composto antifúngico usado isoladamente ou em combinação com outras drogas, por ter um amplo espectro (Santos et al,

2005). Ele exerce sua atividade antifúngica inibindo a síntese de ergosterol fúngico em um dos passos finais de sua biossíntese, que conseqüentemente ira causar a perda da integridade da membrana fúngica (Walsh et al, 1997). Portanto, ele pode ser usado na coleta de dentes e na cultura de cDPSCs. Em comparação com outros fungicidas comumente utilizados em cultura celulares, como a anfotericina B, o fluconazol demonstra eficácia semelhante contra fungos do gênero *Candida*, mas com menos efeitos adversos (Rex et al, 2003; Pappas et al, 2016). No entanto, poucos estudos utilizaram ou definiram doses para uso em cultura de células-tronco.

Células-tronco de cordão umbilical

A coleta das MSC do tecido de cordão umbilical (UCTSC), é menos invasiva quando comparada a coleta da medula óssea, que além de dolorosa pode trazer riscos à saúde do paciente (MAHMOOD, SHAUKAT E CHOUDHERY, 2018). As UCTSC apresentam grande plasticidade e podem ser expandidas em grandes quantidades. Estudos mostram que células-tronco derivadas do cordão umbilical expressam marcadores similares aqueles expressos em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (WANG, 2004). Porém, as UCTSC entram em senescência mais tardiamente quando comparada com a de medula óssea, demonstrando assim ser mais resistente ao tempo (VIDAL et al, 2012; MAHMOOD, SHAUKAT e CHOUDHERY, 2018).

Um estudo realizado por Wu et al. (2016) com células derivadas do sangue do cordão umbilical cultivadas sobre uma matriz extracelular, apresentaram características de células pluripotentes. Além disso, essas células parecem apresentar uma população de células que expressam marcadores de progenitores neurais (DIVYA et al., 2012).

Fontes de MSC, como a polpa de dente e o tecido de cordão umbilical, estão sendo exploradas na medicina regenerativa humana e já demonstraram resultados promissores em estudos pré-clínicos e clínicos (SAKAI et al., 2012; DIVYA et al., 2012). Na medicina veterinária existem poucos estudos envolvendo células-tronco de polpa dentária e cordão umbilical de cães. Além disso, quando tratamentos convencionais, para determinado tipo de doença, não apresentam eficácia há a necessidade de procurar alternativas

terapêuticas para essas doenças. Então houve o crescimento do campo de medicina regenerativa em animais de companhia com isso há a necessidade de estudar novas fontes, menos invasivas e que usualmente são descartadas, assim como métodos para sua coleta e cultivo.

Referências

ANTONITSIS, P.; PAPAGIANNAKI, E.I.; KAIDOGLOU, A.; PPAKONSTANTINO, C. *In vitro* cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v. 6, p. 593- 597, 2007.

ARNHOLD S, WENISCH S. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. **Am J Stem Cells**. v.4 n.1 p.1-12, 2015.

BAER, P. C.; GEIGER, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/StemCells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. **Stem Cells International**, p. 1-11, 2012.

BELTRAMI, A.P.; BARLUCCHI, L.; TORELLA, D.; BAKER, M.; LIMANA, F.; CHIMENTI, S.; KASAHARA, H.; ROTA, M.; MUSSO, E.; URBANEK, K.; LERI, A.; KAJSTURA, J.; NADAL-GINARD, B.; ANVERSA, P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell**, v. 114, p. 763-776, 2003.

BESALTI, O., CAN, P., AKPINAR, E., AKTAS, Z., ELCIN, A. E., & ELCIN, Y. M. Intraspinal transplantation of autologous neurogenically-induced bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of paraplegic dogs without deep pain perception secondary to intervertebral disk disease. **Turkish Neurosurgery**, v.25, p.625–632, 2015.

CANAPP, S. O., JR., LEASURE, C. S., COX, C., IBRAHIM, V., & CARR, B. J. Partial cranial cruciate ligament tears treated with stem cell and platelet-rich plasma combination therapy in 36 dogs: A retrospective study. **Frontiers in Veterinary Sciences**, v.3, n.112, 2016.

CAO, C.; DONG, Y. Study on culture and in vitro osteogenesis of blood derived human mesenchymal stem cells. **Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery**, v. 18, n. 8, p. 642-647, 2005.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.9, p.641-650, 1991.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of PathologyJ Pathol**; v. 217 p. 318 – 324, 2009.

CARVALHO, A. C. C.; GOLDENBERG, R. C. S. G. **Células-tronco mesenquimais: conceitos, métodos de obtenção e aplicações**. 1 ed., São Paulo: Atheneu, 2012.

CRIGLER, L.; KAZHANIE, A.; YOON, T. J.; ZAKHARI, J.; ANDERS, J.; TAYLOR, B.; VIRADOR, V. M. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. **FASEB Journal**, v. 21, p. 2050-2063, 2007.

CUERVO, B., RUBIO, M., SOPENA, J., DOMINGUEZ, J., VILAR, J., MORALES, M., CARRILLO, J. Hip osteoarthritis in dogs: A randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p.13437–13460, 2014.

DIVYA MS, ROSHIN GE, DIVYA TS, RASHEED VA, SANTHOSHKUMAR TR, ELIZABETH KE, JAMES J, PILLAI RM. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells consist of a unique population of progenitors co-expressing mesenchymal stem cell and neuronal markers capable of instantaneous neuronal differentiation. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, n.57, 2012.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; I. MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, DJ.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

FORTIER LA. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. **Veterinary Surgery**. v.34 p. 415–423, 2005.

FOUDAH, D., MONFRINI, M., DONZELLI, E, NIADA S., ANBRINI, AT, ORCIANI M, TREDICI G, MILOSO M. Expression of Neural Markers by Undifferentiated Mesenchymal-Like Stem Cells from Different Sources. **J Immunol Res**. 2014.

FRASER, J.K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M.H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 150-154, 2006.

FRIAS, DFR, KOZUSNY-ANDREANI, DI, PRINA, RM. Identificação da microbiota gengival de cães aparentemente hígidos. **Nucleus**, v.15, n.1, p. 129-136, 2018.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and Tissue Kinetics**, v.3, p.393–403, 1970.

GAUTAM, P., RECINO, A., FOALE, R. D., ZHAO, J., GAN, S. U., WALLBERG, M., LEVER, A. M. L. Promoter optimisation of lentiviral vectors for efficient insulin gene expression in canine mesenchymal stromal cells: potential surrogate beta cells. **Journal of Gene Medicine**, v.18 n.10, p.312–321, 2016.

GONÇALVES NN, AMBROSIO CE, PIEDRAHITA JA. Stem Cells and Regenerative Medicine in Domestic and Companion Animals: A Multispecies Perspective. **Reprod Dom Anim**. v.49 (Suppl. 4), p. 2–10, 2014.

GRIFFITHS, M.J.; BONNET, D.; JANES, S.M. Stem cells of the alveolar epithelium. **The Lancet**, v. 366, p. 249-260, 2005.

GUGJOO, M. B., AMARPAL, A., SHARMA, G. T. Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. *Journal of Cellular Physiology*. p.1-33, 2019.

HASS, R.; KASPER, C.; BÖHM, S; JACOBS, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 12, 2011.

ISOBE, Y.; KOYAMA, N.; NAKAO, K.; OSAWA, K.; IKENO, M.; YAMANAKA, S.; OKUBO, Y.; FUJIMURA, K.; BESSHO K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.45, p.124–13, 2015.

KANG, X.Q.; ZANG, W.J.; BAO, L.J.; LI, D.L.; XU, X.L.; YU, X.J. Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Cell Biology International**, v. 30, p. 569 – 575, 2006.

KRAUSE, D.S.; THEISE, N.D.; COLLECTOR, M.I.; HENEGARIU, O.; HWANG, S.; GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S.J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v. 105, n. 3, p. 369-377, 2001.

LEE, R.H.; KIM, B.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H.; SUH, K.; BAE, Y.C.; JUNG, J.S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 14, p. 311-324, 2004.

LEE, S.J., RYU, M.-O., SEO, M.-S., PARK, S.-B., AHN, J.-O., HAN, S.-M., YOUN, H.-Y. Mesenchymal stem cells contribute to improvement of renal function in a canine kidney injury model. **In Vivo**, v.31, n.6, p.1115–1124, 2017.

LECHANTEUR C, BRIQUET A, GIET O, DELLOYE O, BAUDOUX E, BEGUIN Y. Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: a large banking experience. **Journal of translational medicine** v.14, n.1 p. 145. 2016.

LUO L, HE Y, WANG X, KEY B, LEE BH, LI H, YE Q. Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair. **Stem Cells Int**. 2018; 2018: 1731289.

MAHMOOD R, SHAUKAT M AND CHOUDHERY MS. Biological properties of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, umbilical cord tissue and bone marrow. **AIMS Cell and Tissue Engineering**. v.2, n.2, p. 78–90, 2018.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.

MELTON, D.A.; COWEN, C. Stemness: Definition, Criteria, and Standards. In: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.; MELTON, D.; PEDERSEN, R.;

THOMAS, E. D.; THOMSON, J.; WILMUT, S. I. (eds.). **Essentials of stem cell biology**. Oxford: Academic Press, 2009.

MOTHE, A.J.; TATOR, C.H. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 11, p. 3824–3834, 2012.

MUSHAHARY, D, SPITTLER, A, KASPER, C, WEBER, V, CHARWAT, V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. **Cytometry Part A**, v. 93 n.1, p. 19–31, 2017.

NAGAYA R, MIZUNO-KAMIYA M, TAKAYAMA E, KAWAKI H, ONOE I, TANABE T, NAGAHARA K, KONDOH N. Mechanisms of the immunosuppressive effects of mouse adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on mouse alloreactively stimulated spleen cells. **Experimental and Therapeutic Medicine** 7: 17-22, 2014.

NOTH, U.; OSYCZKA, A.M.; TULI, R.; HICKOK, N.J.; DANIELSON, K.G.; TUAN, R. S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, p. 1060-1069, 2002.

OLSEN, A., JOHNSON, V., WEBB, T., SANTANGELO, K., DOW, S., & DUERR, F. Evaluation of Intravenously Delivered Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Elbow Osteoarthritis in Dogs: A Pilot Study. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**. 2019.

PALLOSSARI, H.; WAHLGREN, J.; LARMAS, M.; RONKA, H.; SORSA, T.; SALO, T.; TJADERHANE, L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. **J Dent Res**. 2000.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, CLANCY CJ, MARR KA, OSTROSKY-ZEICHNER L, REBOLI AC, SCHUSTER MG, VAZQUEZ JA, WALSH TJ, ZAOUTIS TE, SOBEL JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**. v. 62, n. 4, p.1-50, 2016.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p.143– 147, 1999.

PITTENGER, M.F.; MARTIN, B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, v. 95, p.9-20, 2004.

POGUE, B., ESTRADA, A. H., SOSA-SAMPER, I., MAISENBACHER, H. W., LAMB, K. E., MINCEY, B. D., CONLON, T. J. Stem-cell therapy for dilated cardiomyopathy: A pilot study evaluating retrograde coronary venous delivery. **Journal of Small Animal Practice**, v.54, p.361–366, 2013.

REBELATTO, C. K.; AGUIAR, A.M.; MORETÃO, M.P.; SENEGAGLIA, A. C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V.F. ; BROFMAN, P.S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L.S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n.7, p.901-13, 2008

REX JH, PAPPAS PG, KARCHMER AW, SOBEL J, EDWARDS JE, HADLEY S, BRASS C, VAZQUEZ JA, CHAPMAN SW, HOROWITZ HW, ZERVOS M, MCKINSEY D, LEE J, BABINCHAK T, BRADSHAW RW, CLEARY JD, COHEN DM, DANZIGER L, GOLDMAN M, GOODMAN J, HILTON E, HYSLOP NE, KETT DH, LUTZ J, RUBIN RH, SCHELD WM, SCHUSTER M, SIMMONS B, STEIN DK, WASHBURN RG, MAUTNER L, CHU TC, PANZER H, ROSENSTEIN RB, BOOTH J. A Randomized and Blinded Multicenter Trial of High-Dose Fluconazole plus Placebo versus Fluconazole plus Amphotericin B as Therapy for Candidemia and Its Consequences in Nonneutropenic Subjects. **Clinical Infectious Diseases**, 36(10), 1221–1228, 2003.

SAKAI K, YAMAMOTO A, MATSUBARA K, NAKAMURA S, NARUSE M, YAMAGATA M, SAKAMOTO K, TAUCHI R, WAKAO N, IMAGAMA S, HIBI H, KADOMATSU K, ISHIGURO N, UEDA M. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. **J Clin Invest.**; 122(1): 80–90 2012.

SANTIN R, MATTEI AS, WALLER SB, MADRID IM, CLEFF MB, XAVIER MO, DE OLIVEIRA NOBRE M, NASCENTE PDA S, DE MELLO JR, MEIRELES MC. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.1, p.139-143, 2013.

SANTOS JR, I.D.; SOUZA, I.A.M.; BORGES, R.G.; SOUZA, L.B.S; SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, 2005.

SHI, S.; BARTOLD, P.M.; MIURA, M.; SEO, B.M.; ROBEY, P.G.; GRONTHOS, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 8, p.191-199, 2005.

STOCCHERO, I. N.; STOCCHERO, G. F. Isolation of Stem Cells from Human Adipose Tissue: Technique, Problems, and Pearls. In: ILLOUZ, Y. G.; STERODIMAS, A. (eds.). **Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 13-18, 2011.

TAKAHASHI K., SHINYA YAMANAKA S. **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors**. Cell 126, 663–676, August 25, 2006.

VIDAL MA, WALKER NJ, NAPOLI E, BORJESSON DL. Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow,

Adipose Tissue, and Umbilical Cord Tissue. **Stem Cells Dev** 21: 273–283, 2012.

