ISOLAMENTO, CULTURA, EXPANSÃO, CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTES DO PERIÓSTEO DO PALATO DURO DE PACIENTE IDOSO

Extraction, culture, expansion, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from the periosteum of the hard palate of a 77-year-old donor

RESUMO

Neste trabalho, uma técnica minimamente invasiva para a coleta do periósteo do palato é apresentada, possibilitando o isolamento e a expansão das células-tronco mesenquimais em qualquer fase da vida do indivíduo. O doador com 77 anos de idade foi submetido à biopsia do tecido do palato duro por meio de um bisturi circular, com 3 mm de diâmetro, nas proximidades da região dos pré-molares superiores, sem a necessidade da realização de suturas, devido ao tamanho mínimo de incisão. A cultura celular do periósteo proveniente do palato foi estabelecida com sucesso, chegando ao final da quarta passagem após 53 dias de cultivo. A análise por citometria de fluxo indicou que o periósteo do palato contém população de células-tronco mesenquimais CD73, CD90 e CD105 positivas, além da baixa expressão de marcadores de superfície de células-tronco hematopoiéticas. A expressão do marcador CD105 (76,10%) indica potencial osteogênico dessa fonte de células-tronco mesenquimais, o que foi consubstanciado após indução à diferenciação osteogênica. O periósteo do palato demonstrou-se uma fonte satisfatória de células-tronco mesenquimais de fenótipo "jovem", mesmo em adultos com idade avançada, e com potencial de aplicabilidade na bioengenharia óssea.

Palavras-chave – Células-tronco; Periósteo; Técnicas de cultura de células.

ABSTRACT

In this work, a minimally invasive technique for collecting the periosteum from the palate is presented, enabling the isolation and expansion of mesenchymal stem cells at any stage of the individual's life. The 77-year-old donor underwent hard palate tissue biopsy using a circular scalpel, 3 mm in diameter, in the vicinity of the upper premolar region, without the need to perform sutures, due to the minimal size incision. Cell culture of periosteum from the palate was successfully established, reaching the end of the 4th passage after 53 days of culture. Flow cytometric analysis indicated that the palate periosteum contains a population of CD73, CD90 and CD105 positive mesenchymal stem cells, in addition to the low expression of hematopoietic stem cell surface markers. The expression of the CD105 marker (76.10%) indicates the osteogenic potential of this source of mesenchymal stem cells, which was substantiated after induction of osteogenic differentiation. The palate periosteum proved to be a satisfactory source of mesenchymal stem cells of the "young" phenotype, even in adults with advanced age, and with potential applicability in bone bioengineering.

Key words – *Stem cells; Periosteum; Cell culture techniques.*

José R. M. Ferreira[1]
Tamara C. L. Castro[2]
Daniel Navarro da Rocha[3]
André A. Pelegrine[4]

[1](Qual especialidade?) do Depto. de Bioengenharia – R-Crio Criogenia. Orcid: (informar número).
[3](Qual especialidade?) do Depto. de Bioengenharia – R-Crio Criogenia. Orcid: (informar número).
[3](Qual especialidade?) do Depto. de Bioengenharia – R-Crio Criogenia. Orcid: (informar número).
[4](Qual especialidade?) – São Leopoldo Mandic. Orcid: (informar número).

Recebido em nov/2021
Aprovado em dez/2021

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais se apresentam como um grupo especial de células com a capacidade de autorrenovação e posterior diferenciação em alguns tipos de células especializadas, inclusive do tecido duro[1]. As células-tronco mesenquimais (CTM) estão presentes em uma variedade de tecidos e podem ser isoladas em qualquer fase da vida do indivíduo, de acordo com a sua capacidade de adesão e multiplicação *in vitro*. Estas células, especificamente encontradas na região crânio-orofacial, ganharam significativa importância após serem isoladas da polpa dentária e descritas em 2000[2]. Desde então, esse tipo celular vem sendo proposto em inúmeros protocolos experimentais e clínicos para a medicina regenerativa.

