

Expressão da aldeído desidrogenase (ALDH), STRO-1 e CD44 em células-tronco da polpa de dentes decíduos e permanentes

Expression of aldehyde dehydrogenase (ALDH), STRO-1 and CD44 in pulp stem cells from deciduous and permanent teeth

Cintia V. MACHADO¹; Paloma D. S. TELLES²; Ivana L. O. NASCIMENTO³

1 - Professora da Clínica Integrada de Atenção à Criança da Faculdade de Odontologia da Universidade Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME), Salvador, Bahia, Brasil;

2 - Professora Adjunta em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil;

3 - Professora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da enzima aldeído desidrogenase (ALDH), assim como dos marcadores de membrana celular STRO-1 e CD44 em células-tronco da polpa de dentes decíduos (SHEDs), permanentes (DPSCs) e fibroblastos da polpa (HDPFs), através da citometria de fluxo e do western blot. Para tanto, as células foram cultivadas em meio DMEM/HEPES, suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para a avaliação dos resultados da citometria de fluxo foram utilizados o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e o teste de comparação múltipla de Dunn. As três linhagens de células, quando caracterizadas pelo western blot, expressaram fortemente a ALDH, assim como o STRO-1, ao passo que apresentaram uma fraca expressão para

o CD44, não apresentando diferença na intensidade das bandas entre as mesmas. Já na análise por citometria de fluxo, todas as células apresentaram valores percentuais altos para o CD44, sem diferença estatística. Para o marcador STRO-1, os valores foram relativamente baixos para os três tipos celulares, havendo diferença apenas entre SHEDs e HDPFs. Os valores percentuais para a atividade da enzima ALDH foram igualmente baixos, havendo diferença estatisticamente significante entre DPSCs e HDPFs. Os resultados deste estudo sugerem que SHEDs, DPSCs e fibroblastos podem compartilhar algumas características, como a expressão de determinados marcadores genéticos. Da mesma forma, indicam que o uso da ALDH pode ser explorado em pesquisas futuras, para caracterização e seleção das MSCs.

PALAVRAS-CHAVE: Polpa dentária; Células-tronco; Aldeído desidrogenase.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, um aumento exponencial no número de publicações a respeito das células-tronco tem sido observado, refletindo o potencial de uso destas células em estratégias terapêuticas em humanos¹. As células-tronco adultas têm sido o grande foco destes estudos, e dentre estas, as células-tronco mesenquimais ou estromais (MSCs), visto que pesquisas utilizando células-tronco embrionárias apresentam inúmeros obstáculos de ordem ética e religiosa. As MSCs já foram identificadas em diversos tecidos, tais como medula óssea, fluido sinovial, tecido adiposo, polpa de dentes decíduos e permanentes, cordão umbilical, músculo esquelético, dentre outros²⁻⁶.

As MSCs são sabidamente difíceis de serem purificadas, pois não existem marcadores realmente específicos para este grupo de células^{7,8}. Entretanto, a identificação de marcadores mais adequados é crucial para que a aplicação da engenharia de tecidos ou de terapias baseadas na utilização destas células para a cura de diferentes doenças, assim como para que a regeneração de órgãos e tecidos se torne uma realidade⁸. Alguns marcadores têm sido frequentemente utilizados para a identificação de células-tronco mesenquimais de diferentes origens, nos quais estão incluídos o STRO-1, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, SSEA-1

(*stage-specific embryonic antigen-1*) e SSEA-4^{7,9-13}.

A aldeído desidrogenase (ALDH) é uma enzima citosólica responsável pela oxidação intracelular de aldeídos, a qual está envolvida na oxidação do retinol em ácido retinóico durante as fases iniciais de diferenciação das células-tronco^{14,15}. Esta enzima seria crucial para a proteção das mesmas contra aldeídos tóxicos endógenos e exógenos, assim como para a habilidade destas células em se diferenciar em linhagens distintas¹⁶.