VOLK, S. W., & THEORET, C. Translating stem cell therapies: The role of companion animals in regenerative medicine. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21 n.3 p. 382–394, 2013.

WALSH, T.J.; KASAI, M.; FRANCESCONI, A.; LANDSMAN, D.; CHANOCK, S.J. New evidence that *Candida albicans* possesses additional ATP-binding cassette MDR-like genes: implications for antifungal azole resistance. **J. Med. Vet. Mycol.**, 1997.

WANG HS, HUNG SC, PENG ST, HUANG CC, WEI HM, GUO YJ, FU YS, LAI MC, CHENA CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**. 2004; 22: 1330–1337

WANG, T.; XU, Z.; JIANG, W.; MA, A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. **International Journal of Cardiology**, v.109, n.1, p. 74-81, 2006.

WIGGS, RB; LOBPRISE, HB. Veterinary dentistry: principles and practice. **Lippincott-Raven Publishers**. ISBN : 03-975-13852. 1997.

WOBUS AM, BOHELER KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiol Rev** 85:635–678, 2005.

WU J, SUN Y, BLOCK TJ, MARINKOVIC M, ZHANG ZL, CHEN R, YIN Y, SONG J, DEAN DD, LU Z, CHEN XD. Umbilical cord blood-derived nonhematopoietic stem cells retrieved and expanded on bone marrow-derived extracellular matrix display pluripotent characteristics. **Stem Cell Research & Therapy** 7:176, 2016.

ZEIRA, O., ASIAG, N., ARALLA, M., GHEZZI, E., PETTINARI, L., MARTINELLI, L., CANTILE, C. Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: Safety, feasibility and preliminary clinical findings. **Journal of Neuroinflammation**, v.12, n.181, 2015.

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

CAPÍTULO 2

Caracterização das células-tronco mesenquimais derivadas de polpa dentária e cordão umbilical de cães

Characterization of mesenchymal dental pulp-derived and umbilical cord-derived stem cells of dogs

Paulo Henrique Utumi¹, Alexandra Cristina Senegaglia², Letícia Fracaro², Felipe Yukio Ishikawa Fragoso², Dayane Mayumi Miyasaki², Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto², José Ademar Villanova Junior¹

Affiliation:

¹ Postgraduate Program in Animal Science - Pontifical Catholic University of Parana (PUCPR) – Curitiba, Paraná, Brasil

² Core for Cell Technology - Pontifical Catholic University of Parana (PUCPR) – Curitiba, Paraná, Brasil

Paulo Henrique Utumi - utumipr@hotmail.com

Alexandra Cristina Senegaglia - alexandra.senegaglia@pucpr.br

Letícia Fracaro – leticiafracaro@gmail.com

Felipe Yukio Ishikawa Fragoso - yukio.ishikawa@gmail.com

Dayane Mayumi Miyasaki - day_mayumi@hotmail.com

Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto - carmen.rebelatto@pucpr.br

José Ademar Villanova Jr - jose.villanova@pucpr.br

Autor correspondente: Paulo Henrique Utumi

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (MSC) podem ser definidas como células-tronco adultas, multipotentes, com capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares. A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) estabeleceu critérios mínimos para definir MSC. As MSC podem ser isoladas de diferentes fontes como: polpa dentária e cordão umbilical. A polpa dentária contém uma população de células-tronco com localização perivascular e potencial de diferenciação em múltiplas linhagens semelhante à MSC obtidas a partir de outros tecidos. Outra fonte de MSC utilizada é o cordão umbilical, onde sua coleta é menos invasiva, não gera riscos ao paciente e seu material normalmente seria descartado. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar o potencial de proliferação e formação de colônias das células-tronco mesenquimais derivadas de polpa dentária canina (cDPSCs) e do tecido do cordão umbilical de cães (cUCSC). Foram coletadas três amostras de polpa dentária e três de cordão umbilical. As amostras foram dissociadas mecanicamente e isoladas por digestão enzimática usando colagenase tipo II. As células foram expandidas e foi realizada a diferenciação para as linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. Para diferenciação osteogênica, o meio foi trocado três vezes por semana, em seguida as células foram coradas com Alizarina Red evidenciando os cristais de cálcio. Para diferenciação adipogênica, o meio foi trocado três vezes por semana e então as células foram coradas com Oil Red evidenciando os vacúolos lipídicos. Para a diferenciação condrogênica o meio foi trocado três vezes por semana e foram coradas com azul de toluidina evidenciando os mucopolissacarídeos. Para o ensaio clonogênico foram plaqueadas 300 células/poço em placas de seis poços e cultivadas durante nove dias, em seguida as colônias foram coradas com violeta cristal para serem contadas. Para o ensaio de proliferação, foram plaqueadas 1×10^4 células/poço em placa de seis poços, então a cada cinco dias foi realizada a dissociação enzimática e as células foram contadas em câmara de Neubauer. As cDPSC e cUCSC apresentaram aderência ao plástico e morfologia fibroblastoide após cultivo de acordo com os critérios mínimos da ISCT. Tanto as cDPSCs quanto as cUCT apresentaram potencial de diferenciação para as três linhagens (osteogênica, adipogênica e condrogênica). As cUCSC apresentaram maior taxa de proliferação ($p=0.0414$) número de unidades formadora de colônia ($p=0.0002$) quando comparada às cDPSC na passagem três. Conclui-se que as cDPSC e cUCSC apresentaram as características de células-tronco mesenquimais e que as cUCSC até a passagem três possuem uma maior taxa de proliferação e maior quantidade de unidades formadoras de colônias que as cDPSC, podendo ser utilizadas na terapia celular.

Palavras-chave: Isolamento, diferenciação, unidade formadora de colônias, proliferação, polpa dentária, cordão umbilical.

Introdução

O campo de medicina regenerativa para animais de companhia vem crescendo nos últimos anos. Embora o impacto clínico da terapia celular em medicina veterinária seja menor em comparação com seu impacto na medicina humana, a caracterização de células-tronco (CT) de diversos tecidos de várias espécies seguida por um número crescente de estudos pré-clínicos, levou ao uso relativamente disseminado das CT em terapias celulares na medicina veterinária clínica (1).

As células-tronco (CT) são definidas como células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversos tipos celulares (2,3,4). São classificadas pela sua origem em embrionárias, adultas (3,5) e pluripotentes induzidas (iPS) (6), e pelo seu potencial de diferenciação celular em totipotentes, pluripotentes e multipotentes (7).

As células-tronco mesenquimais (MSC) podem ser definidas como células-tronco adultas, multipotentes, capazes de dar origem a uma série de tipos celulares diferenciados. Inicialmente foram descritas por Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina (8) como precursores de fibroblastos da medula óssea.

Para padronizar as MSC, a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT), propôs três critérios mínimos para sua definição: as células devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura, apresentar a expressão de alguns marcadores de superfície (CD105, CD73 e CD90) e a expressão reduzida de outros marcadores (CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II), e as células devem ser capazes de se diferenciar *in vitro* em pelo menos três linhagens celulares (osteoblastos, adipócitos e condroblastos) (9).

A polpa dentária contém uma população de células-tronco com localização perivascular e potencial de diferenciação em múltiplas linhagens semelhante à MSC obtidas a partir de outros tecidos. Em humanos, as células-tronco derivadas da polpa dentária (DPSC) podem ser isoladas de terceiros molares e dentes decíduos que normalmente são descartados, não sendo necessária uma cirurgia extra para sua obtenção. Em cães, não existe a prática de retirada do terceiro molar, sendo utilizado para isolamento das DPSC, geralmente, dentes de cães submetidos à eutanásia ou que vieram a óbito.

DPSC apresentam alto número de unidades formadoras de colônias, alta taxa de proliferação, quando comparadas com MSC derivadas de medula óssea, e maior tempo de sobrevivência (10). Além disso, elas expressam marcadores neuronais mesmo antes de induzidas a diferenciação neuronal (11). Isso faz das DPSC uma excelente candidata para estudos com doenças e traumas neuronais.

Outra fonte de MSC muito utilizada são as derivadas do cordão umbilical, onde sua coleta é menos invasiva quando comparada a coleta da medula óssea, que além de dolorosa pode trazer riscos a saúde do paciente (12). Além disso, as células-tronco derivadas do cordão umbilical têm uma vantagem, uma vez que elas entram em senescência mais tardiamente quando comparadas com as células derivadas de medula óssea, demonstrando assim serem mais resistentes (12,13).

Fontes de MSC, como a polpa de dente e o tecido de cordão umbilical, estão sendo exploradas na medicina regenerativa humana e já demonstraram resultados promissores em estudos pré-clínicos e clínicos.

Com isso, esse trabalho visou realizar a caracterização imunofenotípica das células-tronco derivadas de polpa dentária canina (cDPSC) e das MSC do tecido do cordão umbilical canino (cUCSC) utilizando um painel padrão para MSC e realizar a diferenciação destas em três linhagens celulares: condrócitos, adipócitos e osteoblastos. O campo de medicina regenerativa em animais de companhia tem crescido nos últimos anos, e com isso a necessidade de estudar novas fontes, menos invasivas e que usualmente são descartadas.

Material e métodos

Coleta e isolamento das MSC

Este estudo teve início após a aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da PUCPR (Registro nº 01211/2018 – ANEXO 1). Foram coletadas três amostras de polpa dentária e três amostras de cordão umbilical de cães. Todas as amostras foram coletadas após o preenchimento do termo de consentimento.

As amostras de cordão umbilical foram coletadas em clínicas particulares sob aprovação do proprietário do cão. As amostras vieram de

recém-nascidos, de mães e pais saudáveis, e foram excluídos cordões umbilicais de natimortos.

As amostras de dentes foram coletadas de pacientes que vieram a óbito na Clínica Veterinária Escola da PUCPR. As amostras vieram de cães sem raça definida (SRD), adultos jovens, e foram coletados logo após o óbito. Foram utilizados apenas dentes que não estavam com a polpa dentária comprometida, e os cães não possuíam no seu histórico doença infecciosa, endócrina, neoplásica ou afecção da cavidade oral, exceto periodontite leve.

Para o isolamento das células do cordão umbilical (cUCSC) foi realizada a dissociação mecânica seguida de dissociação enzimática. O cordão umbilical foi lavado com salina fosfatada (PBS) e 1% de uma solução de penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Gibco, USA), seguido por dissociação mecânica e enzimática com colagenase tipo II (Gibco, USA). O material foi mantido em estufa a 37°C por 16 horas sob homogeneização constante. Após este período o material foi lavado com PBS e foi realizada a segunda etapa da digestão enzimática com uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco, USA) durante 15 minutos em estufa a 37°C. Logo após foi realizada a interrupção da ação enzimática e o botão de células foi plaqueado em frascos de cultivo celular, em meio Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) (Gibco, USA), soro bovino fetal 20% (SBF) (Gibco, USA).

Para o isolamento das cDPSC, o conteúdo da polpa dentária foi removido e transferido para um frasco contendo meio de cultura IMDM, penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100µg/ml), além de heparina (5000 U/ml). O dente foi retirado do frasco de coleta e lavado em PBS e 1% de uma solução de penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Gibco, USA). Em placa de petri, os fragmentos de polpa dentária foram removidos com auxílio de uma lima endodôntica. A suspensão celular foi dissociada pela ação da enzima colagenase tipo II, sob agitação constante, a 37°C, por uma hora e centrifugada em PBS. As células foram então ressuspensas e plaqueadas em frascos com meio de cultura suplementado com penicilina (100unidades/ml) e estreptomicina (100µg/ml) e SBF 20%.

As células foram mantidas em estufa com 5% de tensão de CO₂, 37°C e 95% de umidade. A troca de meio de cultura foi realizada de acordo com a proliferação e confluência celular. Quando as culturas atingiram cerca de 80%-

90% de confluência, as células foram então dissociadas utilizando tripsina/EDTA 0,25% por 5 minutos, centrifugadas, contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas (passagem 1).

Diferenciação celular

Após o isolamento e a expansão das cDPSC e cUCSC, as duas fontes foram diferenciadas em adipócitos, osteoblastos e condroblastos.

Para as diferenciações osteogênica e adipogênica, as MSC das duas fontes foram plaqueadas em triplicata, em placas de 24 poços sobre lamínulas. As células foram incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ até atingirem uma confluência de 80%. Para a placa controle as células foram cultivadas com IMDM e 15% de SBF e para a placa de diferenciação foram adicionados 500 µL de meio de diferenciação adipogênica e osteogênica (Lonza, USA). As trocas de meio foram realizadas três vezes por semana, durante três semanas para a diferenciação adipogênica e durante uma semana para osteogênica. Após a diferenciação adipogênica foi feita a coloração com Oil Red O (Sigma Aldrich, USA), para a visualização dos vacúolos lipídicos. Para a diferenciação osteogênica, após a fixação, foi adicionado às células vermelho de alizarina S (Sigma Aldrich, USA) para avaliar a presença de cristais de cálcio.

Para a diferenciação condrogênica foi realizada a cultura em micromassa para as cDPSC e cUCSC. Cerca de 1×10^6 células em meio de cultura foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos, em um tubo cônico para formar uma massa celular. Para o tubo controle as células foram cultivadas com IMDM e 15% de SBF e para o tubo de diferenciação foi adicionado 1 ml de meio de diferenciação condrogênica (Lonza, USA) e as células foram cultivadas durante 21 dias. O meio foi trocado três vezes por semana. Após este período, o agregado celular foi fixado com formaldeído a 10%, desidratado e embocado em parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram corados com solução de azul de toluidina (Sigma Aldrich, USA) para demonstrar a presença de proteoglicanas na matriz extracelular e vacuolos ao redor de condrócitos jovens.

