



MIKI TAKETOMI SAITO

**“CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DE CÉLULAS  
MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL DE HUMANOS COM POTENCIAL PARA  
DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA/CEMENTOBLÁSTICA”**

PIRACICABA

2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MIKI TAKETOMI SAITO

**“CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DE CÉLULAS  
MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL DE HUMANOS COM POTENCIAL PARA  
DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA/CEMENTOBLÁSTICA”**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. KARINA GONZALES SILVÉRIO RUIZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO  
DO TÍTULO DE MESTRA EM CLÍNICA  
ODONTOLÓGICA, NA ÁREA DE PERIODONTIA.

Este exemplar corresponde à versão final  
da Dissertação defendida pela aluna Miki Taketomi Saito,  
e orientada pela Profa.Dra.Karina Gonzales Silvério Ruiz

---

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Sa28c Saito, Miki Taketomi, 1986-  
Caracterização do fenótipo de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos com potencial para diferenciação osteoblásticas/cementoblástica / Miki Taketomi Saito. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Karina Gonzáles Silvério Ruiz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Células-tronco. 2. Diferenciação celular. 3. Expressão gênica. I. Ruiz, Karina Gonzales Silverio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Phenotypic characterization of mesenchymal stem cell from human periodontal ligament with osteoblastic/cimentoblastic differentiation potential

**Palavras-chave em Inglês:**

Stem cells

Cell differentiation

Gene expression

**Área de concentração:** Periodontia

**Titulação:** Mestra em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Karina Gonzáles Silvério Ruiz [Orientador]

Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes

Cristiane Ribeiro Salmon

**Data da defesa:** 06-03-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 06 de Março de 2013, considerou a candidata MIKI TAKETOMI SAITO aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Karina Gonzales Silvério Ruiz".

---

Profa. Dra. KARINA GONZALES SILVÉRIO RUIZ

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes".

---

Profa. Dra. THAISÂNGELA RODRIGUES LOPES E SILVA GOMES

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Cristiane Ribeiro Salmon".

---

Profa. Dra. CRISTIANE RIBEIRO SALMON

Dedico este trabalho aos meus pais, Kunihiro Saito e Julieta Taketomi Saito, e a meus avós, Haruo Saito e Fumi Saito, Ken-Iti Taketomi e Kimiko Taketomi, exemplos de caráter, dedicação e perseverança.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção da vida e pelas oportunidades que me proporcionou no decorrer dela.

Aos meus pais, por me darem mais do que apoio, por me incentivarem a seguir em busca do aprimoramento de minha formação acadêmica; por me mostrarem que nada vence a dedicação e o trabalho honesto; pelo amor incondicional que nos une.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas (FOP – UNICAMP), na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, onde pude aprofundar meus conhecimentos e aperfeiçoar minhas habilidades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da FOP – UNICAMP, nas pessoas dos Professores Dr. Márcio de Moraes e Dra. Renata Rodrigues Garcia, que permitiu meu aprimoramento acadêmico.

A minha orientadora, Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, por ter confiado em mim como sua orientada, tornando o meu sonho de realizar uma pós-graduação possível, e por toda a sua ajuda, paciência, incentivo e compreensão comigo. Com essa oportunidade, tive o prazer de conhecer não só seu competente lado profissional, mas sua doçura como pessoa, o que me fez a ter como exemplo não apenas na questão profissional, mas como ser humano.

A Profa. Dra. Gláucia Ambrosano, pela fundamental ajuda na análise estatística desta minha dissertação e por ter me aceitado como estagiária na disciplina de Bioestatística, estando sempre disposta a tirar minhas dúvidas, por mais básicas que fossem e independente do horário das aulas, mesmo diante de todas as ocupações que ela tem.

Aos professores da Área de Periodontia da FOP-UNICAMP, Dr. Francisco Humberto Nociti Jr, Dr. Antônio Wilson Sallum, Dr. Enilson Antônio Sallum e Dr. Márcio Zaffalon Casati por compartilharem de seus conhecimentos e companhias comigo para meu aprimoramento profissional.

Às alunas de pós-doutorado Dras. Bruna Amorim e Luciane Martins, por sempre estarem presentes e dispostas a me ajudar e me guiar neste mundo dos experimentos laboratoriais que ainda tenho muito a trilhar, e, em especial, a Dra. Cristiane Salmon, por ter iniciado o projeto de isolamento de subclones no Laboratório de Periodontia da FOP –

UNICAMP e ter gentilmente me ensinado a técnica de isolamento, assim como tantas outras ajudas para a realização da minha dissertação.

A Profa. Dra. Thaisângela Rodrigues, pelas suas palavras doces de carinho e incentivo (desde a minha primeira visita à FOP) que vinham sempre num sorriso amoroso, e que me estimularam muito a seguir este caminho da pós-graduação na FOP.

Ao Prof. Dr. Mauro Santamaria, que me deu muitas dicas, muitos conselhos, desde a época da minha especialização; que ajudou nos meus primeiros passos redigindo um artigo científico, e que foi peça fundamental para eu realizar o sonho de publicar meu primeiro artigo científico.

Aos colegas de pós-graduação em Periodontia desta Faculdade, Ana Paula Giorgetti, Ana Regina Moreira, Camila Camarinha, Hugo Felipe do Vale, Lucas Queiróz, Mirella Lindoso, Mônica Grazieli Corrêa, Tatiana Meulman, Tiago Taiete, Tiago Tarbes, Vivieni Barbosa, e, em especial, a Lucas Moura e Mayra Albiero, agradeço pelos conselhos, momentos de trabalho e momentos de descontração. Incluo também neste grupo a colega Maria Fernanda Santos Peres, com a qual não convivi durante a minha pós-graduação, mas convivi intensamente durante o meu estágio e durante minha especialização e da qual sinto saudades da convivência.

Aos funcionários da Faculdade, em especial, a Regina Caetano, Mariana Fugolin e Eliete Marin, por sempre ajudarem quando necessário.

Aos pacientes, quer seja aqueles que doaram suas células para a realização deste estudo, quer seja aqueles que confiaram em mim para atendê-los.

Aos meus amigos belenenses que moram em Piracicaba, em especial a Lucas Moura, Patrícia Feio, Camila Andrade e Armando Kaieda, pelas alegrias (e comidas típicas) divididas, pelo apoio nos momentos de tristeza e desânimo, pela torcida a cada desafio a ser enfrentado.

Aos meus amigos, meus parentes e professores, de todos os cantos do Brasil, mas especialmente aos de Belém, que sempre me acolhem com palavras de carinho, me fazendo sentir muito querida e ter muitas saudades, mas que, ao mesmo tempo, me incentivam para que eu continue meus estudos longe de casa, superando as saudades, em busca do meu sonho.



"É exatamente disso que a vida é feita, de momentos.  
Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins,  
para o nosso próprio aprendizado.  
Nunca esquecendo do mais importante:  
Nada nessa vida é por acaso.  
Absolutamente nada.  
Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte,  
da melhor forma possível.  
A vida nem sempre segue a nossa vontade,  
mas ela é perfeita naquilo que tem que ser."  
Chico Xavier

## RESUMO

Vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de isolar e caracterizar células com fenótipo mesenquimal indiferenciado a partir do ligamento periodontal de humanos e avaliar o seu potencial em promover a neoformação dos tecidos periodontais. A partir destes estudos, sabe-se que há uma grande heterogeneidade celular no ligamento periodontal. Contudo, ainda não está claro na literatura se apenas um tipo de célula progenitora é capaz de se diferenciar em todos os tecidos presentes no periodonto ou se há um fenótipo celular mais favorável à regeneração periodontal. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar subclones celulares que apresentam maior comprometimento para aquisição do fenótipo osteoblástico/cementoblástico a partir de uma população de células do ligamento periodontal caracterizadas como mesenquimais indiferenciadas ( $CD105^+ CD34^- CD45^-$ ). Utilizando-se a técnica do cilindro de clonagem, subclones celulares foram isolados e avaliados quanto ao seu potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica (ensaio de Von Kossa), à capacidade proliferativa (ensaio de MTS), e expressão da proteína STRO-1 pela técnica da imunofluorescência. Adicionalmente, os subclones celulares que apresentaram potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica foram caracterizados pelo PCRq quanto à expressão de genes relacionados ao fenótipo osteoblástico (fator de transcrição relacionado a Runt- 2 – *RUNX2* – e fosfatase alcalina – *ALP*), e modulação dos marcadores específicos para células mesenquimais indiferenciadas (*CD105*, *CD166* e *OCT-4*) durante o processo de indução osteogênica. Os resultados mostraram que dos seis subclones isolados, três apresentavam potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica, (grupo C-O), e os outros três não possuíam capacidade de formar matriz mineralizada (grupo C-F). O grupo C-O apresentou capacidade proliferativa significativamente menor comparada ao grupo C-F ( $p \leq 0,05$ ) e ambos os grupos apresentaram marcação positiva para proteína STRO-1. Durante o processo de indução osteogênica do grupo C-O, foi observado um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) da expressão de *RUNX2* e *CD166*, mas não dos outros marcadores avaliados (*ALP*, *CD105* e *OCT-4*). Os achados deste estudo mostraram que as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos  $CD105^+ CD34^- CD45^-$  constituem uma população celular heterogênea, compreendendo um grupo de células mais proliferativas, mas sem potencial para depositar matriz mineralizada (grupo C-F), e outro

grupo de células com menor potencial proliferativo, mas que possuem capacidade de diferenciação osteoblástica/cementoblástica (grupo C-O). Adicionalmente, foi observado que a expressão do marcador de superfície *CD166* é modulada durante o processo de indução à diferenciação osteoblástica/cementoblástica no grupo C-O.

**Palavras-chave:** células-tronco; diferenciação celular; ligamento periodontal; expressão gênica.

## ABSTRACT

Several studies have been conducted in order to isolate and characterize cells from human periodontal ligament with mesenchymal stem cell phenotype, and evaluate its potential to promote periodontal tissues neof ormation. From these studies, it was observed that there is a great heterogeneity in periodontal ligament cells. However, it is not clear in the literature whether only one type of progenitor cell is able to differentiate into all tissues of the periodontium or whether there is a cell phenotype more favorable for periodontal regeneration. In this context, the aim of this study was to isolate and characterize subclones that show greater commitment to acquisition of an osteoblastic/cementoblastic phenotype from a population of periodontal ligament cells characterized as mesenchymal stem cells ( $CD105^+ CD34^- CD45^-$ ). Cell subclones were isolated by ring-cloning technique and evaluated for their osteoblastic/cementoblastic differentiation potential (Von Kossa assay), proliferative capacity (MTS assay), and expression of STRO-1 protein by immunofluorescence technique. Additionally, the subclones that showed potential to osteoblastic/cementoblastic differentiation were characterized by qPCR for expression of genes related to osteoblastic phenotype (*runt-related transcription factor-2* – *RUNX2* and *alkalin phosphatase* – *ALP*) and modulation of specific markers of undifferentiated mesenchymal cells (*CD105*, *CD166* and *OCT-4*) during osteogenic induction. Six subclones were isolated, and three of them presented osteoblastic/cementoblastic differentiation potential (C-O group), and the other three did not present this potential (C-F group). The C-O group showed significantly lower proliferative capacity compared to the C-F group ( $p \leq 0.05$ ), and both groups were positively stained for protein STRO-1. During the osteogenic induction of C-O group, there was a significant increase in the expression of *RUNX2* and *CD166* ( $p \leq 0.05$ ), but not in the other assessed markers (*ALP*, *CD105* and *OCT-4*). The findings of the present study showed that  $CD105^+ CD34^- CD45^-$  mesenchymal stem cells from human periodontal ligament are a heterogeneous cell population, comprising a group of more proliferative cells without potential to deposit mineralized matrix (C-F group), and another group of cells with lower proliferative potential with capacity of osteoblastic/cementoblastic differentiation (C-O group). Additionally, it was observed that the expression of *CD166* is modulated during osteoblastic/cementoblastic induction process in C-O group.

