

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

**ISOLAMENTO E ANÁLISE DE DANOS GENÔMICOS DE
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE CÃES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jaime Sardá Aramburú Junior

Santa Maria, RS, Brasil

2013

ISOLAMENTO E ANÁLISE DE DANOS GENÔMICOS DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE CÃES

Jaime Sardá Aramburú Junior

Dissertação de mestrado apresentada Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Luis Ney Pippi

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sardá Aramburú Junior, Jaime
ISOLAMENTO E ANÁLISE DE DANOS GENÔMICOS DE CÉLULAS-
TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE CÃES / Jaime Sardá Aramburú
Junior.-2013.
57 f.; 30cm

Orientador: Ney Luis Pippi
Coorientador: Paulo Afonso Burmann
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2013

1. células-tronco 2. polpa dental 3. genômica 4. dano
ao DNA 5. Picogren I. Luis Pippi, Ney II. Afonso
Burmann, Paulo III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós Graduação em Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**Isolamento e análise isolamento e análise de danos
genômicos de células-tronco da polpa dentária de cães**

elaborada por
Jaime Sardá Aramburú Junior

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Luis Ney Pippi, Doutor (UFSM)
(Orientador)

Paulo Alfonso Burmann (UFSM)

Michel Mansur Machado (UNIPAMPA)

Santa Maria, fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela Sabedoria destes dois anos.

A minha esposa, Noemy, que superou junto comigo o sonho do laboratório.

As minhas filhas (Manoella e Rafaela) por terem “compreendido” minhas ausências nos almoços e escola.

Aos meus pais (Jaime e Sônia) pelo apoio na minha escolha profissional, que vezes abdicaram de seus sonhos em prol dos meus; e de meus irmãos, pelo estímulo de seguir em frente nos nossos estudos.

Ao meu orientador professor Ney Luis Pippi pela oportunidade de ingressar na pesquisa, seu apoio e confiança em nossas ideias e pessoa.

Ao professor Paulo Burmann que fez a primeira fagulha para eu ir buscar algo além da graduação e por abrir a sua lista de contatos dentro do CCS e UFRGS para nós.

Aos colegas de pós-graduação e funcionários do LACE, a Nelci, xerifa do BLOCO 5, pelo cafezinho e mate. A Beloni não entendia o que falava, mas me ajudou muito.

Agradeço também aos estagiários (Diego, Marcela, Bethina e Gabriel).

Para meus amigos Tiago, Saulo e Maurício (Comigo) formávamos o “quarteto fantástico”. Cada qual com seu “*modus operandi*”.

Ao Xerox fiquei pobre, mas a Odonto seguiu adiante.

Em especial ao Tiaguinho meu amigo de viagem e de sonhos nas pesquisas, **já te botei em fria, já??** A frase mais ouvida nestes 2 anos.

A Prof^a Ivana e a Biogenômica (Alencar, Fran, Sabrina, Eduardo, Olmiro, M^a Fernanda ... é muita gente) um abraço fraterno pela ajuda que me foi dada.

A Maria que sempre dava um jeito para me ajudar dentro do PPGMV-UFSM.

Ao **Cnpq** pela bolsa de estudo.

Por fim, agradeço aos animais deste estudo. Tenho a certeza deque seu uso não foi em vão. Tenham todo meu eterno respeito e gratidão.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

Isolamento e análise de indicadores genotóxicos em células-tronco de polpa dentária de cães

Autor: Jaime Sardá Aramburú Junior
Orientador: Prof. Dr. Ney Luis Pippi
Local da Defesa: Santa Maria, Fevereiro de 2013.

Quebras na dupla-fita do DNA são consideradas uma das formas mais letais de dano que podem comprometer a capacidade das células-tronco de se auto-renovarem ou de se diferenciarem. Portanto, estudos adicionais são necessários para identificar biomarcadores de danos genômicos que possam ajudar os pesquisadores a escolher as melhores linhagens celulares para estudos e seu uso clínico veterinário. Para tanto o presente estudo teve como objetivo implantar uma técnica de obtenção de células-tronco a partir de polpa de dente (*dental stem-cells*, DSCs) de cães avaliando a taxa de proliferação celular, a morfologia das células e a qualidade celular através de indicadores de dano de DNA e estresse oxidativo em oito diferentes passagens de cultura em fase indiferenciada. A escolha de obtenção de células-tronco a partir da polpa dentária se deu por ser de fácil acesso, as células possuem crescimento rápido e ótimo potencial de diferenciação celular. Para avaliar a qualidade das células em oito diferentes passagens foi feita análise da taxa de proliferação celular, de danos no DNA por duas técnicas complementares (Ensaio do DNA Cometa e Fragmentação do DNA por análise fluorimétrica utilizando-se o corante Picogreen) e dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam estresse oxidativo via ensaio fluorimétrico do DCFH-DA. Os resultados mostraram importantes diferenças entre as passagens iniciais em relação as mais tardias. Em geral até terceira passagem a taxa de proliferação celular foi mais alta, com menor dano genômico e produção de EROs, sendo a segunda passagem a que apresentou melhor qualidade. Entretanto outra questão observada foi o grande número de células com DNA danificado observado em todas as passagens. Os resultados sugerem que testes relativamente simples e baratos como o DNA cometa e a análise de fragmentação do DNA podem ajudar na escolher a passagem celular em que as células apresentam melhor qualidade genômica e funcional tanto para as pesquisas quanto na aplicação clínica regenerativa.

Palavras Chave: células-tronco, terapia regenerativa, toxicidade, polpa dentária, células mesenquimais

ABSTRACT

Master Thesis
Post-Graduate Program in Veterinary
Federal University of Santa Maria

Isolation and genotoxicity analyses of dog Dental Pulp Stem Cells

Author: Jaime Sardá Aramburú Junior

Advisor: Prof Ney Luis Pippi

Date and place of the defense: Santa Maria, February, 2013

The double-strand DNA breaks are considered one of the most lethal forms of damage that can compromise the ability of stem cells self-renew and differentiate. Therefore, additional studies are necessary to identify genome damage biomarkers that help the researchers to choose the better cell line to apply in clinical use. Here, we evaluated the potential use of DNA Comet Assay, DNA fragmentation fluorimetric assay using Picogreen dye and reactive oxygen species (ROS) level by DCFH-DA fluorimetric assay as potential biomarkers to identify the genome conditions of dental stem cells (DSCs) isolated from dog's canine teeth. The results showed important differences among the three initial DSCs passage when compared to $\geq 4^{\text{th}}$ passages. In general, the initial DSCs passages presented higher cell proliferation, lower DNA damage and ROS. However, we noticed a large number of nucleus with some level of DNA damage (30 to 40% in the initial DSCs passage and $> 50\%$ in the late passage) that indicates an *in vitro* DSCs genomic fragility. The results suggest that these relatively simple and inexpensive approaches as Comet, DNA fragmentation could to help for sorting stem cell with less DNA damage used to research or therapeutic use.

Palavras-chave: stem cells, regenerative therapy, dental pulp, genotoxicity, ADN damage

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Uso de células-troncos obtidas a partir da polpa dentária	10
1.2 Aspectos toxicológicos relacionados à cultura de células-tronco	12
1.3 O Ensaio DNA Cometa Alcalino	14
1.4 Ensaio de Fragmentação de DNA por fluorimetria utilizando o corante Picogreen®.....	16
2 OBJETIVO.....	19
3 RESULTADOS	20
3.1 Manuscrito.....	21
4 DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÕES	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco são células indiferenciadas capazes de autorenovação e de diferenciação em diversas linhagens celulares (HARADA et al., 1999; LEALE, 2007), podendo ser classificadas quanto à origem em embrionárias e adultas (DE SOUZA, 2008). Ao longo da embriogênese, as células embrionárias, totipotentes são aquelas que têm capacidade ilimitada de proliferação e podem originar qualquer tecido corpóreo. Já, a princípio, as células-tronco adultas pluripotentes são células indiferenciadas que estão em do repouso nos tecidos, mas que com estímulo apropriado podem originar novas células (CASAGRANDE et al., 2011).

O avanço das tecnológicas cito-genômicas transformou a cultura de células em uma valiosa ferramenta aplicável aos estudos de biologia celular e potencialmente a terapias regenerativas. Em termos técnicos, a cultura de células consiste na manutenção e expansão celular *in vitro* com a indução ou não da diferenciação celular via adição de compostos como fatores de crescimento, hormônios e outros agentes indutores. A cultura celular permite assim á análise de comportamento, metabolismo, mecanismos de regulação, síntese, destino de produtos celulares e demais aspectos de funcionamento da célula (LUIZI et al., 2004).

Assim, o cultivo celular é a base para pesquisas de terapia celular e engenharia tecidual. Esta última é uma área atual da ciência relacionada com biologia celular, bioengenharia, biomateriais, bioquímica e biofísica que tem como objetivo a reconstrução de tecidos e órgãos corporais disfuncionais (MITRANO et al., 2010).

Para utilizar a terapia celular primeiro é necessário avaliar o comportamento das células *in vitro*. As pesquisas com terapia celular fez com que se buscassem tecidos que sirvam de fontes acessíveis de células-tronco adultas (CASAGRANDE, 2011).

As células-tronco podem ter origem nos diversos tecidos do corpo (MEIRELLES et al., 2006), como medula óssea, tecido nervoso, pele, retina, intestino, tecido adiposo e polpa dentária (HARADA et al., 1999; FUCHS e

SEGRE, 2000; GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al.; 2003; TREICHEL et al., 2011).

1.1 Uso de células-troncos obtidas a partir da polpa dentária

Pesquisas em células da polpa dentária, ao contrário do que pode ser pensado têm uma longa história. A biologia precisa das células da polpa dentária foi originalmente descrita pelo Dr. Stantley e colaboradores em 1962. Estes pesquisadores conseguiram obter fibroblastos a partir da cultura das células de polpa dentária. Entretanto, havia um grande mistério de como os odontoblastos precursores eram recrutados ao longo da formação da ponte de dentina. Posteriormente foi descoberta a existência de células que tinham a capacidade de regenerar os odontoblastos (FITZGERALD, 1979). Entretanto, só mais recentemente é que uma população de células-tronco mesenquimais (CTM) foi isolada deste tecido (GRONTHOS et al. 2000).

