

Isolamento de células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos e sua capacidade para diferenciação osteogênica

Isolation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and their ability to osteogenic differentiation

Rafaella de Souza Salomão Zanette¹

Gustavo Torres de Souza²

Camila Maurmann de Souza³

Claudinéia Pereira Maranduba⁴

João Vitor Paes Rettore⁵

Antônio Márcio Resende do Carmo⁶

Angelo Atalla⁷

Fernando de Sá Silva⁸

Marcelo de Oliveira Santos⁹

Carlos Magno da Costa Maranduba¹⁰

DOI: <https://doi.org/10.34019/2179-3700.2018.v18.30679>

Resumo

As células-tronco de dentes decíduos exfoliados, isoladas como uma subpopulação das células-tronco da polpa dentária, demonstram possuir a capacidade de se diferenciarem in vitro em neurônios, adipócitos, odontoblastos e osteoblastos. Devido a sua facilidade de obtenção, que não envolve um procedimento invasivo, esta linhagem celular é considerada uma grande promessa para a medicina regenerativa. Os objetivos deste trabalho foram estabelecer e caracterizar duas linhagens de células-tronco de dentes decíduos humanos. As linhagens foram isoladas a partir de amostras de crianças saudáveis de 6 anos de idade. Os resultados mostraram, por citometria de fluxo, que as células foram positivas para marcadores de células-tronco mesenquimais (CD105 (SH2), SH3 e SH4) e negativa para a marcação hematopoiética (CD45) e que as linhagens estabelecidas foram constituídas de uma população homogênea de células-tronco. As células obtidas foram avaliadas quanto a sua proliferação e capacidade de diferenciação osteogênica. As linhagens tiveram estatisticamente a mesma taxa de proliferação e foram capazes de diferenciação osteogênica.

¹ Bolsista BIC/UFJF.

² Acadêmico do Curso de Farmácia, UFJF.

³ Bolsista BIC/UFJF.

⁴ Estagiária do Curso de Farmácia, UFJF.

⁵ Bolsista do Programa de Mestrado em Ciências Biológicas, ICB, UFJF.

⁶ Professor da Faculdade de Odontologia, UFJF.

⁷ Médico Hematologista da Faculdade de Medicina, UFJF.

⁸ Professor da Faculdade de Odontologia, UFJF, Campus Governador Valadares.

⁹ Professor do Departamento de Biologia, ICB, UFJF.

¹⁰ Professor orientador - Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFJF, e-mail: carlos.maranduba@ufjf.edu.br.



Palavras-chave: Células-Tronco. Polpa dentária. Dente decíduo. Diferenciação osteogênica. Proliferação.

Abstract

The human exfoliated deciduous teeth stem cells, isolated as a subpopulation of the dental pulp stem cells, have shown the capacity to differentiate *in vitro* to neurons, adipocytes, odontoblast and osteoblasts. Due to their easy and non-invasive procedure of obtaining, this cell lineage is regarded as a great promise for regenerative medicine. The aims of this work were to establish and characterize two human exfoliated deciduous teeth stem cells lineage. The lineages were isolated from samples of healthy 6-year old children. The flow cytometry results showed that the cells were positive for mesenchymal stem cells markers (CD105 (SH2), SH3 and SH4) and negative for hematopoietic marker (CD45) and that the lineages were constituted by homogenous population of stem cells. The cells obtained were evaluated regarding their proliferation and osteogenic differentiation capacity. The lineages had statistically the same proliferation rate and were capable of osteogenic differentiation.

Keywords: Stem cells. Dental pulp. Deciduous teeth. Osteogenic differentiation. Proliferation.