Diversos estudos mostram que a atividade da ALDH pode ser utilizada para caracterizar e selecionar células-tronco hematopoiéticas (HSCs), tanto murinas quanto humanas¹⁵⁻¹⁹. Da mesma forma, populações de células-tronco adultas de diferentes origens, como células progenitoras neurais, do tecido adiposo, assim como MSCs obtidas da medula óssea foram isoladas com base na atividade desta enzima¹⁹⁻²¹. A ALDH também tem sido empregada em várias pesquisas para identificar subpopulações de células com características de células-tronco, tanto em cânceres dos sistemas hematopoiético e linfático, quanto em tumores sólidos, como câncer de mama, ovário, fígado e intestino²²⁻²⁶. Em relação à polpa dentária, Telles et al.²⁷ (2007) identificaram a presença deste marcador em células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHEDs) e células-tronco da polpa de den-

tes permanentes humanos (DPSCs), as quais são linhagens de células-tronco mesenquimais isoladas destes tecidos, através da técnica da imunocitoquímica.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da enzima ALDH em SHEDs, DPSCs e fibroblastos de polpa dentária humana (HDPFs), além de outros marcadores usualmente empregados para caracterizar e selecionar células-tronco mesenquimais, através das técnicas de citometria de fluxo e *western blot*.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTURA DE CÉLULAS

As SHEDs e DPSCs (gentilmente doadas pelo Dr. Songtao Shi - Dental Biology Unit, Craniofacial Skeletal Diseases Branch, NIH Bethesda, MD, EUA), assim como fibroblastos da polpa de dentes permanentes humanos - HDPFs (gentilmente doados pela Dra. Tatiana Botero - Department of Cariology, Restorative Sciences and Endodontics, School of Dentistry, University of Michigan, MI, USA) foram cultivadas em meio DMEM/HEPES (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Laborclin, Pinhais, Brasil) e 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), e armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada três dias, sendo as culturas mantidas nestas condições até atingirem confluência de cerca de 90%, quando eram então realizadas as passagens. As células eram colhidas com solução de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) e transferidas para subculturas com o respectivo meio de cultura até ser necessária a próxima passagem.

As SHEDs foram utilizadas nas passagens de 7 a 9, as DPSCs nas passagens 7 e 8 e os HDPFs, nas passagens 6 e 7. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

CITOMETRIA DE FLUXO

As células (SHEDs, DPSCs e HDPFs) foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos e submetidas à leitura em citômetro de fluxo. Um total de 106 células foi incubado por 30 min a 4°C com os anticorpos STRO-1 (Clone Stro-1, Invitrogen, Camarillo, CA, USA) e CD44 (Clone EPR1013Y, Abcam, Cambridge, UK), conjugados com APC ou PE (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA). Para detecção da atividade da enzima ALDH nas células foi utilizado o kit AL-DEFLUOR (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram suspensas com o substrato ativado do Aldefluor (BAA - BODIPY® aminiacetaldeído) ou com o inibidor específico desta enzima (DEAB - dietilaminobenzaldeído), sendo incubadas por 45 min a 37°C. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo FACSDiVA Cell Sorter (BD Biosciences).

WESTERN BLOT

Para avaliação dos marcadores STRO-1, CD44 e ALDH em SHEDs, DPSCs e HDPFs, as células foram coletadas com solução de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), incubadas com tampão de lise celular (NP-40), sonicadas, centrifugadas e o sobrenadante foi coletado para a quantificação da proteína total, realizada em um espectrofotômetro (Genius Tecan, Tecan, Graz, Áustria) em um comprimento de onda de 595 nm, com o auxílio do pro-

grama Magellan (Tecan Trading AG, Suíça). A seguir, 20µg de proteína de cada amostra foram separadas por um gel de SDS-PAGE (12% para ALDH e 9% para STRO-1 e CD44), transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em TBST, por uma hora. Os anticorpos primários anti-ALDH, 1:500 (Clone 44/ALDH, BD Biosciences), anti-CD44, 1:500 (Clone EPR1013Y, Abcam) e anti-STRO-1, 1:500 (Clone Stro-1, Invitrogen) foram incubados overnight a 4°C. Depois de lavadas em TBST, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (HRP), por duas horas em temperatura ambiente. Após nova lavagem, a detecção do sinal foi realizada com luminescência química (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). O sinal foi visualizado através de filmes Kodak BIOMAX MR

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar se houve diferença estatística entre SHEDs, DPSCs e HDPFs em relação aos marcadores avaliados pela citometria de fluxo, foram utilizados o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e o teste de comparação múltipla de Dunn.