Gronthos et al.(2000) foram os primeiros então a isolar células-tronco adultas da polpa dentária a partir de dentes permanentes. Em 2003 Miura e colaboradores isolaram estas células a partir de dentes decíduos. Logo a seguir pesquisas mostraram que as células-tronco da polpa dentária possuíam alta taxa de crescimento, e de potencial de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e células neuronais (KAWASHIMA, 2012).

Estes resultados abriram a perspectiva de estudos que possibilitassem o desenvolvimento de estratégias terapêuticas regenerativas utilizando células-tronco de polpa dentária através do uso integrado de ferramentas de biologia celular e molecular (CASAGRANDE et al., 2011; KAWASHIMA, 2012).

Esta tecnologia é de grande interesse na medicina veterinária uma vez que teoricamente permite a recuperação terapêutica de animais que apresentam doenças degenerativas, ou mesmo que sofreram lesões traumáticas.

Dada à facilidade de obtenção das células-troncos da polpa dentária, sobe ano a ano o número cada vez maior de trabalhos feitos tanto em animais

quanto seres humanos. A Tabela 1 modificada a partir da revisão sobre o tema feita por Kawashima (2012) fornece uma síntese da aplicação de células-tronco de polpa dentária. Nesta revisão o autor compilou evidências atuais que mostram que as células-tronco da polpa dentária têm potencial de regeneração da dentina, de odontoblastos, da própria polpa dentária, de ossos, cartilagens, músculos, folículo piloso, córnea, células neuronais, melanócitos e células endoteliais. Entretanto, faltam ainda ensaios clínicos tanto em animais quanto em humanos relacionados ao uso deste tipo de célula na regeneração tecidual.

Tabela 1 Síntese de alguns estudos voltados a potencial aplicação de células-tronco de polpa dentária (modificada de KAWASHIMA, 2012).

Espécies	Hospedeiro do transplante	Resultados do transplante	Problemas relacionados ao transplante e aplicação clínica
Humanos/Suínos	Camundongos Suínos	Formação de dentina, tecido pulpar e cimento	Aparecimento de odontoblastos não típicos
Ratos	Ratos – cápsula renal	Formação do dente	Estudos com ratos que são modelos experimentais
Coelho	Coelho	Formação de tecido pulpar e de tecido nervoso	Histologia alterada Aparecimento de odontoblastos não típicos
Humanos	Células foliculares dentárias	Formação de tecidos semelhantes à polpa-dentina, do cimento e do complexo periodontal	Histologia alterada
Humanos	Polpa dentária dos terceiros molares	Camundongos	Aparecimento de odontoblastos não típicos
Cães	Polpa dental	Diferenciação em odontoblastos	Estudo experimental

Além de ensaios clínicos também existe a necessidade de estudos relacionados com indicadores de genotoxicidade das células-tronco de polpa dentária que poderiam afetar o sucesso regenerativo.

1.2 Aspectos toxicológicos relacionados à cultura de células-tronco

Um dos efeitos indesejáveis está relacionado à reprogramação das células-tronco, não para a diferenciação celular, mas sim para a formação de tumores benignos ou malignos. Estes eventos podem ocorrer na medida em que as células-tronco quando em cultura podem sofrer e fixar mutações genômicas pró-carcinogênicas. Esta condição está relacionada com reações adversas como ocorrência de mutações nas culturas de células-tronco, instabilidade cromossômica, modificações nas taxas de proliferação celular o que limita o uso terapêutico das células-tronco tanto em animais quanto em seres humanos (BAUM et al., 2011).

Estudos recentes como o conduzido por Ferletta et al. (2011) investigaram a presença de células semelhantes a células-tronco na linhagem tumoral canina CMT-U229. Esta linhagem tumoral foi estabelecida a partir de um tumor mamário benigno, atípico que tem a propriedade de formar estruturas similares a ductos em gel de colágeno. Os autores localizaram as células-tronco no epitélio e a análise mostrou que a linhagem tumoral expressava marcadores de superfície CD44 e CD49f que estão geralmente presentes em células-tronco. Assim, se admite a necessidade de estudos que garantam não só o sucesso regenerativo dos órgãos e tecidos quanto a sua segurança.

Comparado com o número de estudos relacionados à diferenciação de células-tronco e terapia tecidual, investigações relacionadas com aspectos toxicogenômicos das células-tronco são muito reduzidas.

Um dos grandes problemas relacionados as células-tronco e a perda da integridade genômica durante longos períodos de cultura *in vitro* o que pode ocasionar a aquisição de um fenótipo similar a um tumor cancerígeno. Uma investigação recente conduzida por Hyka-Nouspikel et al (2012) observou que devido a ausência da expressão das proteínas p21/Walf1/Cip1 células-tronco embrionárias perdem a propriedade de checarem sua condição para a divisão celular e tornam-se vulneráveis a danos de DNA induzidos por fatores ambientais como as radiações ultravioletas (UV). Quando expostas ao UV a maioria das células-tronco morrem via indução da apoptose. Entretanto, uma subpopulação de células continua a se proliferar acumulando diversas

mutações no DNA danificado. Estas células resistentes ao UV retêm a sua capacidade proliferativa e seu potencial para a diferenciação pluripotentes ainda que marcadamente sejam menos sensíveis as induções a morte celular programada (apoptose). Estes achados demonstraram que, a resposta deficiente relacionada ao DNA lesionado pode induzir situações indesejáveis pró-carcinogênicas ou mesmo tornar ineficiente a diferenciação tecidual esperada.

Considerando as células-tronco de polpa dentária um dos aspectos que pode interferir na qualidade destas células diz respeito a sua própria conservação. Atualmente, estas células são criopreservadas em suspensão usando Me₂SO. Este processo é feito a fim de evitar a formação de gelo intracelular que é letal para as células.

O estudo conduzido por Zhurova et al. (2010) mostrou que a viabilidade das células-tronco de polpa dentária após o descongelamento afetou a integridade da membrana das células e a capacidade de formação de colônias. Por outro lado, na criopreservação feita em monocamadas celulares estas células conseguiram manter a integridade da membrana ainda que tenham perdido a capacidade proliferativa. Outros estudos também relataram efeitos citotóxicos nas células-tronco de polpa dentária como o metacrilato (TRUBIANI et al., 2012), de compostos utilizados na restauração dentária (KANJEVAC et al., 2012; GUVEN et al., 2012).

Um estudo recente que utilizou células-tronco de polpa dentária oriundas de seres humanos também descreveu que 70% das células investigadas apresentavam anormalidades cariotípicas incluindo poliploidia, aneuploidia e formação de cromossomos em anéis. Também foi observada alta frequência de mutações cromossômicas que se originam continuamente nos cultivos celulares (DUAILIBI et al. 2012).

Os autores postularam que estas células, por possuírem uma taxa de proliferação rápida apresentando alta densidade celular em condições *in vitro* acabam sofrendo estresse metabólico e, conseqüentemente exibem instabilidade cromossômica durante as passagens celulares iniciais. De fato as expansões *in vitro* podem refletir mudanças genéticas adaptativas destas células. Estes resultados sugerem cautela no uso das células-tronco e a

necessidade de estudos adicionais sobre a genotoxicidade que auxiliem na criação de protocolos regenerativos com eficácia e segurança adequada.

Apesar da necessidade de estudos adicionais e até mesmo de marcadores que auxiliem os pesquisadores a identificar rapidamente linhagens de células com um grande número de danos genômicos estudos nesta área estão abaixo do esperado.

Talvez isto ocorra porque existe a necessidade do estabelecimento de abordagens interdisciplinares envolvendo não só aspectos da biologia celular e molecular, mas também da área da genômica toxicológica. Existem muitos ensaios amplamente utilizados no mundo que avaliam, de modo geral danos no DNA. Tais ensaios podem ser potencialmente aplicáveis a avaliações de linhagens de células-tronco com potencial de diferenciação celular.

1.3 O Ensaio DNA Cometa Alcalino

Durante os últimos 20 anos o ensaio de DNA Cometa tem provado ser uma excelente ferramenta para a investigação de danos no DNA de diversos tipos de células. No caso, esta técnica permite avaliar agentes que induzem dano no DNA e também agentes que induzem o reparo do DNA.

Com base neste contexto e na necessidade de análise de dados, o presente estudo teve como objetivo estabelecer uma metodologia de isolamento, cultivo e expansão de células-tronco indiferenciadas da polpa de dentes decíduos de cão analisando indicadores de estresse metabólico celular ao longo das passagens celulares que poderiam afetar a qualidade das células-tronco obtidas. Este método também é considerado como muito versátil, pois avalia o dano de DNA de cada célula individual.

Inicialmente o Ensaio de DNA Cometa foi desenvolvido para detectar quebras das duplas-fitas da molécula de DNA. Atualmente este teste está muito bem estabelecido e tem sido extensivamente utilizado por ser simples, relativamente rápido, economicamente pouco dispendioso e reproduzível. Por este motivo, o DNA cometa é um ensaio que tem sido aplicado em muitos

campos da biologia básica e aplicada bem como na área médica humana e animal.

O ensaio DNA Cometa também chamado de “eletroforese em gel de célula única” é considerado então como um método genotoxicológico sensível onde qualquer tipo de célula nucleada pode ser avaliado (BELPAEME et al., 1998).

A técnica foi desenvolvida a partir de trabalhos iniciais feitos por Östling e Johanson (1984) e de Singh et al (1988). Como pode ser visto na Figura 1, para a realização da técnica uma amostra de células em estudo é disposta em uma lâmina histológica. A seguir as lâminas são imersas em soluções que lisam as membranas celulares (citoplasmática e nuclear) e também as proteínas histonas que estão ligadas no DNA. Após este procedimento as lâminas são submetidas a eletroforese em uma cuba contendo tampão alcalino. Este tampão desnatura o DNA e todos os fragmentos que estiverem quebrados (formando simples fita de DNA) migram mais lentamente formando uma espécie de cauda. Assim, quando maior o dano no DNA maior é o tamanho da cauda. Para visualizar os núcleos de DNA a amostra é primeiro neutralizada, fixada e então corada geralmente com brometo de etídio que liga-se ao DNA e emite uma coloração fluorescente ou com nitrato de prata, que escure-se os núcleos. Para analisar os danos foram criadas cinco categorias (dano 0, 1,2,3,4) conforme o tamanho da cauda. DNAs completamente fragmentados indicam também apoptose. Para cada amostra são feitas duas lâminas do qual são lidas 50 núcleos em cada. Este procedimento deve ser feito por dois observados independentes para garantir a interpretação correta.