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco da polpa de dente (CTPD), que possuem a capacidade de se diferenciarem em osso, cartilagem e dentina, quando transplantadas, foram isoladas tanto de humanos quanto de camundongos (YAMAMURA, 1985; CAPLAN, 1991). Estudos mais aprofundados de uma população mais restrita de CTPD humanas demonstraram uma rápida expansão e proliferação *in vitro* e a expressão de alguns marcadores de células-tronco mesenquimais, tais como o STRO-1 e CD146 (MIURA *et al.*, 2003). Após a indução da diferenciação, em condições de cultura apropriadas e utilizando diferentes agentes indutores de diferenciação, foi possível a produção *in vitro* de células neuronais, adipócitos e odontoblastos, e a formação especializada de dentina e osso após transplante em camundongo (GRONTHOS *et al.*, 2000; MIURA *et al.*, 2003).

Com a possibilidade de obtenção de CTPD, teve início à utilização de um novo modelo para o estudo da diferenciação de células-tronco adultas *in vitro* e regeneração tecidual *in vivo* (GRONTHOS *et al.*, 2000). Da mesma forma, observou-se que o remanescente pulpar derivado de dentes decíduos também contém uma população de células-tronco adultas, as quais foram denominadas de células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (do inglês, *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth* - SHED) (MIURA *et al.*, 2003). As SHED demonstram propriedades de células-tronco típicas as quais incluem clonogenicidade, proliferação celular extensiva e multipotência, e se destacam por possuírem mais eficiência em determinadas características quando comparadas com células-troncos isoladas de medula óssea, como maior potencial imunossupressor (YAMAZA *et al.*, 2010).

As SHED são interessantes do ponto de vista de sua fácil obtenção, uma vez que apresentam um procedimento invasivo mínimo e é uma fonte de tecido de fácil acesso em comparação com outros tecidos humanos, tais como a medula óssea e tecido adiposo (YAMAZA *et al.*, 2010). Dessa forma, possuem vantagens que se tornam atraentes do ponto de vista da medicina regenerativa.

No presente trabalho visamos estabelecer linhagens de células-tronco da polpa de dente decíduo humano (SHED) e sua caracterização quanto à proliferação e capacidade de diferenciação osteogênica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Comitê de Ética

As linhagens de células-tronco da polpa dentária de dentes decíduos foram obtidas de crianças saudáveis após aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEP/UFJF Parecer no. 003/2011) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

2.2 Obtenção das Células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos

Os dentes decíduos exfoliados foram coletados como amostras de descarte biológico de duas crianças de 6 anos de idade. As amostras foram processadas como descrito por Gronthos *et al.* (2000) e cultivadas em placa de petri de 35x10 mm (Corning) usando meio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Invitrogen, CA), suplementado com 15% (v/v) soro fetal bovino (Hyclone), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomina, 2 mM L-glutamina e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen, CA).

2.3 Ensaio de proliferação celular

Para comparar o padrão de proliferação das SHED (passagem P3), foram semeadas (dia 0) 1×10^5 células em diferentes placas de petri de 60 mm, de forma independente. Após 4, 8 e 12 dias, o meio de cultivo foi removido e as células aderidas foram lavadas em PBS para remoção do soro. A seguir, as células foram tratadas com 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco) e incubadas à 37°C por 5 minutos. A tripsina foi neutralizada com meio DMEM-F12 contendo 10% soro FBS (Hyclone) e o sobrenadante foi centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos. O precipitado celular formado foi

ressuspendido em 1 ml de meio de cultivo e o número de células foi estimado com auxílio da Câmara de Neubauer. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.4 Análise por citometria de fluxo

A análise para os marcadores de células mesenquimais foram realizadas usando os anticorpos CD105 (SH2), SH3 e SH4, e também o marcador hematopoiético, o anticorpo CD45. Para o procedimento, as células foram coletadas por meio de desagregação enzimática (tripsina), a suspensão de células foi centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos e o precipitado celular lavado 2 vezes em PBS contendo 0.1% BSA. A imunocitoquímica foi realizada de acordo com a sugestão dos fabricantes quanto à concentração dos anticorpos, deixando-os por 30 minutos à 4°C. A seguir, as amostras foram tratadas com uma solução de PBS contendo paraformaldeído 1% como tratamento de fixação das células. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACS CaliburCytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo padrão para citometria de fluxo do fabricante (Becton Dickinson, USA), os resultados foram analisados usando o software CellQuestProgram (Becton Dickinson, USA) e os dados gerados foram analisados usando o software CellQuestProgram (BD Biosciences).