Caracterização imunofenotípica

Para a caracterização imunofenotípica das MSC, anticorpos comerciais foram utilizados para analisar a expressão dos marcadores de superfície celular (Quadro 1). Para a marcação, as células foram lavadas com PBS e na sequência incubadas no escuro durante 30 minutos com os anticorpos específicos conjugados a fluorocromos. As células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 500 µL de uma solução contendo 1% de formaldeído. Anticorpos isotípicos IgG1 foram utilizados como controle. Aproximadamente 1×10^5 células foram adquiridas no Citômetro de Fluxo BD FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, USA) e analisadas pelo software FlowJo v8.0.2 (Tree Star, Ashland, USA). O painel de anticorpos foi utilizado de acordo com o apresentado no Quadro 1 e anticorpos isotípicos IgG1 de camundongo foram utilizados como controle.

Quadro 1. Lista de anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das amostras de células-tronco derivadas de polpa dentária canina (cDPSC) e células-tronco derivadas de tecido do cordão umbilical canino (cUCSC) com os seus respectivos fluorocromos, marcas, clones e a espécie alvo.

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Clone	Espécie alvo
CD14	APC	BD Pharmingen	M5E2	Humano, <i>Rhesus</i> , <i>Cynomolgus</i> , Babuino, Cão
CD29	PE	Abcam	MEM-101A	Cão
CD34	PE	eBioscience	1H6	Cão
CD44	Alexa	ABD Serotec	YKIX337.8.7	Cão
CD45	FITC	eBioscience	YKIX716.13	Cão
HLA-DR	PerCP	BD Pharmingen	TU36	Humano, <i>Rhesus</i> , <i>Cynomolgus</i> , Babuino, Cão, Coelho
7-AAD	-	BD Pharmingen	-	-
Anexina	PE	BD Pharmingen	-	-

Ensaio de unidades formadoras de colônias

Para o ensaio de unidades formadoras de colônias foram utilizadas células na passagem 3, onde 300 células foram plaqueadas em triplicata em

placa de seis poços. Essas células foram cultivadas com meio IMDM + 20% de SBF durante sete dias e então fixadas e coradas com o metanol e violeta cristal (Sigma Aldrich, USA). As colônias foram contadas utilizando um microscópio estereoscópico. Foram consideradas colônias agrupamentos com 50 ou mais células. Para obter a porcentagem de unidades formadoras de colônias foi realizado o seguinte cálculo: média da contagem da triplicata dividido pelo número de células plaqueadas (300) multiplicado por 100.

Ensaio de proliferação

Para o ensaio de proliferação, 1×10^4 células foram plaqueadas em placas de seis poços em triplicata e cultivadas durante cinco dias. No terceiro dia foi realizada a troca de meio de cultura (IMDM suplementado com 15% de soro bovino fetal. Ao final do quinto dia, foi realizada a dissociação enzimática das células e a contagem utilizando câmara de Neubauer. A taxa de proliferação foi feita dividindo a média de contagem das triplicatas pelo número de células plaqueadas (1×10^4).

Resultados

Cultivo, isolamento e diferenciação

Sob as condições de cultivo as cDPSC e as cUCSC apresentaram morfologia fibroblastoide e aderência ao plástico, características das MSC (Figura 2).

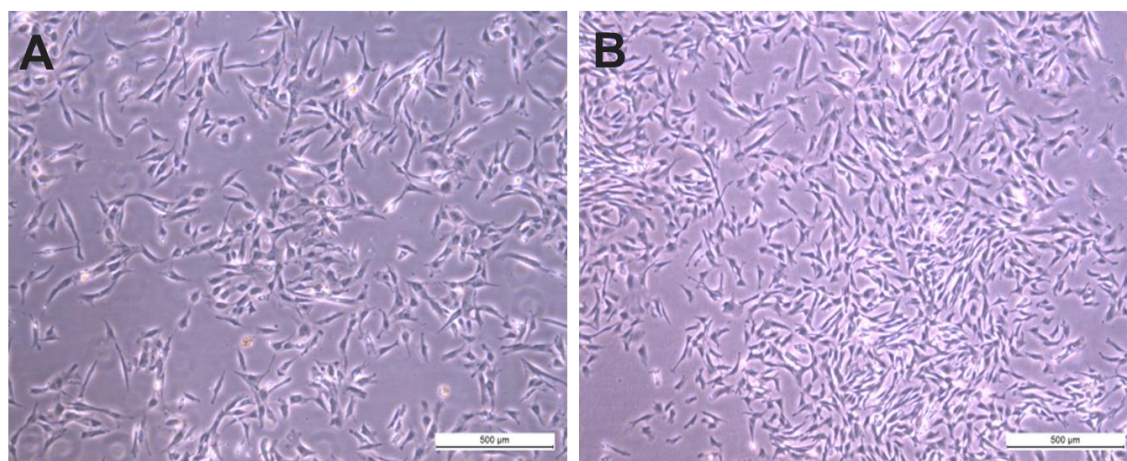


Figura 2. Imagem representativa das células-tronco derivadas de tecido do cordão umbilical de cão (cUCSC) e células-tronco derivadas de polpa dentária de cão (cDPSC). (A) cUCSC em cultivo na passagem 3 apresentando morfologia fibroblastoide e aderência ao plástico. (B) cDPSC em cultivo na passagem 3 apresentando morfologia fibroblastoide e aderência ao plástico. Aumento: 50x.

Na diferenciação adipogênica foi possível visualizar os vacúolos lipídicos no interior das células induzidas a diferenciação. Nas células tratadas com meio de diferenciação osteogênica foi possível observar a presença de cristais de cálcio. Nos ensaios de diferenciação condrogênica, foi possível observar a presença de proteoglicanas na matriz cartilaginosa e lacunas ao redor dos condrócitos jovens (Figura 3).

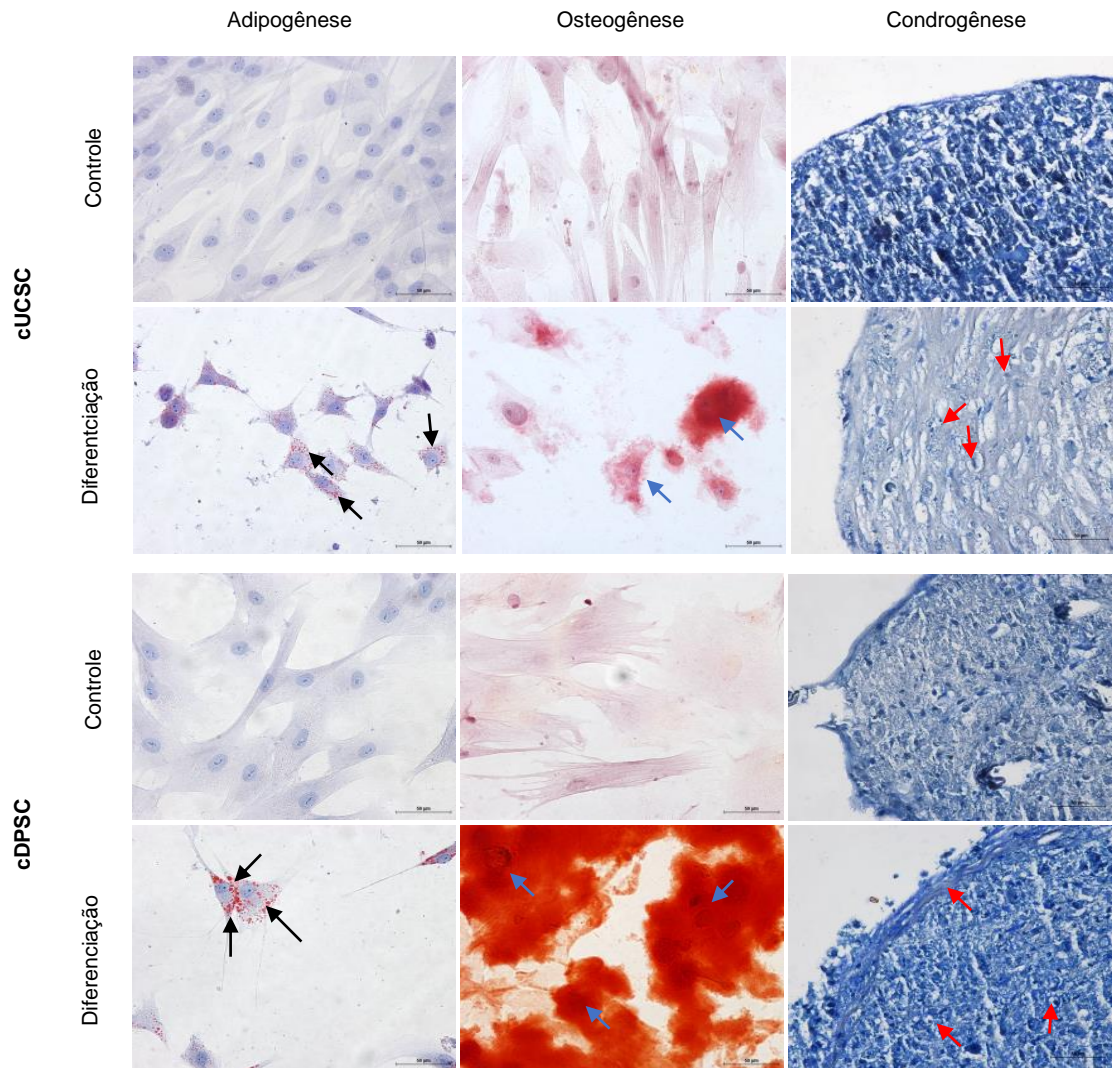


Figura 3. Imagem representativa da diferenciação *in vitro* de células-tronco derivadas de tecido do cordão umbilical de cão (cUCSC) e células-tronco derivadas de polpa dentária de cão (cDPSC). Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das cDPSCs e cUCSC com seus respectivos controles. As setas pretas representam vacúolos lipídicos da diferenciação adipogênica. As setas azuis representam a formação de cristais de cálcio da diferenciação osteogênica. As setas vermelhas representam a deposição de proteoglicanos e as lacunas ao redor dos condrócitos jovens na diferenciação condrogênica. No controle das cDPSC e cUCSC não foi possível identificar nenhuma característica de diferenciação. Aumento: 400x.

Caracterização imunofenotípica

Ambas as amostras de cDPSC e cUCSC apresentaram positividade para CD29 e CD44 e negatividade para CD14, CD45, CD34 e HLA-DR (Quadro 2 e Figura 4). Quanto ao 7-AAD e anexina, tanto a cDPSC quanto as cUCSC apresentaram baixas taxas de mortalidade (1,61% e 0,5% respectivamente) e de apoptose (1,67% e 1,38% respectivamente) (Figura 4).

Quadro 2. Quadro representativo dos resultados da caracterização imunofenotípica das células-tronco derivadas de tecido do cordão umbilical de cão (cUCSC) e células-tronco derivadas de polpa dentária de cão (cDPSC). Nota-se padrão de positividade para CD29 e CD44 e negatividade para CD14, CD45, CD34 e HLA-DR.

	cDPSC	cUCSC
CD29	99,4%	99,6%
CD44	41,3%	58,1%
CD14	0,72%	0,26%
CD45	0,42%	0,4%
CD34	1,36%	3,76%
HLA-DR	0,23%	0,18%

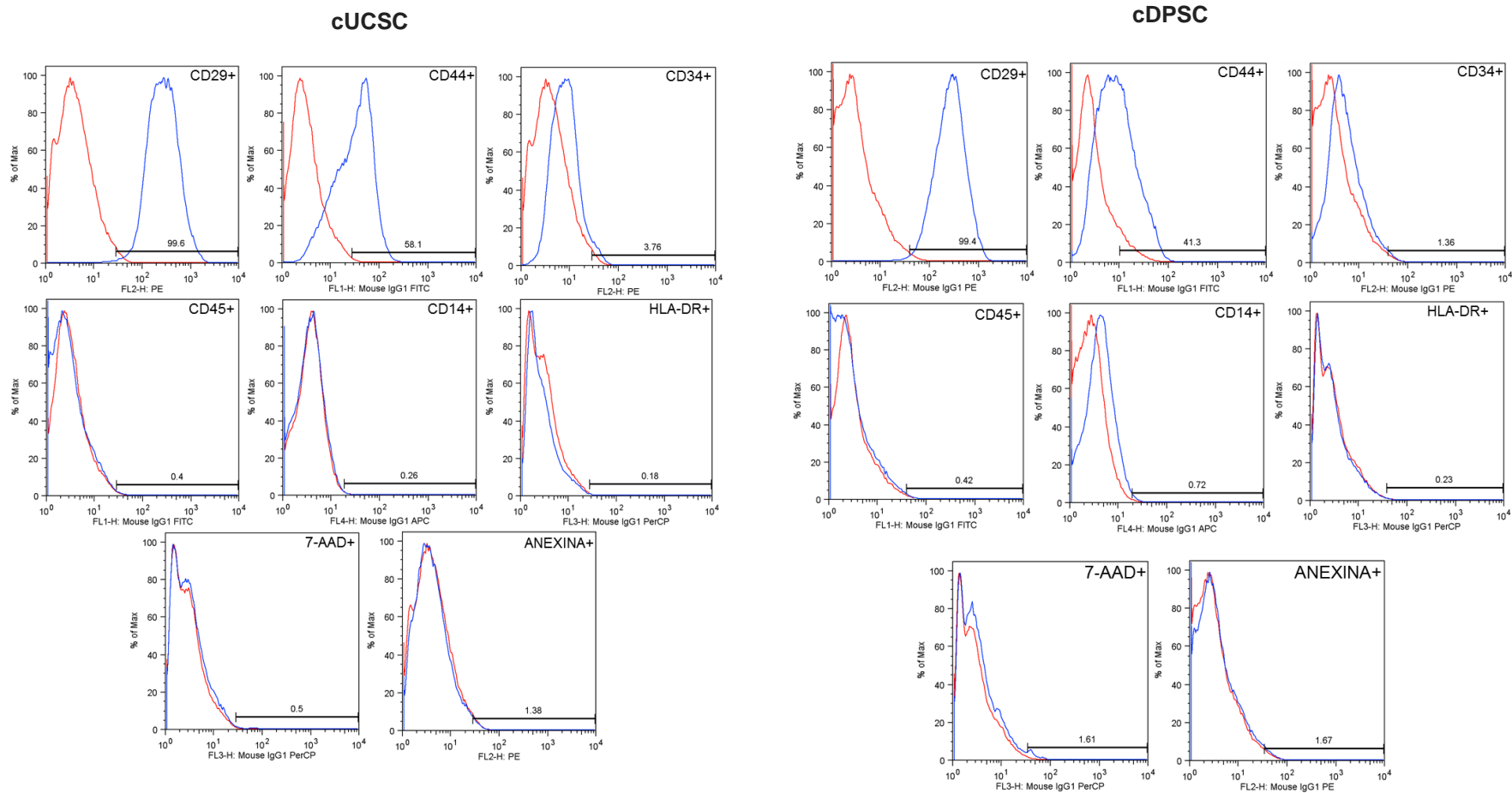


Figura 4. Amostra representativa da análise imunofenotípica por citometria de fluxo de células-tronco derivadas de tecido do cordão umbilical de cão (cUCSC) e células-tronco derivadas de polpa dentária de cão (cDPSC). Os histogramas em vermelho representam o controle isotópico (negativo) dos anticorpos e os histogramas em azul representam a porcentagem da população positiva para cada anticorpo.