**Keyword:** stem cells; cell differentiation; periodontal ligament; gene expression.

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALCAM – Molécula de Adesão Celular Ativada por Leucócito (*Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*)

ALP – Fosfatase Alcalina (*Alkaline Phosphatase*)

BMSC – Células Mesenquimais Indiferenciadas da Medula Óssea (*Bone Marrow Stem Cells*)

BSA – Albumina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumin*)

CD – Grupo de Diferenciação (*Cluster of Differentiation*)

C-F – Subclones comprometidos com linhagem fibroblástica

C-O – Subclones comprometidos com linhagem osteoblástica/cementoblástica

FBS – Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

GAPDH – Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (*Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*)

MSC – Células Mesenquimais Indiferenciadas (*Mesenchymal Stem Cells*)

MTS – Sal de Tetrazólio (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*)

OCT-4 – Proteína Octamérica (*Octameric protein – 4*)

OM – Meio osteogênico (meio de cultura padrão suplementado com 50 µg/mL de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato e 10<sup>-5</sup>M de dexametasona)

PBS – Solução Fosfato Salina (*Phosphate Buffered- Saline*)

PCRq – Reação de Cadeia Polimerase em Tempo Real Quantitativa (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*)

PDLSC – Células Mesenquimais Indiferenciadas do Ligamento Periodontal (*Periodontal Ligament Stem Cells*)

RUNX2 – Fator de Transcrição Relacionado a Runt- 2 (*Runt-Related Transcriptor Factor - 2*)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Periodonto, periodontite e propostas para a regeneração do periodonto .....	3
2.2. Células mesenquimais indiferenciadas (MSC) .....	4
2.2.1. MSC com potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica .....	6
2.3. Células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal (PDLSC) .....	7
3. PROPOSIÇÃO .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1. Considerações éticas .....	12
4.2. Cultura das PDLSC de humanos.....	12
4.3. Isolamento de subclones a partir de PDLSC.....	13
4.4. Seleção dos subclones com potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica por meio de ensaio de mineralização .....	14
4.5. Caracterização dos subclones com fenótipo osteoblástico/cementoblástico (C-O) e fenótipo fibroblástico (C-F) .....	15
4.5.1. Viabilidade e capacidade proliferativa – Ensaio de MTS .....	15
4.5.2. Imunofluorescência para STRO-1 .....	16
4.5.3. Expressão gênica dos marcadores biológicos relacionados ao fenótipo osteoblástico/cementoblástico ( <i>RUNX2</i> e <i>ALP</i> ) e relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado ( <i>CD105</i> , <i>CD166</i> e <i>OCT-4</i> ).....	17
4.5.3.1. Extração de RNA .....	17
4.5.3.2. Síntese de DNA complementar .....	18
4.5.3.3. Reações de <i>real-time</i> PCR.....	18
4.6. Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS .....	20
5.1. Isolamento de subclones a partir de PDLSC.....	20
5.2. Seleção dos subclones com potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica por meio de ensaio de mineralização .....	21
5.3. Caracterização dos subclones com fenótipo osteoblástico/cementoblástico (C-O) e fenótipo fibroblástico (C-F) .....	21
5.3.1. Viabilidade e capacidade proliferativa – Ensaio de MTS .....	21

5.3.2.	Imunofluorescência para STRO-1 .....	22
5.3.3.	Expressão gênica dos marcadores biológicos relacionados ao fenótipo osteoblástico/cementoblástico ( <i>RUNX2</i> e <i>ALP</i> ) e relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado ( <i>CD105</i> , <i>CD166</i> e <i>OCT-4</i> ).....	23
6.	DISCUSSÃO.....	28
7.	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34
	ANEXO .....	39



## 1. INTRODUÇÃO

Visando regenerar o periodonto, várias técnicas têm sido propostas desde o início dos anos de 1980, tais como regeneração tecidual guiada (RTG), utilização de enxertos e substitutos ósseos, condicionamento da superfície radicular, uso de proteínas derivadas do esmalte e fatores de crescimento. Contudo, como o periodonto é uma estrutura bastante complexa, sendo composto por diversos tecidos intimamente relacionados, a regeneração do periodonto tem mostrado-se extremamente complexa e difícil de ser atingida, com ampla variabilidade dos resultados e baixa previsibilidade de regeneração utilizando-se tais técnicas regenerativas (Aichelmann-Reidy & Reynolds, 2008; Ivanovski, 2009). Além disso, tais técnicas apresentam indicação limitada a defeitos periodontais infra-ósseos e lesões de furca Grau II de Miller (Ivanovski, 2009).

Neste contexto, a engenharia tecidual surgiu com o objetivo de aumentar a previsibilidade de obtenção de regeneração e também de ampliar as indicações dos procedimentos regenerativos por meio da promoção de estímulo e condições ideais para a interação entre três elementos-chave: células, arcabouço e moléculas sinalizadoras (Bartold *et al.*, 2000). Devido à complexidade de tecidos presentes no periodonto, a utilização de células mesenquimais indiferenciadas (MSC) parece ser uma alternativa promissora, uma vez que as mesmas são auto-renováveis, apresentam alta proliferação e capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (Arosarena, 2005; Nagatomo *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Elangovan *et al.*, 2009; Silverio *et al.*, 2010).

Estudos que investigaram as MSC derivadas de ligamento periodontal de humanos (PDLSC) demonstraram que estas compreendem uma população heterogênea, com células comprometidas com perfil fibroblástico e outras com perfil osteoblástico/cementoblástico (Seo *et al.*, 2004; Nagatomo *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Singhatanadgit *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Diante desta heterogeneidade celular presente no ligamento periodontal, é importante a identificação e caracterização de linhagens específicas de células mesenquimais indiferenciadas quanto à expressão de marcadores celulares, potencial proliferativo e de diferenciação celular a fim de caracterizar o perfil celular mais favorável para a aplicação futura em engenharia tecidual periodontal (Gay *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009).

Dentre os tecidos periodontais a serem regenerados durante o processo de cicatrização tecidual, a neoformação de cemento sobre superfície radicular previamente contaminada é considerada um processo crítico para o restabelecimento do aparato de inserção do dente (Bosshardt, 2005). Assim, o isolamento e a caracterização de células com fenótipo cementoblástico dentre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal parece ser importante. O primeiro passo para alcançar esse objetivo, consiste na identificação de PDLSC com maior potencial para formar matriz mineralizada, distinguindo-as das células comprometidas com fenótipo fibroblástico.

Os estudos utilizando técnica de isolamento de colônias derivadas de uma única célula (subclones) demonstram que este método permite a avaliação de populações celulares mais homogêneas, possibilitando uma investigação mais minuciosa para a identificação dos possíveis marcadores que estejam relacionados com o direcionamento para diferenciação osteoblástica/cementoblástica (Okamoto *et al.*, 2002; Luan *et al.*, 2006; Fukiage *et al.*, 2008; Singhatanadgit *et al.*, 2009). Além disso, até o momento, nenhum estudo foi realizado com o intuito de verificar se as células mesenquimais indiferenciadas isoladas do ligamento periodontal de humanos (PDLSC) sofrem modulação dos marcadores celulares relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado durante o processo de indução à diferenciação osteoblástica/cementoblástica.

Desta forma, neste estudo, o isolamento de subclones a partir de uma população de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos previamente caracterizadas como sendo CD105<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> (Silverio *et al.*, 2010) foi realizado, tendo o objetivo de se obter populações celulares homogêneas (subclones) e caracterizar os subclones que apresentam maior comprometimento para aquisição do fenótipo osteoblástico/cementoblástico quanto à capacidade proliferativa e imunomarcção para STRO-1 e expressão de genes relacionados ao fenótipo osteoblástico/cementoblástico (*RUNX2* e *ALP*). Adicionalmente, a modulação da expressão de marcadores relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado (*CD105*, *CD166* e *OCT-4*) durante o processo de indução osteogênica foi avaliada nestes subclones.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Periodonto, periodontite e propostas para a regeneração do periodonto**

O periodonto corresponde ao aparato de proteção e inserção que circunda o dente e é composto por gengiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar (Benatti *et al.*, 2007; Elangovan *et al.*, 2009). A função do periodonto é ancorar o dente ao osso alveolar, de forma a permitir a função mastigatória concomitantemente à manutenção da integridade dos tecidos ao redor do dente. A periodontite é uma doença inflamatória iniciada pelo biofilme bacteriano, a qual resulta em destruição da inserção conjuntiva e de osso alveolar, podendo levar à perda dentária (Elangovan *et al.*, 2009). O principal objetivo da terapia periodontal é controlar a inflamação induzida pelas bactérias periodontopatogênicas a fim de restabelecer a saúde periodontal, permitindo a preservação do dente e do sistema mastigatório como um todo. Uma vez que o aspecto infeccioso-inflamatório da doença esteja controlado, a correção de defeitos anatômicos e a regeneração dos tecidos periodontais perdidos também devem ser objetivos da terapia periodontal (Elangovan *et al.*, 2009; Ivanovski, 2009).

Desde o início dos anos de 1980, várias técnicas têm sido propostas com o objetivo de regenerar o periodonto, tais como regeneração tecidual guiada (RTG), utilização de enxertos e substitutos ósseos, condicionamento da superfície radicular, uso de proteínas derivadas do esmalte e fatores de crescimento (Karring *et al.*, 1985; Bartold *et al.*, 2000; Jepsen *et al.*, 2002; Mariotti, 2003; Reynolds *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2005; Bosshardt, 2008; Sculean *et al.*, 2008; Ivanovski, 2009). Contudo, como o periodonto é uma estrutura bastante complexa, não sendo composto apenas por um tipo tecidual, mas por tecidos mineralizados (osso alveolar e cemento) e não mineralizados (gengiva e ligamento periodontal), os quais estão intimamente relacionados, a regeneração do periodonto tem mostrado-se extremamente difícil de ser atingida. Estudos utilizando tais técnicas regenerativas têm demonstrado ampla variabilidade dos resultados e baixa previsibilidade de regeneração (Aichelmann-Reidy & Reynolds, 2008; Ivanovski, 2009). Além disso, as mesmas apresentam indicação clínica limitada, restringindo-se a defeitos periodontais infra-ósseos e lesões de furca Grau II de Miller (Ivanovski, 2009).

Neste contexto, a aplicação da engenharia tecidual tem surgido como uma nova proposta na busca da regeneração dos tecidos periodontais, baseando-se em conceitos de

biologia celular, molecular e engenharia de biomateriais, pela interação entre basicamente três elementos-chave: células, moléculas de sinalização e arcabouços, com o objetivo de aumentar a previsibilidade de obtenção de regeneração periodontal e também de ampliar as indicações dos procedimentos regenerativos (Bartold *et al.*, 2000).

Tal como na fundamentação biológica do uso de membrana na RTG para excluir das células epiteliais e do tecido conjuntivo gengival (com maior proliferação, contudo, indesejadas) e promover o povoamento da ferida com células mais favoráveis à regeneração periodontal (Karring *et al.*, 1985), a seleção de células com maior capacidade de regeneração dos tecidos periodontais e exclusão daquelas sem este potencial é de suma importância para a implementação das técnicas de regeneração periodontal utilizando-se engenharia tecidual. Desta forma, é imprescindível o melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que regulam o processo de cicatrização tecidual, assim como a identificação das células responsáveis pela formação e manutenção dos tecidos periodontais (Bosshardt, 2005).

## **2.2. Células mesenquimais indiferenciadas (MSC)**

As células-tronco são células indiferenciadas com capacidade ilimitada de auto-renovação e cujas células-filha têm capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares (King *et al.*, 2009; Watt & Driskell, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Dependendo da fonte de obtenção destas células, elas podem ser classificadas em células-tronco embrionárias, quando obtidas de embriões, ou células-tronco do adulto, quando obtidas de tecidos já formados (Watt & Driskell, 2010; Zhang *et al.*, 2012). As células-tronco embrionárias podem dar origem a tecidos dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) (King *et al.*, 2009), mas as células-tronco do adulto dão origem apenas a tipos celulares mais restritos, geralmente advindos da mesma camada germinativa (Greco *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012).

As células mesenquimais indiferenciadas (MSC) têm sido grande foco de estudo dentro da engenharia tecidual devido à capacidade de diferenciação em diversos tipos de linhagens mesenquimais, como adipócitos, condrócitos e osteócitos (Pittenger *et al.*, 1999; Gay *et al.*, 2007; Greco *et al.*, 2007; Mafi *et al.*, 2011). Neste contexto, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar marcadores celulares que possam

identificar estas células dentro dos tecidos humanos adultos (Dominici *et al.*, 2006; Mafi *et al.*, 2011).