2.5 Ensaio de indução osteogênica *in vitro*

Para induzir as SHED para diferenciação osteogênica, uma densidade inicial de 3×10^3 células/cm² (Passagem P7) foram semeadas em placas de 6-well (Corning) em meio de cultura DMEM (Sigma) suplementado com 10% FBS (Hyclone), 10 mMβ-glicerol-fosfato (Sigma), 0,2 mM ácido ascórbico (Sigma) e 10^{-8} M dexametasona (Sigma). A cultura foi mantida por três semanas, substituindo o meio de cultivo a cada três dias, como descrito por Zukef *al.* (2002). Para demonstrar adiferenciação osteogênica, as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 24 horas e foram coradas com a técnica de *von Kossa*, específica para diferenciação osteogênica.

2.6 Estatística

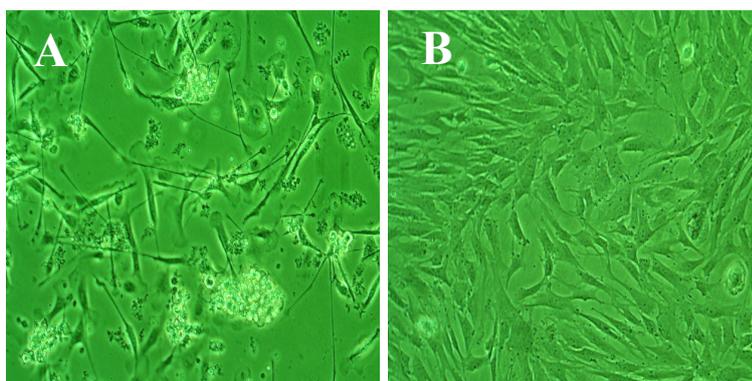
Análise foi feita com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Prism 5; GraphPadsoftware), sendo considerado um nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 SHED

As células isoladas das duas linhagens apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos, como mostrado na Figura 1. Proliferavam-se aderidas às placas e eram constituídas de uma população homogênea de células.

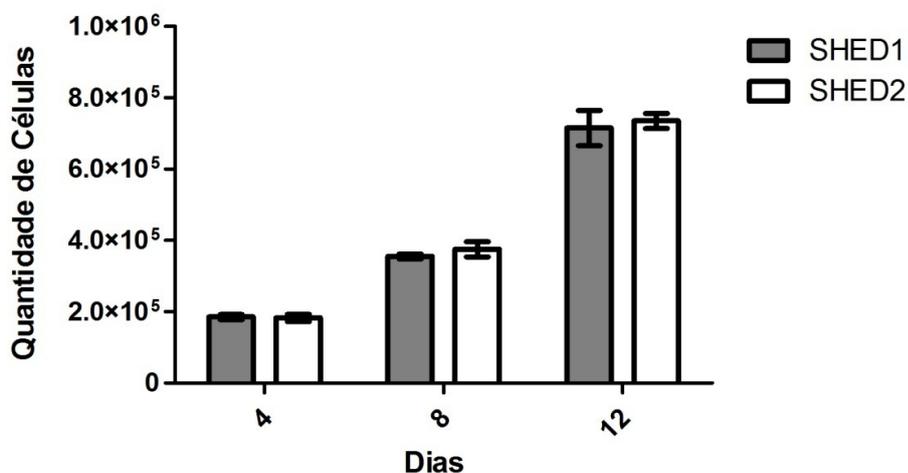
Figura 1 – SHED. A) Células em cultura primária; B) Semiconfluência celular após o primeiro repique celular. Objetiva de 10X.