RESULTADOS

CITOMETRIA DE FLUXO

Os resultados da análise por citometria de fluxo das células avaliadas (SHEDs, DPSCs e HDPFs) estão apresentados na Tabela 1. Os valores encontrados para o CD44 foram iguais ou superiores a 90% em todas as diferentes linhagens de células, inclusive para os fibroblastos de polpa dental, não havendo diferença estatística entre os grupos. Em relação ao STRO-1, uma fração menor de células entre os três diferentes grupos apresentou-se positiva para este marcador. Os valores percentuais de células STRO-1⁺ entre SHEDs e DPSCs foram maiores do que os encontrados nos HDPFs. Entretanto, foi detectada diferença significativa apenas entre as SHEDs e os fibroblastos. Todas as células testadas apresentaram valores mais baixos para a atividade da enzima ALDH. Houve diferença significativa entre as DPSCs e fibroblastos, em relação à quantidade de células ALDH⁺ nestas duas linhagens. As Figuras 1, 2 e 3 ilustram os resultados obtidos.

Tabela 1 - Representação dos valores percentuais da Mediana (Percentil 25 e 75) obtidos através da análise por citometria de fluxo de SHEDs, DPSCs e HDPFs, para os marcadores STRO-1, CD44 e ALDH.

	SHEDs Mediana (%) (Percentil 25 - 75)	DPSCs Mediana (%) (Percentil 25 - 75)	HDPFs Mediana (%) (Percentil 25 - 75)
STRO-1	9,76* (7,09 - 20,73)	8,18 (7,13 - 11,35)	3,23* (3,0 - 5,78)
CD44	99,6 (97,7 - 99,9)	90,1 (84,6 - 97,8)	99,8 (99,6 - 99,8)
ALDH	1,98 (1,6 - 2,2)	2,94* (2,7 - 3)	1,5* (1,0 - 1,7)

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$).