A região crânio-orofacial é uma fonte atrativa de diferentes tipos de células-tronco mesenquimais (CTM ou do inglês *mesenchymal stem cells – MSC*). Algumas fontes de CTMs que podem ser encontradas na região crânio-orofacial são: medula óssea da maxila e mandíbula (BMSC), polpa dentária (DPSC), papila apical (SCAP), ligamento periodontal (PDLSC), folículo dental (DFSC), periósteo (PSC), gengiva (GMSC), glândulas salivares (SGMSC) e tecido adiposo (AMSC). Dentre estas fontes de coleta, o periósteo é um tecido conjuntivo altamente vascularizado, encontrado como uma fina camada recobrindo as superfícies ósseas do corpo humano, que vem apresentando um enorme potencial como nicho de células-tronco mesenquimais, para o desenvolvimento de novas terapias para a regeneração dos tecidos. Este tecido vem sendo utilizado em diversas cirurgias odontológicas e ortopédicas, seja no tratamento de fraturas ósseas, regeneração tecidual guiada ou para o aumento do assoalho do seio maxilar, por exemplo. Porém, o uso das células-tronco mesenquimais obtidas deste tecido ainda é limitado e subestimado[3-5]. A hipótese de que as células mesenquimais da região oral seriam excelentes candidatas para uso na medicina regenerativa vem da sua fácil obtenção e alto potencial de diferenciação em diversos tecidos[1,6].

Sabe-se que os nichos de células-tronco sofrem inúmeras influências que determinam sua manutenção e regulação. Um exemplo que pode ser citado é quando, na presença de altas concentrações de algum íon ou fator parácrino (cálcio, fator de crescimento do fibroblasto – FGF, Notch, Wnt), as células-tronco respondem a essas alterações, bem como o estresse oxidativo também desempenha um papel importante na determinação do destino dessas células[7]. Em pacientes jovens, o periósteo apresenta-se mais espesso, vascularizado e pouco aderido, quando comparado com o dos adultos, variando também com a sua localização[8-9]. Entretanto, em qualquer idade é observada a presença das células-tronco mesenquimais periosteais que podem ser isoladas, multiplicadas e armazenadas sob condições adequadas e com potencial de uso na medicina regenerativa. Neste trabalho, foi apresentada uma técnica minimamente invasiva de biopsia do periósteo do palato, quando em comparação às fontes convencionais, como a medula óssea e a polpa dentária (Figuras 1).

Além do potencial regenerativo da célula escolhida, outro fator importante que deve ser levado em conta são os processos de senescência celular que podem sofrer grande influência a depender da idade do doador. A senescência exerce um papel negativo na capacidade de autorrenovação e proliferação celular, embora a juventude das células mesenquimais obtidas em adultos pode ser um fator impeditivo de um bom desempenho em regeneração tecidual, ou até mesmo no uso de células mesenquimais como agentes imunomoduladores. Alguns autores reportam que é possível obter populações de CTMs jovens, mesmo em indivíduos com mais de 60 anos[10].

Neste trabalho, foi demonstrado o sucesso na extração e na cultura de células-tronco mesenquimais obtidas do palato de indivíduo com 77 anos de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Paciente do sexo masculino, com 77 anos de idade, foi orientado sobre o protocolo cirúrgico e, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), submetido à biopsia do tecido do palato duro por meio de um bisturi circular com 3 mm de diâmetro, nas proximidades da região dos pré-molares superiores, mais especificamente a uma distância de 3 mm a 4 mm da junção amelocementária dos dentes permanentes. Uma das vantagens deste protocolo cirúrgico é a ausência da realização de suturas, devido ao tamanho mínimo de incisão. Eventualmente, em caso de algum nível de sangramento, uma breve compressão com gaze estéril será o suficiente para estabilização do coágulo.

Para esta técnica, é necessário um movimento rotacional durante a incisão do bisturi, tanto no sentido horário quanto no sentido anti-horário, imprescindível para que uma pressão seja exercida até o contato com o tecido ósseo palatino, para a retirada total do periósteo. Um descolador de periósteo pode ser utilizado para deslocar o tecido que permanece no local de incisão e, posteriormente, uma pinça é indicada para a adequada inserção do tecido no tubo contendo a solução de transporte, que é composta por meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – *low glucose*, Sigma-Aldrich, cat. D2902) enriquecido com solução antibiótica de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, cat. P4333).