3.2 Proliferação celular

As SHED foram avaliadas quando à capacidade de dobrar a população após 4, 8 e 12 dias e os resultados mostraram não haver diferença estatística ($P < 0,005$) entre as duas linhagens estabelecidas (Figura 2).

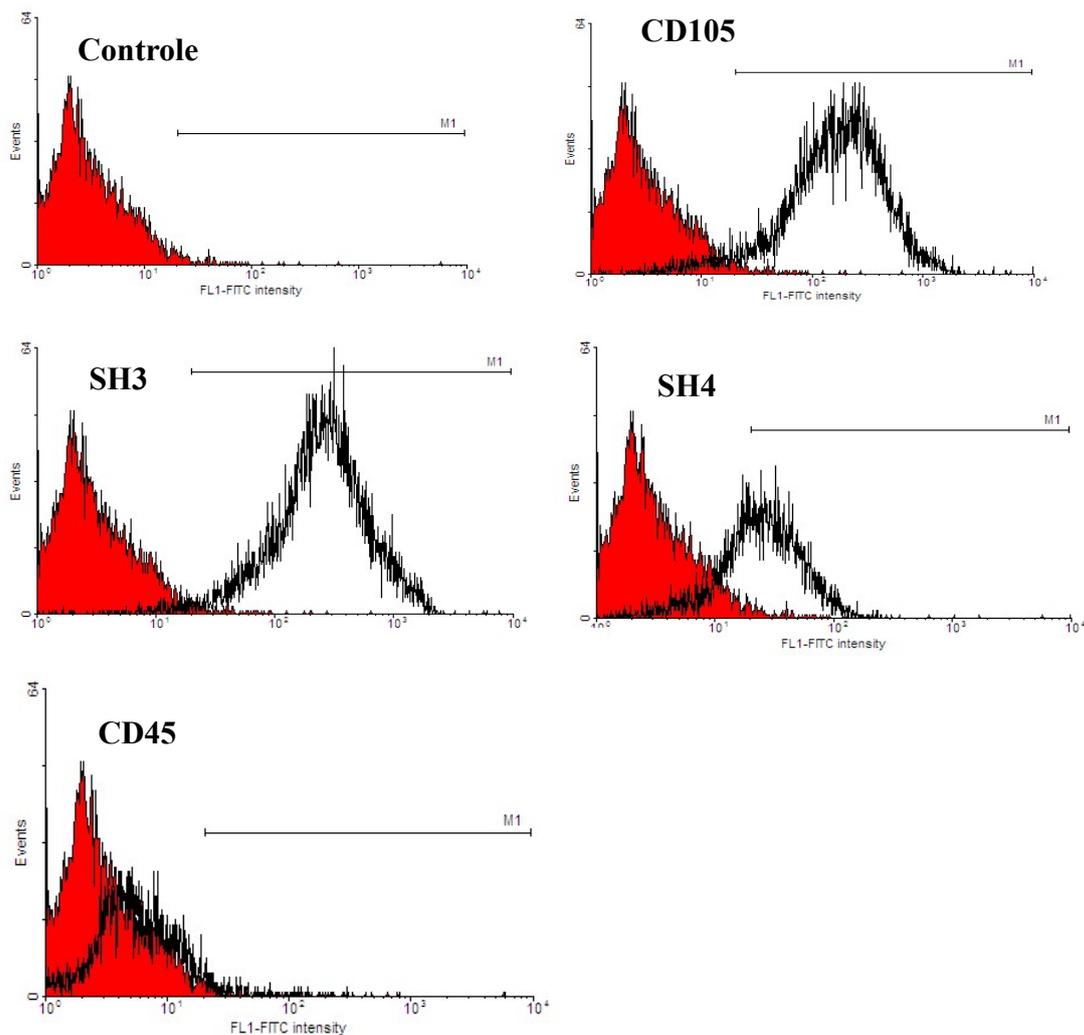
Figura 2 – Proliferação das células isoladas da polpa de dentes decíduos exfoliados (SHED).