Ensaio de proliferação e de unidades formadoras de colônias

Foi possível observar que na passagem 3, as cDPSC apresentaram menor porcentagem de unidades formadoras de colônias (4,55%) quando comparados com a cUCSC (5,64%) (Figura 5) com diferença estatística ($p=0,0002$) (Figura 6) e as cDPSC apresentaram uma menor taxa de proliferação (1,39x) que as cUCSC (2.14x) com diferença estatística ($p=0,0414$) (Figura 6).

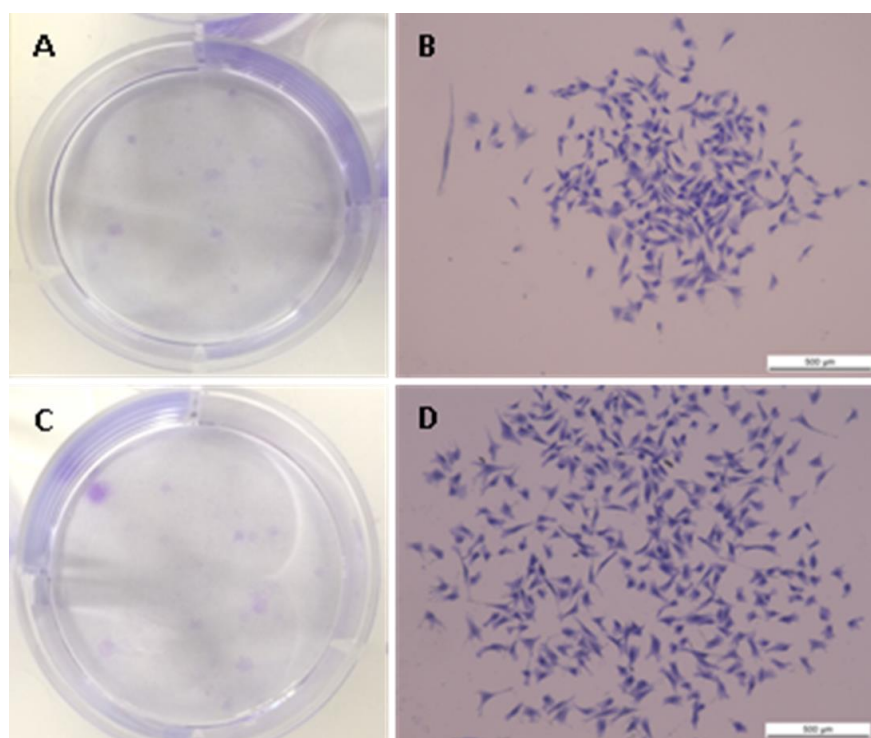


Figura 5. Imagens representativas de unidades formadoras de colônias das células-tronco derivadas de polpa dentária de cão (cDPSC) e células-tronco derivadas de tecido do cordão umbilical de cão (cUCSC). A. Colônias formadas por cDPSC B. Colônia de cDPSC em microscopia ótica aumento de 50x C. Colônias formadas por cUCSC. D. Colônias de cUCSC em microscopia ótica aumento de 50x.

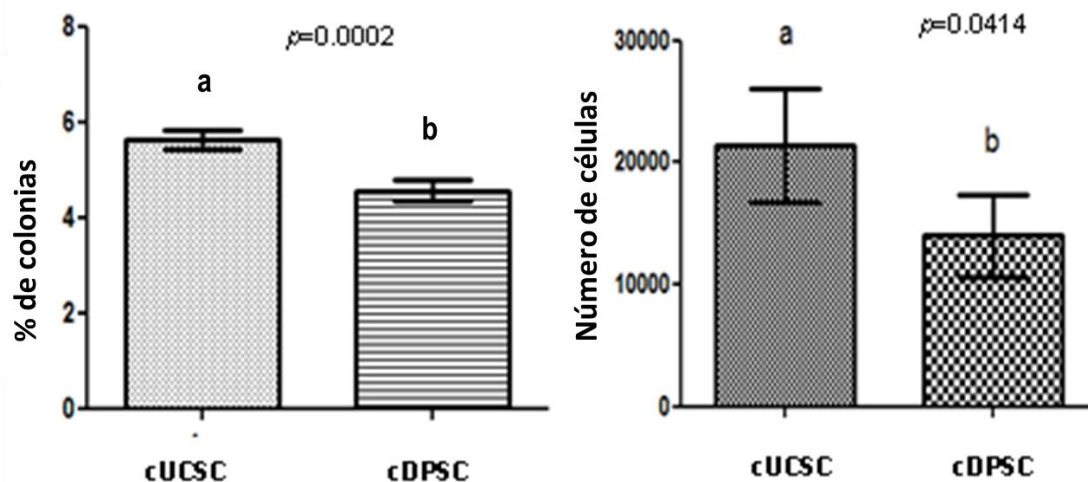


Figura 6. Unidades formadoras de colônias e proliferação celular. A. Comparação da porcentagem de unidades formadoras de colônias de células-tronco derivadas de tecido do cordão umbilical canino (cUCSC) e células-tronco derivadas de polpa dentária canina (cDPSC) na passagem 3. B. Comparação de taxa de proliferação de cUCSC e cDPSC.

DISCUSSÃO

O presente estudo descreveu o isolamento e a caracterização de células-tronco caninas de duas fontes diferentes, a polpa dentária e o tecido do cordão umbilical. Para o isolamento dessas células foram utilizados os mesmos protocolos de isolamento de polpa dentária (14) e cordão umbilical humano (15). Foram utilizadas células entre as passagens 3 e 4, pois nessas passagens o cultivo já é mais homogêneo, livre de outros tipos celulares.

Os três critérios mínimos padronizados pela ISCT (9) para definir uma MSC são aderência ao plástico, diferenciação em pelo menos três linhagens celulares (osteoblastos, condroblastos e adipócitos) e a expressão e não expressão de alguns marcadores de superfície celular específicos. Pode-se observar no presente estudo que tanto as cDPSC quanto as cUCSC apresentaram aderência ao plástico e se diferenciaram nas três linhagens propostas, apresentando assim as mesmas características das células-tronco humanas (16,17).

Na diferenciação osteogênica foi possível observar a formação de cristais de cálcio após sete dias utilizando a coloração vermelho de alizarina S. Dissanayaka et al. (18) também demonstraram essa diferenciação osteogênica em cDPSC em quatro semanas de diferenciação, porém os testes realizados demonstravam que

após uma semana as cDPSC já expressavam marcadores específicos de diferenciação osteogênica. As cUCSC também conseguiram se diferenciar na linhagem osteogênica, corroborando com os resultados encontrados por Pham et al. (20), porém em seu estudo a diferenciação foi realizada em 21 dias, diferente dos sete dias demonstrados no presente estudo. Uranio et al. (21) demonstraram que células-tronco da matriz do cordão umbilical de cães expressaram os marcadores osteogênicos, mesmo antes da indução da diferenciação.

Na diferenciação adipogênica, foi possível observar os vacúolos lipídicos no interior das cDPSC e cUCSC, embora a quantidade e tamanho desses vacúolos seja pequena. De acordo com os resultados obtidos por Dissanayaka et al. (18), o potencial adipogênico das cDPSC é inferior se comparado com as DPSC humanas. Para as cUCSC Uranio et al. (21) observaram a presença de lipídios no interior das células apenas após 25 dias.

Na diferenciação condrogênica, foi possível observar a deposição de proteoglicanos e as lacunas ao redor dos condrócitos jovens. Este trabalho corroborou com Dissanayaka et al. (18) que também observaram a diferenciação condrogênica em cDPSCs. Já nas cUCSC, Uranio et al. (21) também observaram com sucesso a condrogênese de células da mesma fonte em cães.

Quanto a expressão dos marcadores de superfície, foi possível observar que tanto as cDPSC quanto as cUCSC apresentaram o mesmo padrão de expressão, positividade para CD29 e CD44 e negatividade para CD14, CD45, CD34 e HLA-DR. O CD14 é um marcador característico de monócitos/macrófagos, o CD34 de progenitores hematopoéticos/células endoteliais e o CD45 (antígenos comuns de leucócitos) é um marcador de células hematopoéticas (22), com isso os resultados mostraram que as células presentes na cultura não são células derivadas do sangue, o que poderia determinar uma população de células mais heterogênea em cultivo. O CD44 é um marcador de matriz celular e o CD29 é um marcador de adesão (integrina) ambos apresentaram perfil imunofenotípico positivo corroborando com outros estudos utilizando DPSC e UCTSC de origem humana (23, 24). Quanto a expressão do antígeno HLA-DR (Classe II do Sistema HLA), as MSC expressam uma pequena porcentagem desses antígenos (25), o mesmo padrão observado neste trabalho. Zhan et al. 2019 (26), demonstrou esse mesmo padrão de

marcadores com positividade para CD44 e negatividade para CD14, CD45, CD34 e para MHC II (HLA-DR) em seu estudo de células-tronco mesenquimais de diferentes tecidos de cães.

Quanto a taxa de proliferação foi possível verificar diferença significativa, na passagem três as cDPSC obtiveram uma menor taxa de proliferação se comparada às cUCSC. O mesmo padrão foi observado nas unidades formadoras de colônias, onde as cDPSC também obtiveram menor porcentagem estatisticamente significativa de unidades formadoras de colônias, o que poderia justificar a taxa de proliferação ser menor. Dissanayaka et al. (18) observaram que a taxa de proliferação e a porcentagem de colônias das cDPSC são bem menores se comparadas às hDPSC. Dissanayaka et al. (18) compararam a taxa de proliferação e de unidades formadoras de colônias de cDPSC, DPSC humanas e MSC de medula óssea humana e observou que as DPSC humanas obtiveram uma maior taxa de proliferação e uma maior quantidade de unidades formadoras de colônias quando comparada as outras. Isso também pode ter sido ocasionado pela fase de desenvolvimento dos tecidos, uma vez que o cordão umbilical é proveniente de um tecido mais precoce de desenvolvimento quando comparado com a polpa dentária.

Conclusão

Com os resultados obtidos foi possível concluir que as cDPSC e cUCSC apresentaram características de células-tronco mesenquimais, sendo capazes de se diferenciar nas três linhagens sugeridas pela ISCT. As cUCSC até a passagem três possuem uma maior taxa de proliferação e maior quantidade de unidades formadoras de colônias que as cDPSC. Os resultados demonstraram que estas células são fortes candidatas a terapia celular, pois apresentaram todas as características das MSC, além das fontes serem de fácil obtenção.

Conflito de interesse

Os autores declararam que não há conflito de interesses na publicação desse artigo.

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos

Agradeço a equipe do Núcleo de Tecnologia Celular (NTC - PUCPR) que auxiliou na execução desse estudo.

Referências

1. VOLK, S. W., & THEORET, C. Translating stem cell therapies: The role of companion animals in regenerative medicine. **Wound Repair and Regeneration**. (2013) 21(3): 382–394.
2. KRAUSE, D.S.; THEISE, N.D.; COLLECTOR, M.I.; HENEGARIU, O.; HWANG, S.; GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S.J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**. (2001) 105(3): 369-377.
3. FORTIER LA. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. **Veterinary Surgery**. (2005) 34:415–423.
4. MELTON, D.A.; COWEN, C. Stemness: Definition, Criteria, and Standards. In: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.; MELTON, D.; PEDERSEN, R.; THOMAS, E. D.; THOMSON, J.; WILMUT, S. I. (eds.). **Essentials of stem cell biology**. Oxford: Academic Press. (2009).
5. WOBUS AM, BOHELER KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiol Rev**. (2005) 85: 635–678.
6. TAKAHASHI K., SHINYA YAMANAKA S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**. (2006) 126: 663–676.
7. CARVALHO, A. C. C.; GOLDENBERG, R. C. S. G. Células-tronco mesenquimais: conceitos, métodos de obtenção e aplicações. 1 ed., São Paulo: Atheneu. (2012).
8. FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and Tissue Kinetics**. (1970) 3: 393–403.
9. DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; I. MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, DJ.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, **Cytotherapy**. (2006) 8(4):315–317.
10. ISOBE, Y.; KOYAMA, N.; NAKAO, K.; OSAWA, K.; IKENO, M.; YAMANAKA, S.; OKUBO, Y.; FUJIMURA, K.; BESSHO K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. (2015) 45: 124–130.