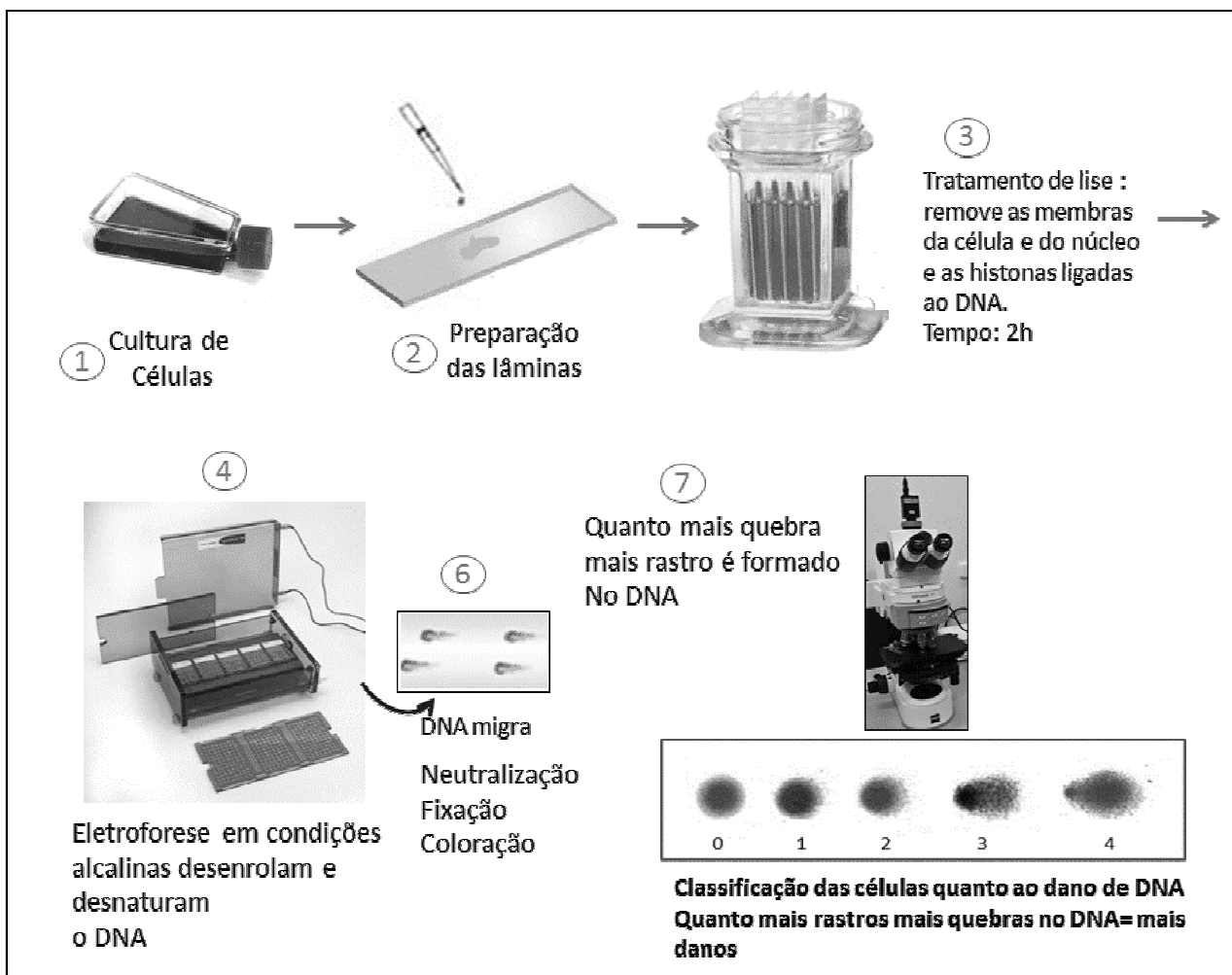


Figura 1 Síntese das principais etapas do ensaio DNA Cometa Alcalino (SINGH et al., 1988).

1.4 Ensaio de Fragmentação de DNA por fluorimetria utilizando o corante Picogreen®

Apesar do amplo uso da técnica de DNA Cometa Alcalino para avaliar dano de DNA a principal limitação deste teste é a sua interpretação subjetiva e, portanto os resultados gerados são qualitativos. Por este motivo, novos ensaios têm sido propostos para analisar dano de DNA via técnicas quantitativas.

É importante comentar que danos no DNA podem ser reparáveis (como a fragmentação) e não reparáveis (se ocorrer incisões e modificações nas moléculas de açúcar e das bases nitrogenadas). Ambas as condições

podem ser causadas por fatores ambientais onde o ataque oxidativo é uma das principais causas de genotoxicidade.

Geralmente danos não reparáveis do DNA eram medidos por ensaios como o Ensaio DNA Cometa (qualitativo), análise de micronúcleos (semi-quantitativo) ou através de eletroforese em gel de agarose de DNA isolado. Nos últimos anos análise quantitativa de DNA utilizando corantes fluorescentes começou a ser feita. Recentemente, Georgiou et al (2009) desenvolveram um protocolo em que análise da quantidade de DNA é medida por fluorimetria. Nesta técnica, corantes ultrasensíveis como o DNA picogreen ligam-se apenas ao DNA que está em dupla-fita (*double-strand* ou *dsDNA*). O corante consegue detectar uma quantidade mínima de dsDNA no meio (25 pg/ml). Para dar uma ideia do quanto esta quantidade é mínima 80 pg de DNA correspondem ao DNA genômico de apenas 120 células. Portanto, se o DNA apresentar algum tipo de fragmentação provocada por fatores endógenos ou exógenos a fluorescência emitida vai diminuir e assim pode ser avaliado efeito genotóxico. Assim, Georgiou et al (2009) sugeriram que o uso de ensaio de quantificação do DNA medido por fluorimetria utilizando o DNA Picogreen® pode ser um teste quantitativo complementar ao Ensaio DNA Cometa.

Esta técnica de análise de fragmentação do DNA pelo Picogreen está começando a ser utilizada em diversas situações incluindo análise da ação genotóxica de pesticidas em ensaios *in vitro* com culturas celulares (PARRA et al., 2012), no plasma do sangue para identificar morte celular extensa de leucócitos principalmente em estados de doenças infecciosas como a dengue (HA et al., 2011) e para a quantificação de DNA em culturas de células bi e tridimensionais (CHEN et al., 2012).

A técnica para análise é bastante simples: uma pequena quantidade da solução contendo o DNA Picogreen deve ser adicionada na amostra que, deve ser deixada no escuro durante 5 minutos. Logo após é feita a leitura no fluorímetro em uma faixa de 485 nm de excitação e 520nm de emissão em condições de temperatura ambiente. Esta técnica pode ser feita em placas de 96 poços com uma quantidade muito pequena de amostras e reagentes.

Portanto, o uso desta técnica para avaliar a condição do DNA em diferentes passagens de culturas de células-tronco seria bastante interessante. Entretanto, não foi encontrado na literatura estudo prévio utilizando tal técnica para avaliação de células-tronco em diversas passagens.

2 OBJETIVO

O estudo aqui desenvolvido teve como objetivo implantar uma técnica de obtenção de células-tronco a partir de polpa de dente (*dental stem-cells*, DSCs) de cachorros avaliando a taxa de proliferação celular, a morfologia das células e a qualidade celular através de indicadores de dano de DNA e estresse oxidativo em oito diferentes passagens de cultura em fase indiferenciada.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão sob a forma de manuscrito, redigido em Língua Inglesa que será submetido a Revista *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, fator de impacto 3.035 classificada como Qualis A1 pela CAPES na área de Medicina Veterinária.

O manuscrito foi organizado segundo as instruções para os autores detalhada disponibilizadas pela revista na página: <http://www.elsevier.com/journals/mutation-research-genetic-toxicology-and-environmental-mutagenesis/1383-5718/guide-for-authors>

Título do artigo: DNA comet and quantitative fragmentation assays to assess DNA damage of adult dental stem cells (DSCs) cultures passage.

Autores: Jaime Sardá Aramburú Junior, Tiago Luis Eilers Treichel, Maurício Borges da Rosa, Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho, Alencar Kolinski Machado, Francine Carla Cadoná, Sabrina Guastavino Homerich, Paulo Afonso Burmann, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Ney Luis Pippi

3.1 Manuscrito

DNA COMET AND QUANTITATIVE FRAGMENTATION ASSAYS TO ASSESS DNA DAMAGE OF ADULT DENTAL STEM CELLS (DSCs) CULTURES PASSAGE

Financial support: CNPq, CAPES, FAPERGS, FAPEAM

Jaime Sardá Aramburú Junior¹, Tiago Luis Eilers Treichel¹, Maurício Borges da Rosa¹, Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho¹, Alencar Kolinski Machado², Francine Carla Cadoná³, Sabrina Guastavino Homerich⁴, Paulo Afonso Burmann⁴, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{2,3,4}, Ney Luis Pippi¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria

² Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

³ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

⁴ Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

Corresponding author: Ivana B.M. da Cruz, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brasil. Zip code: 90.105-900. Phone: 55-55-32208163, Fax: 55-55-32208239, email: ibmcruz@hotmail.com

Abstract

The double-strand DNA breaks are considered one of the most lethal forms of damage that can compromise the ability of stem cells self-renew and differentiate. Therefore, additional studies are necessary to identify genome damage biomarkers that help the researchers to choose the better cell line to apply in clinical use. Here, we evaluated the potential use of DNA Comet Assay, DNA fragmentation fluorimetric assay using Picogreen dye and reactive oxygen species (ROS) level by DCFH-DA fluorimetric assay as potential biomarkers to identify the genome conditions of dental stem cells (DSCs) isolated from dog's canine teeth. The results showed important differences among the three initial DSCs passage when compared to $\geq 4^{\text{th}}$ passages. In general, the initial DSCs passages presented higher cell proliferation, lower DNA damage and ROS. However, we noticed a large number of nucleus with some level of DNA damage (30 to 40% in the initial DSCs passage and $> 50\%$ in the late passage) that indicates an *in vitro* DSCs genomic fragility. The results suggest that these relatively simple and inexpensive approaches as Comet, DNA fragmentation could to help for sorting stem cell with less DNA damage used to research or therapeutic use.