Após a obtenção da amostra de periósteo, o tecido foi lavado com solução antibiótica composta por penicilina e estreptomicina 1% (Sigma-Aldrich, cat. P4333), anfotericina B 0,1% (Gibco, cat. 15290018) e Mycozap (Lonza, cat. LT07-918). Em seguida, a amostra foi cortada e imersa em 1 mL de colagenase 0,6% (Sigma-Aldrich, cat. C0130), em banho maria, a 37°C durante 15 a 30 minutos. Depois, a atividade enzimática foi neutralizada com meio básico DMEM (Sigma-Aldrich, cat. D2902) e as células foram centrifugadas a 1.000 RPM durante cinco minutos. Na sequência à etapa de centrifugação, o *pellet* ressuspenso em meio de cultura *xeno free* (Human Mesenchymal-XF Expansion Medium,

Merck-Millipore, cat. SCM045) foi transferido para uma garrafa de 25 cm^2 própria para o cultivo celular e acondicionado em incubadora de CO_2 (Water Jacketed série III, Thermo Scientific) a 37°C, 5% CO_2 e 80% de umidade para um crescimento adequado.

O desenvolvimento e crescimento celular foi acompanhado a cada dois dias e o meio de cultura foi trocado de duas a três vezes por semana. Ao atingir 80%-90% de confluência, as células foram destacadas da garrafa de cultura por ação enzimática (TrypLE, Gibco, cat. 12604021) a 37°C por, no máximo, dez minutos. A solução enzimática foi neutralizada com meio basal, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio *xeno free*, divididas em duas garrafas de 25 cm^2 e devolvidas à cultura para dar seguimento à multiplicação celular. Este processo foi repetido sempre que necessário até um máximo de quatro passagens.

Caracterização

A análise de imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo (citômetro de fluxo BD Accuri C6, Bacton-Dickinson Biosciences), utilizando o programa BD Accuri C6 *software* (Bacton-Dickinson Biosciences). As células foram suspensas em solução Stain Buffer (BSA) – Bacton-Dickinson Pharmingen, cat. 554657 – a uma concentração de 1,0 x 10^6 células/mL e coradas com os anticorpos monoclonais de escolha. Após uma incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, as células foram lavadas três vezes com solução Stain Buffer (BSA) e ressuspensas em 0,500 mL de solução Stain Buffer (BSA). A fim de analisar a expressão de marcadores de superfície celular, as células foram tratadas com os seguintes anticorpos monoclonais: CD45 (Bacton-Dickinson Biosciences, cat.555483), CD73 (Bacton-Dickinson Biosciences, cat. 550257), CD90 (Bacton-Dickinson Biosciences, cat. 555595) e CD105 (Bacton-Dickinson Biosciences, cat. 561443). O mínimo de 1.000 eventos foi realizado para cada amostra.