De acordo com a Sociedade Internacional para Terapia Celular, os critérios mínimos para que uma população celular seja considerada como de MSC são: que elas sejam aderentes ao plástico, quando cultivadas em meio padrão em placas de cultura; que expressem os marcadores de superfície *CD105*, *CD73*, *CD90* e não expressem os marcadores *CD45*, *CD34*, *CD14*, *CD79 $\alpha$*  e HLA-DR; que sejam capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

Ao realizar uma revisão sistemática com 29 estudos sobre marcadores de superfície de MSC, Mafi *et al.* (2011) observaram que o marcador *CD105* foi o mais reportado entre os estudos como um marcador positivo nas MSC, seguido dos marcadores *CD90*, *CD44*, *CD73*, *CD29*, *CD13*, *CD34*, *CD146*, *CD106*, *CD54* e *CD166*. Além disso, o marcador *CD34* foi o mais frequentemente reportado como negativo nas MSC, seguido dos marcadores *CD14*, *CD45*, *CD11b*, *CD49d*, *CD106*, *CD10* e *CD31*. Contudo, os autores notaram que há grande diversidade de descrição dos marcadores de superfície de MSC na literatura, como, por exemplo, o *CD106* e o *CD34*, reportado tanto como marcador positivo como negativo. Esta diversidade de descrição dos marcadores de MSC demonstra que, na realidade, as MSC compreendem uma população de células heterogênea e em diferentes estágios de comprometimento com determinadas linhagens celulares (Stewart *et al.*, 2003; Tormin *et al.*, 2009; Rada *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

Diante da heterogeneidade celular das MSC, é importante a investigação da expressão de marcadores celulares e compreensão das vias de sinalização que levam as MSC a se comprometerem com determinada linhagem celular. Investigações mais minuciosas nestas populações de MSC têm permitido a identificação de marcadores celulares que possibilitam selecionar células com maior potencial para diferenciação condroblástica e osteoblástica (Gronthos *et al.*, 1994; Bruder *et al.*, 1997; Bruder *et al.*, 1998; Satomura *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 2003; Fukiage *et al.*, 2008; Arufe *et al.*, 2010; Rada *et al.*, 2011), o que poderia aperfeiçoar os procedimentos de engenharia tecidual pela seleção de células com maior potencial para diferenciação nas linhagens celulares relacionados aos tecidos que se deseja regenerar.

### 2.2.1. MSC com potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica

O processo de diferenciação osteoblástica/cementoblástica é regulado por um complexo conjunto de moléculas. O fator de transcrição relacionado a Runt-2 (*RUNX2*) é considerado um dos fatores iniciais e essenciais para a diferenciação das MSC em osteoblastos (Anjos-Afonso & Bonnet, 2007). A expressão de genes da fosfatase alcalina (*ALP*), sialoproteína óssea (*BSP*) e colágeno tipo I (*Coll1a1*), osteocalcina (*OCN*) e osteopontina (*OPN*) estão relacionados ao processo de diferenciação osteoblástica/cementoblástica (Pittenger *et al.*, 1999; Anjos-Afonso & Bonnet, 2007) e são utilizados para confirmar a diferenciação das MSC em células comprometidas com a formação de tecidos mineralizados (Pittenger *et al.*, 1999; Minguell *et al.*, 2001; Gay *et al.*, 2007).

Alguns estudos investigando MSC da medula óssea (BMSC), de membrana sinovial e do tecido adiposo demonstram que a separação de subpopulações de MSC a partir da expressão de determinados marcadores celulares pode ajudar na seleção de MSC com maior potencial para diferenciação em determinados tipos celulares, como condroblastos ou osteoblastos (Fukiage *et al.*, 2008; Arufe *et al.*, 2010; Rada *et al.*, 2011). Fukiage *et al.* (2008) observaram uma associação negativa entre a expressão de *CD106* e o potencial para diferenciação osteogênica em células derivadas da medula óssea. Arufe *et al.* (2010) avaliaram subpopulações de células derivadas de membrana sinovial humana enriquecidas para *CD73*, *CD106* e *CD271* e observaram que a subpopulação enriquecida para *CD73* apresentava melhor potencial para diferenciação osteogênica e que a subpopulação enriquecida para *CD271* apresentava melhor potencial para diferenciação condrogênica. Rada *et al.* (2011) isolaram subpopulações de células mesenquimais de tecido adiposo pelos marcadores celulares *CD29*, *CD 44*, *CD49d*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *STRO-1* e *p75* e observaram que a subpopulação isolada a partir do marcador *STRO-1* foi a que apresentou maior potencial para diferenciação osteogênica, enquanto as subpopulações isoladas pelos marcadores *CD29* e *CD105* apresentaram maior potencial para diferenciação condrogênica.

Outros estudos mostram que a expressão de determinados marcadores é modulada durante o processo de diferenciação celular (Fukiage *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2008) observaram que MSC de medula óssea apresentam marcação positiva para os marcadores *CD13*, *CD29*, *CD44*, *CD73*, *CD90*, *CD105* e *CD166*, mas quando estas células

foram submetidas tanto à diferenciação osteogênica, quanto condrogênica ou adipogênica, a expressão de *CD106* diminuiu significativamente enquanto não houve diferença na expressão dos outros marcadores avaliados. Similarmente, Fukiage *et al.* (2008) também observaram que a expressão de *CD106* foi inibida quando MSC de medula óssea foram cultivadas em meio de indução à diferenciação osteogênica.

### **2.3. Células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal (PDLSC)**

No final da década de 1970, especulou-se que o tipo celular que povoaria a ferida cirúrgica periodontal durante os estágios iniciais de cicatrização seria crítico para determinar o tipo de cicatrização da ferida periodontal (Melcher, 1976). Estudos subsequentes constataram que o processo de regeneração periodontal dependia da migração e proliferação das células provenientes do ligamento periodontal remanescente, acompanhada pela diferenciação e síntese de componentes da matriz tecidual (Karring *et al.*, 1985; Buser *et al.*, 1990; Beertsen *et al.*, 1997).

A remoção do ligamento periodontal do terço médio da raiz de dentes saudáveis extraídos por razões ortodônticas é a fonte mais comumente utilizada para obtenção de células do ligamento periodontal em experimentos *in vitro* e *in vivo* para a engenharia tecidual periodontal. Contudo, as células obtidas do ligamento periodontal não representam uma população homogênea, mas compreendem diversos subtipos celulares relacionados com a formação dos tecidos que compõem o periodonto de inserção (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar), apresentando-se em diferentes estágios de diferenciação celular celular (Mcculloch & Bordin, 1991; Seo *et al.*, 2004; Ivanovski *et al.*, 2006; Nagatomo *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Singhatanadgit *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Atualmente, sabe-se que o ligamento periodontal de dentes permanentes e decíduos de humanos abrigam células mesenquimais indiferenciadas (Seo *et al.*, 2004; Gay *et al.*, 2007; Singhatanadgit *et al.*, 2009; Silverio *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Contudo, não está claro na literatura se os diversos tipos celulares presentes no ligamento periodontal (fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos) derivam de uma única célula progenitora ou derivam de células progenitoras distintas (Mcculloch & Bordin, 1991; Liu *et al.*, 1997; Bosshardt, 2005; Wang *et al.*, 2011).

Seo *et al.*(2004) identificaram no ligamento periodontal de humanos, populações celulares caracterizadas como células mesenquimais indiferenciadas (células STRO-1<sup>+</sup> e CD146<sup>+</sup>). Estas células, quando cultivadas *ex vivo*, mostraram-se capazes de formar unidades formadoras de colônia (CFU-F) e diferenciarem-se em fenótipos osteoblástico/cementoblástico, condroblástico e adipogênico, comprovando o seu perfil de indiferenciação e multipotencialidade. Contudo, quando transplantadas em camundongos imunossuprimidos, observou-se que apenas 8 dos 13 subclones derivados de uma única célula mesenquimal indiferenciada do ligamento periodontal (PDLSC) possuíam a capacidade de formar estruturas semelhantes ao ligamento periodontal e cimento, sugerindo então, uma heterogeneidade celular mesmo dentro da população de PDLSC.

Gay *et al.* (2007) agruparam células de ligamento periodontal de diversos pacientes, isolaram PDLSC por citometria de fluxo pelo marcador STRO-1 e avaliaram a capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagem osteoblástica/cementoblástica destas células comparando-as com uma população de BMSC pela coloração de Vermelho de Alizarina após 48 dias de indução osteogênica. Os autores observaram que a coloração nas PDLSC estava isolada em grupamentos celulares, enquanto a coloração nas BMSC apresentava-se mais difusa em todas as células cultivadas. Diante deste resultado, os autores sugeriram que tal diferença pudesse ser decorrente da população de PDLSC isolada para o marcador STRO-1 por citometria de fluxo ser uma população heterogênea enriquecida com MSC ou que a população de PDLSC estivesse em diferente estágio de comprometimento de diferenciação quando comparados com as BMSC.

Utilizando-se a técnica do cilindro de clonagem, quatro subclones derivados de uma única célula foram obtidos a partir de um *pool* de células do ligamento periodontal de humano e foram comparados com uma população de células de ligamento periodontal isoladas por separação magnética pela expressão do marcador STRO-1 e com uma população de BMSC (Singhatanadgit *et al.*, 2009). A análise por citometria de fluxo dos marcadores relacionados a células mesenquimais demonstrou que as duas populações estudadas (PDLSC STRO-1<sup>+</sup> e BMSC), assim como os subclones isolados de ligamento periodontal, não expressavam os marcadores CD34 e 45, os quais são relacionados a células hematopoiéticas, e expressavam os marcadores CD29 e CD44, relacionados a MSC. Contudo, esta análise também demonstrou que somente as populações STRO-1<sup>+</sup> de



ligamento periodontal e a de BMSC expressavam o marcador STRO-1, que também é um marcador relacionado a MSC, sendo que os subclones obtidos do *pool* de células do ligamento periodontal não expressavam tal marcador. Os autores observaram também que a subpopulação STRO-1<sup>+</sup> do ligamento periodontal, as BMSC e um dos subclones tiveram capacidade de diferenciação osteoblástica, condroblástica e adipogênica, dois subclones derivados do ligamento periodontal tiveram somente capacidade de diferenciação osteogênica e um dos subclones não teve capacidade de diferenciação. Além disso, o subclone com capacidade de multi-diferenciação apresentou maior capacidade proliferativa e de formação de colônia que a subpopulação STRO-1<sup>+</sup>.

Em estudo subsequente, Sununliganon & Singhatanadgit (2012) avaliaram três subclones (com baixa (PC12), moderada (PC3) e alta (PC4) capacidade de formação de matriz mineral) isolados pela técnica de cilindro de clonagem quanto à expressão de marcadores relacionados a células mesenquimais e a células osteoblásticas utilizando PCR *array*. Os autores observaram que a expressão de três moléculas relacionadas a células mesenquimais indiferenciadas, a saber, adesão intercelular 1 (*ICAM1*), integrina beta 1 (*ITGI*) e de telomerase transcriptase reversa (*TERT*), era maior nos subclones PC3 e PC4 do que no subclone PC12 quando cultivados em meio de cultura padrão e que a expressão de marcadores relacionados a células osteoblásticas, dentre eles *RUNX2* e *ALP*, também era maior nos subclones PC3 e PC4 do que no subclone PC12 quando cultivados sob indução osteogênica. Contudo, a modulação da expressão dos marcadores relacionados a células mesenquimais quando os subclones foram cultivados em meio osteogênico não foi avaliada.

Estes estudos (Seo *et al.*, 2004; Gay *et al.*, 2007; Singhatanadgit *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Sununliganon & Singhatanadgit, 2012) demonstram que há heterogeneidade celular, mesmo dentro deste grupo específico de células isoladas como tendo características de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal. Acredita-se que dentro deste conjunto de células mesenquimais, algumas estejam comprometidas com linhagem fibroblástica e outras com linhagem formadora de tecido mineralizado, sendo que estas últimas compreendem subpopulações osteoblásticas e cementoblásticas (Liu *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 2004; Nagatomo *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007). Contudo, pouco se sabe sobre os marcadores associados as PDLSC com maior capacidade de diferenciação em células da

linhagem osteoblástica/cementoblástica e se a expressão destes marcadores sofre modulação durante o processo de diferenciação.

### **3. PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar subclones celulares que apresentam maior comprometimento para aquisição do fenótipo osteoblástico/cementoblástico a partir de uma população de células mesenquimais indiferenciadas (CD105<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>) do ligamento periodontal de humanos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Considerações éticas**

Esta pesquisa seguiu as recomendações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas (FOP – UNICAMP) sob o protocolo de número 030/2012 (Anexo).