Keywords

Stem cell, genotoxicity, Dental Stem Cells, oxidative stress, DNA damage

1. Introduction

The considerable therapeutic potential of embryonic and adult stem cells has generated increasing interest in a wide variety of biomedical disciplines mainly with mesenchymal stem cells. This is the case of adult dental stem cells (DSCs) have been isolated from humans and animals including dogs, presenting a distinctive population of pluripotential cells [1,2,3,4]. The DSCs offer a potentially renewable source of cell types that are easily isolated and expanded for use in regenerative therapies as dentine, odontoblasts, dental pulp, bone, cartilage, muscle, hair follicle, cornea, neuronal cells, melanocytes, and endothelial cells [5].

However, while the therapeutic potential of advanced stem cell modification has been observed in clinical trials with long term follow-up [6], potential adverse reactions related to insertional mutagenesis by integrating gene vectors and chromosomal instability in proliferating cells have emerged as a major limitation [7]. The stem-cells susceptibility to the acquisition of chromosomal anomalies is related to significant their cell proliferation and metabolic activity [8,9,10,11,12]. The major concern related to chromosomal instability is if *in vitro* manipulation during culture expansion increases tumourigenicity risk [13,14,15].

A study performed by Duailibi et al. [16] using a human DSCS lines revealed that approximately 70% of the cells exhibited karyotypic abnormalities including polyploidy, aneuploidy and ring chromosomes. The authors emphasize the need for the careful analysis of the genome instability of cultured hDSCS before they can be clinically used.

Despite the relevance of regenerative therapies to human and veterinarian medicine [17], studies to determine potential genome damage biomarkers that help the researchers to choose the better cell line to realize regenerative studies or to applied in clinical use are still incipient.

The Comet assay is a versatile and sensitive method of measuring DNA damage in individual cells that Kruszewski and collaborators [18] showed that the 100 comets usually analyzed in a typical comet experiment are sufficient to obtain a reliable cell cycle distribution comparable with the results obtained by the flow cytometry for the same cell population. The comet assay has proven to be a useful tool for investigating the induction and repair of DNA in various cell types and o identify patients oversensitive to DNA damaging agents and in predicting resistance of tumor cells to radio- and chemotherapy [19].

Therefore, this study aimed to isolate dog DPSCs using previously methods described by human DPSCs evaluating the potential genotoxicity using DNA Comet assay during eight undifferentiated cell passages. However, as Comet assay present some subjective level, we also evaluated the DNA fragmentation by fluorimetric quantification as well as the reactive oxygen species (ROS) levels as biomarker of oxidative status of DSCs cultures passage

2. Material and Methods

2.1 Samples

The deciduous canine tissues were removed from a healthy dog determined through physical examination and to canine removal the dog was submitted a preanesthetic procedure using ketamine (15 mg kg^{-1}), midazolam (0.2 mg kg^{-1}) and morphine (0.5 mg kg^{-1}) and fully anesthetized with propofol (4 mg kg^{-1}). The heart rate and oxygen saturation of dogs were monitored during the tooth extraction procedure. The study protocol (084/2011) was approved by the Research Animal Ethics Committee of Universidade Federal de Santa Maria, RS-Brazil.

2.2 Isolation and cultivation conditions of dog DSCS

The isolation and cultivation of DSCS was performed as previously described by Bernardi et al. [20]. Briefly, soon after the extraction, teeth were immersed in 1 mL DEMEN/HEPES culture medium, 10% bovine fetal serum, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ de streptomycin and 0.45 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicin to transport the teeth samples from surgery room to cellular laboratory.

Upon removal of pulp tissue, the teeth were clinically evaluated for the presence of absence of the remaining root to evaluate the possible contact zones of the pulp tissue with the external environment. The pulp was isolated from the dental tissue with the aid of an excavator, and all pulp tissue was

removed (crown and root) from the dentin. This procedure was performed in the laminar flow in sterile conditions. The pulp was minced and incubated at 5% CO₂ 37°C for 60 minutes in buffer containing 0.2% type 1 collagenase (Gibco). The cells were disrupted from the dental pulp and cultured in the same media conditions described before. The culture medium was changed after 24 hours of initial plating and, after this time, every 3-4 days. When the culture reached 90% of confluence, a passage using trypsin-EDTA 0.5% (Sigma-Aldrich) was performed to loosen the cells from the plate. The density of cells seeded in each passage was 10⁴ cells/cm².

2.3 Cell proliferation and DSCs morphological analysis

The proliferation rate in different DSCS culture passages was determined by cell counting using a Neubauer chamber as well as by MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide) using DPSCs seeded into 96-well plates at a density of 5 x 10⁵ cells/well. The MTT assay was evaluated according to the manufacturer's instructions (Sigma). MTT reduction/attenuation values for each well were measured spectrophotometrically at 570 nm. The MTT assay was carried out every each culture cell passage in quadruplicate. The morphological analysis of DSCs in different passages was also microscopically evaluated considering the cell form, and general tissue structure.

2.4 Reactive Oxygen Species production

The accumulation of intracellular oxidative damage is related to cell *in vitro* aging and subsequently decrease in potential cellular proliferation and differentiation [21]. Therefore, we evaluated to biomarkers during different DSCS culture passages: intracellular ROS production and lipid peroxidation. The reactive oxide species (ROS) production was evaluated using a non-fluorescent cell-permeating compound 2-(2,2-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA assay) as described by Wallace et al. [22]. DCFH-DA is hydrolysed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. DSCS samples of each culture passage were treated with DCFH-DA (10 $\mu\text{mol/l}$) for 60 min at 37 °C. The fluorescence was measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm. The calibration curve was performed with standard DCF (0–1 mmol) and the level of ROS production was calculated as nmol DCF formed/mg protein [22].

2.5 DNA fragmentation assay

The level of DNA fragmentation of DSCS from each culture cell passages was performed using a ultrasensitive protocol to quantifies the degree of DNA fragmentation using Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen) using a protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation) using a protocol similar to described by Batel et al. [23] and Georgiou et al. [24] and adjusted by culture cell in 96-well.

The method is based on the ability of the specific fluorochrome dye (PicoGreen®) to make a very stable complex with double-strand DNA (dsDNA) in alkaline conditions instead of ssDNA, proteins, SDS, and urea. This selectivity characteristic is used to follow DNA denaturation with decreasing fluorimetric signal intensity proportionate to increasing ssDNA and mononucleotide content. To perform the assay the PicoGreen dye was diluted 1:200 with TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) and incubated with cell culture samples (1×10^5 cells/well) in the dark at room temperature for 5 min. To minimize photobleaching effects, time for fluorescence measurement was kept constant for all samples. The fluorescence was measured at an excitation of 485nm and an emission of 520nm recorded at room temperature. All the fluorescence measurements were recorded on a fluorimeter (SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). A standard curve was generated using double-stranded (ds) lambda DNA provided by the manufacturer. The fluorescence emission measurement of each sample of eight DSCs passage was evaluated. To cell sample was an average of four independent measurements and the corresponding standard error is indicated in the data. As during the cell passage the number cells is variable due to potential different cell proliferation the data were initially corrected to number of cells in each passage (dsDNA fluorescence/number of cells). Additionally, the DNA fragmentation in different DSCS culture passage was expressed as a percentage of dsDNA calculated in relation to first culture cell.

2.6 Single cell gel electrophoresis (comet assay)

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [25] in accordance with the general guidelines for use of the comet assay [26,27,28] in DSCS samples of 1st ,3rd and 8th passages. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

2.7 Statistical analysis

The results of the all experiments were analyzed with one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test. P-values <0.05 were considered as significant.

3 Results

The DSCs cells presented a fusiform morphology similar to fibroblast cells that was maintained from all cell culture passages (Figure 1, A). The growth curve (Figure 1B, 1C) showed the proliferation of DSCS cells active from passages two and three ($p=0.001$) and after the DSCS proliferation presented an intermediary values among the first and second/third passages.

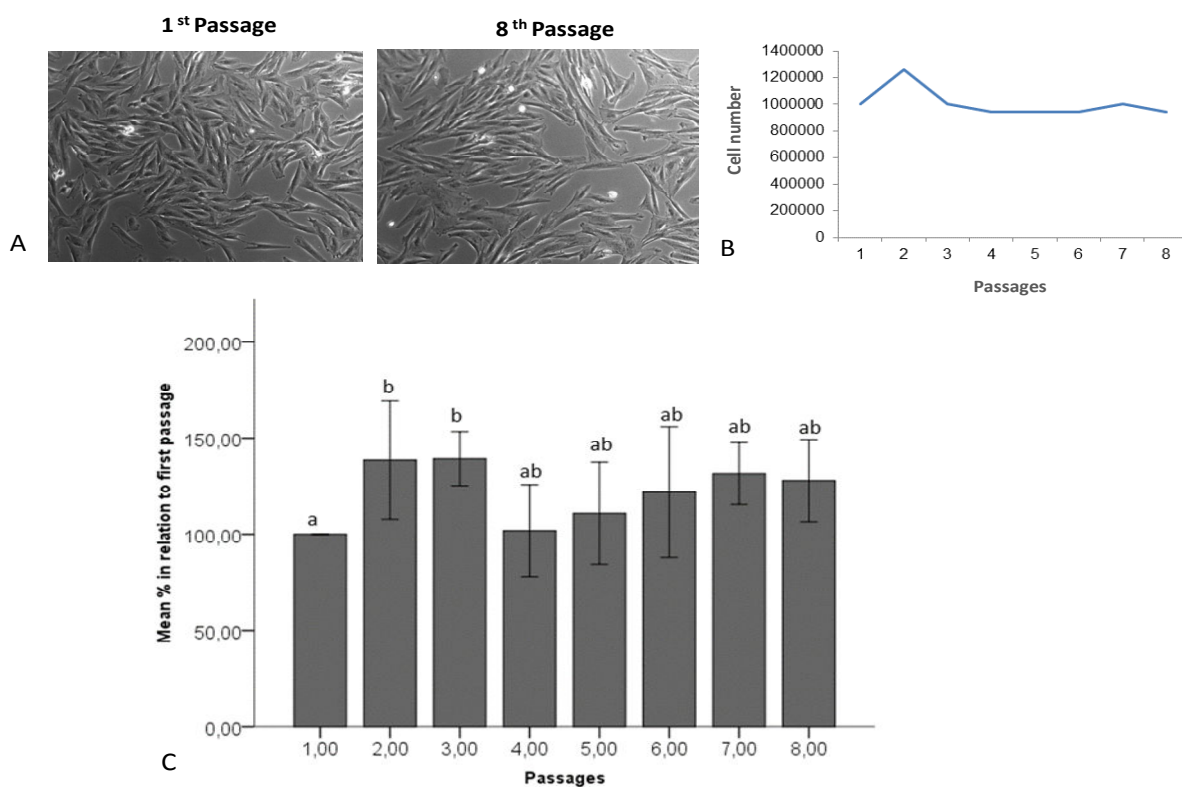


Figure 1 (A) Morphologic appearance of DPSCs isolated from dog's canine teeth. No differences were found in morphologic appearance between DSCs during the eight cell passages; (B) growth among in different DSCs passage analyzed by cell counting) and MTT assay.