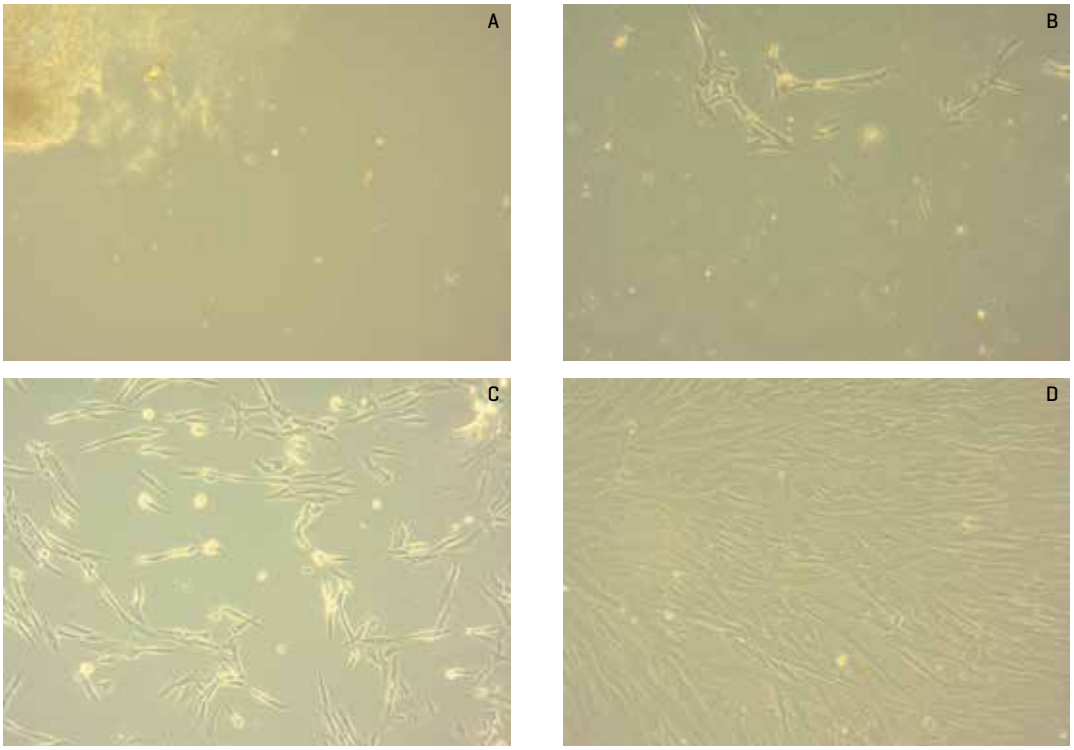
Para avaliar a propriedade de diferenciação das células-tronco mesenquimais do periósteo do palato, as células obtidas em quarta passagem foram submetidas à diferenciação osteogênica *in vitro*, em triplicata, em uma placa de 12 poços. As células foram cultivadas em meio osteogênico contendo DMEM/baixa glicose (Sigma-Aldrich, cat. D2902) com 0,1 µM de dexametasona (Sigma-Aldrich, cat. D1756) e 50 µM de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma-Aldrich, cat. A8960). No dia 21, a coloração com vermelho de alizarina foi realizada a fim de identificar o acúmulo de cálcio mineralizado. Os poços foram lavados com PBS e, brevemente, as células foram fixadas com solução de formaldeído 4% (Dinâmica, cat. P.10.0504.000.00.81) durante 30 minutos. Após a fixação, os poços foram corados com solução de vermelho de alizarina 2% (pH 4,2; Dinâmica, cat. P.01.0297.001.09.81) durante 45 minutos, ao abrigo da luz. Ao final, as imagens foram obtidas em microscópio (Zeiss Primovert).

RESULTADOS

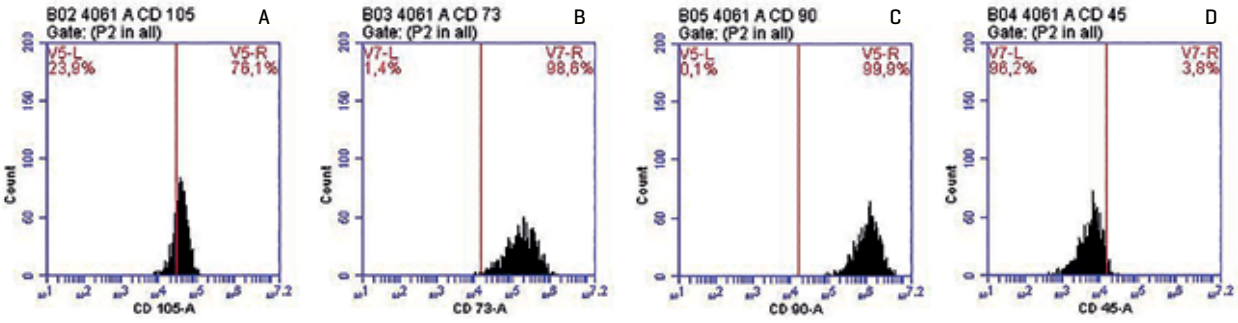
Cultura celular

A cultura celular do periósteo proveniente do palato foi estabelecida com sucesso e a liberação das células pelo tecido foi observada até a sua adesão ao plástico da garrafa de cultivo (Figura 2A), levando-as ao espraiamento após 19 dias (Figuras 2A e 2B). As células demonstraram morfologia semelhante a fibroblastos, conforme indicação pela sociedade internacional de terapia celular (ISCT). Após a demonstração da capacidade de aderir e proliferar com sucesso nas garrafas de cultura (Figura 2D), as células chegaram ao final da quarta passagem após 53 dias de cultivo.