11. FOUDAH, D., MONFRINI, M., DONZELLI, E, NIADA S., ANBRINI, AT, ORCIANI M, TREDICI G, MILOSO M. Expression of Neural Markers by Undifferentiated Mesenchymal-Like Stem Cells from Different Sources. **J Immunol Res.** (2014) 987678,.
12. MAHMOOD R, SHAUKAT M AND CHOUDHERY MS. Biological properties of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, umbilical cord tissue and bone marrow. **AIMS Cell and Tissue Engineering.** (2018) 2(2): 78–90.
13. VIDAL MA, WALKER NJ, NAPOLI E, BORJESSON DL. Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Tissue. **Stem Cells Dev.** (2012) 21: 273–283.
14. KARAMZADEH, R., ESLAMINEJAD, M.B., AFLATOONIAN, R. Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods. **J. Vis. Exp.** (2012) (69), e.4372.
15. HAN YF, TAO R, SUN TJ, CHAI JK, XU G, LIU J. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. **Cytotechnolog.** (2013) 65:819-827.
16. ZHANG, W., WALBOOMERS, X. F., SHI, S., FAN, M., & JANSEN, J. A. Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation. **Tissue Engineering.** (2006) 12(10): 2813–2823.
17. JO YY, LEE HJ, KOOK SY, CHOUNG HW, PARK JY, CHUNG JH, CHOUNG YH, KIM ES, YANG HC, CHOUNG PH. Isolation and Characterization of Postnatal Stem Cells from Human Dental Tissues. **Tissue Engineering.** (2007) 13(4): 767–773.
18. DISSANAYAKA WL, ZHU X, ZHANG C, JIN L. Characterization of Dental Pulp Stem Cells Isolated from Canine Premolars. **Journal of Endodontics.** (2011) 37(8):1074-1080.
19. POLTAVTSEVA, RA, NIKONOVA, YA, SELEZNEVA, II, YAROSLAVTSEVA, AK, STEPANENKO, VN, ESIPOV, RS, PAVLOVICH SV, KLIMANTSEV IV, TYUTYUNNIK NV, GREBENNIK TK, NIKOLAEVA AV, SUKHIKH, GT. Mesenchymal Stem Cells from Human Dental Pulp: Isolation, Characteristics, and Potencies of Targeted Differentiation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** (2014) 158(1):164–169.
20. PHAM PV, TRUONG NC, LE PTB, TRAN, TDX, VU, NB, BUI, KHT, PHAN, NK. Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal

- stem cells for clinical applications. **Cell and Tissue Banking**. (2016) 17(2):289–302.
21. URANIO MF, VALENTINI L, LANGE-CONSIGLIO A, CAIRA M, GUARICCI AC, L'ABBATE A., CATAACCHIO CR, VENTURA M, CREMONESI F, DELL'AQUILA ME. Isolation, Proliferation, Cytogenetic, and Molecular Characterization and In Vitro Differentiation Potency of Canine Stem Cells From Foetal Adnexa: A Comparative Study of Amniotic Fluid, Amnion, and Umbilical Cord Matrix. **Mol. Reprod. Dev.** (2011) 78: 361–373.
 22. GRONTHOS S., MANKANI M., BRAHIM J., ROBEY P. G., SHI S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **PNAS**. (2000) 97(25):13625–13630.
 23. ALSULAIMANI RS, AJLAN SA, ALDAHMAH AM, ALNABAHEEN MS, ASHRI NY. Isolation of dental pulp stem cells from a single donor and characterization of their ability to differentiate after 2 years of cryopreservation. **Saudi Med J**. (2016) 37(5):551-60.
 24. CHANG YH, WU KC, LIU HW, CHU TY, DING DC. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells reduce monosodium iodoacetate-induced apoptosis in cartilage. **Tzu Chi Medical Journal**; (2018) 30(2):71-80.
 25. KRAMPERA M, FRANCHINI M, PIZZOLO G, APRILI G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. **Blood Transfusion**; (2007) 5:120-129.
 26. ZHAN XS, EL-ASHRAM S, LUO DZ, LUO HN, WANG BY, CHEN SF, BAI YS, CHEN ZS, LIU CY, JI HQ. A Comparative Study of Biological Characteristics and Transcriptome Profiles of Mesenchymal Stem Cells from Different Canine Tissues. **International Journal of Molecular Sciences**. (2019) 20(6).

CAPITULO 3

Cytotoxicity of fluconazole on canine dental pulp-derived stem cells

Paulo Henrique Utumi¹, Letícia Fracaro², Felipe Yukio Ishikawa Fragoso², Lidiane Maria Boldrini Leite², Paula Joly dos Santos³, José Ademar Villanova Jr¹, Alexandra Cristina Senegaglia².

Affiliations:

¹ Postgraduate Program in Animal Science - Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) – Curitiba, Paraná, Brazil

² Core for Cell Technology - Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) – Curitiba, Paraná, Brazil

³ Undergraduate in Veterinary Medicine - Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) – Curitiba, Paraná, Brazil

Paulo Henrique Utumi – utumipr@hotmail.com

Letícia Fracaro – leticiafracaro@gmail.com

Felipe Yukio Ishikawa Fragoso - yukio.ishikawa@gmail.com

Lidiane Maria Boldrini Leite - lidiane.leite@pucpr.br

Paula Joly dos Santos - paula_joly_ds@hotmail.com

José Ademar Villanova Jr - jose.villanova@pucpr.br

Alexandra Cristina Senegaglia – alexandra.senegaglia@pucpr.br

Corresponding author: Alexandra Cristina Senegaglia – alexandra.senegaglia@pucpr.br

Pontifical Catholic University of Paraná

Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba Paraná, Brazil - 80215-901

Highlights

- Fluconazole in collection medium prevented fungal contamination in cDPSC cultures
- Fluconazole at 120 or 240 µg/ml did not change cDPSC proliferation
- Fluconazole at 240 µg/ml decreased cDPSC viability when compared to control.

Abstract

Canine dental pulp-derived mesenchymal stem cells (cDPSCs) are adult, multipotent cells, able to self-renew and differentiate into multiple lineages. Fungal control in stem cell culture is not widely used. Fluconazole is a fungicide that inhibits synthesis of ergosterol and compared to amphotericin B shows the same efficacy against fungi of the *Candida* genus, with fewer adverse effects. The aim in this study was to determine if fluconazole in collection medium is cytotoxic or alters the proliferation and viability of cDPSCs. Samples from permanent teeth were collected in a sterile tube with IMDM, penicillin, streptomycin, sodium heparin and multiple concentrations of fluconazole. Dental pulp was digested with collagenase type II and expanded *in vitro*. After 12 days of cultivation, enzymatic dissociation was performed to quantify, differentiate, and characterize the cDPSCs. Cytotoxicity was evaluated using 7-AAD dye. Characterization of cDPSCs showed that fluconazole had no influence on immunophenotypic characteristics and differentiation. Cell proliferation assay showed that fluconazole did not significantly alter the replication capacity of cDPSCs. Cytotoxicity analysis showed the highest concentration of fluconazole used (240 µg/ml) had a higher proportion of non-viable cells. Thus, to prevent contamination and sample loss during expansion while maintaining minimal cell toxicity, we suggest the addition of fluconazole at a concentration of 120 µg/ml to cDPSCs collection medium.

Keywords: Mesenchymal Stem cells, Cell Expansion, Viability, Proliferation

Introduction

Stem cells (SCs) are undifferentiated and functionally defined as cells capable of self-renewal and to differentiate into multiple cell lineages (Melton et al., 2009). Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult, multipotent cells that are able to differentiate into several differentiated cell types such as adipocytes, chondrocytes, osteoblasts, myoblasts, and astrocytes (Antonitsis et al, 2007). They were first described by Friedenstein, Chailakhjan and Lalykina (1970) as fibroblast precursors from bone marrow. MSCs have both perivascular locations (Meirelles et al., 2008); they can be isolated from multiple sources including bone marrow (Lee et al, 2004), placenta, amnion, umbilical cord, umbilical cord blood (Hass et al, 2011), dental pulp (Shi et al, 2005), and adipose tissue (Fraser et al, 2006). MSCs from dental pulp (DPSC) are interesting candidates for regenerative medicine protocols (Fracaro et al, 2019). Their collection is minimally invasive, the biological material would be normally discarded (Cordeiro et al, 2008), and these cells can be isolated, expanded *in vitro*, and characterized (Rebelatto et al, 2008). Dental pulp has stem cells with perivascular location and similar potential compared to MSCs from other sources. They also have higher proliferation rates, when compared to MSCs from bone marrow (Isobe et al, 2015).

The oral environment is naturally septic, with bacteria, fungi, and protozoa typically present (Estrela, 2004). Periodontal diseases are caused by multiple factors; however, bacterial plaque is the primary etiologic agent responsible for most oral infections (Domingues et al, 1999). Dental plaque are formed in the surface of enamel. Typically, it is associated with poor oral hygiene, as food debris is an excellent substrate for bacterial growth (Ferro et al, 2008).

Since dogs are rarely subjected to stringent and routine oral hygiene, bacterial plaques form readily. The exposure of teeth to several contaminants can hinder canine DPSCs isolation and expansion *in vitro*. Frias et al. (2018) identified yeast fungi of the genera *Candida* and *Malassezia* on the oral mucosa of dogs. Santin et al. (2013) showed that *M. pachydermatis* and *Candida* spp. are part of the normal microbiota of different regions of the canine oral cavity, being isolated in a greater proportion of animals affected by halitosis, suggesting that these fungi play an important role in compromising the oral health of dogs. Carreira et. al. (2015) found that in older animals, there was an accumulation of bacterial plaque and a higher incidence of periodontitis, due to age-related reductions in the immune response.

Cell culture contamination is a real problem often found in stem cell biology and therapeutics. Many strategies are used to decrease contamination in cell culture (Luisi et al, 2008), including amphotericin B, penicillin/streptomycin (Shirakawa et al, 1994; Tjaderhane et al, 1998), or penicillin/streptomycin added to nystatin and amphotericin B (Palossari et al, 2000).

Fluconazole is an antifungal drug used alone or in combination with other drugs, because it has a wide spectrum (Santos et al, 2005). Fluconazole exerts its antifungal activity by inhibiting fungal ergosterol synthesis at one of the final steps of its biosynthesis, which will consequently cause loss of integrity of the fungal membrane (Walsh et al, 1997). Therefore, it can be used in tooth collection and cDPSCs culture. Compared to other fungicides commonly used in cell culture such as amphotericin B, fluconazole shows similar efficacy against fungi of the *Candida* genus, but with fewer adverse effects (Rex et al, 2003; Pappas et al, 2016). Nevertheless, few studies have used it or defined doses for its use in stem cell culture. It is therefore important to evaluate the efficacy of fluconazole use in standardized methods of collection and isolation of cDPSCs.

This study aimed to evaluate if different concentrations of fluconazole in collection medium of canine teeth are toxic or affect cell proliferation and viability of cDPSC.

Methods

Sample collection

This study was approved by the Pontifical Catholic University of Paraná Ethics Committee for Animal Use (registry number 01211/2018). Teeth were extracted from dogs after their owners signed consent forms. Three permanent canine teeth were obtained from three dogs, totalizing nine samples. Samples were collected from young adult, without breed defined dogs immediately after death. Only teeth with undamaged dental pulp were used. Dogs which did not have infectious disease, endocrine, neoplastic or infection of oral cavity, except from mild periodontitis, in their medical history.

Canine teeth were extracted with dental surgical instruments, then washed with 0.12% chlorhexidine gluconate (Periogard® Colgate, São Paulo, Brazil) and cut in half with a dental burr to expose the pulp. The pulp was removed and transferred to a sterile conical tube with Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA), supplemented with 1% penicillin (100U/ml) and streptomycin

(100µg/ml) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA) and 5000U/ml sodium heparin (Hemofol, Cristália, São Paulo, Brazil).

Two different fluconazole (Isofarma, Eusébio, Brazil) concentrations of 120µg/ml (F120), 240µg/ml (F240) and a without fluconazole control (WFC) were used in sample collection medium to assess its influence on cell viability (Figure 1). After collection, the teeth were immediately taken to the laboratory for isolation of stem cells.

Cell isolation and expansion

Before pulp collection, teeth were washed twice in phosphate buffer saline solution (PBS) (Gibco Invitrogen, Carlsbad USA) with 1% penicillin/streptomycin. Fragments of dental pulp were collected with an endodontic file and canine dental pulp stem cells (cDPSCs) were isolated by enzymatic digestion with 10 ml of collagenase type II solution in PBS (0.0048 g/ml) (Invitrogen, Carlsbad, USA), under constant stirring at 37°C for 1 h. cDPSCs were plated in a 25cm² culture flask with IMDM supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 20% fetal bovine serum (FBS) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA), and maintained in an incubator supplied with a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Medium replacement was performed every three days. When cultures reached about 80% -90% confluency, the cells were then dissociated using 0.25% trypsin / EDTA for 5 minutes, centrifuged, counted in Neubauer's chamber and replated (Passage 1).

Characterization of cDPSCs

Cells were differentiated into three cell lineages (osteogenic, adipogenic and chondrogenic) and immunophenotypically by flow cytometry. For adipogenic and osteogenic differentiation, cDPSCs were plated in triplicate, and cultured with specific differentiation media (Lonza, Walkersville, USA). Medium replacement was performed three times per week. After 21 days of adipogenic differentiation induction, samples were stained with Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to evaluate the presence of lipid vacuoles. After seven days of osteogenic differentiation induction, samples were stained with Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to evaluate the presence of calcium crystals. The micromass culture was used for chondrogenic differentiation. Samples were cultured for 21 days with chondrogenic differentiation medium (Lonza, St. Louis, USA). Medium was replaced three times per week. Cellular aggregates were

fixed and stained with toluidine blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), to observe the presence of mucopolysaccharide in the extracellular matrix.