The ROS levels were also evaluated in different passages of dog DSCs. As can see in Figure 3 the, comparing to first passage the others presented higher ROS levels mainly in 3rd and from $\geq 6^{\text{th}}$ passages ($p=0.003$).

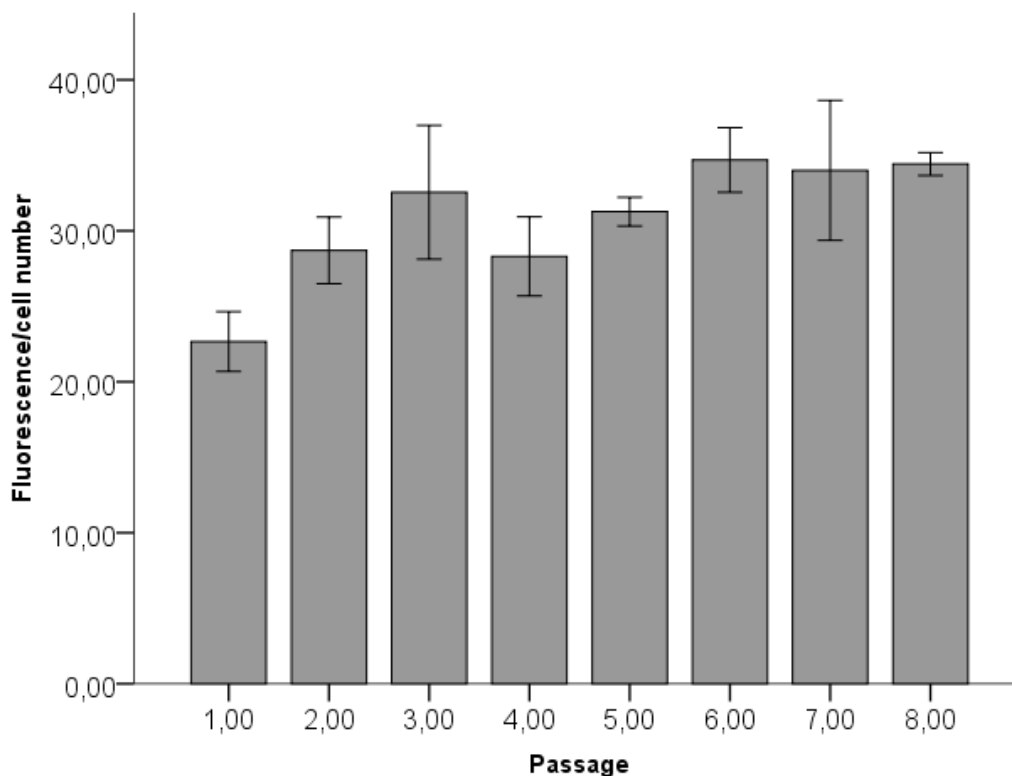


Figure 2 Concentrations of reactive oxidative species (ROS) production by DSCs in different passage evaluated by fluorimetric DCFH-DA assay and corrected by cell number of each passage. Different letters indicating significant statistical differences evaluated by analysis of variance followed by Tukey post hoc test ($p<0.05$).

DNA fragmentation was evaluated by fluorimetric assay and the results of dsDNA levels are presented in Figure 2. Comparing to first passage that was used to reference and represented 100% of dsDNA level the second passage presented higher dsDNA levels ($p=0.0001$). The other DSCs passages presented intermediary levels between the first as well as the second passages. As the data were corrected to number of cells these results the effect of higher number cells also observed in the proliferation cell analysis was not considered result of differential cell number observed in DSCs passage.

The results of potential DNA damage during the eight DSCS passages analyzed by DNA Comet assay are presented in Table 1 and Figure 4. The DNA damage index that evaluated the intensity of DNA damage was to three initial DSCs passages. However, the DNA damage trended to increase from 4th passage and presented higher levels in the 7th passage (Table 1). A second analysis to evaluated the number of cells that not present any DNA damage (damage 0) was also evaluated and the data are presented in the Figure 4. The results showed that in the three initial passages 40% or more cells did not present high DNA damage when compared to other passages.

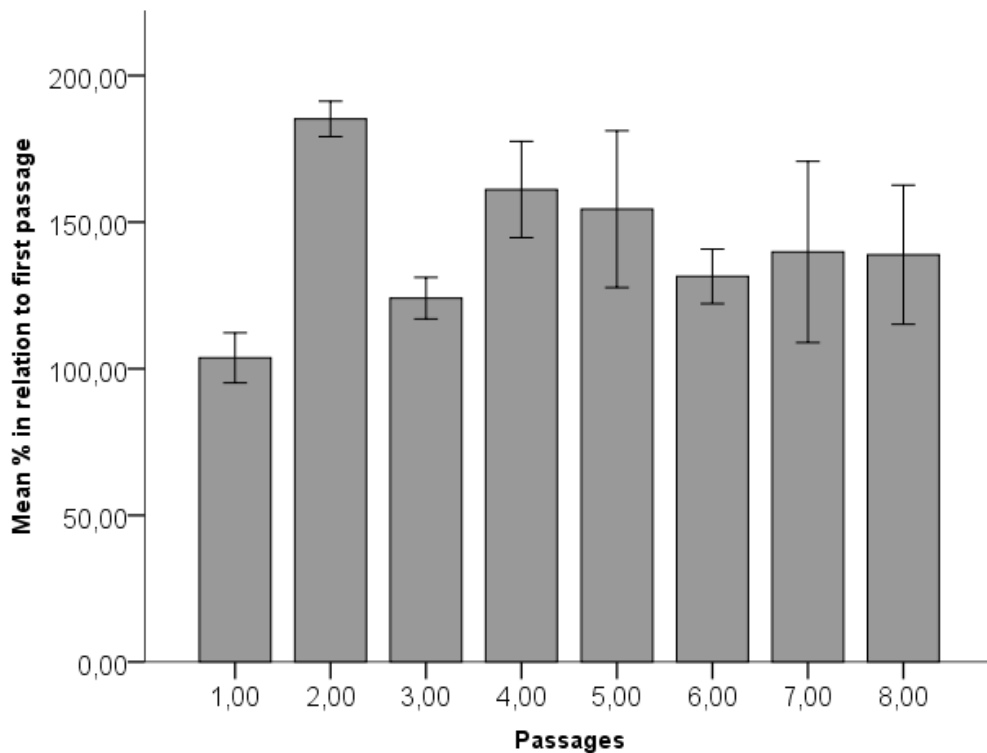


Figure 3 dsDNA level evaluated by fluorimetric Picogreen assay of DSCs in different passages. The results are presented in % related to first DSCs passage. Different letters indicating significant statistical differences evaluated by analysis of variance followed by Tukey post hoc test ($p < 0.05$).

However, the number of nucleus without any DNA damage can be considered low ($< 50\%$) in the DSCs cells. Then, we sum the nuclei without damage with nuclei classified as having damage level 1. The three initial DSCs passages had on average 75.4% of nuclei without damage or damage level 1 whereas the other 24.6% of nuclei had damage in categories ≥ 2 . From the 4th passage the average of nuclei without damage or damage level 1 was 65.9%.

Table 1 DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of several dental stem cells in different cell culture passages.

Passages	Comet class frequency (/100 nucleus analyzed)					Index Damage
	Mean \pm SE					
	0	1	2	3	4	
1	44.5 \pm 9.3	27.7 \pm 2.9	13.4 \pm 4.2	6.3 \pm 1.6	2.5 \pm 0.6	55.5 \pm 7.5
2	44.9 \pm 6.1	30.4 \pm 2.8	12.6 \pm 2.5	7.2 \pm 1.8	2.7 \pm 0.3	55.1 \pm 6.1
3	54.1 \pm 9.4	24.7 \pm 7.6	8.2 \pm 7.3	6.3 \pm 2.6	3.3 \pm 0.8	45.9 \pm 4.7
4	37.9 \pm 8.6	28.9 \pm 7.7	11.4 \pm 3.8	10.5 \pm 3.3	5.2 \pm 1.2	62.0 \pm 8.6
5	43.4 \pm 7.0	27.1 \pm 4.2	10.2 \pm 4.2	8.2 \pm 1.6	3.7 \pm 1.2	63.6 \pm 5.9
6	47.8 \pm 8.8	15.5 \pm 2.1	10.7 \pm 4.7	7.0 \pm 1.4	4.1 \pm 1.6	52.2 \pm 8.9
7	27.1 \pm 9.8	36.0 \pm 9.4	14.7 \pm 5.4	13.2 \pm 3.0	11.7 \pm 2.9	82.8 \pm 9.4
8	48.9 \pm 9.6	26.5 \pm 3.9	10.7 \pm 4.9	7.8 \pm 1.0	6.8 \pm 2.4	51.2 \pm 9.8