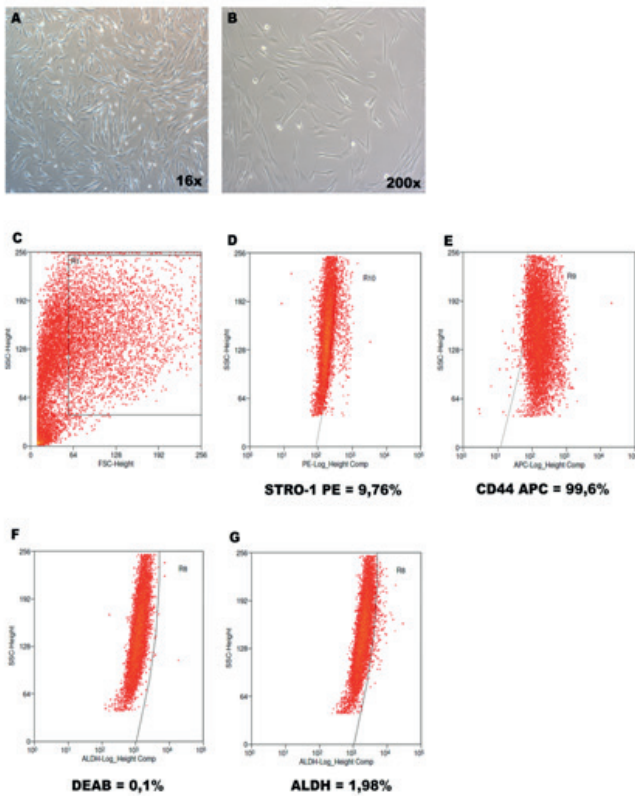


Figura 1

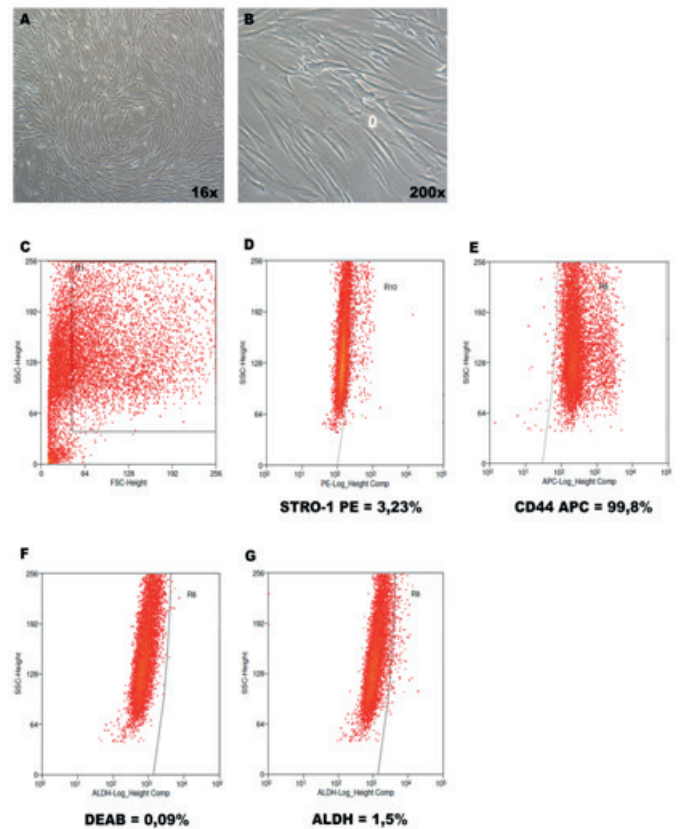


Figura 3

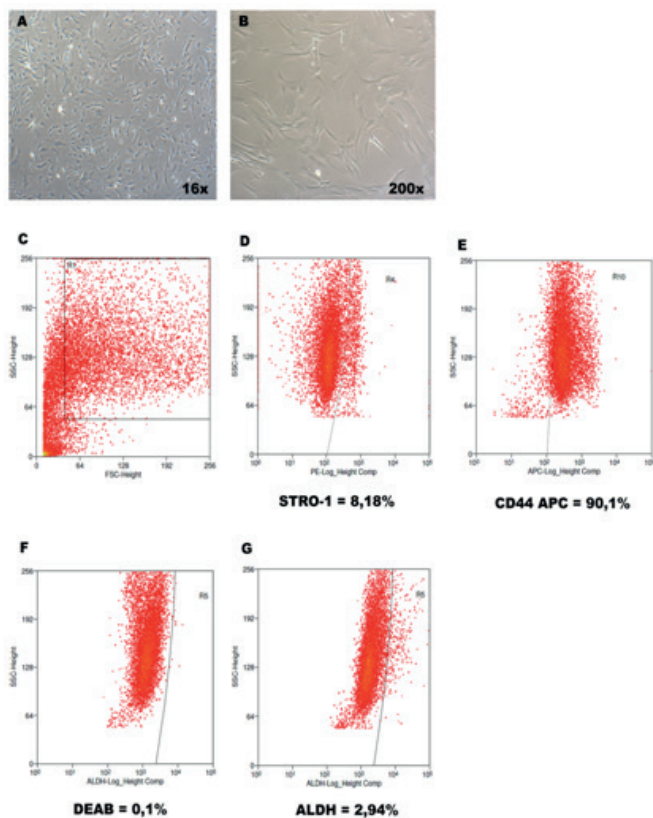


Figura 2

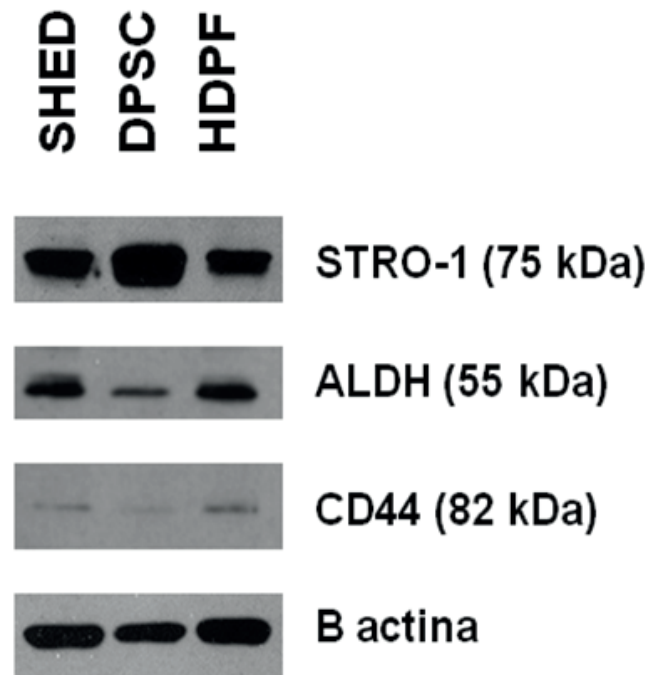


Figura 4

WESTERN BLOT

A expressão dos marcadores STRO-1, ALDH e CD44 em células-tronco isoladas da polpa de dentes decíduos e permanentes e em fibroblastos de polpa dental também foi avaliada através do *western blot*. SHEDs, DPSCs e fibroblastos apresentaram expressão positiva para o STRO-1 e ALDH, enquanto que

foi observada uma marcação bastante tênue para o CD44. Os resultados desta análise estão apresentados na Figura 4.

DISCUSSÃO

Fenotipicamente, as células-tronco mesenquimais são caracterizadas por expressarem um conjunto de marcadores de superfície celular e ausência de outros. Assim, diversos marcadores têm sido descritos e testados para definir esta população de células. Dentre estes encontra-se o STRO-1, cuja expressão por citometria de fluxo em células pulpareas humanas apresenta-se variável, apesar de ser considerado um marcador genuíno de MSCs²⁸. Na medula óssea, células STRO-1 negativas não foram capazes de formar colônias, ou seja, não contêm CFU-Fs (unidades formadoras de colônias de fibroblastos)²⁹. Células isoladas da polpa de dentes permanentes humanos com base na expressão do STRO-1 foram capazes de formar um tecido semelhante ao complexo dentino-pulpar *in vivo*, além de tecido ósseo e cartilaginoso³⁰. Entretanto, de acordo com Gronthos et al.