Immunophenotypic characterization was performed by flow cytometry. Commercial antibodies were used for analyzing the expression of cell surface markers (Table 1). For that, cells were washed with PBS and incubated in the dark for 30 minutes with antibody. Cells were washed with buffer and fixed with 500 μ l of 1% formaldehyde. IgG1 isotypic antibodies were used as control. Samples were acquired (approximately 100,000 cells) in BD FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, USA) and data were analyzed by FlowJo software v8.0.2 (Tree Star, Ashland, USA).

Cell proliferation assay

Cell counts are important for monitoring cell health and proliferation rate. On the 12th day of culture, the cell proliferation assay was performed to determine if fluconazole had an effect on the normal growth of cDPSCs. Enzymatic dissociation of the cDPSCs was performed using 0.25% trypsin/EDTA (Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA), followed by counting using a hemocytometer (Neubauer's Chamber).

Cell toxicity analysis

The 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (BD Pharmingen, San Jose, USA) is a fluorescent dye with high affinity for DNA and is used as a cell viability dye. Cells with compromised membranes stain with 7-AAD, evidencing non-viable cells. Shortly after cellular dissociation, 7-AAD was added to 1×10^5 cells and incubated for 30 min at room temperature ($\sim 22^\circ\text{C}$). Fluorescence was measured in BD FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, USA) and data were analyzed with FlowJo Version 8.0.2 (Tree Star, Ashland, USA).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm standard deviations. Levine's test, one-way ANOVA, and Tukey's multiple comparison test were used for statistical analysis. The statistical significance level used was less than 0.05. All calculations were made using Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) version 5.0 for Windows.

Results

Cell isolation and expansion

One of the three samples collected without fluconazole (WFC group) contaminated with fungal in the first 24 hours. None of the samples collected with fluconazole became contaminated. By day 3 after isolation, we observed small colonies of cDPSCs, and the culture still showed many cellular debris. By day 7, with the changes of culture medium, it was possible to observe the culture much cleaner and free of cellular debris. By day 12 it was observed larger, and more developed colonies (Figure 2). As expected, in culture all groups presented a fibroblast-like cell morphology and adhesion to plastic. None of the three groups (WFC, F120, and F240) showed qualitative differences in their morphology or early growth kinetics.

cDPSC characterization

After adipogenic differentiation induction, was visualized lipid vacuoles within the cells. In osteogenic differentiation we observed the presence of calcium crystals. In chondrogenic differentiation, was observed mucopolysaccharides in the cartilaginous matrix and gaps around the young chondrocytes. No differentiation characteristics was observed in cells cultured in control medium (IMDM + 15% FBS) (Figure 3A).

In immunophenotypic characterization by flow cytometry cDPSCs were positive for CD29 (99.7%) and CD44 (60.1%), and negative for CD14 (0.11%), CD45 (1.45%), CD34 (1.31%) and HLA-DR (0.45%) (Figure 3B). None of the three groups (WFC, F120, and F240) showed influence on these parameters.

Cell proliferation assay

In the analysis of cell proliferation, we observed that fluconazole did not affect proliferation of these cells (Table 2), since there were no statistical differences between the WFC group and the fluconazole groups ($P = 0.5142$) (Figure 4).

Cellular toxicity

An analysis of fluconazole cytotoxicity using 7-AAD dye showed that all groups had low mortality rates (Figure 5A). Statistical analysis indicated that the F240 group had a slight decrease in viability in comparison with WFC group. The F120 group, however, was not statistically different from the other two groups (Figure 5B). The comparison of WFC to F120 ($P = 0.1199$) and F120 to F240 ($P = 0.2104$) did not

produce statistically significant differences, but WFC to F240 ($P = 0.0354$) was statistically significant.

Discussion

For cDPSC isolation the protocol for human dental pulp isolation was used (Karamzadeh et al, 2012). For characterizations, cells were used in passages 3 and 4 before signs of senescence, besides that in these passages the cultures tend to be more homogeneous, free of other cell types.

According to the International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT), the three minimum criteria to define MSCs are adhesion to plastic, differentiation into at least three cell lineages (osteoblasts, chondroblasts and adipocytes), and the expression/non-expression of specific cell surface markers (Dominici et al, 2006). Was observed that all cDPSCs isolates presented adhesion to plastic and could be differentiated into the three cell lineages, thus presenting the same characteristics as human DPSCs (Zhang et al, 2006).

In osteogenic differentiation we observed the calcium crystal formation after 7 days. This calcium crystals accumulation in the cDPSCs after seven days of induction osteogenic differentiation can be explained by the high rate of expression of phosphatase alkaline (ALP) in these cells (Dissanayaka et al, 2011). ALP is an enzyme considered an osteogenic marker and studies have shown that it is possible to observe the activity of this enzyme even before the induction of osteogenic differentiation in DPSC (Poltavtseva et al, 2014). This demonstrates a ease for DPSCs to differentiate into osteogenic lineages. In adipogenic differentiation, was observed lipid vacuoles inside the cDPSCs, although both their number and size were small. According to Dissanayaka et al. (2011), the adipogenic potential of cDPSCs is lower than that of to human DPSCs. In chondrogenic differentiation, we observed the deposition of proteoglycans and gaps around the young chondrocytes. These observations are consistent with those of Dissanayaka et al. (2011) who also observed chondrogenic differentiation in cDPSCs.

Given the lack of some of the specific markers for dogs, it was not possible to assay for all of the markers listed by the ISCT (Dominici et al, 2006). Was did, however, observe that cDPSCs were positive for CD29 and CD44, and negative for CD14, CD45, CD34, and HLA-DR. CD14 is a characteristic monocyte/macrophage marker, CD34 is a marker for hematopoietic progenitors and endothelial cells, and CD45 is a common leukocyte antigens marker (Gronthos et al, 2000). These data

demonstrate that cDPSC cultures did not contain blood derived cells, which could determine a more heterogeneous cell population in culture. CD44 is a cell matrix marker and CD29 is an adhesion marker (integrin) both showed a positive immunophenotypic profile, consistent with a markers observed on human DPSCs (Alsulaimani et al, 2016). Was observed a small percentage of HLA-DR antigen expression (MHC class II cell surface receptor), studies demonstrate that MSCs expresses a small percentage of these antigens, the same observed in this study (Krampera et al, 2007).

The results of cell proliferation assays showed that fluconazole did not alter the normal cDPSC proliferation. De Logu et al. (2005) also found that high doses of fluconazole (1 mg/ml) for 72 h did not alter the metabolic activity of a kidney cell line, demonstrating that neither viability nor proliferation of these cells were not altered. Was verified in the results of viability tests using 7-AAD, a slightly higher proportion of non-viable cells at 240 µg/ml fluconazole, suggesting slight toxicity at increased concentrations. Although the F240 group showed a decrease in viable cells, with a statistical difference when compared to WFC, this decrease on the cell viability would not cause damage to the cultivation once cDPSCs presented a mean of 97% viability.

All procedures involving the isolation and expansion of stem cells are extremely expensive. Procedures that avoid wastage of samples in culture are very important to allow the wide development of this technology benefiting a larger number of patients. The contamination of one of the samples collected without fluconazole and no contamination in the samples with the different concentrations demonstrates the need to use the fungicide.

Conclusion

This study presented positive results regarding the use of fluconazole for fungal control in the collection of samples. Although there was an increase in cell mortality, it is still a low number of dead cells. Although it does not detract from its use, the samples with higher concentration of fluconazole (240 µg/ml) had a higher number of non-viable cells compared to those in the samples that did not receive fluconazole. Thus, in order to prevent contamination that causes loss of samples during expansion, maintaining minimal cytotoxicity, we suggest the addition of fluconazole at the concentration of 120µg/ml to the collection medium of cDPSC.

Acknowledgements

Acknowledgement for the team of Core for Cell Technology for assisted in the execution of this study and School of Veterinary Clinics both from Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) for the assistance of collecting the dogs' teeth.

Funding statement

This work was supported by Fundação Araucária and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Brazil - Finance Code 001.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this article.

References

1 - MELTON, D.A.; COWEN, C. Stemness: Definition, Criteria, and Standards. In: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.; MELTON, D.; PEDERSEN, R.; THOMAS, E. D.; THOMSON, J.; WILMUT, S. I. (eds.). Essentials of stem cell biology. Oxford: Academic Press, 2009.

2 - FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and Tissue Kinetics**, v.3, p.393–403, 1970.

3 - MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.

4 - LEE, R.H.; KIM, B.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H.; SUH, K.; BAE, Y.C.; JUNG, J.S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 14, p. 311-324, 2004.

5 - HASS, R.; KASPER, C.; BÖHM, S; JACOBS, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 12, 2011.

6 - SHI, S.; BARTOLD, P.M.; MIURA, M.; SEO, B.M.; ROBEY, P.G.; GRONTHOS, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 8, p.191-199, 2005. 7 - FRASER, J.K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M.H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 150-154, 2006.

8 - ANTONITSIS, P.; PAPAGIANNAKI, E.I.; KAIDOGLOU, A.; PAPAKONSTANTINOY, C. *In vitro* cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**. v. 6, p. 593- 597, 2007.

9- FRACARO L, SENEGAGLIA AC, CORREA A, BROFMAN PRS. Dental pulp-derived stem cells: a promising source for regenerative medicine. **Biomed J Sci & Tech Res** 15(1)-2019.

10 - CORDEIRO, M. M. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod.**, v.34, n.8, p.962-969, 2008.

11 - REBELATTO, C. K.; AGUIAR, A.M.; MORETÃO, M.P.; SENEGAGLIA, A. C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.;

MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V.F. ; BROFMAN, P.S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L.S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n.7, p.901-13, 2008.

12 - ISOBE, Y.; KOYAMA, N.; NAKAO, K.; OSAWA, K.; IKENO, M.; YAMANAKA, S.; OKUBO, Y.; FUJIMURA, K.; BESSHO K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.45, p.124–13, 2015.

13 - ESTRELA, Carlos, **Ciência Endodôntica**. São Paulo: Artes Médicas, 2004.

14 - DOMINGUES, L.M.; ALESSI, A.C.; CANOLA, J.C.; SEMPRINI, M. Tipo e frequência de alterações dentárias e periodontais em cães na região de Jaboticabal, SP. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 1999.

15 - FERRO, DG; CORREEA, HL; VENTURINI, M. Periodontia Veterinária (parte I): O peridonto e a moléstia periodontal. **Nosso Clínico**, 2008.

16 - FRIAS, DFR, KOZUSNY-ANDREANI, DI, PRINA, RM. Identificação da microbiota gengival de cães aparentemente hígidos. **Nucleus**, v.15, n.1, p. 129-136, 2018.

17 - SANTIN R, MATTEI AS, WALLER SB, MADRID IM, CLEFF MB, XAVIER MO, DE OLIVEIRA NOBRE M, NASCENTE PDA S, DE MELLO JR, MEIRELES MC. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.1, p.139-143, 2013.

18 - CARREIRA, M.L.; DIAS, D.; AZEVEDO, P. Relationship Between Gender, Age, and Weight and the Serum Ionized Calcium Variations in Dog Periodontal Disease Evolution. **Topics in Compar. An Med**, v. 30, P.51–56, 2015.

19 - LUISI, SB, BARBACHAN JJD, CHIES JAB, FILHO MS. Uso de anfotericina B como antifúngico no meio de cultura para células pulpares humanas. **Revista Odontologia**. v.23, p.58-62, 2008.

20 - SHIRAKAWA, M.; SHIBA, H.; NAKANISHI, K.; OGAWA, T.; OKAMOTO, H.; NAKASHIMA, K.; NOSHIRO, M.; KATO, Y. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. **J Dent Res**. 1994.

21 - TJADERHANE, L.; SALO, T.;LARJAVA, H.; LARMAS, M.; OVERALL, CM. A novel organ culture method to study the function of human odontoblastsin vitro: gelatinase expression by odontoblasts is differentially regulated by TGF-beta1. **J Dent Res.** 1998;

22 - PALOSSARI, H.; WAHLGREN, J.; LARMAS, M.; RONKA, H.; SORSA, T.; SALO, T.; TJADERHANE, L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. **J Dent Res.** 2000.

23 - SANTOS JR, I.D.; SOUZA, I.A.M.; BORGES, R.G.; SOUZA, L.B.S; SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, 2005.

24 - WALSH, T.J.; KASAI, M.; FRANCESCONI, A.; LANDSMAN, D.; CHANOCK, S.J. New evidence that *Candida albicans* possesses additional ATP-binding cassette MDR-like genes: implications for antifungal azole resistance. **J. Med. Vet. Mycol.**, 1997.

25 - REX JH, PAPPAS PG, KARCHMER AW, SOBEL J, EDWARDS JE, HADLEY S, BRASS C, VAZQUEZ JA, CHAPMAN SW, HOROWITZ HW, ZERVOS M, MCKINSEY D, LEE J, BABINCHAK T, BRADSHAW RW, CLEARLY JD, COHEN DM, DANZIGER L, GOLDMAN M, GOODMAN J, HILTON E, HYSLOP NE, KETT DH, LUTZ J, RUBIN RH, SCHELD WM, SCHUSTER M, SIMMONS B, STEIN DK, WASHBURN RG, MAUTNER L, CHU TC, PANZER H, ROSENSTEIN RB, BOOTH J. A Randomized and Blinded Multicenter Trial of High-Dose Fluconazole plus Placebo versus Fluconazole plus Amphotericin B as Therapy for Candidemia and Its Consequences in Nonneutropenic Subjects. **Clinical Infectious Diseases**, 36(10), 1221–1228, 2003.