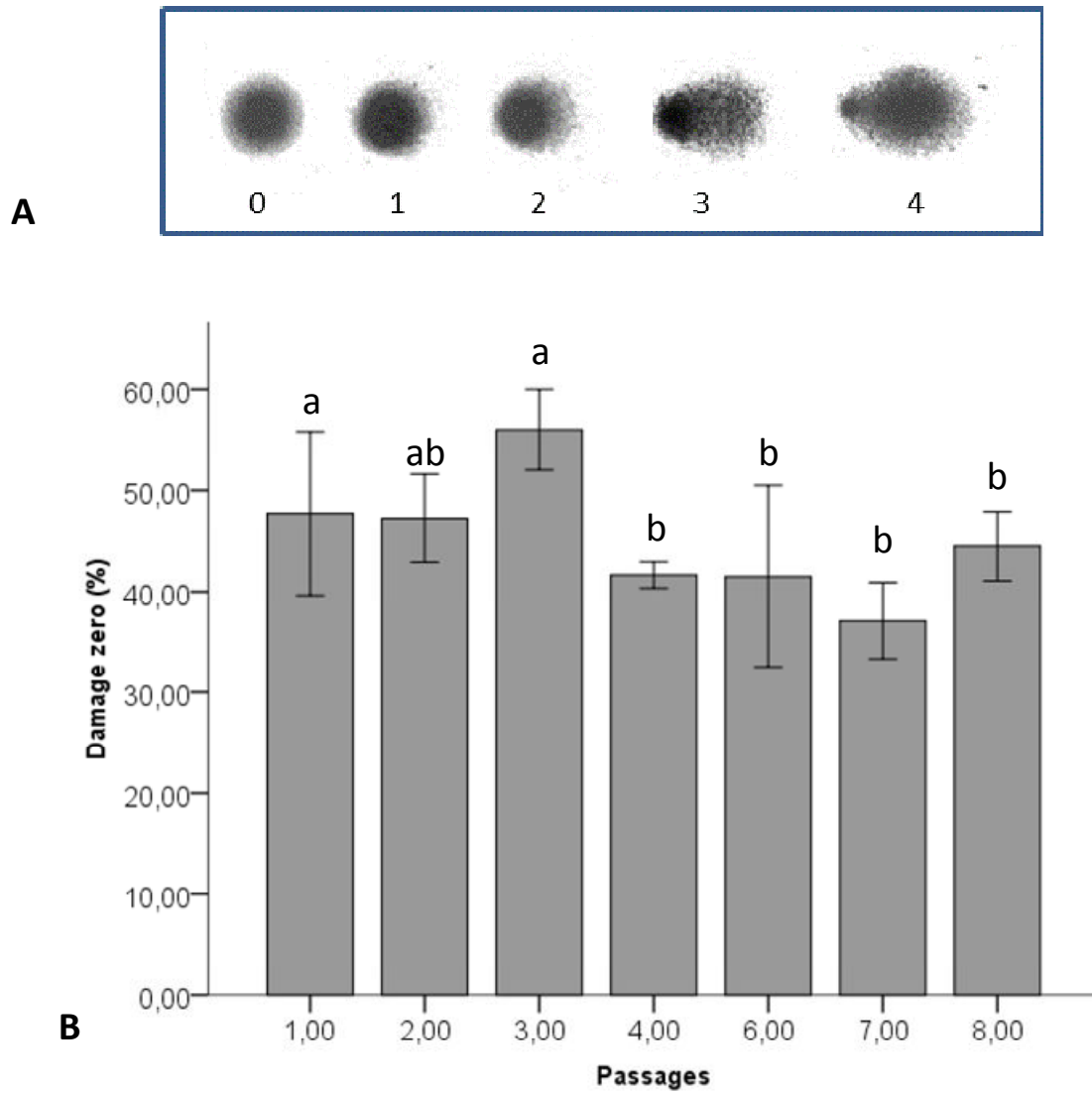


Figure 4 DNA Comet Alkaline Assay: (A) DNA damage levels. (B) Frequency of nucleus without DNA damage (zero) in different DSCs passages. Different letters indicating significant statistical differences evaluated by analysis of variance followed by Tukey post hoc test.

4 Discussion

Adult stem cells, as DSCs are important in the long term maintenance of tissues throughout life, since these lineages are responsible for body tissues regeneration that suffer some damage or to replacing senescent terminally differentiated cells [29]. According, these cells have an effective system to maintain their genomic integrity, both by increased stress defense and DNA repair mechanisms. This maintenance is very important because genomic alterations can potentially compromise the functionality of entire cell lineages. The dsDNA breaks are considered one of the most lethal forms of damage, and failure to adequately repair that can compromise the ability of stem cells as DSCs self-renew and differentiate, as well as can lead to genomic instability and disease [29].

Therefore, the major challenge concerning the use of DSCs or other adult stem cells as a source of cells in tissue regeneration therapies is related to ability to maintain their genetic integrity during long term culture and differentiation [7,16].

However, to evaluate in *in vitro* conditions the genome quality of stem cells is not easy. This is because most stem-cell cultures did not present some morphological biomarkers that help us the better cells that cells with genome compromised. For this reason, a potential fast screening of genomic conditions of cells that will be used in regenerative approaches is desirable. Therefore, in the present study we investigated the quality of eight initial DSCS passages

derived from dog dental tissue in relation to potential DNA damage using two approaches: DNA Comet and DNA fragmentation assays.

Before we discuss the results found here is important to comment about the use of DNA fragmentation assay as quantitative complementary test in the analysis of DNA damage of DSCs. As the characterizing the structural integrity of DNA is critical in a wide variety of biological applications, the analysis of DNA damage has important clinical and molecular research applications. Several studies have analyzed, for example the repair precision in pluripotent cells and their differentiated progeny using several biomarkers as zinc finger nucleases [30]. However, assays as DNA fragmentation using DNA picogreen dye could help us to eliminate the subjectivity to become easier to evaluate the presence of DNA damage in an easy and fast way. Thereby, we used a protocol adapted from Georgiou et al. [23] to quantitatively evaluate the DNA damage in different DSCs passage together with DNA Comet assay, a classic and broadly used genotoxic assay.

The Picogreen dye has the ability to measure 25 pg/mL of dsDNA with a standard spectrofluorometer and fluorescein excitation and emission wavelengths and minimize the fluorescence contribution of RNA and single-stranded DNA (ssDNA). Additionally, the Picogreen-based DNA quantification is used in different cell lysis protocol frequently used to quantify the cellularity of three-dimensional (3D) cell-seeded scaffolds to induce *in vivo* tissue formation [31] and to quantify the DNA from two-dimensional and three-dimensional cell cultures [32]. Since the necrosis, apoptosis and dsDNA breaks cause DNA

degradation, cells with DNA damage potentially present lower level of dsDNA and, therefore lower fluorescence than cells with genomic integrity.

On the other hand, during the last 20 years, the comet assay has proven to be a useful tool for investigating the induction and repair of DNA in various cell types. Previous studies, as performed by Nikitina et al. [33] have analyzed the assessment of DNA damage in human bone marrow cells and multipotent mesenchymal stromal cells using DNA Comet assay

Our results showed important differences among the three initial DSCs passage when compared to $\geq 4^{\text{th}}$ passages when the data of DNA fragmentation as well as Comet assay are considered. These data are in agreement to results described by Nikitina et al. [32] that assessed the DNA damage in human bone marrow cells and multipotent mesenchymal cells from 3 to 11 cell culture passages. These authors observed that in the early and late passages the mesenchymal cells presented some cells with DNA damage. These results suggest that both test could to be used a complementary assay to help researchers choose which cell passage containing less damage in genomic studies of cell regeneration and differentiation.

However, a fact that needs to be discussed concerns the large number of cells with DNA damage that were found in the comet assay in all DSCs passage (approximately 30-40% of nucleus presented some DNA damage level!). These results point to the potential " DSCs fragility genomic these cells in conditions *in*

vitro" that could to be some impact on further differentiation and regenerative processes.

This assumption is supported by a previous study performed by Duailibi et al. [16]. These authors analyzed human DSCs cytogenetic integrity using classical G banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with X chromosome specific probe in the second cell passage. They found about 70% of the cells with karyotypic abnormalities including polyploidy, aneuploidy and ring chromosomes. These results showed a heterogeneous spectrum of abnormalities indicates a high frequency of chromosomal mutations that continuously arise upon extended culture. Unfortunately, the authors did not study other further passages to permit a comparison with our results.

To ensure maintenance of the stem cells as DSCs and to coordinate differentiation of progeny, all these cells must protect the genome from genotoxic lesions potentially caused by exogenous and endogenous factors. Among the endogenous factors, the ROS has an important role. ROS generate DNA damage by oxidative modification of DNA bases or by spontaneous hydrolysis of nucleosides. These molecules lead to the formation of DNA double - strand breaks. Since DNA damage can originate from oxidative attack of ROS to DNA, from nuclease action during DNA repair or during early or late events in apoptosis or necrosis [23] we investigate if the DSCs ROS production could to be different in different DSCs cultures passage. Our results showed increase in ROS levels from DSCs second passage that increased significantly in the $\geq 6^{\text{th}}$ cell passage.

Considering the whole of results, cell proliferation rate, DNA damage evaluated by DNA picogreen and Comet assay as well as ROS production, the second DSCs passage was better with lower indicator of DNA damage and oxidative.

Baum et al. [7] commented that about management of genotoxicity of stem cells with potential therapeutic use some mutations occurring in the production of stem cell are not necessarily dangerous. However, we don't know where and when "bad mutations" can affect the success of regeneration or cause adverse effects as cellular malignization.

Considering the results presented here, we suggest that integrative approach involving stem culture cells and relatively simple and inexpensive approaches as Comet, DNA fragmentation as well as ROS levels for sorting stem cell with less DNA damage used in research or therapeutic use. This suggestion can be considered important since different somatic lineages may respond differently to the same toxic challenge or cell culture conditions [34].

Some methodological limitations related to our study need to be comment: we did not investigate other potential DNA damage biomarker as mutation in genes related to cellular cycle as p53 and retinoblastoma. We did not test if the DSCs cells in different passage that present different DNA damage conditions could to modify the differentiation and cellular senescence processes. However, we believe that the lack of these additional experiments did not invalidate the results presented here.

Finally, we point out that for our best knowledge this is the first one study that analyzed the potential DNA damage effects in different DSCS passages by DNA fragmentation assay as well as DNA Comet assay. The results obtained suggest that incorporation of DNA damage assays in stem cell culture as DSCs may help us to choose the best stem cell passage to conduct regenerative experiments.