### **4.2. Cultura das PDLSC de humanos**

Culturas primárias de PDLSC (células CD105<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>) foram isoladas e caracterizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Área de Periodontia da FOP – UNICAMP como previamente descrito por Silvério *et al.* (2010). Brevemente, terceiros molares inclusos indicados para exodontia foram obtidos de pacientes que procuraram a Clínica de Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, sendo esses pacientes saudáveis, do sexo masculino ou feminino, entre 19 e 29 anos, não fumantes, que não estavam grávidas e sem história de medicação sistêmica nos últimos seis meses. O ligamento periodontal do terço médio destes dentes foi gentilmente removido, digerido em uma solução de colagenase/dispase (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), e uma suspensão celular foi obtida passando as células através de um *cell strainer* de 100 µm de diâmetro (BD Falcon, Bedford, MA, EUA). Esta suspensão celular foi centrifugada, e o pellet celular obtido foi cultivado em meio de cultura padrão, composto por Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), 100 µg/ml de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA) até alcançar confluência. Este cultivo celular e os demais citados neste trabalho foram cultivados em incubadora (Sanyo MCO -18IAC, Moriguchi City, Osaka, Japão) a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO<sub>2</sub> e 98% de umidade. A partir desse *pool* celular derivado do ligamento periodontal, as células CD105<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> (fenótipo relacionado às células mesenquimais indiferenciadas) foram obtidas, utilizando a técnica de separação magnética (MACS, Miltenyl Biotec Inc., Auburn, CA, EUA), e este fenótipo mesenquimal foi confirmado por meio de análise de citometria de fluxo, onde foi observado que estas células

expressavam CD105 e CD166 e não expressavam os marcadores CD34 e CD45. Além disso, essas células foram caracterizadas como MSC devido a sua capacidade de: 1) expressarem gene para *OCT-4*, um marcador de pluripotencialidade e indiferenciação celular, 2) expressarem a proteína STRO-1, marcador específico para células mesenquimais indiferenciadas, 3) diferenciarem-se em células com fenótipo osteoblástico/cementoblástico e 4) diferenciarem-se em células semelhante a adipócitos (Silverio *et al.*, 2010). Estas PDLSC foram estocadas em nitrogênio líquido para experimentos futuros.

### **4.3. Isolamento de subclones a partir de PDLSC**

Dentre as cinco populações de PDLSC isoladas e caracterizadas no estudo de Silvério *et al.* (2010), uma única população foi selecionada para realizar o isolamento dos subclones celulares. A seleção dessa população foi baseada na capacidade proliferativa e de multipotencialidade observadas no estudo de Silvério *et al.* (2010). Então, com o intuito de se obter populações de células homogêneas (subclones) pelo isolamento de colônias derivadas de uma única célula, e identificar células comprometidas com fenótipo osteoblástico/cementoblástico e células comprometidas com fenótipo fibroblástico, esta população de PDLSC (na passage 4) foi semeada em cinco pratos de cultura de 100 x 20 mm em concentração celular de 250 células/prato e cultivada em meio de cultura padrão. O crescimento celular foi acompanhado, com trocas periódicas do meio de cultura a cada três dias. Quando as colônias derivadas de uma única célula formaram um agregado de cerca de 50 células, o isolamento das colônias foi realizado pela técnica do cilindro de clonagem (Pittenger *et al.*, 1999; Mcfarland, 2000; Mathupala & Sloan, 2009; Singhatanadgit *et al.*, 2009; Sununliganon & Singhatanadgit, 2012) (Figura 1), a qual consistiu na remoção do meio de cultura padrão, lavagem das células com solução fosfato salina (PBS) (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA) e aplicação do cilindro de clonagem de 8 mm de diâmetro (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) circundando a colônia que se desejava isolar. Em seguida, o PBS do interior do cilindro foi aspirado e as células da colônia foram tripsinizadas com solução de Tripsina 0,25% e EDTA 2,21mM (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA). Em seguida, cada colônia de células tripsinizada foi semeada em um poço de uma placa de 24 poços (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA) e cultivada com meio de cultura padrão. Este ponto foi considerado como a passagem 0

(P0) do subclone. Ao se atingir 70-80% de confluência celular, os subclones foram transferidos para placas de cultura progressivamente maiores a fim de se obter quantidade suficiente de células, e, posteriormente, congelados utilizando-se o meio de congelamento *Recovery Cell Culture Freezing Medium* (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA) para realização dos futuros experimentos. Durante este processo de isolamento, expansão, congelamento e descongelamento dos subclones, aqueles que não atingiram confluência ou apresentaram características morfológicas de senescência foram descartados (Yang *et al.*, 2009).

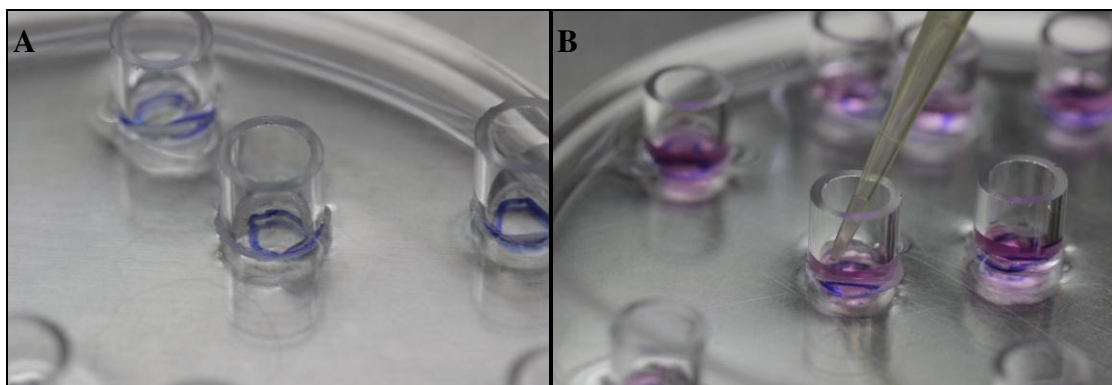


Figura 1. Isolamento de populações de células homogêneas (colônias derivadas de uma única célula) pela técnica do cilindro de clonagem. A: Aplicação do cilindro de clonagem circundando a colônia. B: Tripsinização da colônia para plaqueamento em um poço de uma placa de 24 poços.

#### **4.4. Seleção dos subclones com potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica por meio de ensaio de mineralização**

Com o intuito de selecionar os subclones celulares que apresentavam a capacidade de formar nódulos mineralizados (sugerindo comprometimento com fenótipo osteoblástico/cementoblástico) e diferenci-los dos que não apresentavam tal capacidade (sugerindo comprometimento com fenótipo fibroblástico), realizou-se o ensaio de Von Kossa. Para tal, os subclones foram semeados em quadruplicata em placas de 24 poços, a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço, mantidos em meio de cultura padrão. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído pelo meio de cultura osteogênico (constituído por meio de cultura padrão suplementado com 50  $\mu\text{g/mL}$  de ácido ascórbico, 10 mM de  $\beta$ -glicerolfosfato e  $10^{-5}\text{M}$  de dexametasona) em dois poços, e como controle negativo do experimento, dois poços de cada subclone foram mantidos em meio de cultura padrão

durante todo o período de 28 dias. Ao final deste período, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente e as células foram fixadas com etanol 100% (1 mL/poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100% até 50%, por 5 minutos em cada solução), e lavadas em água destilada por duas vezes. Em seguida, 1 mL de solução de 5% de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foi colocado e em cada poço e as células foram incubadas no escuro por 1 hora. Então, as células foram lavadas quatro vezes em água destilada e expostas à luz até que o mineral escurecesse. Baseando-se na capacidade de formação de nódulos minerais observada neste ensaio, inferiu-se que os subclones que apresentaram capacidade de mineralização *in vitro* apresentavam maior potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblásticas e estes foram agrupados no grupo C-O (comprometimento com o fenótipo osteoblástico/cementoblástico), enquanto que os subclones que não apresentaram tal capacidade foram associados com o comprometimento com o fenótipo fibroblástico, sendo agrupados no grupo C-F.

#### **4.5. Caracterização dos subclones com fenótipo osteoblástico/cementoblástico (C-O) e fenótipo fibroblástico (C-F)**

Os subclones com potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica (C-O) e os subclones comprometidos com fenótipo fibroblástico (C-F) foram avaliados comparativamente quanto à viabilidade e capacidade proliferativa e quanto à imunomarcagem para STRO-1. Adicionalmente, os subclones do grupo C-O também foram analisados quanto à expressão gênica de marcadores relacionados ao comprometimento com a diferenciação osteoblástico/cementoblástico (*RUNX2* e *ALP*) e de marcadores relacionados a células mesenquimais indiferenciadas (*CD105*, *CD166*, *OCT-4*) quando cultivados sob indução osteogênica.

##### **4.5.1. Viabilidade e capacidade proliferativa – Ensaio de MTS**

Para a avaliação da viabilidade celular e capacidade proliferativa dos subclones com potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica (C-O) em comparação aos subclones comprometidos com fenótipo fibroblástico (C-F), os subclones de ambos os grupos foram semeados em triplicata, a uma concentração de  $10^4$  células/poço em placas de

96 poços, e mantidos em meio de cultura padrão por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado com 2% de FBS, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina por 10 dias, com troca de meio nos dias 3 e 7. Ao final de cada um dos períodos de avaliação (1, 3, 7 e 10 dias), 20 µL de *Cell Titer96 Aqueous One Solution Reagent* (Promega, Madison, WI, EUA) foi adicionado em cada poço. Após 2 horas de incubação, foi realizada a leitura da absorbância a 490 nm no aparelho VersaMax ELISA *Microplate Reader* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), sendo esta absorbância correspondente ao reagente MTS que foi bio-reduzido em formazan pelas células viáveis. Desta maneira, quanto maior a absorbância, maior o número de células viáveis.

#### **4.5.2. Imunofluorescência para STRO-1**

Para avaliar o padrão de expressão de STRO-1, um marcador relacionado à MSC, nos subclones com maior comprometimento para diferenciação osteoblástica/cementoblástica (grupo C-O) em relação aos subclones com menor potencial para esta diferenciação (grupo C-F), os subclones de ambos os grupos foram semeados sobre lamínulas de vidro circulares (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) colocadas em poços de cultura de placa de 24 orifícios, numa concentração de  $2 \times 10^4$  células/poço, utilizando-se meio de cultura padrão. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 min a temperatura ambiente, lavadas com PBS por três vezes, e então, bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA) a 4% por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS por três vezes e incubadas com o anticorpo monoclonal *mouse* anti-STRO-1 (Millipore, Temecula, CA, EUA) (diluição de 1:50 em BSA 1%) por 1 hora a temperatura ambiente. Subsequentemente, as células foram lavadas com PBS por três vezes e incubadas com anticorpo secundário *goat anti-mouse* conjugado ao marcador Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) (diluição de 1:1000 em BSA a 1%) por 1 hora. Então, as lamínulas de vidro foram montadas em lâmina de microscopia (Start Frost, Knittelglaser, Braunschweig, Alemanha) utilizando-se o ProLong<sup>®</sup> *gold antifade reagent* (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). A localização da imunomarcagem foi detectada utilizando-se o microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha) da FOP-UNICAMP. Como



controle negativo da reação, subclones celulares foram submetidos ao mesmo protocolo, apenas substituindo a incubação com o anticorpo primário pela incubação somente com BSA a 1%.