³¹ (2003), a expressão deste marcador é gradualmente perdida durante a expansão da cultura de células. No presente estudo, a expressão do STRO-1 em SHEDs e DPSCs entre as passagens 7 e 9, apesar de relativamente baixa (9,76% e 8,18%, respectivamente), está de acordo com os resultados encontrados por outros pesquisadores em diferentes estudos, onde a população de células STRO⁺ variou de 2,14 a 12,06%^{6,32-34}. Quando SHEDs, DPSCs e HDPFs foram comparados quanto à expressão deste marcador, houve diferença significativa apenas entre as SHEDs e os fibroblastos.

Em relação ao CD44, marcador utilizado frequentemente para caracterizar células mesenquimais, SHEDs, DPSCs e HDPFs apresentaram uma elevada expressão do mesmo, não havendo diferença estatística nos valores percentuais encontrados entre as três linhagens de células. Esta proteína, presente na membrana da célula, possui diversas funções biológicas, dentre elas a adesão e migração celular, assim como foi sugerido que esta molécula exerça um papel na mineralização inicial da dentina durante o desenvolvimento dentário^{35,36}. Apesar de este marcador estar distribuído abundantemente em diversos tipos celulares, como células mesenquimais, endoteliais, hematopoiéticas e leucócitos, o CD44 tem sido utilizado para caracterizar células-tronco mesenquimais de diversas origens, assim como selecionar células-tronco tumorais junto a outros marcadores, principalmente nos tumores epiteliais e hematopoiéticos^{2,3,37-40}.