26 - PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, CLANCY CJ, MARR KA, OSTROSKY-ZEICHNER L, REBOLI AC, SCHUSTER MG, VAZQUEZ JA, WALSH TJ, ZAOUTIS TE, SOBEL JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.** Feb 15;62(4):e1-50, 2016.

27- KARAMZADEH, R., ESLAMINEJAD, M.B., AFLATOONIAN, R. Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods. **J. Vis. Exp.** (69), e.4372, 2012

28 - DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; I. MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, DJ.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

International Society for Cellular Therapy position statement, **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

29 - ZHANG, W., WALBOOMERS, X. F., SHI, S., FAN, M., & JANSEN, J. A. Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation. **Tissue Eng.** 12(10):2813-23 2006.

30 - DISSANAYAKA WL, ZHU X, ZHANG C, JIN L. Characterization of Dental Pulp Stem Cells Isolated from Canine Premolars. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 8, p. 1074-1080, 2011.

31 - POLTAVTSEVA, RA, NIKONOVA, YA, SELEZNEVA, II, YAROSLAVTSEVA, AK, STEPANENKO, VN, ESIPOV, RS, PAVLOVICH SV, KLIMANTSEV IV, TYUTYUNNIK NV, GREBENNIK TK, NIKOLAEVA AV, SUKHIKH, GT. Mesenchymal Stem Cells from Human Dental Pulp: Isolation, Characteristics, and Potencies of Targeted Differentiation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.158 n.1, p.164–169, 2014

32 - GRONTHOS S., MANKANI M., BRAHIM J., ROBEY P. G., SHI S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97 no. 25 p. 13625–13630, 2000

33 - ALSULAIMANI RS, AJLAN SA, ALDAHMAH AM, ALNABAHEEN MS, ASHRI NY. Isolation of dental pulp stem cells from a single donor and characterization of their ability to differentiate after 2 years of cryopreservation. **Saudi Med J.** v.37 n.5 p551-60, 2016.

34 - KRAMPERA M, FRANCHINI M, PIZZOLO G, APRILI G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. **Blood Transfusion.** v.5 p.120-129, 2007.

35 - DE LOGU A, SADDI M, CARDIA MC, BORGNA R, SANNA C, SADDI B, MACCIONI E. In vitro activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother.** 55(5):692-8. 2005. DOI: 10.1093/jac/dki084

TABLES

Table 1. Antibodies used for immunophenotypic characterization by flow cytometry.

Antibodies	Fluorochrome	Brand	Clone	Target species
CD14	APC	BD Pharmingen (San Jose, USA)	M5E2	Human <i>Rhesus</i> , <i>Cynomolgus</i> , Baboon, Dog
CD29	PE	Abcam (Cambridge, USA)	MEM-101A	Dog
CD34	PE	eBioscience (San Diego, USA)	1H6	Dog
CD44	Alexa Fluor 488	ABD Serotec (Kidlington, UK)	YKIX337.8.7	Dog
CD45	FITC	eBioscience (San Diego, USA)	YKIX716.13	Dog
HLA-DR	PerCP	BD Pharmingen (San Jose, USA)	TU36	Human, <i>Rhesus</i> , <i>Cynomolgus</i> , Baboon, Dog, Rabbit
7-AAD	-	BD Pharmingen (San Jose, USA)	-	-

Table 2. No effect of fluconazole on growth of cDPSC cultures 12 d post isolation.

Cells were counted in a hemocytometer. cDPSCs: Canine dental pulp stem cell; WFC: control without fluconazole; F120: Fluconazole group 120 µg/ml; F240: Fluconazole group 240 µg/ml

	WFC	F120	F240
Sample 1	9.5 x 10 ⁵	3.5 x 10 ⁵	3 x 10 ⁵
Sample 2	5.5 x 10 ⁵	6.5 x 10 ⁵	6.5 x 10 ⁵
Sample 3	3.5 x 10 ⁵	2.5 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵

FIGURES

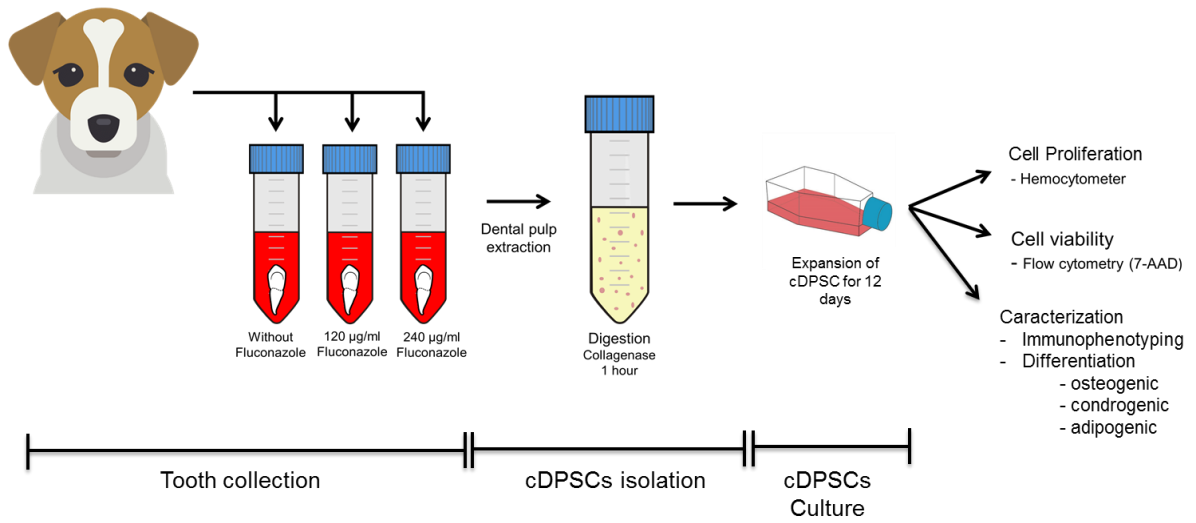


Figure 1. Study design.

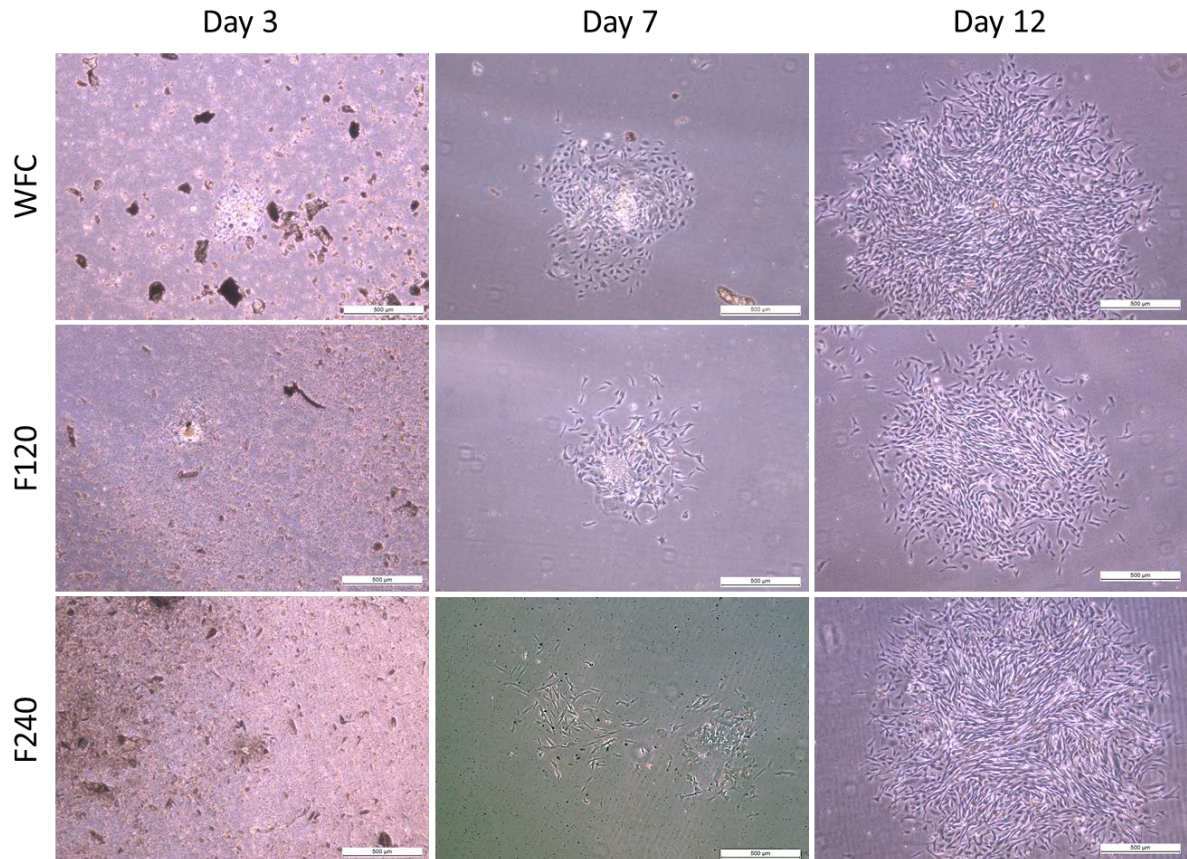


Figure 2. Time course of growth of cDPSCs cultures. Development of cDPSCs isolates collected without fluconazole (WFC) or with different concentrations of fluconazole (F120 and F240) at 3, 7, and 12 days. At day three, few cells and many cell debris can be observed resulting from the isolation process; on day seven is observed less cell debris and the first colonies of cells initiating the expansion and at day 12 cells are observed in great proliferative activity. cDPSCs: Canine dental pulp stem cell; WFC: control without fluconazole; F120: Fluconazole group 120 µg/ml; F240: Fluconazole group 240 µg/ml.

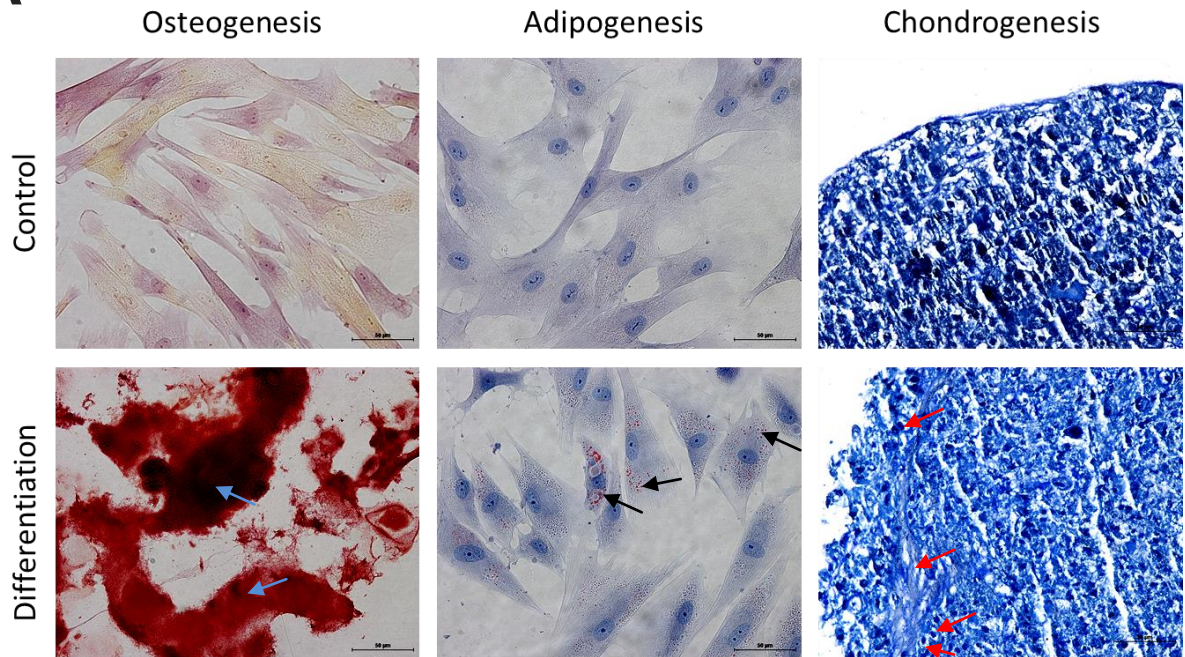
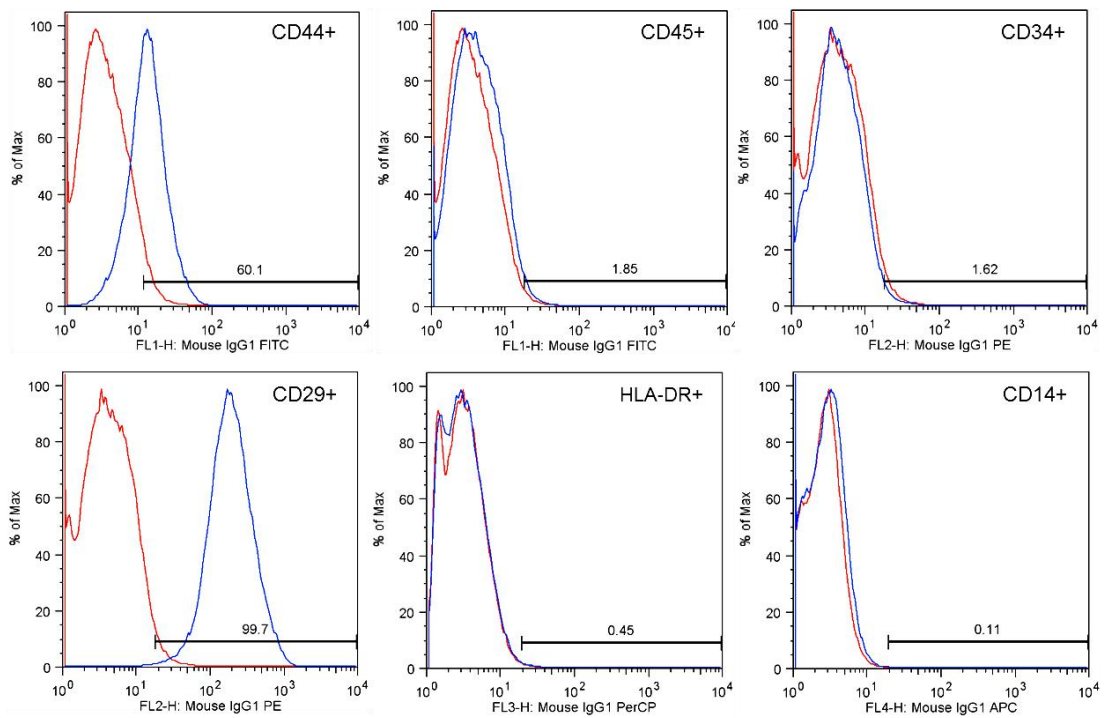
A**B**

Figure 3. cDPSCs characterization. (A) Osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation of cDPSCs with their respective controls. Blue arrows: calcium crystals; black arrows: lipid vacuoles; red arrows: proteoglycan deposition and gaps around young chondrocytes. (B) Immunophenotypic characterization by flow cytometry of cDPSCs. Red histograms represent isotype control (negative) of the antibodies and blue histograms represent the percentage of the positive population for each antibody. IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium; cDPSCs: Canine dental pulp stem cell; WFC: control without fluconazole; F120: Fluconazole group 120 μ g/ml; F240: Fluconazole group 240 μ g/ml.