### **4.5.3. Expressão gênica dos marcadores biológicos relacionados ao fenótipo osteoblástico/cementoblástico (*RUNX2* e *ALP*) e relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado (*CDI05*, *CDI66* e *OCT-4*)**

#### **4.5.3.1. Extração de RNA**

O perfil de expressão dos marcadores biológicos *RUNX2* e *ALP*, relacionados ao fenótipo osteoblástico/cementoblástico, foi avaliado nos subclones do grupo C-O nos períodos de 3, 7 e 14 dias a fim de confirmar o potencial de comprometimento com o perfil osteoblástico/cementoblástico dos mesmos. Adicionalmente, o perfil de expressão de marcadores biológicos relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado (*CDI05*, *CDI66* e *OCT-4*) nos subclones C-O durante o processo de diferenciação osteogênica foi avaliado nos mesmos períodos. Para tal, os subclones foram semeados em placas para cultivo celular de 60 x 15 mm, a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/placa, mantidos em meio de cultura padrão por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura padrão foi substituído por novo meio de cultura padrão ou pelo meio de cultura de indução osteogênica. Ao final dos períodos de 3, 7 e 14 dias, o ácido ribonucleico (RNA) total foi isolado por meio da utilização do reagente TRIzol<sup>®</sup> (Ambion, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, o meio de cultura foi aspirado e as células lavadas com PBS em temperatura ambiente. Um mililitro do reagente TRIzol<sup>®</sup> foi adicionado a cada prato de cultura sendo seu o conteúdo (células + reagente TRIzol<sup>®</sup>) transferido para um tubo eppendorf e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. A cada tubo eppendorf foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Frankfurt, Alemanha) sendo estes agitados cuidadosamente em “vortex”, incubados por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 11500 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 0,5 mL de isopropanol (Merck, Frankfurt, Alemanha), sofrendo agitação em “vortex” e incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Novamente os tubos foram centrifugados a 11500 rpm (Bio-Spin-R, BioAgency, São Paulo, Brasil) por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 75% (Merck,

Frankfurt, Alemanha) a 4°C, centrifugado a 11500 rpm por 3 minutos a 4°C, e seco a temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel de filtro. As amostras de RNA foram suspensas em água MiliQ livre de RNase e então, armazenadas a -70°C. O RNA total foi tratado para a eliminação de qualquer resíduo de DNA na amostra com Turbo DNA-free® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

#### **4.5.3.2. Síntese de DNA complementar**

A concentração de RNA das amostras tratadas foi medida utilizando-se um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e 1 µg da amostra tratada foi utilizada para a síntese de 20 µL DNA complementar (cDNA). As reações foram realizadas utilizando-se o kit *First-strand cDNA synthesis* com o *primer Anchored-oligo (dT)<sub>18</sub>* (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.5.3.3. Reações de *real-time* PCR**

As reações de *real-time* PCR (PCRq) foram realizadas com o sistema *LightCycler* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha), utilizando-se o kit *FastStart DNA Master plus SYBR Green I* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Os *primers* utilizados (Tabela 1) foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para desenhar *primers* para o sistema o *LightCycler* (Roche Applied Science). Para cada uma das “corridas”, a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando o programa do próprio fabricante (*LightCycler Relative Quantification Software - Roche Applied Science*). A quantificação relativa foi realizada utilizando o gene *GAPDH* como gene de referência para normalização dos valores.

Tabela 1. *Primers* utilizados para reações de *real-time* PCR (PCRq)

Gene	<i>Primers</i> (5' → 3')	Amplicon (pb)	Temperatura de Anelamento	Nº de Ciclos
<i>GAPDH</i>	Forward: ACATCATCCCTGCCTCTAC Reverse: CCACCTTCTTGATGTCATCATATTTG	171	51°C	40
<i>CD105</i>	Forward: GTCAATATCCTGTCGAGTCATCA Reverse: CAGGAACTCGGAGACGG	183	55 °C	35
<i>CD166</i>	Forward: CATGAAGAAGTCAAAGACTGCATC Reverse: TTTGTTTATGTCTTAAATACAATCCACGTT	190	55 °C	40
<i>OCT-4</i>	Forward: AGCTTAGCTTCAAGAACATGTGTA Reverse: GTTGCCTCTCACTCGGT	161	55 °C	40
<i>RUNX2</i>	Forward: CCGTCCATCCACTCTACCAC Reverse: ATGAAATGCTTGGGAAGTGC	139	55 °C	40
<i>ALP</i>	Forward: CGGGCACCATGAAGGAAA Reverse: GGCCAGACCAAAGATAGAGTT	184	55 °C	40

*GAPDH*: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; *RUNX2*: fator de transcrição relacionado a Runt-2; *ALP*: fosfatase alcalina. *OCT-4*: proteína octamérica-4.

#### 4.6. Análise estatística

Após a análise exploratória dos dados relativos à análise da viabilidade celular e capacidade proliferativa (ensaio de MTS) e à análise da expressão gênica, foi constatada a necessidade de transformação logarítmica apenas dos dados relativos à análise da expressão dos genes *CD105*, *CD166* e *OCT-4* para que os mesmos atendessem as pressuposições de uma análise paramétrica. Após a transformação dos dados necessários e seleção da melhor estrutura da covariância, foi aplicada a metodologia de modelos mistos (PROC MIXED) para medidas repetidas, seguido do teste de Tukey Kramer para comparações múltiplas, considerando o nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Isolamento de subclones a partir de PDLSC

A partir de uma população de cultura primária de PDLSC, 48 colônias originadas a partir de uma única célula (subclones) foram isoladas e plaqueadas em um poço de uma placa de 24 poços. Contudo, destes 48 subclones, apenas 16 apresentaram capacidade de alcançar confluência nas sucessivas placas de cultivo até alcançarem quantidade suficiente para serem congeladas para experimentos futuros. Entretanto, após o descongelamento dos subclones para a realização dos experimentos, somente seis subclones mantiveram a viabilidade e potencial proliferativo que permitiram obter quantidade suficiente de células para a realização do presente estudo (Figura 2).

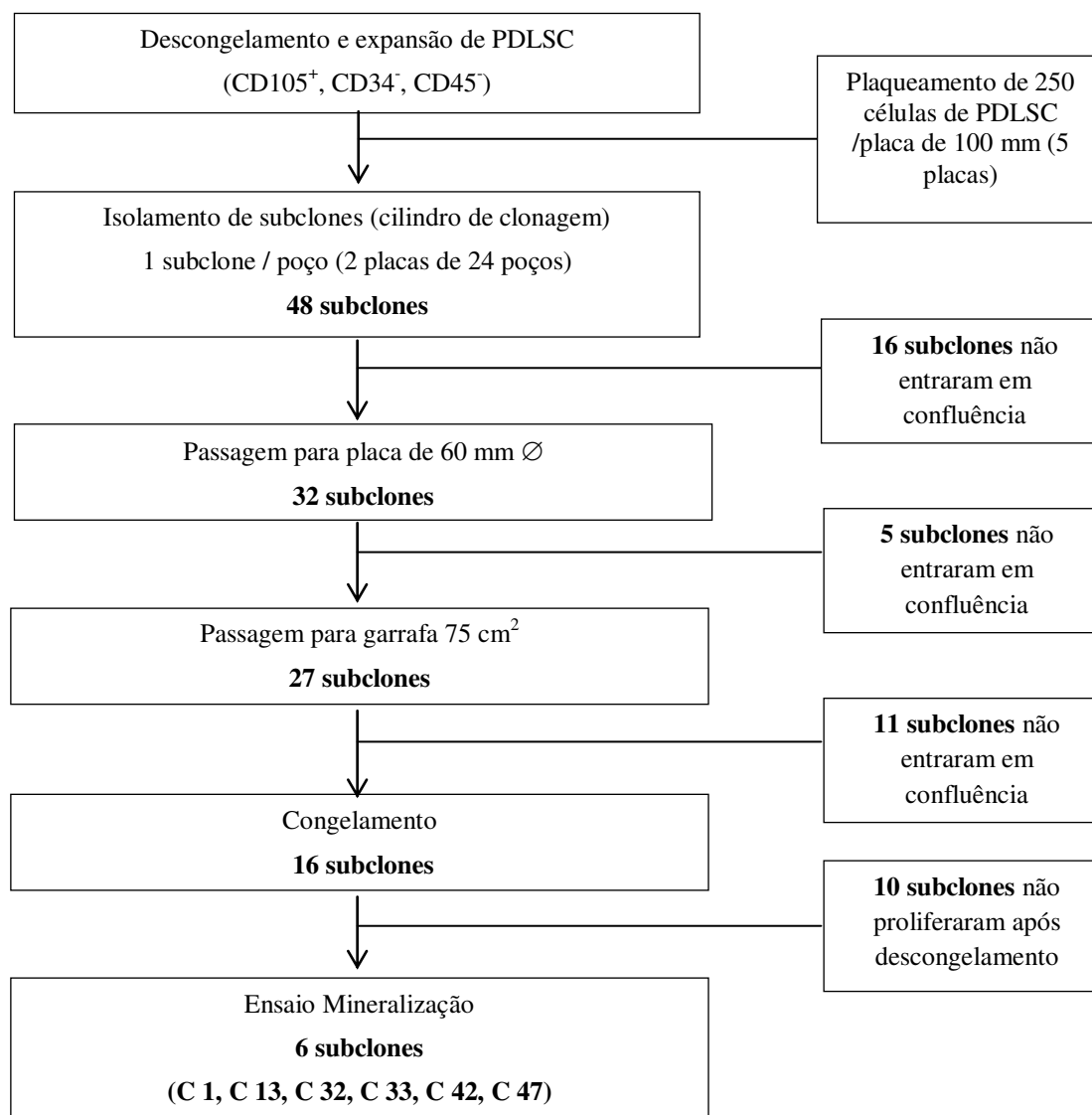


Figura 2. Fluxograma de isolamento dos subclones a partir de uma população de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humano.

## 5.2. Seleção dos subclones com potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica por meio de ensaio de mineralização

Pelo ensaio de Von Kossa, observou-se que três subclones (C 1, 13 e 42) apresentaram sua capacidade de formar nódulos minerais *in vitro*, sendo então categorizados como subclones comprometidos com o fenótipo osteoblástico/cementoblástico (C-O), e outros três (C 32, 33 e 47) não apresentaram tal capacidade, sendo categorizados como comprometidos com perfil fibroblástico (C-F) (Figura 3).

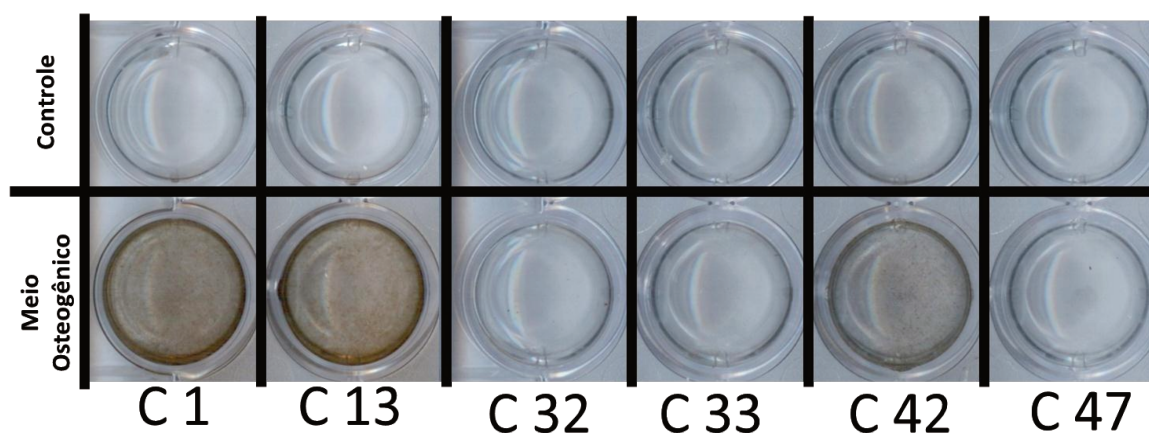


Figura 3. Aspecto macroscópico do ensaio de Von Kossa realizado para os seis subclones isolados de *pool* de PDLSC após 28 dias de cultivo em meio de cultura padrão (Controle) ou meio de indução osteogênico (Meio Osteogênico), demonstrando que os subclones C 1, 13 e 42 apresentaram capacidade de mineralização *in vitro* quando cultivados sob indução osteogênica, enquanto outros subclones C 32, 33, 47 não apresentaram tal capacidade.

## 5.3. Caracterização dos subclones com fenótipo osteoblástico/cementoblástico (C-O) e fenótipo fibroblástico (C-F)

### 5.3.1. Viabilidade e capacidade proliferativa – Ensaio de MTS

Os subclones com perfil fibroblástico (C-F) apresentaram maior capacidade de proliferação ao longo do período avaliado, sendo que houve um aumento significativo na quantidade de células viáveis nos períodos de 7 e 10 dias em comparação com os períodos iniciais (1 e 3 dias) ( $p \leq 0,05$ ). Já os subclones com perfil osteoblástico/cementoblástico apresentaram menor potencial proliferativo (C-O), sendo que houve um aumento significativo no número de células viáveis comparando-se o sétimo dia de cultivo em relação ao primeiro dia ( $p \leq 0,05$ ), mas que não se manteve ao final do período avaliado, no

décimo dia de cultivo ( $p > 0,05$ ) (Figura 4). Além disso, observou-se que no sétimo e no décimo dia de cultivo, a quantidade de células viáveis no grupo dos subclones com perfil fibroblástico (C-F) apresentou-se significativamente maior do que no grupo com perfil osteoblástico/cementoblástico (C-O) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 4).