Existem muitas limitações para se purificar uma determinada população de células-tronco com base somente em marcadores de superfície. Em primeiro lugar, a expressão dos mesmos pode variar entre diferentes espécies e fontes de células-tronco, assim como também pelos diferentes métodos de isolamento e cultivo celular utilizados por diversos grupos de pesquisa^{1,41-43}. Em segundo, o fenótipo da célula poder ser alterado pela progressão do ciclo celular ou pelo cultivo das células *ex vivo*, assim como pelo transplante destas células *in vivo*. Portanto, a purificação das mesmas com base na função conservada da célula-tronco, como por exemplo, a atividade da enzima ALDH, tem sido proposta como uma alternativa promissora para o isolamento de diferentes populações de células-tronco^{41,44}.

A porcentagem de células ALDH positivas em diferentes linhagens celulares normalmente é baixa, variando de 0,96 a 3,59%^{24,26,45-48}. Apesar de não existirem referências em relação às células pulpareas, e dentre estas as células-tronco/progenitoras e fibroblastos, os valores encontrados neste estudo através da citometria de fluxo foram igualmente baixos, apesar de significativamente maiores do que os

controles negativos, onde a enzima inibidora da ALDH (DEAB) foi adicionada. Alguns autores especulam que a população de células mesenquimais indiferenciadas ou células-tronco representam menos de 1% do total de células da polpa⁴⁹, o que estaria de acordo com os níveis percentuais da atividade da ALDH encontrados em SHEDs (1,98%) e DPSCs (2,94%). Entretanto, para que atividade da enzima ALDH possa ser considerada um marcador de células-tronco mesenquimais, incluindo as isoladas da polpa de dentes decíduos e permanentes humanos, testes de diferenciação celular realizados em células ALDH positivas, selecionadas através da citometria de fluxo, devem ser realizados. No presente estudo, houve diferença significativa na quantidade de células ALDH⁺ entre DPSCs e HDPFs, mas não entre SHEDs e os fibroblastos. Apesar dos baixos valores encontrados para a atividade desta enzima em linhagens de células-tronco de polpa dental observadas neste estudo, eles estão de acordo com os valores encontrados na literatura, mesmo que nestes estudos outros tipos de células-tronco tenham sido utilizados, até porque, até o momento, nenhuma pesquisa avaliou a atividade desta enzima em SHEDs e DPSCs através da citometria de fluxo.

Em relação ao *western blot*, realizado também para avaliar a expressão do STRO-1, CD44 e ALDH em SHEDs, DPSCs e fibroblastos, bandas bem marcadas foram observadas para a ALDH e o STRO-1, indicando a expressão positiva destes marcadores nas células da polpa dental. Em relação ao CD44, uma marcação bem fraca, mas equivalente para os três tipos celulares foi observada, a despeito da alta expressão observada na análise por citometria de fluxo. Talvez o mecanismo de detecção do marcador entre os dois tipos de teste possa explicar essa diferença nos resultados. A expressão positiva do STRO-1 e da ALDH nas células-tronco da polpa reforça os resultados obtidos através da citometria de fluxo que, apesar dos valores percentuais relativamente baixos encontrados, estão de acordo com os obtidos em outros estudos. Houve uma pequena diferença na intensidade das bandas marcadas entre DPSCs e HDPFs em relação ao ALDH. Entretanto, como valores muito baixos da atividade desta enzima são normalmente encontrados, inclusive dentro de uma população de células consideradas tronco (seriam células mais primitivas, com um fenótipo ainda mais indiferenciado)¹⁶, acreditamos que esta diferença não seja relevante.