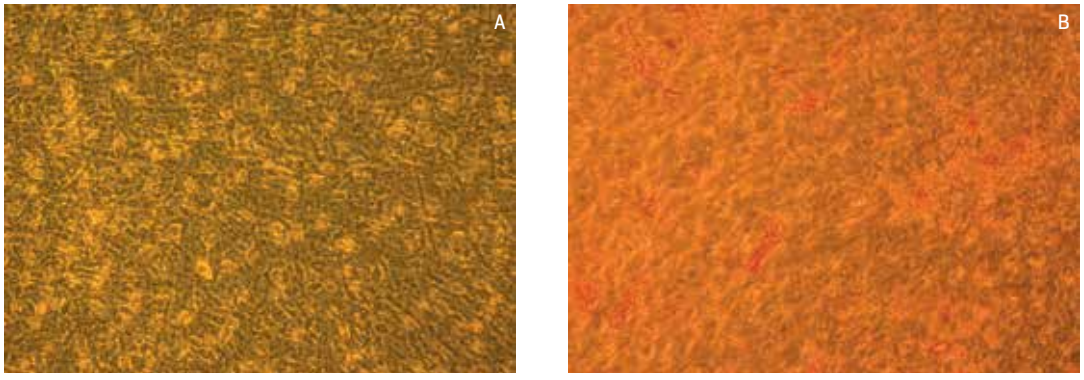
Figuras 1 – A. A coleta é realizada por meio de um bisturi circular, com 3 mm de diâmetro, a uma distância de 3 mm a 4 mm da junção amelocementária dos dentes pré-molares superiores. B. Ao final, o uso de descolador de periósteo e pinça é indicado para a retirada do tecido.



Figuras 2 – Estágios do cultivo celular do periósteo do palato. A. Liberação das células pelo tecido. B. Células espraiadas. C. Células em baixa confluência. D. Células aptas para criopreservação.



Figuras 3 – Quantificação fenotípica para marcadores de superfície CD105, CD73, CD45 e CD90.



Figuras 4 – Diferenciação osteogênica das CTMs. A. Controle negativo. B. Amostra diferenciada.

Imunofenotipagem

De acordo com o posicionamento da International Society for Cellular Therapy (ISCT), uma das características que as células-tronco mesenquimais devem exibir é o fenótipo positivo para os marcadores CD105, CD90 e CD73 (≥ 95% +) e negativo para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 e HLA-DR (≤ 2% +). Os resultados obtidos são exibidos nas Figuras 3.

Diferenciação osteogênica

Outra característica que deve ser considerada para a caracterização das células-tronco mesenquimais é a capacidade de diferenciação quando induzidas. Os resultados da diferenciação osteogênica são exibidos nas Figuras 4.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, a técnica de coleta do periósteo do palato, minimamente invasiva, demonstrou-se satisfatória para o posterior isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais do indivíduo com 77 anos. A literatura relata que as células-tronco de doadores adultos possuem baixo potencial de proliferação, bem como aumento de senescência, quando comparadas às de doadores jovens[11-12]. A hipótese de que a idade do doador seja um fator importante e que possa influenciar em uma futura terapia celular vem sendo discutida, porém ainda precisa ser investigada mais a fundo. O envelhecimento está entre os principais fatores de risco para o surgimento de doenças, portanto a identificação desses conjuntos de fenômenos que levam à senescência continua sendo um desafio para o adequado desenvolvimento terapêutico em idosos.

A análise por citometria de fluxo indicou que o periósteo do palato contém população de células-tronco mesenquimais CD73, CD90 e CD105 positivas, além da baixa expressão de marcadores de superfície de células-tronco hematopoiéticas. Entretanto, a expressão do marcador CD105 (76,10%) foi inferior ao recomendado (> 95%) nos critérios da ISCT. O periósteo vem sendo documentado como promissora fonte de células-tronco com alto potencial osteogênico[3,13] e estudos sugerem o marcador CD105 como um preditivo do potencial osteogênico das células-tronco mesenquimais provenientes de polpas dentárias e tecido adiposo[14].

Embora as evidências demonstrem que as células-tronco mesenquimais extraídas do periósteo possam ter a expressão de CD105 em menores valores, quando em comparação às células provenientes de polpa dentária e medula óssea, a diferenciação osteogênica mostrou um resultado promissor. Portanto, apesar dos valores abaixo do referencial determinado pela ISCT, estas células demonstram uma capacidade vantajosa de integrar processos regenerativos para a bioengenharia óssea[3,13,15].

Os índices absolutos para uma caracterização fenotípica de células-tronco mesenquimais ainda precisam ser definidos. Entretanto, compreender em qual nível processos de senescência podem ser interferentes em estratégias em medicina regenerativa ou terapias celulares é um requisito importante ao se idealizar a fabricação de produtos para a terapia avançada e sua eficácia relativa. Ademais, evidências apontam para a eficácia de se obter células mesenquimais de fenótipo "jovem" mesmo de indivíduos idosos[10].