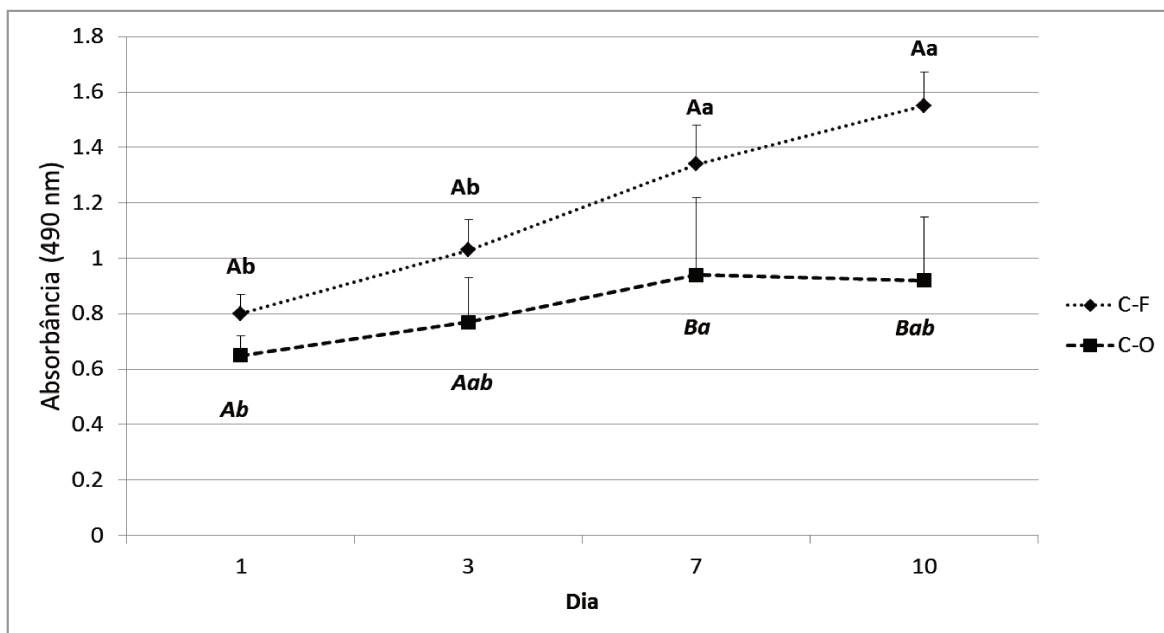


Figura 4. Viabilidade e capacidade proliferativa dos subclones com perfil fibroblástico (C-F) e perfil osteoblástico/cementoblástico (C-O) ao longo de 10 dias de cultivo avaliadas por meio de ensaio de MTS. Quadrado ou losângulo em cada período representam média + desvio padrão. Letras maiúsculas distintas representam diferença significativa intergrupo (C-F vs C-O) e letras minúsculas distintas representam diferença significativa intragrupo (entre os dias) ( $p \leq 0,05$ ) (Teste de Tukey Kramer).

### 5.3.2. Imunofluorescência para STRO-1

Todos os subclones, tanto do grupo C-O quanto do grupo C-F, expressaram o marcador relacionado a células mesenquimais indiferenciadas STRO-1 (Figura 5).

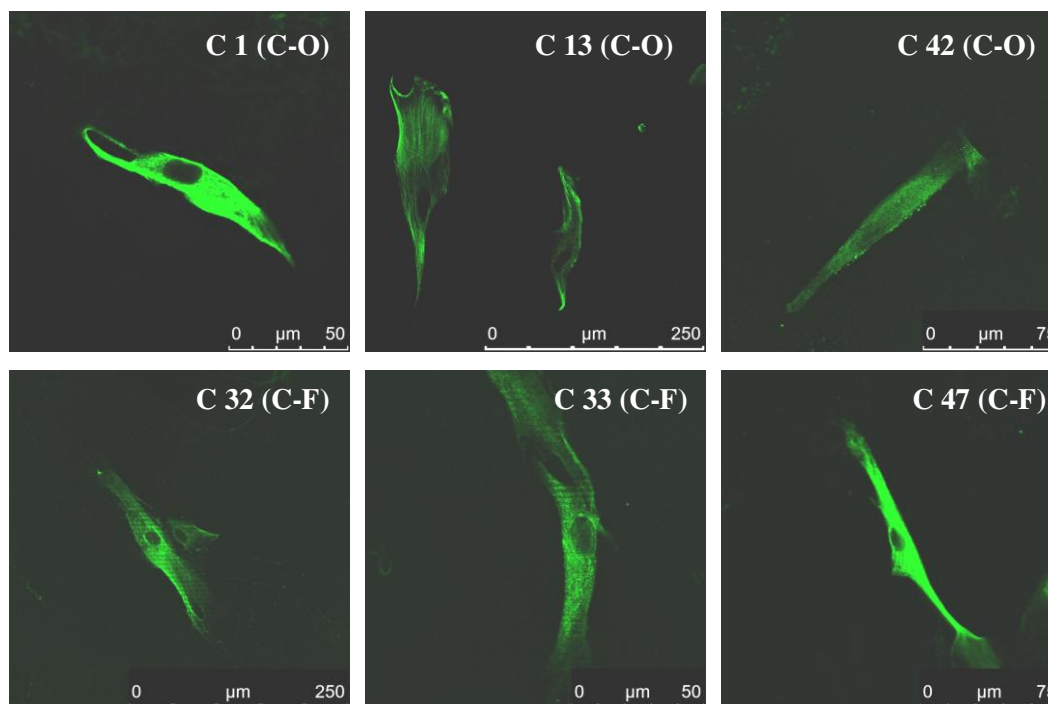


Figura 5. Imunomarcação para STRO-1 mostrou que tanto os subclones C-O (C 1, C 13 e C 42) quanto os subclones C-F (C 32, C 33 e C 47) expressaram o marcador STRO-1.

### 5.3.3. Expressão gênica dos marcadores biológicos relacionados ao fenótipo osteoblástico/cementoblástico (*RUNX2* e *ALP*) e relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado (*CD105*, *CD166* e *OCT-4*)

A avalia o da expressão dos genes *RUNX2* e *ALP* demonstrou que todos os subclones do grupo C-O apresentaram aumento na expressão destes genes quando cultivados em meio de indu o osteogênica (OM), indicando o comprometimento dos mesmos com o fenótipo osteoblástico/cementoblástico. Em rela o ao gene *RUNX2*, em ambas as condi es de cultura (sob indu o osteogênica ou não) foi observado um aumento na sua expressão a partir do dia 3, o qual se manteve até o dia 14. Esse aumento nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) foi significativo quando os subclones foram cultivados sob indu o osteogênica (OM) ( $p < 0.0001$ ) comparado quando cultivados em meio de cultura padrão (DMEM) (Figura 6A). Quanto   expressão do gene *ALP*, embora seja possível observar pela Figura 6B que o aumento na expressão desse gene ocorreu somente nos subclones celulares cultivados em meio osteogênico, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos (OM e DMEM) em nenhum período experimental. Isto se deve ao fato dos subclones terem apresentado uma grande

variabilidade no padrão de expressão do gene *ALP* quando submetidos à indução osteogênica. Como observado na Figura 7B, aos 3 dias em cultura, todos os subclones do grupo OM apresentam uma expressão aumentada do gene *ALP*. Contudo, aos 7 e 14 dias em cultura, somente o subclone C42 manteve esse perfil de expressão, enquanto que o C13 apresentou um pico de expressão aos 14 dias (Figura 7B). Essa variabilidade entre os subclones C-O durante o processo de maturação em fenótipo osteoblástico/cementoblástico, também foi observada para a expressão do gene *RUNX2* (Figura 7A), porém, com menor oscilação entre os subclones nos diferentes períodos de observação.

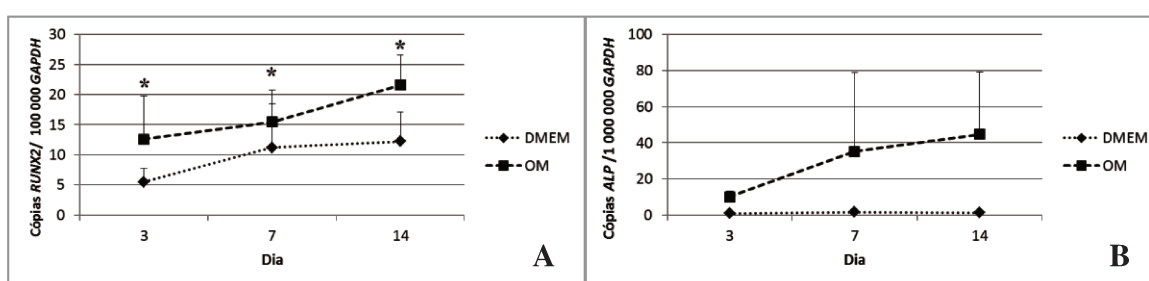


Figura 6. Análise de expressão de genes relacionados ao fenótipo osteoblástico/cementoblástico por *real time* PCR. Aumento na expressão dos genes *RUNX2* (A) e *ALP* (B) apresentado pelos subclones do grupo C-O cultivados em meio osteogênico (OM) durante os três períodos experimentais. Quadrado ou losângulo e barras em cada período representam média+desvio-padrão. Diferença significativa intergrupo está assinalada por \* ( $p < 0,05$ ) (Teste de Tukey Kramer).

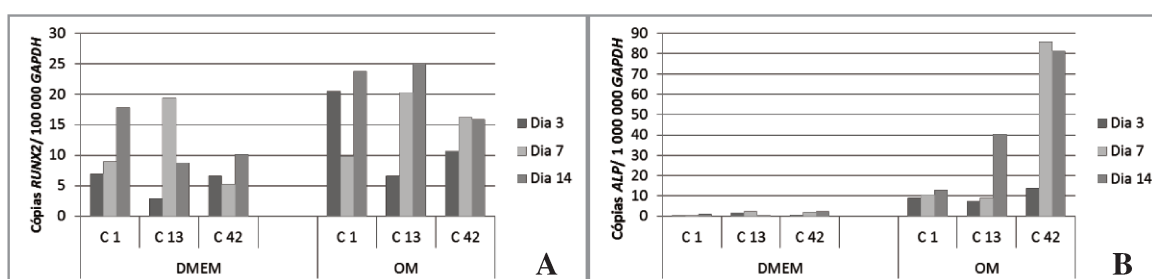


Figura 7. Variabilidade no padrão de expressão dos genes *RUNX2* (A) e *ALP* (B) dos subclones do grupo C-O cultivados sob indução osteogênica (OM) ou não (DMEM) e analisados pela técnica do *real time* PCR.

Quanto à modulação dos marcadores relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado (*CD105*, *CD166* e *OCT-4*) durante o processo de indução osteogênica, embora, numericamente, os subclones tenham apresentado valores maiores nos níveis de RNAm para os genes *CD105* (Figura 8A) e *OCT-4* (Figura 8B) após 7 e 14 dias em cultura



sob indução osteogênica (OM), diferenças estatisticamente significativas não foram observadas quando comparados com o cultivo sem indução (DMEM). Isto ocorreu devido à grande variabilidade no padrão de expressão desses genes pelos três subclones do grupo C-O. Conforme demonstrado pelas Figuras 9A e 9B, somente o clone C13 apresentou um aumento expressivo dos genes *CD105* e *OCT-4* sob indução osteogênica nos períodos de 7 e 14 dias. Um aumento significativo ( $p=0,027$ ) nos níveis de RNAm para *CD166* foi observado em todos os períodos experimentais, quando os subclones C-O foram cultivados sob indução osteogênica (Figura 8C). A variabilidade no padrão de expressão entre os subclones do grupo C-O também foi observada para o gene *CD166* (Figura 9C), porém, com menor oscilação entre os subclones nos diferentes períodos de observação.