Muitas questões ainda precisam ser esclarecidas em relação à origem das MSCs e o relacionamento destas células com outras células estromais, como os fibroblastos. Além disso, o conceito de que as MSCs são realmente células-tronco tem sido estabelecido principalmente por critérios *in vitro*, como a aderência ao plástico, capacidade de autorrenovação e transdiferenciação, assim como a expressão de determinados marcadores^{50,51}. As MSCs e os fibroblastos compartilham características importantes, como o efeito supressor sobre células do sistema imune, potencial de proliferação, capacidade de diferenciação nas linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica, assim como apresentam vários marcadores de superfície em comum, além de alguns marcadores de células-tronco embrionárias^{50,52,53}. Para Haniffa et al.⁵³ (2009), as células-tronco mesenquimais seriam fibroblastos com uma nova "roupagem". Inclusive, a *International Society of Cellular Therapy* (ISCT) não é capaz de diferenciar as MSCs de fibroblastos pela atual definição de células-tronco mesenquimais. Por este motivo, propôs que células aderentes ao plástico, normalmente referidas como células-tronco mesenquimais, na qual podem estar incluídos alguns tipos de fibroblastos, deveriam ser denominadas de células mesenquimais estromais multipotentes, en-

quanto que o termo MSC deve ser reservado para uma fração destas (ou outras) células que demonstrem atividade de célula-tronco através de critérios bem estabelecidos, como a multidiferenciação *in vivo*, a habilidade de formar colônias, a capacidade de autorrenovação por longos períodos, assim como a expressão de outros marcadores de superfície^{50,54,55}. Alguns estudos sugerem a utilização de novos marcadores que possam fazer a distinção entre MSCs e fibroblastos, onde o CD106 e o CD146 estariam fortemente expressos nas MSCs e não nos fibroblastos, enquanto que o CD10 e o CD26 seriam marcadores específicos de fibroblastos^{55,56}.

Talvez estas semelhanças observadas em alguns estudos entre MSCs e fibroblastos justificariam os resultados desta pesquisa, onde valores muito próximos foram encontrados na análise por citometria de fluxo entre as células avaliadas com os marcadores utilizados. Da mesma forma, os marcadores STRO-1, CD44 e ALDH não apresentaram diferença na intensidade das bandas marcadas entre os três tipos de células no teste de *western blot*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados do presente estudo podemos inferir que as células da polpa dental (SHEDs, DPSCs e fibroblastos), expressam os marcadores STRO-1, ALDH e CD44, quando caracterizadas pela citometria de fluxo e *western blot*. Da mesma maneira, os dados encontrados nesta pesquisa indicam a possibilidade de que SHE-Ds, DPSCs e fibroblastos possam se tratar de populações celulares semelhantes.