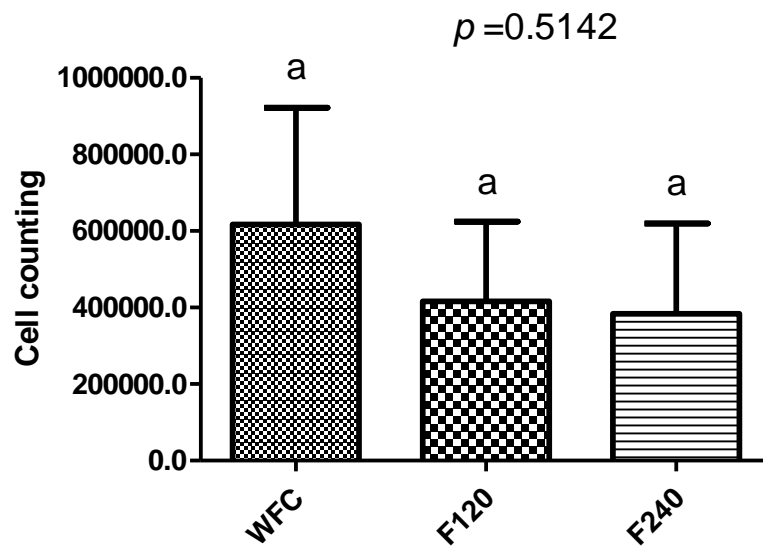


Figure 4. Proliferation Assay. Cell counts after 12 days of culture of cDPSCs collected with (F120, F240) or without fluconazole (WFC). cDPSCs: Canine dental pulp stem cell; WFC: control without fluconazole; F120: Fluconazole group 120 $\mu\text{g/ml}$; F240: Fluconazole group 240 $\mu\text{g/ml}$.

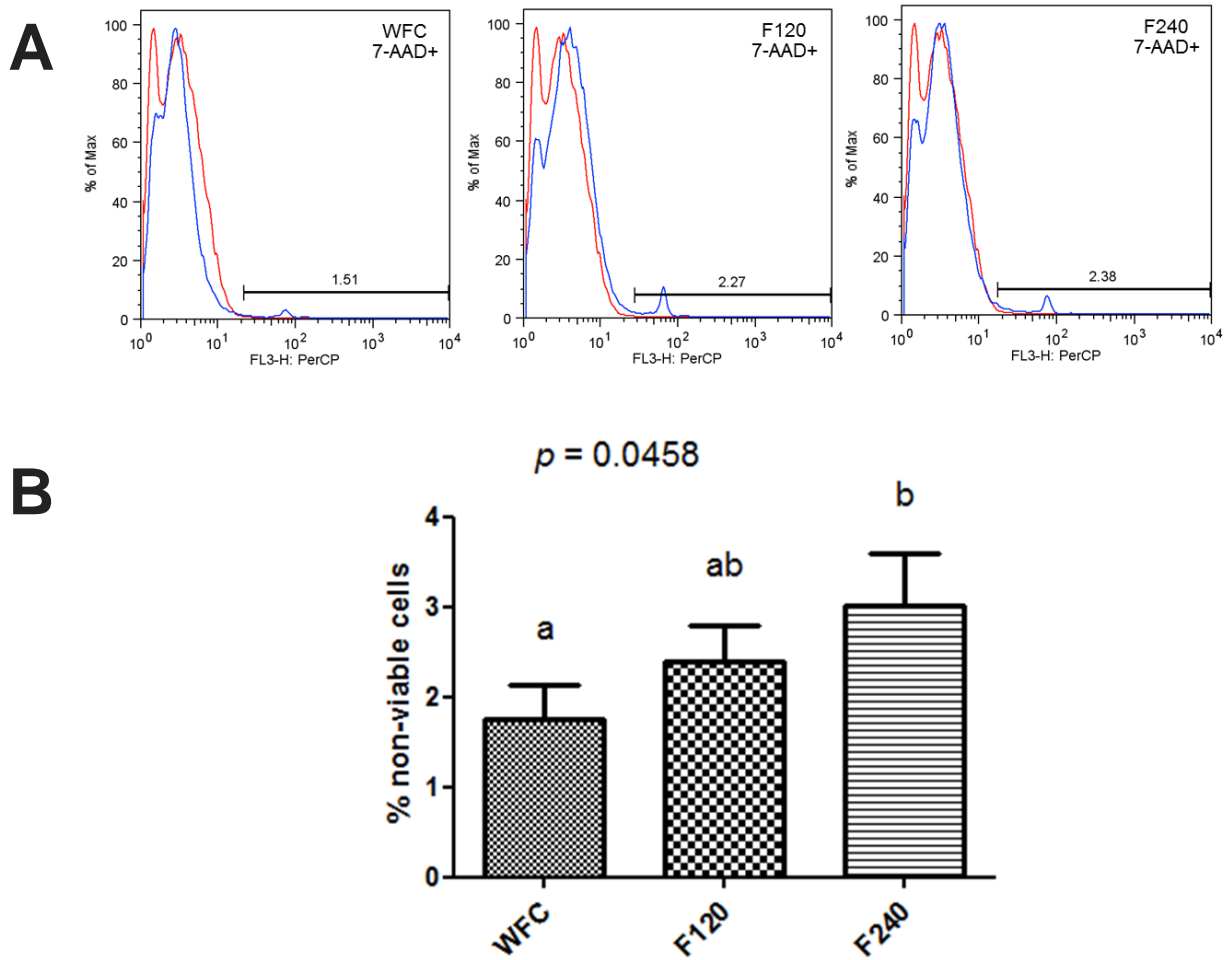


Figure 5. cDPSCs viability. (A) 7-AAD viability assay on cDPSCs collected with (F120, F240) or without fluconazole (WFC). Red histograms represent isotype controls and blue histograms represent the percentages of non-viable cDPSCs. (B) Means \pm SD of non-viable cells in cDPSCs isolates collected with (F120, F240) or without fluconazole (WFC). The WFC and F240 measurements were statistically different ($P = 0.035$)

CAPITULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo conseguiu adaptar técnicas utilizadas para isolamento de células-tronco de polpa dentária e cordão umbilical de seres humanos em cães.

Foi possível verificar que o fluconazol foi eficiente em prevenir a contaminação somente sendo utilizado na coleta das cDPSC. A melhor concentração utilizada sem alterar a viabilidade das cDPSC foi de 120ug/ml. Embora a maior concentração utilizada na coleta (240ug/ml) contribuiu para diminuir um pouco a viabilidade das cDPSC, a viabilidade se manteve em cerca de 97%, e mesmo assim não interferiu na proliferação, na diferenciação e nem nas características imunofenotípicas dessas células. Isso nos mostra que podemos utilizar o fluconazol sem alterar as características celulares das cDPSC.

As características das cDPSC e as cUCSC se mantiveram de acordo com as características gerais das células-tronco mesenquimais, apresentando morfologia fibroblastoide, aderência ao plástico quando submetidas às condições de cultivo e se diferenciaram nas 3 linhagens propostas: adipogênica, condrogênica e osteogênica.

As amostras de cDPSC e cUCSC apresentaram o mesmo padrão de positividade para CD 29 e CD44 e negatividade para CD 14, CD 45, CD34 e HLA-DR. Com isso, tanto as cDPSC quanto as cUCSC demonstraram as características imunofenotípicas de uma MSC. O CD14, CD34 e o CD45 são marcadores de células hematopoéticas, com isso os resultados mostram que as células presentes na cultura não são células derivadas do sangue, apresentando uma população mais homogênea de CT. O CD44 é um marcador de matriz envolvida nas interações célula-célula e na adesão celular, e o CD29 é um marcador de integrina envolvida com a adesão celular, e apresentaram positividade como esperado. Houve uma certa dificuldade quanto a caracterização imunofenotípica devido à pouca disponibilidade de marcadores específicos para células de cães.

O 7-AAD marca apenas as células com mortas, com isso os resultados mostraram que tanto a cDPSC quanto as cUCSC apresentaram baixas taxas de mortalidade. Já a anexina marca células em estado de apoptose a partir da quantificação da fosfatidilserina, um composto fosfolipídico localizado na parte interna da membrana celular que é exposta quando a célula inicia a apoptose. Com isso, as cDPSC e as cUCSC apresentaram baixa quantidade de células marcadas com anexina e, portanto, baixas taxas de apoptose. Isso nos mostra que essas células estavam com taxa de viabilidade alta e com poucas células entrando em apoptose.

Além disso, foi comparada a taxa de proliferação e de unidades formadoras de colônias entre as cDPSC e as cUCSC na passagem 3. Foi possível verificar que nessa passagem as cDPSC obtiveram menor taxa de proliferação que as cUCSC. As cDPSC também obtiveram menor porcentagem de unidades formadoras de colônias, o que poderia justificar a menor taxa de proliferação. A fase em que o tecido se encontra pode justificar essa maior taxa de proliferação e de unidade formadora de colônias, uma vez que o cordão umbilical se encontra em uma fase mais precoce se comparada com a polpa dentária.

Esse estudo abre possibilidades para estudos futuros utilizando essas células. A literatura descreve que as MSC derivadas dessas fontes possuem um grande potencial para diferenciação em células da linhagem neuronal. Principalmente as cDPSC que possuem a mesma origem embrionária de células da linhagem neuronal (ectoderme). Por isso, as etapas futuras seriam avaliar o potencial de diferenciação neuronal tanto das cDPSC quanto das cUCSC. Após essa etapa, sabendo qual a melhor fonte, será possível utilizar essas células em estudos clínicos para doenças neurodegenerativas e lesões neuronais.

ANEXOS

CERTIFICATE OF ENGLISH EDITING

This document certifies that the paper listed below has been edited to ensure that the language is clear and free of errors. The edit was performed by professional editors at Editage, a division of Cactus Communications. The intent of the author's message was not altered in any way during the editing process. The quality of the edit has been guaranteed, with the assumption that our suggested changes have been accepted and have not been further altered without the knowledge of our editors.

TITLE OF THE PAPER

Cytotoxicity of fluconazole in canine dental pulp-derived stem cells

AUTHORS

José Ademar Villanova Junior

JOB CODE

PUCBR_318

Signature



Vikas Narang,
Senior Vice President,
Operations- Author Services, Editage

Date of Issue
April 16, 2019

Editage, a brand of Cactus Communications, offers professional English language editing and publication support services to authors engaged in over 500 areas of research. Through its community of experienced editors, which includes doctors, engineers, published scientists, and researchers with peer review experience, Editage has successfully helped authors get published in internationally reputed journals. Authors who work with Editage are guaranteed excellent language quality and timely delivery.

Contact Editage

Worldwide
request@editage.com
+1 877- 334- 8243
www.editage.com

Japan
submissions@editage.com
+81 03- 6868- 3348
www.editage.jp

Korea
submit-
korea@editage.com
1544- 9241
www.editage.co.kr

China
fabiao@editage.cn
400- 005- 6055
www.editage.cn

Brazil
contato@editage.com
0800- 892- 20- 97
www.editage.com.br

Taiwan
submitjobs@editage.com
02 2657 0306
www.editage.com.tw



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 08 de março de 2018.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01211/2018

TÍTULO DO PROJETO: *CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE POLPA DENTÁRIA E TECIDO CORDÃO UMBILICAL DE CÃES*

INFLUÊNCIA DO FLUCONAZOL NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS-TRONCOS DERIVADAS DA POLPA DENTÁRIA CANINA

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ISOLAMENTO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO DO CORDÃO UMBILICAL DE CÃES

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

JOSÉ ADEMAR VILLANOVA JUNIOR

EQUIPE DE PESQUISA

Mikaela dos Anjos Adur, Paula Joly dos Santos, Paulo Henrique Utumi, Alexandra Cristina Senegaglia, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Medicina Veterinária

VIGÊNCIA PROJETO	DO	02/04/18 a 29/06/18	QUANTIDADE DE ANIMAIS	12 dentes 12 Cordões umbilicais
ESPECIE/LINHAGEM		<i>Canis lupus familiaris (dentes molares e cordões umbilicais)</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO		Variável	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO		Variável	ESPECIE - GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL		Clinica Escola Veterinária da PUCPR	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização.



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