References

- [1] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahim, P.G. Robey, S. Shi, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97 (2000) 13625–13630.
- [2] B.M. Seo, M. Miura, S. Gronthos, P.M. Bartold, S. Batouli, J. Brahim, M. Young, P.G. Robey, C.Y. Wang, S. Shi, Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *Lancet* 364 (2004) 149–155.
- [3] S. Nakamura, Y. Yamada, W. Katagiri, T. Sugito, K. Ito, M. Ueda, Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp, *J. Endodont.* 35 (2009) 1536–1542.
- [4] J.Y. Park, S.h. Jeon, P.H. Choung, Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis, *Cell Transplant.* 20 (2011) 271-285.

- [5] N. Kawashima, Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration?, *Arch Oral Biol* 57 (2012) 1439–1458
- [6] M. Cavazzana-Calvo, A. Fischer, F.D. Bushman, S. Hacein-Bey-Abina, P. Leboulch, Is normal hematopoiesis maintained solely by long-term multipotent stem cells?, *Blood* 117 (2011) 4420–4424.
- [7] C. Baum, U. Modlich, G. Göhring, B. Schlegelberger. Concise review: managing genotoxicity in the therapeutic modification of stem cells, *Stem Cells* 29 (2011) 1479-84.
- [8] A.V. Roschke, K. Stover, G. Tonon, A.A. Schäffer, I.R. Kirsch, Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability, *Neoplasia* 4 (2002) 19-31.
- [9] B.W. Draper, C.M. McCallum, J.L. Stout, A.J. Slade, C.B. Moens, A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish, *Methods Cell Biol.* 77 (2004) 91-112.
- [10] J.J. Buzzard, N.M. Gough, J.M. Crook, A. Colman, Karyotype of human ES cells during extended culture, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 381-382.
- [11] L.M. Hoffman, M.K. Carpenter, Human embryonic stem cell stability, *Stem Cell Rev.* 1 (2005) 139-144.

[12] P. Rebuzzini, T. Neri, M. Zuccotti, C.A. Redi, S. Garagna, Chromosome number variation in three mouse embryonic stem cell lines during culture, *Cytotechnology* 58 (2008) 17-23.

[13] N. Lefort, A.I. Perrier, Y. Laâbi, C. Varela, M. Peschanski, Human embryonic stem cells and genomic instability, *Regen. Med.* 4 (2009) 899-909.

[14] R.J. Lund, E. Närvä, R. Lahesmaa, Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells, *Nat. rev. Genet.* 13 (2012) 732-744.

[15] M. Yang, G. Büsche, A. Ganser, Z. Li, Cytological characterization of murine bone marrow and spleen hematopoietic compartments for improved assessment of toxicity in preclinical gene marking models, *Ann Hematol.* (2013) [Epub ahead of print].

[16] M.T. Duailibi, L.D. Kulikowski, S.E. Duailibi, M.V. Lipay, M.I. Melaragno, L.M. Ferreira, J.P. Vacanti, P.C. Yelick, Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines, *J. Mol. Histol.*, 43 (2012) 89-94.

[17] I. Ribitsch, J. Burk, U. Delling, C. Geißler, C. Gittel, H. Jülke, W. Brehm, Basic science and clinical application of stem cells in veterinary medicine, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 123 (2010) 219-263.

[18] M. Kruszewski, T. Iwanerko, E.K. Machaj, T. Ołdak, M. Wojewódzka, L. Kapka-Skrzypczak, Z. Pojda, Direct use of the comet assay to study cell cycle

distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation, *Mutagenesis* 2012 27 (2012) 551-558.

[19] A. A. Goodarzi, P. A. Jeggo, Irradiation induced foci (IRIF) as a biomarker for radiosensitivity. *Mutation Res.* 736 (2012) 39-47.

[20] L. Bernardi, S.B. Luisi, R. Fernandes, T.P. Dalberto, L. Valenti, J.A.B. Chies, A.C.M. Fossati, P. Pranke, The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption, *J. Endodont.* 37 (2011) 973-979.

[21] M. S. Rao, M. P. Mattson, Stem cells and aging: expanding the possibilities, *Mech. Ageing Dev.* 122 (2001)713–734.

[22] D.R. Wallace, S.L. Dodson, A. Nath, R.M. Booze, Delta opioid agonists attenuate TAT(1–72)-induced oxidative stress in SK-N-SH cells, *Neurotoxicology* 27 (2006) 101–106.

[23] R. Batel, Z. Jaksic, N. Bihari, B. Hamer, M. Fafandel, C. Chauvin, H.C. Schröder, W.E. Müller, R.K. Zahn, A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod), *Anal Biochem.* 270 (1999) 195-200.

[24] C.D. Georgiou, I. Papapostolou, K. Grintzalis, Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks), *Nat. Protoc.* 4 (2009) 125-131.

[25] N. Singh, M. McCoy, R. Tice, E. Schneider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1995) 184–191.

[26] R.R. Tice, D. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen* 35 (2000) 206–221.

[27] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, G. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis* 18 (2003) 45–51.

[28] S. Nadin, L. Vargas-Roig, D. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183–1186.

[29] C.R.Rocha, L.K.Lerner, O.K.Okamoto, M.C. Marchetto, C.F. Menck. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutat Res* 752 (2013) 25-35

[30] H. Fung, D.M. Weinstock, Repair at single targeted DNA double-strand breaks in pluripotent and differentiated human cells, *PLoS One* 6 (2011) e20514.

[31] S. Impens, Y. Chen, S. Mullens, F. Luyten, J. Schrooten, Controlled cell-seeding methodologies: a first step toward clinically relevant bone tissue engineering strategies, *Tissue Eng. Part. C. Methods* 16 (2010) 1575-1583.

[32] Y. Chen, M. Sonnaert, S.J. Roberts, F.P. Luyten, J. Schrooten, Validation of a PicoGreen-based DNA quantification integrated in an RNA extraction method for two-dimensional and three-dimensional cell cultures, *Tissue Eng. Part. C. Methods* 18 (2012) 444-452.

[33] V.A. Nikitina, A.I. Chausheva, A.K. Zhanataev, E.Y. Osipova, A.D. Durnev, N.P. Bochkov, Assessment of DNA damage in human bone marrow cells and multipotent mesenchymal stromal cells, *Bull. Exp. Biol. Med.* 151 (2011) 550-552.

[34] P.Nagaria, C.Robert, F.V. Rassool. DNA double-strand break response in stem cells: Mechanisms to maintain genomic integrity. *Biochim Biophys Acta* 1830 (2013) 2345-53

4 DISCUSSÃO

Os resultados aqui descritos mostraram diferenças importantes entre as três primeiras passagens das DSCs quando comparadas com $\geq 4^{\text{a}}$ passagem. No caso, as três primeiras passagens mostraram uma melhor taxa de proliferação celular e menor indicação de danos genômicos via análise de fragmentação do DNA e ensaio DNA Cometa bem como de estresse oxidativo avaliado pelos níveis de produção de ROS pelas células. Estes dados estão de acordo com os resultados descritos por Nikitina et al. (2011) que avaliaram os danos no DNA em células de medula óssea humana e células mesenquimais multipotentes entre a 3^{a} e 11^{a} passagem de cultura celular. Os autores observaram que nas passagens iniciais e finais as células mesenquimais apresentaram algumas células com dano no DNA.

Considerando a revisão de literatura feita, até o presente momento o estudo aqui descrito não havia sido conduzido em células-tronco de polpa dentária assim como não foram encontrados estudos envolvendo análise de fragmentação de DNA pelo ensaio fluorimétrico do Picogreen® em diferentes passagens de células-tronco de qualquer natureza. Portanto, é importante tecer algumas considerações sobre a relevância da realização de testes de genotoxicidade em estudos e aplicações terapêuticas envolvendo células-tronco adultas ou mesmo embrionárias.

Células-tronco adultas, como a DSCs são importantes para manutenção de um grande número de tecidos ao longo da vida. Estas linhagens são responsáveis pela regeneração dos tecidos do corpo que sofreram algum dano

ou para a reposição de células envelhecidas terminalmente diferenciadas (ROCHA et al., 2012).

Evidências têm sido acumuladas mostrando que as células-tronco adultas assim como as células-tronco embrionárias têm um sistema eficaz para manter sua integridade genômica, tanto pela defesa ao aumento de estresse e pelos mecanismos de reparo do DNA. Esta manutenção é muito importante, pois as alterações genômicas podem, potencialmente, comprometer a funcionalidade de linhagens inteiras de células. As quebras nas moléculas de DNA dupla-fita (dsDNA) são consideradas uma das formas mais letais e os danos causados podem gerar incapacidade das células reparar adequadamente o seu genoma. Esta condição pode gerar instabilidade genômica e assim pode comprometer a habilidade das células-tronco de se auto-renovarem, se diferenciarem. e diferenciação, bem como pode conduzir a estados de doença como o câncer (ROCHA et al., 2012).

Portanto, o principal desafio relativo à utilização de DSCs ou células-tronco adultas como uma fonte de células em terapias de regeneração de tecidos potencialmente aplicadas na medicina veterinária está relacionada com a capacidade de manter a sua integridade genética ao longo do tempo da cultura e a diferenciação (BAUM et al., 2012).

No entanto, para avaliar, as condições *in vitro* de qualidade do genoma das células-tronco não é fácil. Isto porque a maioria das culturas de células-tronco não apresenta algum biomarcador morfológico que permita identificar as células com um genoma “saudável” das células genomicamente comprometidas. Por esta razão, é desejável o desenvolvimento de avaliações sobre a condição genômica das células através de ensaios rápidos. Portanto,

no presente estudo, investigou-se a qualidade das DSCS em oito passagens iniciais derivadas de tecido dental cão em relação a danos ao DNA através de duas técnicas: DNA Cometa e ensaios de fragmentação de DNA.

À medida integridade estrutural do DNA é fundamental numa grande variedade de aplicações biológicas, a análise de danos no DNA tem importantes aplicações na pesquisa clínica e molecular. Vários estudos analisaram, por exemplo, a precisão de reparo em células pluripotentes e progênes diferenciadas usando algum biomarcador como nucleases que possuem “zinc fingers” [29]. No entanto, os ensaios de fragmentação de DNA como ensaios de fragmentação de DNA usando o corante DNA Picogreen® poderia ajudar a eliminar a subjetividade para avaliar a presença de danos no DNA de uma maneira fácil e rápida. Desse modo, foi utilizado um protocolo adaptado de Georgiou et al. (2012) para avaliar quantitativamente os danos ao DNA nas diferentes passagem das DSCs, juntamente com DNA ensaio Cometa, um ensaio clássico de genotoxicidade.