3.3 Avaliação de marcadores de células tronco mesenquimais e hematopoiéticos

As SHED apresentam marcação para os marcadores mesenquimais CD105, SH3 e SH4, e não apresentam expressão de marcador hematopoiético (CD45). Isso sugere uma população homogênea em contaminação com outros tipos celulares (Figura 3).

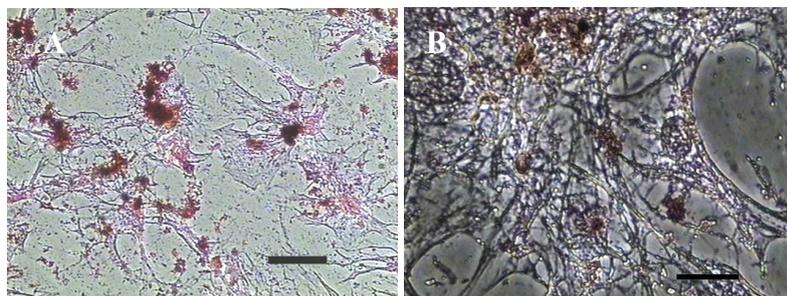
Figura 3 – Citometria de Fluxo. Em vermelho o controle negativo; em branco as células marcadas.



3.4 Avaliação da plasticidade das SHED

A indução das SHED para diferenciação osteogênica, em meio contendo dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerol-fosfato, resultou na mineralização da matriz celular (Figura 4).

Figura 4 – SHED após indução osteogênica mostrando em marrom o depósito de cálcio. A) Objetiva 10X e barra 50 μ M; B). Objetiva 40X e barra 25 μ M.



4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O termo plasticidade celular refere-se à capacidade de uma dada célula-tronco, isolada de um tecido específico (ou órgão), adquirir o fenótipo de célula especializada de outro tecido diferente e, em alguns casos, a capacidade de mudar de linhagem entre endoderme, mesoderme, e ectoderme.

Existem vários mecanismos que explicam a plasticidade das células-tronco, dentre esses destacam-se: (1) desdiferenciação, onde uma célula madura ou de restrita linhagem torna-se uma célula progenitora/precursora imatura e diferencia-se para outra linhagem celular; (2) transdeterminação, situação na qual as células-tronco são redirecionadas a originar tipos celulares de uma célula-tronco/precursora diferente; (3) transdiferenciação, mecanismo pelo qual a diferenciação celular pode ganhar características fenotípicas de outra célula diferenciada; e por último, (4) fusão celular, onde as células-tronco implantadas se fundem com as células hospedeiras (MARTIN-RENDON; WATT, 2003; WAGERS; WEISSMAN, 2004; CATACCHIO *et al.*, 2013).

O conhecimento atual da plasticidade das células-tronco adultas indica que elas são menos pluripotentes do que as células-tronco embrionárias. As células-tronco adultas tecido-específico podem ser encontradas em muitos órgãos, incluindo a medula óssea, trato gastrointestinal, pele, pulmão, fígado e coração. Destes, as células-tronco da medula óssea têm sido muito estudadas (CATACCHIO *et al.*, 2013). Porém, outras células-tronco de origens teciduais diferentes da medula óssea já apresentam muitos estudos, com é o caso das CTPD, incluindo as SHED.

Procurando avaliar a capacidade das SHED de se diferenciar, induzimos as mesmas para a formação de tecido ósseo, *in vitro*. Observamos que as SHED isoladas

apresentaram potencial de diferenciação óssea com capacidade de deposição de cálcio.