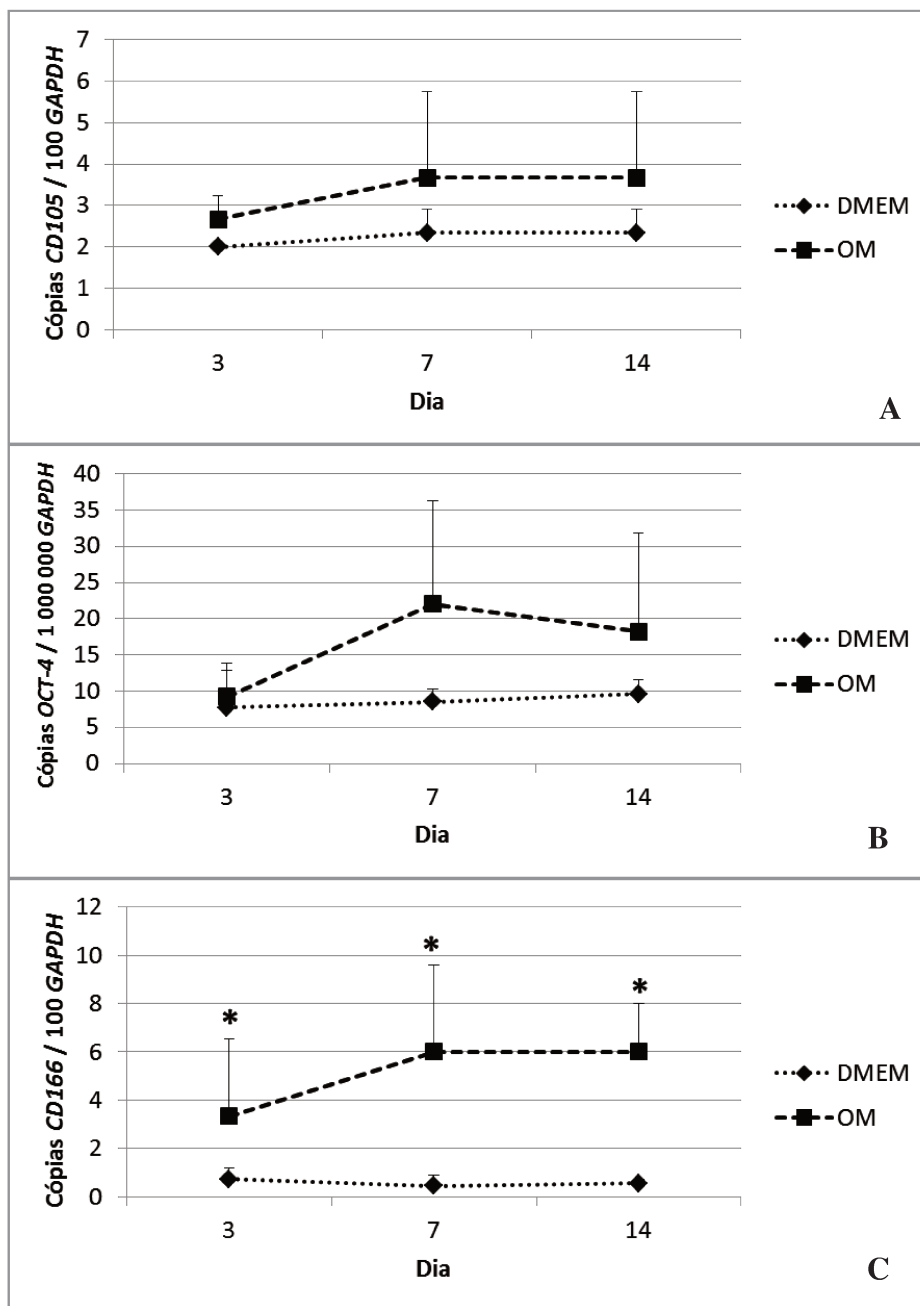


Figura 8. Análise por *real time* PCR da expressão dos genes relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado, *CD105* (A), *OCT-4* (B) e *CD166* (C), dos subclones do grupo C-O cultivados sob indução osteogênica (OM) ou não (DMEM). Quadrado ou losângulo e barras em cada período representam média + desvio-padrão. Diferença significativa intergrupo está assinalada por \* ( $p \leq 0,05$ ) (Teste de Tukey Kramer).

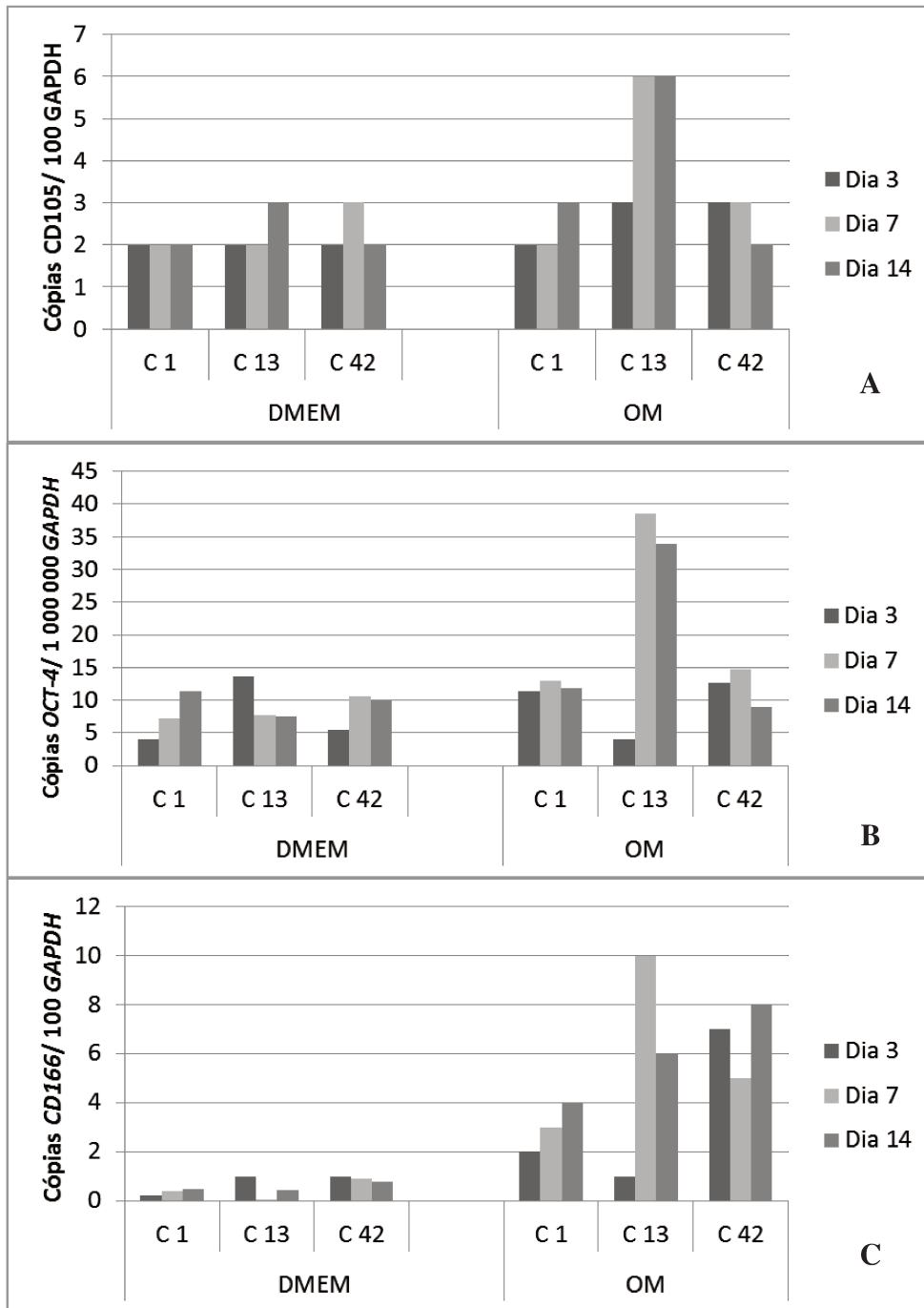


Figura 9. Variabilidade no padrão de expressão dos genes *CD105* (A), *OCT-4* (B) e *CD166* (C) dos subclones do grupo C-O cultivados sob condição osteogênica (OM) ou não (DMEM) e analisados pela técnica do *real time* PCR.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que há uma heterogeneidade celular nas PDLSC (CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>) em relação ao comprometimento com a formação de matriz mineralizada e capacidade proliferativa, uma vez que o isolamento de PDLSC pela técnica do cilindro de clonagem permitiu o isolamento de seis populações de células derivadas de uma única célula (subclones), onde três subclones apresentaram capacidade de formação de nódulos minerais *in vitro*, indicando o potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica, e três não apresentaram capacidade de formação de nódulos minerais *in vitro*, indicando menor potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica. Além disso, o presente estudo demonstrou que todos os subclones isolados apresentaram a expressão do marcador STRO-1, indicando que este marcador relacionado à MSC é expresso nas PDLSC independente do potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica ou não, o que corrobora com outros estudos que relatam que células STRO-1<sup>+</sup> podem dar origem a vários tipos celulares, como fibroblastos e células osteoprogenitoras (Simmons & Torok-Storb, 1991; Gronthos *et al.*, 1994).

A manutenção da heterogeneidade celular quando do isolamento de PDLSC a partir de um marcador para fenótipo mesenquimal indiferenciado utilizando-se a técnica de separação magnética, como observada no presente trabalho, também foi relatada por Singhatanadgit *et al.* (2009). Estes autores (Singhatanadgit *et al.*, 2009) compararam uma população de ligamento periodontal isolada para o marcador STRO-1 com quatro populações derivadas de uma única célula (subclones) de um *pool* de células primárias de ligamento periodontal e observaram ao microscópio óptico, que a população STRO-1<sup>+</sup> era composta por células com morfologias heterogêneas em contraste com os subclones, que se apresentavam morfologicamente mais homogêneos. Além disto, Singhatanadgit *et al.* (2009) observaram que os subclones não apresentavam marcação para STRO-1 e um destes subclones apresentou capacidade de multi-diferenciação *in vitro* e maior capacidade proliferativa e de formação de colônia comparado à população heterogênea de células do ligamento periodontal STRO-1<sup>+</sup>.

Em outros estudos, subclones derivados de células do folículo dental (Luan *et al.*, 2006) e da medula óssea de humanos (Fukiage *et al.*, 2008) foram avaliados quanto à

expressão de marcadores celulares relacionados à condição mesenquimal indiferenciada, onde observou-se que todos os subclones expressaram o marcador *CD105*, independente do seu potencial de diferenciação osteogênica. Adicionalmente, Fujii *et al.* (2008) isolaram três subclones (denominados 1-4, 1-11 e 1-24) de uma população de células do ligamento periodontal imortalizada e avaliaram estes subclones em relação a imunomarcação para STRO-1 e CD146 e potencial de diferenciação *in vitro* e *in vivo*. Os autores observaram que o subclone 1-24 apresentou somente expressão de STRO-1 e não foi capaz de se diferenciar em fenótipo osteoblástico/cementoblástico *in vitro*. Já, o subclone 1-4, marcado positivamente apenas para CD146, apresentou capacidade de diferenciação osteoblástica/cementoblástica *in vitro*, mas não houve formação de tecidos periodontais *in vivo*, sendo que apenas o subclone 1-11, que expressou concomitante os marcadores CD146 e STRO-1, apresentou capacidade de diferenciação osteoblástica e adipogênica *in vitro* e de formar estrutura semelhante a ligamento periodontal quando transplantado subcutaneamente em camundongos. Assim, os resultados dos trabalhos acima citados (Luan *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2008; Fukiage *et al.*, 2008; Singhatanadgit *et al.*, 2009), juntamente com o resultado do presente trabalho, demonstram que o isolamento de colônias derivadas de uma única célula (subclones) possibilita a seleção de uma população celular mais homogênea para caracterização do fenótipo celular mais favorável a regeneração periodontal. Contudo, esta técnica de isolamento celular por subclonagem pode ter favorecido a seleção PDLSC que expressem STRO-1 no presente trabalho, já que estudos em células da medula óssea (Simmons & Torok-Storb, 1991) e do ligamento periodontal (Seo *et al.*, 2004) demonstram que populações celulares isoladas para o marcador STRO-1 pela técnica de separação magnética apresentam maior potencial para formação de colônias. Além disso, os resultados do presente estudo e dos estudos anteriores (Luan *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2008; Fukiage *et al.*, 2008; Singhatanadgit *et al.*, 2009) demonstram que mais investigações em relação a outros marcadores celulares, além do CD105 e do STRO-1, são necessárias para caracterizar melhor o fenótipo das células mesenquimais com maior potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica e regeneração dos tecidos periodontais. Devido à complexidade celular dos tecidos mesenquimais, é provável que um conjunto de marcadores celulares ao invés de um único marcador celular seja necessário

para identificar com maior confiabilidade as células com melhor perfil para a regeneração tecidual, como observado no estudo de Fujii *et al.* (2008).

Os resultados do presente estudo demonstraram que os subclones com capacidade de formação de tecidos mineralizados *in vitro* observada pelo ensaio de Von Kossa também apresentaram menor potencial proliferativo do que as células sem tal capacidade. Resultado semelhante foi observado em um estudo que avaliou a heterogeneidade celular de células progenitoras humanas do folículo dental de camundongos, onde se observou que os subclones que apresentaram maior precipitação de fosfato pelo ensaio de Von Kossa foram também aqueles que apresentaram menor potencial proliferativo (Luan *et al.*, 2006). Contudo, estes resultados são diferentes dos observados em subclones isolados de células mesenquimais da medula óssea de camundongos por Satomura *et al.* (2000), os quais observaram que os subclones com perfil osteoblástico apresentaram maior potencial proliferativo que aqueles sem potencial osteoblástico. Estas diferenças podem ser decorrentes da origem do tecido obtido, já que as células do ligamento periodontal são derivadas do folículo dental e, desta forma, tendem a mecanismos regulatórios de proliferação e diferenciação mais semelhantes às células progenitoras do folículo dental do que às da medula óssea.