CONCLUSÃO

A técnica de extração do periósteo do palato de doador adulto com 77 anos e o posterior isolamento e expansão de suas células-tronco mesenquimais demonstrou-se satisfatória e com potencial de aplicabilidade na bioengenharia óssea.

Nota de esclarecimento
Nós, os autores deste trabalho, não recebemos apoio financeiro para pesquisa dado por organizações que possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho. Nós, ou os membros de nossas famílias, não recebemos honorários de consultoria ou fomos pagos como avaliadores por organizações que possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho, não possuímos ações ou investimentos em organizações que também possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho. Não recebemos honorários de apresentações vindos de organizações que com fins lucrativos possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho. Não estamos empregados pela entidade comercial que patrocinou o estudo e também não possuímos patentes ou *royalties*, nem trabalhamos como testemunha especializada ou realizamos atividades para uma entidade com interesse financeiro nesta área.

Endereço para correspondência
André Pelegrine
Endereço completo
Telefone
e-mail

REFERÊNCIAS

1. Oliver JD, Madhoun W, Graham EM, Hendrycks R, Renouard M, Hu MS. Stem cells regenerating the craniofacial skeleton: current state-of-the-art and future directions. J Clin Medicine 2020;9(10):3307.
2. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97(25):13625-30.
3. Schmelzeisen R, Schimming R, Sittinger M. Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation – a preliminary report. J Craniomaxillofac Surg 2003;31(1):34-9.
4. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – part I: stem cell sources. J Prost Res 2012;56(3):151-65.
5. Ferretti C, Mattioli-Belmonte M. Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: boosting current knowledge. World J Stem Cells 2014;6(3):266-77.
6. Rocha DN, Rlsb M, Barbosa RM. Mesenchymal stem cells associated with bioceramics for bone tissue regeneration. Biomater Med Appl 2017;1-2. (informar volume e número da edição)
7. Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, Catón J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. Adv Dent Res 2011;23(3):275-9.
8. Al-Qtaitat A, Shore RC, Aaron JE. Structural changes in the ageing periosteum using collagen III immuno-staining and chromium labelling as indicators. J Musculoskelet Neuronal Interact 2010;10(1):112-23.
9. Nahian A, Chauhan PR. Histology, periosteum and endosteum. 2021; StatPearls [Internet]. COMPLETAR
10. Block TJ, Marinkovic M, Tran ON, Gonzalez AO, Marshall A, Dean DD et al. Restoring the quantity and quality of elderly human mesenchymal stem cells for autologous cell-based therapies. Stem Cell Res Ther 2017;8(1):239.
11. Yukata K, Xie C, Li TF, Takahata M, Hoak D, Kondabolu S et al. Aging periosteal progenitor cells have reduced regenerative responsiveness to bone injury and to the anabolic actions of PTH 1-34 treatment. Bone 2014;62:79-89. (informar número da edição)
12. Iezzi I, Lazzarini R, Cerqueni G, Hosein A, Rossato M, Licini C et al. MicroRNA profiling in mesenchymal stromal cells: the tissue source as the missing piece in the puzzle of ageing. Stem Cell Rev Rep 2021;17(3)1014-26.
13. Naung NY, Duncan W, Silva RD, Coates D. Localization and characterization of human palatal periosteum stem cells in serum-free, xeno-free medium for clinical use. European J oral Sci 2019;127(2):99-111.
14. Ishiy FAA, Fanganiello RD, Kobayashi GS, Kague E, Kuriki PS, Passos-Bueno MR. CD105 is regulated by hsa-miR-1287 and its expression is inversely correlated with osteopotential in SHED. Bone 2018;106:112-20. DOI: 10.1016/j.bone.2017.10.014. Epub 2017 Oct 13.
15. Naung NY, Duncan WJ, De Silva RK, Coates DE. HGF/MET in osteogenic differentiation of primary human palatal periosteum-derived mesenchymal stem cells. J Oral Sci 2021;63(4):341-6.

Referênicias
Acesse as referências completas deste artigo no site da ImplantNews.
https://bit.ly/3dwpj45 (ATUALIZAR)