Recentes exemplos mostram a capacidade das CTPD na reparação tecidual óssea. Moradet *al.* (2013), após revisão sistemática, verificaram que até meados de 2013 foram realizados 17 estudos envolvendo CTPD e reparação óssea em modelo animal. Destes, três foram estudos com transplantes alogênicos e 12 foram xenotransplantes. Outros 12 estudos usaram CTPD isolados de humanos. A maioria dos trabalhos utilizou da técnica de enxerto subcutâneo, outros utilizaram de defeitos mandibulares e craniais. Em todos os estudos houve a formação óssea – constituindo evidências da capacidade das CTPD em reparar tecido ósseo *in vivo*.

Muitos trabalhos utilizam técnicas histológicas para avaliarem o enxerto. Annibaliet *al.* (2013) utilizaram das técnicas de micro tomografia computadorizada e tomografia de emissão de pósitrons que permitiram avaliar o posicionamento e a densidade de formação óssea sem interferência mecânica para preparo histológico. Dessa forma, mostraram que tecido ósseo bovino desproteinado apresentou melhor formação óssea em defeito crítico cranial em camundongos que o biomaterial β -trifosfato de cálcio; e que a utilização de CTPD apenas melhorou (não significativamente) a formação óssea.

Recentemente Maraldiet *al.* (2013) demonstraram o forte potencial das CTPD pré-diferenciadas em tecido ósseo na bioengenharia, implantando essas células junto com biomaterial de colágeno em defeito craniano de camundongos. Foi demonstrado que as CTPD pré-diferenciadas corrigiram o defeito ósseo mais eficientemente que o grupo sem CTPD e que essas células promoveram neovascularização, o que eleva o grau de biocompatibilidade promovido pelas DPSC.

Nossos resultados comprovam que as células isoladas por nosso grupo, a partir da polpa de dentes decíduos exfoliados, são células-tronco, com marcações semelhantes às células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea e apresentam plasticidade para diferenciar em células do tecido ósseo, após indução *in vitro*. Dessa forma, nossos resultados estão em consonância com as evidências na literatura de que essas células se apresentam como ferramenta para estudos relacionados à diferenciação óssea em testes de fármacos e materiais bioativos voltados para terapia celular.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto de Ciências Biológicas e à Universidade Federal de Juiz de Fora por acreditar na importância deste projeto.

REFERÊNCIAS

- ANNIBALI, S.; BELLAVIA, D.; OTTOLENGHI, L.; CICCONETTI, A.; CRISTALLI, M.P.; QUARANTA, R.; PILLONI, A. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial "critical size" defect: Preliminary data. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 4, p. 815-825, 2013.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- CATACCHIO, I.; BERARDI, S.; REALE, A.; DE LUISI, A.; RACANELLI, V.; VACCA, A.; RIA, R. Evidence for Bone Marrow Adult Stem Cell Plasticity: Properties, Molecular Mechanisms, Negative Aspects, and Clinical Applications of Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Transdifferentiation. **Stem Cells International**, v. 2013, p. 1-11, 2013.
- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; AND SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.
- MARALDI, T.; RICCIO, M.; PISCIOTTA, A.; ZAVATTI, M.; CARNEVALE, G.; BERETTI, F.; LA SALA, G. B.; MOTTA, A.; DE POL, A. Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 3, p. 53, 2013.
- MARTIN-RENDON, E.; WATT, S. M. Exploitation of stem cell plasticity. **Transfusion Medicine**, v. 13, n. 6, p. 325-349, 2003.
- MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S.; SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.
- MORAD, G.; KHEIRI, L.; KHOJASTEH, A. Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: a systematic review of literature. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 12, p. 1818-1827, 2013.
- WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.
- YAMAMURA, T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 64, n. 4, p. 530-540, 1985.
- YAMAZA, T.; KENTARO, A.; CHEN, C.; LIU, Y.; SHI, Y.; GRONTHOS, S.; WANG, S.; SHI, S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 1, p. 5, 2010.

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, n. 12, p. 4279-4295, 2002.