O corante Picogreen® que tem a capacidade de detectar quantidades muito pequenas de dsDNA com um fluorímetro padrão não se liga a outras moléculas de ácidos nucleicos com DNA fita-simples ou RNAs. Assim, se e somente a fluorescência emitida será relacionada apenas à presença de dsDNA. Além disso, a quantificação de DNA Picogreen é utilizada em protocolos de lise celular utilizados para quantificar as células semeadas em estruturas tridimensionais, *scaffolds*, para induzir a formação de tecido vivo (IMPENS et al., 2010) e a quantificação do DNA em culturas celulares bidimensionais e tridimensionais (CHEN et al., 2012). Uma vez que, necrose, apoptose e quebra de dsDNA causam degradação do DNA, células com dano

no DNA apresentam baixo potencial de dsDNA, portanto uma fluorescência mais baixa que células integras.

Por outro lado, durante os últimos 20 anos, o ensaio cometa provou ser uma útil ferramenta para investigar a indução e reparação de DNA em vários tipos de células. Estudos anteriores, realizados por Nikitina et al. (2011) analisaram a avaliação de danos no DNA em células de medula óssea humana e células estromais mesenquimais multipotentes utilizando o ensaio cometa DNA.

No entanto, um fato que precisa ser também discutido e que emergiu dos resultados aqui descritos diz respeito ao grande número de células com danos no DNA que foram encontrados no ensaio cometa em todas as passagens DSCs (aproximadamente 30-40% dos núcleos apresentaram algum nível de danos no DNA!). Estes resultados apontam para o potencial de "fragilidade genômica das DSCs *in vitro*", que poderia ter algum impacto maior sobre os processos de diferenciação e regenerativos.

Esta suposição é apoiada por um estudo prévio realizado por Duailibi et al (2012). Estes autores analisaram a integridade citogenética das DSCs humana utilizando faixas G clássicas e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda específica de cromossomo X na segunda passagem celular. Eles descobriram que aproximadamente 70% das células com alterações cariotípicas incluindo aneuploidia, poliploidia e cromossomas em forma de anel. Estes resultados mostraram um espectro heterogêneo de anomalias que indica uma alta frequência de mutações cromossômicas que apresentam culturas prolongadas. Infelizmente, os autores não estudaram outras passagens adicionais o que não permitir a comparação com os nossos resultados.

Para assegurar a manutenção das células-tronco como as DSCs e para coordenar a diferenciação de descendência, todas estas células têm que proteger o genoma a partir de lesões potencialmente genotóxicas causadas por fatores endógenos e exógenos. Entre os fatores endógenos, o ROS desempenha um papel importante. ROS pode gerar danos ao DNA através da modificação oxidativa de bases de DNA ou por hidrólise espontânea de nucleósidos. Estas moléculas podem conduzir a quebra das dupla fitas de DNA.

Uma vez que os danos do DNA podem ser provenientes de ataque oxidativo de ROS de DNA, a partir de ações das nucleases durante a reparação do DNA ou durante eventos precoces ou tardios de apoptose ou (NAGARIA et al., 2012) foi também aqui investigado se a produção de ROS pelas DSCs poderia ser diferente em diferentes passagens da cultura de DSCs. Nossos resultados mostraram aumento nos níveis de ROS das DSCs na segunda passagem, que aumentou de forma significativa na 6ª passagem celular.

Considerando-se o conjunto dos resultados, os danos do DNA, a taxa de proliferação de células, avaliada por ensaio de Picogreen® e Cometa, bem como a produção de ROS, a segunda passagem das DSCs foi a melhor apresentando baixo indicadores de danos no DNA e de oxidação.

Baum et al. (2012) teceram comentários a cerca de comportamento da genotoxicidade das células-tronco utilizadas com fins terapêuticos e que algumas mutações ocorridas na produção destas células não são necessariamente perigosas. No entanto, não sabemos onde e quando

"mutações ruins" podem afetar o sucesso da regeneração ou causar efeitos adversos como tumores malignos.

Considerando os resultados apresentados aqui, pode se sugerido que o uso de uma abordagem integrada envolvendo cultura de células-tronco seja relativamente simples e de baixo custo como o Cometa, fragmentação de DNA, bem como níveis de ROS para classificar as células-tronco com menos danos do DNA a serem usadas em pesquisas com fins terapêuticos. Esta sugestão é importante, pois diferentes linhagens somáticas podem responder de forma diferente para o mesmo desafio tóxico ou condições de cultura celular [33].

Algumas limitações metodológicas relacionadas ao estudo aqui desenvolvido também precisam ser comentadas: não foram investigados outros biomarcadores para dano potencial de DNA como mutação nos genes relacionados ao ciclo celular como p53 e retinoblastoma. Não foram testadas se a célula DSCs em diferentes passagens que apresentam diferentes condições de danos do DNA pode alterar a diferenciação e processos de senescência celular. No entanto, acreditamos que a falta desses experimentos adicionais não invalida os resultados aqui apresentados.

Os resultados obtidos sugerem que a incorporação de ensaios de danos ao DNA em cultura de células-tronco como DSCs pode ajudar-nos a escolha da melhor passagem de células-tronco para conduzir experimentos regenerativos.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo:

- implantou com sucesso a técnica de obtenção de células-tronco adultas (DSCs) a partir da polpa dentária de cães e pode ser aplicável a pesquisas de terapias regenerativas na área da medicina veterinária;

- considerando todos os marcadores avaliados, para a cultura de DSCs a linhagem que seria potencialmente a com maior qualidade proliferativa e genômica seria as células da segunda passagem podendo ser indicado seu uso;

- os resultados sugerem que a integração de técnicas de cultura celular com técnicas de análise qualidade genômica como o ensaio DNA cometa e a análise fluorimétrica de fragmentação do DNA são importante para cultura celular com fins terapêuticos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUM, B.J., et al. Early responses to adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA for radiation-induced salivary hypofunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences** Washington, v. 109, p. 19403-19407, 2012.

BERNARDI, L. et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **Journal of Endodontics**, v. 37, 973-979, 2011.

BUZZARD, J.J. et al. Karyotype of human ES cells during extended culture. **National Biotechnology**, v. 22, p. 381-382, 2004.

CASAGRANDE, L. **Aplicação de princípios de engenharia tecidual no estudo da diferenciação de células-tronco pulpares**. 2008. 61 f. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica – Odontopediatria) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

CASAGRANDE, L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, [S.l.], v. 99, p.1-7, Jan. 2011.

CAVAZZANA-CALVO, M., et al. Is normal hematopoiesis maintained solely by long-term multipotent stem cells? **Blood**, v. 117, p. 4420–4424, 2011.

De SOUZA, L.M. **Caracterização de células-tronco de polpa dental humana obtida de dentes decíduos e permanentes**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

DRAPER, B.W. et al. A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. **Methods Cell Biology**, v. 77, p. 91-112, 2004.

DUALIBI, M.T. et al. Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. **Journal of Molecular Histology**, v. 43, p. 89-94, 2012.

FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, Cambridge v. 100, p.143-155, Jan. 2000.

GOODARZI, A.A. et al. Irradiation induced foci (IRIF) as a biomarker for radiosensitivity. **Mutation Research**, v. 736, p. 39-47, 2012.

GRONTHOS S., et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.97, n.25, p.13625-30. Dez. 2000.

GRONTHOS S., et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, Chicago, v.81, n.8, p.531-535, Ago. 2002.

HARADA, H. et al. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with notch and FGF signaling. **Journal of Cell Biology**, Nova Iorque v.147, p.105-120, Out.1999.

HOFFMAN, L.M. et al. Human embryonic stem cell stability. **Stem Cell Review**, v. 1, p. 139-144, 2005.

KRUSZEWSKI, M. et al. Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation. **Mutagenesis**, v. 27, p. 551-558, 2012.

LEFORT, N. et al. Human embryonic stem cells and genomic instability. **Regenerative Medicine**, v. 4, p. 899-909, 2009.

LEAL, S.C. Células-tronco derivadas de polpa dentária humana: propriedades e perspectivas. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, Maringá, v. 12, n. 4, p. 17-18, jul./ago. 2007.

LUISI, S.B. et al. A cultura de células como ferramenta para estudos de comportamento da polpa. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 45, n. 1, p.3-8, jul. 2004.

LUND, R.J. et al. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, p. 732-744, 2012.

MEIRELLES, L.S., et al. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, [S.I.], v. 119, p.2204-2213, jun. 2006.

MITRANO, T.I., et al. Culture and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Gingival Tissue. **Journal of Periodontology**, [S.l.], v. 81, n. 6, p.917-925, jun. 2010.

MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.100, n. 10, p.5087-5112, mai. 2003.

NAKAMURA S., et al. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 1536–1542, 2009.

PARK, J.Y., et al. Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. **Cell Transplantation**, v. 20, p. 271-285, 2011.

RAO, M. S. et al. Stem cells and aging: expanding the possibilities. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, p. 713–734, 2001.

REBUZZINI, P. et al. Chromosome number variation in three mouse embryonic stem cell lines during culture. **Cytotechnology**, v. 58, p. 17-23, 2008.

RIBITSCH, I. et al. Basic science and clinical application of stem cells in veterinary medicine. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 123, p. 219-263, 2010.

ROSCHKE, A.V., et al. Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. **Neoplasia**, v. 4, p. 19-31, 2002.

SEO, B.M, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, p. 49–155, 2004.

TREICHEL, T.L.E., et al. Transplante de fração total de células mononucleares ou fração vascular estromal associada à membrana celulósica em feridas cutâneas experimentais de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 1, p.62-72, 2011.

WALLACE, D.R. et al. Delta opioid agonists attenuate TAT(1–72)-induced oxidative stress in SK-N-SH cells. **Neurotoxicology**, v. 27, p. 101–106, 2006.

YANG, M. et al. Cytological characterization of murine bone marrow and spleen hematopoietic compartments for improved assessment of toxicity in preclinical gene marking models. **Annals of Hematology**, 2013, [Epub ahead of print].