REFERÊNCIAS

- Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26(9): 2287-99.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(25): 13625-30.
- Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119(Pt 11): 2204-13.
- Rebellatto CK, Aguiar AM, Moretão AP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med*. 2008; 233(7): 901-13.
- Nadig RR. Stem cell therapy – hype or hope? A review. *J Conserv Dent*. 2009; 12(4): 131-8.
- Bernardi L, Luisi SB, Fernandes R, Dalberto TP, Valentin L, Chies JAB, et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod*. 2011; 37(7): 973-9.
- Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 2007; 109(4): 1743-51.
- Schwab KE, Hutchinson P, Gargett CE. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum Reprod*. 2008; 23(4): 934-43.
- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(4): 696-704.
- Anjos-Afonso F, Bonnet D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*. 2007; 109(3): 1298-1306.
- Uccelli A, Moretta L, Pistola V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(9): 726-36.
- Govindasamy V, Ronald VS, Totey S, Din SB, Mustafa WM, Totey S, et al. Micromanipulation of culture niche permits long-term expansion of dental pulp stem cells—an economic and commercial angle. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010; 46(9): 764-73.
- 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.
- Yoshida A. Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics*. 1992; 2(4): 139-47.
- Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ, McDonnell DP. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(31): 11707-12.
- Moreb JS. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008; 3(4): 237-46.
- Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1990; 75(10): 1947-50.
- Lioznov MV, Freiburger P, Kröger N, Zander AR, Fehse B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35(9): 909-14.
- Gentry T, Foster S, Winstead L, Deibert E, Fiordalisi M, Balber A. Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. *Cytherapy*. 2007; 9(3): 259-74.
- Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2006; 24(4): 975-85.
- Mitchell JB, McIntosh K, Zvonick S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006; 24(2): 376-85.
- Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, Allen K, Rohatiner AZ, Lister TA, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*. 2005; 23(6): 752-60.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(5): 555-67.
- Ma S, Chan KW, Lee TK, Tang KH, Wo JY, Zheng BJ, et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res*. 2008; 6(7): 1146-53.
- Chang B, Liu G, Xue F, Rosen DG, Xiao L, Wang X, Liu J. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Mod Pathol*. 2009; 22(6): 817-23.
- Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*. 2009; 69(8): 3382-9.
- Telles PDS, Nör JE. Expressão de ALDH e CD44 em células-tronco da polpa dentária. *Braz Oral Res*. 2007; 21(Suppl.1): 223-83.
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(1): 204.
- 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.
30. Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, et al. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol*. 2010; 11:32.
 31. Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 9): 1827-35.
 32. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther*. 2010; 1(1): 5.
 33. Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, Hauschka PV. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2009; 35(6): 818-23.
 34. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(10): 5807-12.
 35. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.
 36. Chen KL, Huang YY, Lung J, Yeh YY, Yuan K. CD44 is involved in mineralization of dental pulp cells. *J Endod*. 2013; 39(3): 351-6.
 37. Da Silva Meireles L, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol*. 2003; 123(4): 702-11.
 38. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod*. 2007; 33(6): 703-8.
 39. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JJ, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res*. 2010; 70(23): 9969-78.
 40. Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(4): 254-67.
 41. Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2004; 104(6): 1648-55.
 42. Javason EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hemtol*. 2004; 32(5): 414-25.
 43. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Cell Tech Biol Med*. 2005; 1(2): 504-9.
 44. Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009; 18(1): 17-25.
 45. Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, Allen K, Rohatiner AZ, Lister TA, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*. 2005; 23(6): 752-60.
 46. Storms RW, Green PD, Safford KM, Niedzwiecki D, Cogle CR, Colvin OM, et al. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood*. 2005; 106(1): 95-102.
 47. Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, et al. Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50(23): 2243-8.
 48. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009; 7(3): 330-8.
 49. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent*. 2009; 19(1): 61-70.
 50. Alt E, Yan Y, Gehmert S, Song YH, Altman A, Gehmert S, et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell*. 2011; 103(4): 197-208.
 51. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
 52. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*. 2007; 179(3):1595-604.
 53. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009; 94(2): 258-63.
 54. Horowitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7(5): 393-5.
 55. Halfon S, Abramov N, Grinblat B, Ginis I. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(1): 53-66.
 56. Kundrotas G. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Acta Med Lit*. 2012; 19(2): 75-9.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity, as well as the expression of STRO-1 and CD44 in pulp stem cells from deciduous (SHEDs) and permanent (DPSCs) teeth, as well in pulp fibroblasts, by flow cytometry and western blot. For this purpose, cells were cultured in DMEM/HEPES, supplemented with fetal bovine serum at 10%, 100U/ml of penicillin, 100µg/mL streptomycin and stored at 37°C and 5% CO₂. To verify differences in the flow cytometry analysis between the three cell types, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used ($p \leq 0,05$), along with the Dunn multiple comparison test. In the western blot test, all the cell lineages strongly expressed ALDH, as well as STRO-1, while they presented a weak expression for CD44. There were no differences in the band intensity

between the three cell types for the proteins tested. In the flow cytometry analysis, all cells showed high percentages of CD44, with no statistical difference. For the STRO-1 marker, the values were relatively low for all the three cell types, and differences were observed just between SHEDs and HDPFs. The values observed for the ALDH activity were also lower, with statistically significant difference between DPSCs and HDPFs. The results of this study suggest that SHEDs, DPSCs and pulp fibroblasts may share some important characteristics, such as the expression of certain genetic markers. Likewise, indicate that the use of ALDH activity can be exploited in future research for identification and characterization of MSCs.

KEYWORDS: Dental pulp; Stem cells; Aldehyde dehydrogenase.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Dra. Cintia de Vasconcellos Machado
Rua Marechal Floriano, 354/701
40110-010, Salvador, Bahia, Brazil
Telefone: (71) 33360636
E-mail: cintiamachado@hotmail.com