Vários estudos na literatura relatam a expressão de *CD105*, *CD106*, *CD166* e *OCT-4* como marcadores para células indiferenciadas de origem mesenquimal (Bruder *et al.*, 1997; Arai *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2003; Nagatomo *et al.*, 2006; Fukiage *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Mafi *et al.*, 2011; Ferro *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2012). Contudo, poucos estudos foram realizados buscando avaliar a modulação destes marcadores durante o processo de diferenciação osteogênica de células mesenquimais indiferenciadas, e resultados controversos foram observados (Bruder *et al.*, 1997; Bruder *et al.*, 1998; Arai *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008; Ferro *et al.*, 2012).

No presente estudo, os subclones que apresentaram capacidade de formar nódulos mineralizados *in vitro* (subclones C-O) foram avaliados quanto à expressão gênica de marcadores relacionados ao fenótipo osteoblástico/cementoblástico (*RUNX2* e *ALP*) e de marcadores relacionados ao fenótipo mesenquimal indiferenciado (*CD105*, *CD166* e *OCT-4*) durante o processo de indução osteogênica. Nesta análise, observou-se que houve aumento médio na expressão de todos os genes avaliados quando os subclones do grupo C-

O foram cultivados sob indução osteogênica em comparação às células cultivadas em meio de cultura padrão. Entretanto, diante o restrito número de subclones que foi possível isolar para este estudo, e devido à alta variabilidade da expressão dos genes *ALP*, *CD105* e *OCT-4* entre os subclones, uma diferença estatisticamente significativa não foi observada para a expressão destes genes, sendo somente observado um aumento significativo para os genes *RUNX2* e *CD166*.

Liu *et al.* (2008) observaram, por citometria de fluxo, que a maioria das BMSC apresentaram marcação positiva para CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD166. E quando estas células foram cultivadas em meio osteogênico por 14 dias, uma redução significativa da expressão de CD106, mas não dos outros marcadores, foi observada. Ferro *et al.* (2012) avaliaram células mesenquimais da polpa dental e observaram que estas células expressavam CD10, CD29, CD105, CD117, *OCT-4*, *Nanog*, *Klf4* e *c-Myc* quando em estado indiferenciado, mas que a expressão de CD10, CD29, CD117, *OCT-4*, *Nanog* e *Klf4*, mas não a de CD105, diminuía quando estas células eram induzidas a diferenciação osteogênica durante um mês. Estes estudos (Liu *et al.*, 2008; Ferro *et al.*, 2012) corroboram com o presente estudo em relação ao o marcador CD105, demonstrando que o mesmo sofre pouca modulação na expressão durante o processo de diferenciação osteogênica. Já em relação à expressão de *OCT-4*, o estudo de Ferro *et al.* (2012) contrasta com o resultado do presente estudo. Quanto ao marcador *CD166*, também denominado ALCAM ou SB-10, o resultado observado no presente estudo, onde se observou um aumento significativo da expressão deste marcador, difere do resultado observado por Liu *et al.* (2008), os quais verificaram que este marcador não sofreu modulação da expressão durante a indução osteogênica em BMSC por duas semanas. Já Bruder *et al.* (1997; 1998) observaram que o marcador *CD166* foi expresso em BMSC e células osteoprogenitoras e que sua expressão foi diminuída a medida que BMSC humanas se diferenciavam em células semelhantes a osteoblastos. Arai *et al.* (2002) também observaram que população de pericôndrio enriquecida com células que expressavam *CD166* apresentou capacidade de multi-diferenciação, mas que a expressão de *CD166* diminuía após indução osteogênica por duas semanas. Estas diferenças entre os resultados do presente trabalho em relação aos estudos relatados na literatura podem estar associadas ao tipo de tecido a partir da qual as MSC foram obtidas, sendo que Liu *et al.* (2009)

sugeriram que devido ao fato de o periodonto ser constituído por tecidos mineralizados e não mineralizados em íntima relação, as células deste tecido requeram uma regulação gênica mais complexa durante a diferenciação.

Recentemente, Chitteti *et al.* (2013) cultivaram osteoblastos de camundongo por seis semanas sob indução osteogênica e observam que a expressão de CD166 apresentava uma distribuição bimodal, sendo que, nos períodos iniciais de cultivo (primeira e segunda semana), houve um aumento na expressão deste marcador, seguida de uma queda na expressão até a sexta semana. Além disso, Chitteti *et al.* (2013) observaram uma associação positiva entre a expressão de Runx2 e CD166, tal como no presente estudo. Assim, estes estudos demonstram que a expressão do marcador CD166 parece estar relacionada os estágios iniciais de comprometimento celular das MSC com a linhagem osteoblástica/cementoblásticas. Neste sentido, a realização de mais estudos para esclarecer os mecanismos envolvidos na regulação das PDLSC, comprometimento das mesmas à diferenciação celular, e avaliação a melhor combinação de marcadores celulares para distinguir populações em diferentes estágios de comprometimento celular são importantes e auxiliarão na melhor compreensão da formação do periodonto. Além disso, este entendimento do processo envolvendo a formação do periodonto e as células progenitoras envolvidas é necessário para que abordagens que melhorem a previsibilidade de regeneração periodontal possam ser propostas.



## 7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que:

- 1) A população de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos selecionadas pelo marcador de superfície CD105, constitui uma população heterogênea de células, apresentando tanto células com potencial para comprometimento com perfil osteoblástico/cementoblástico, como células com potencial para comprometimento com perfil fibroblástico
- 2) Os subclones com potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica são menos proliferativos que os subclones sem este potencial;
- 3) A expressão do marcador STRO-1 não está relacionada com o potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica os subclones de PDLSC;
- 4) O antígeno de superfície *CD166* é modulado nos subclones de PDLSC que apresentam potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica quando estes são cultivados sob indução osteogênica.

## REFERÊNCIAS\*

Aichelmann-Reidy ME, Reynolds MA. Predictability of clinical outcomes following regenerative therapy in intrabony defects. *J Periodontol.* 2008; 79(3): 387-93.

Anjos-Afonso F, Bonnet D. Flexible and dynamic organization of bone marrow stromal compartment. *Br J Haematol.* 2007; 139(3): 373-84.

Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ, Suda T. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med.* 2002; 195(12): 1549-63.

Arosarena O. Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 13(4): 233-41.

Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes I, de Toro FJ, Blanco FJ. Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes. *J Cell Biochem.* 2010; 111(4): 834-45.

Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000.* 2000; (24): 253-69.

Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997; (13): 20-40.

Benatti BB, Silverio KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. *J Biosci Bioeng.* 2007; 103(1): 1-6.

Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res.* 2005; 84(5): 390-406.

Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol.* 2008; 35 Suppl 8: 87-105.

Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone.* 1997; 21(3): 225-35.

Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, *et al.* Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(4): 655-63.

Buser D, Warrer K, Karring T. Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J Periodontol.* 1990; 61(9): 597-601.

Chitteti BR, Cheng YH, Kacena MA, Srour EF. Hierarchical organization of osteoblasts reveals the significant role of CD166 in hematopoietic stem cell maintenance and function. *Bone*. 2013; 54(1): 58-67.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.

Elangovan S, Srinivasan S, Ayilavarapu S. Novel regenerative strategies to enhance periodontal therapy outcome. *Expert Opin Biol Ther*. 2009; 9(4): 399-410.

Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005; (4): CD003875.

Ferro F, Spelat R, D'Aurizio F, Puppato E, Pandolfi M, Beltrami AP, *et al*. Dental pulp stem cells differentiation reveals new insights in Oct4A dynamics. *PLoS One*. 2012; 7(7): e41774.

Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2008; 215(3): 743-9.

Fukiage K, Aoyama T, Shibata KR, Otsuka S, Furu M, Kohno Y, *et al*. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 indicates the differentiation potential of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 365(3): 406-12.

Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*. 2007; 10(3): 149-60.

Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2007; 25(12): 3143-54.

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994; 84(12): 4164-73.

Ivanovski S. Periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2009; 54 Suppl 1: S118-28.

Jepsen S, Eberhard J, Herrera D, Needleman I. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? *J Clin Periodontol*. 2002; 29 Suppl 3: 103-16.

Jiao J, Hindoyan A, Wang S, Tran LM, Goldstein AS, Lawson D, *et al*. Identification of CD166 as a surface marker for enriching prostate stem/progenitor and cancer initiating cells. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42564.

Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol.* 1985; 12(1): 51-60.

King FW, Ritner C, Liszewski W, Kwan HC, Pedersen A, Leavitt AD, *et al.* Subpopulations of human embryonic stem cells with distinct tissue-specific fates can be selected from pluripotent cultures. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(10): 1441-50.

Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dent J.* 2008; 53(2): 108-21.

Lin NH, Gronthos S, Mark Bartold P. Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontol 2000.* 2009 (51): 239-51.

Liu F, Akiyama Y, Tai S, Maruyama K, Kawaguchi Y, Muramatsu K, *et al.* Changes in the expression of CD106, osteogenic genes, and transcription factors involved in the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Metab.* 2008; 26(4): 312-20.

Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res.* 1997; 12(10): 1691-9.

Liu L, Ling J, Wei X, Wu L, Xiao Y. Stem cell regulatory gene expression in human adult dental pulp and periodontal ligament cells undergoing odontogenic/osteogenic differentiation. *J Endod.* 2009; 35(10): 1368-76.

Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev.* 2006; 15(4): 595-608.

Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *Open Orthop J.* 2011; 5 Suppl 2: 253-60.

Mariotti A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003; 8(1): 205-26.

Mathupala S, Sloan AA. An agarose-based cloning-ring anchoring method for isolation of viable cell clones. *Biotechniques.* 2009; 46(4): 305-7.

McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res.* 1991; 26(3 Pt 1): 144-54.

McFarland DC. Preparation of pure cell cultures by cloning. *Methods Cell Sci.* 2000; 22(1): 63-6.

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976; 47(5): 256-60.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001; 226(6): 507-20.

Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, *et al.* Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res.* 2006; 41(4): 303-10.

Okamoto T, Aoyama T, Nakayama T, Nakamata T, Hosaka T, Nishijo K, *et al.* Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295(2): 354-61.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284(5411): 143-7.

Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem Cell Rev.* 2011; 7(1): 64-76.

Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003; 8(1): 227-65.

Satomura K, Krebsbach P, Bianco P, Gehron Robey P. Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. *J Cell Biochem.* 2000; 78(3): 391-403.

Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008; 35 Suppl 8: 106-16.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004; 364(9429): 149-55.

Silverio KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, *et al.* Mesenchymal Stem Cell Properties of Periodontal Ligament Cells From Deciduous and Permanent Teeth. *J Periodontol.* 2010; 81(8): 1207-15.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.* 1991; 78(1): 55-62.

Singhatanadgit W, Donos N, Olsen I. Isolation and characterization of stem cell clones from adult human ligament. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(9): 2625-36.

Stewart K, Monk P, Walsh S, Jefferiss CM, Letchford J, Beresford JN. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells

and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res.* 2003; 313(3): 281-90.

Sununliganon L, Singhatanadgit W. Highly osteogenic PDL stem cell clones specifically express elevated levels of ICAM1, ITGB1 and TERT. *Cytotechnology.* 2012; 64(1): 53-63.

Tormin A, Brune JC, Olsson E, Valcich J, Neuman U, Olofsson T, *et al.* Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets. *Cytotherapy.* 2009; 11(2): 114-28.

Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, *et al.* Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17(7-8): 1015-26.

Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365(1537): 155-63.

Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, Ma ZF, Xu L, Wu JJ, *et al.* Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *J Periodontal Res.* 2009; 44(2): 199-210.

Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E. Mechanisms underlying the osteo- and adipodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal.* 2012: 793823. doi:10.1100/2012/793823



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



**CERTIFICADO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Caracterização do fenótipo de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos com potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica**", protocolo nº 030/2012, dos pesquisadores Karina Gonzales Silverio Ruiz e Miki Taketomi Saito, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 13/07/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Characterization of mesenchymal stem cell phenotype from human periodontal ligament involved in osteoblastic/cementoblastic differentiation**", register number 030/2012, of Karina Gonzales Silverio Ruiz and Miki Taketomi Saito, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 07/13/2012.

**Prof. Dra. Lívia Maria Andalo Tenuta**  
Secretária  
CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.