

O COMPORTAMENTO DE CÉLULAS TRONCOS DE ORIGEM DENTAL É AFETADO PELA CRIOPRESERVAÇÃO? UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

THAÍS GIODA NORONHA¹; GUILLERMO STEVEN GRAZIOLI PITA²; ALISSA SCHMIDT SAN MARTIN³; MARCUS CRISTIAN MUNIZ CONDE⁴; FLÁVIO FERNANDO DEMARCO⁵; LUIZ ALEXANDRE CHISINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – thais.gioda.noronha@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gggrazioli@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – alissasanmartin@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – marcusconde82@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – ffdemarco@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – alexandrechisini@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação baseia-se num complexo equilíbrio estabelecido por uma taxa de congelamento e um agente crioprotetor (AC) (DISSANAYAKE, 2010; CHEN, 2011). Assim, apropriados AC devem permitir que a água saia da célula de forma suficientemente lenta para evitar danos nas membranas celulares, mas suficientemente rápido para evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula. O Dimetil sulfóxido (DMSO) - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ é um solvente polar amplamente aplicado como CA. Devido à sua natureza hidrofílica, o DMSO induz a saída de água em uma velocidade ideal capaz de reduzir o stress térmico durante a transição do estado líquido para o estado sólido (LINDERMAN, 2014).

No entanto, DMSO tem se mostrado citotóxico, uma vez que ele pode diminuir a capacidade de células-tronco mesenquimais (MSC) em se proliferar e diferenciar após o descongelamento (LINDERMAN, 2014). Deste modo, estudos têm testado substâncias alternativas, tais como glicerol, etileno glicol e açúcares, tais como sacarose e trealose, devido à sua citotoxicidade reduzida como AC (PARK, 2014). Tais ACs são amplamente utilizados em técnicas de vitrificação, que são baseadas na eliminação da transição vítrea, chamada de vitrificação. Essa fase ocorre através de um processo rápido de congelamento. Depois disso, a solução é convertida em um sólido amorfo, o qual deve estar livre de cristais de gelo. Além disso, novas instalações especializadas, tais como congeladores de campo magnético (LEE, 2010; LIN, 2015) e congeladores programados (PARK, 2014), têm sido aplicados para melhorar as propriedades biológicas de células e minimizar os efeitos tóxicos do CA.

Há uma deficiência de informação sobre o comportamento de MSC de tecidos dentais criopreservados. MSC são provenientes de tecidos com características específicas e contém uma população heterogênea de células (DOMINICI, 2006), tornando a escolha do melhor agente crioprotetor uma tarefa árdua. Um recente estudo demonstrou que os efeitos da expansão celular *in vitro* sobre a viabilidade e capacidade de diferenciação celular após 10% de DMSO é dependente do tipo celular utilizado (DAVIES, 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática da literatura, a fim de identificar a influência de diferentes protocolos de criopreservação sobre as propriedades biológicas de células-tronco dentais pós-descongelamento.

2. METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão sistemática dos protocolos de criopreservação mais utilizados, observando quais desses afetaram as propriedades biológicas (taxa de sobrevivência celular – TSC -, proliferação, diferenciação, manutenção de marcadores de células-tronco) de células isoladas a partir de tecidos dentais. Palavras-chaves específicas e entre termos foram utilizados nas bases de dados PubMed e ISI Web of Science® até abril de 2015. Dois revisores independentes leram os títulos e resumos de todos os trabalhos respeitando os critérios de inclusão e exclusão pré-determinados. Os dados foram obtidos comparando as propriedades biológicas das células-tronco de tecidos dentais (DSCs) e tecidos dentais previamente e posteriormente à criopreservação. Os critérios de elegibilidade da pesquisa foram os seguintes: a) artigos de pesquisa experimentais; b) Estudos que avaliam as propriedades biológicas de (DSCs) previamente criopreservadas ou células isoladas a partir de tecidos de dentes previamente criopreservados; c) estudos que satisfazem os critérios mínimos para a caracterização de células troncos mesenquimais (MSC) como descrito por Dominici et al. Já os critérios de exclusão foram estudos que avaliem tecidos de origem que não focem da polpa dentária, germen de dentes decíduos, papila apical e ligamento periodontal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca inicial resultou em 1773 registros, dos quais 482 permaneceram após remoção de duplicatas. Assim, 32 foram selecionados após avaliação de título e abstracts sendo feita a sua leitura completa. Depois disso, 21 artigos preencheram os critérios de inclusão/exclusão sendo realizada a extração de dados. O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi aplicado como AC em 100% dos estudos selecionados, em concentrações que variaram de 3% a 20%, sendo utilizado a 10% na maioria deles. Apenas 19% dos estudos incluídos realizaram a criopreservação em períodos superiores a um ano (KUMAR, 2015; PAPACCIO, 2006; KODONAS, 2012; MA, 2012). Além disso, o uso de DMSO [10%] na criopreservação mostrou bons resultados relacionados com a manutenção das células após o descongelamento. O que demonstra sua eficácia como AC de células e também tecidos, por períodos de até 2 anos mantendo as funções biológicas, como diferenciação e marcadores de superfície (LEE, 2012; VASCONCELOS, 2012; DOGAN, 2013)

Também foi visto que a técnica de congelamento rápido, sem pré-congelamento, a (-80°C) por até um ano foi viável mantendo as características das células e tecidos (KUMAR, 2015). O DMSO apresentou melhores características que agentes de vitrificação tais como glicerol e etileno glicol. No entanto, um crioprotector modificado (0,05 M de glucose, 0,05 M de sacarose e 1,5 m de etileno glicol) permitiu > 70% da taxa de sobrevivência de células estaminais do folículo dentário humano após 3 meses de armazenamento do tecido (PARK, 2014).

A penetração dos agentes criopreservadores no congelamento do elemento dental inteiro se mostrou mais eficaz com a realização de pequenas perfurações gerando micro-canais através da camada de esmalte. Desta forma, o AC apresentou maior contato com o tecido pulpar. Células criopreservadas através desta técnica expressaram marcadores de uma maneira semelhante às células sem criopreservação. Além disso, foi possível isolar células-tronco de tecidos

pulpaes (DPSCs) viáveis a partir de tecidos pulpaes comprometidos por até seis meses de crioconservação (CHEN, 2011).

MSCs provenientes de tecidos dentários criopreservados tem apresentado propriedades biológicas tais como TSC, capacidade de adesão, a alta taxa de proliferação e diferenciação, sendo bastante semelhantes às observadas em DSC não crioconservada. Todos os estudos incluídos testaram o DMSO, sendo que o DMSO 10% foi o CA mais aplicado, proporcionando pós-descongelamento TSC acima de 90%.

4. CONCLUSÕES

Nesta revisão sistemática observamos que DSC podem ser criopreservados principalmente com DMSO [10% - 20%] por períodos de até 2 anos mantendo a sua alta taxa de proliferação, multipotencia e marcadores de superfície. A criopreservação de todo o dente para isolar DSC futuramente parece ser um método não confiável e investigações futuras são necessárias neste campo. Por outro lado, a crioconservação do tecido pulpar intacto parece constituir uma fonte atraente e confiável para isolar DPSC. Contudo, os tempos de criopreservação avaliados nesses estudos selecionados foram curtos, apenas 19% dos estudos incluídos foram por períodos mais longos do que um ano. Assim, o comportamento de DSC no armazenamento em longo prazo pode não ser seguro. As conclusões apresentadas nesta revisão sistemática devem ser interpretadas com cautela.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DISSANAYAKE, S.C.; CHE, Z.M.; CHOI, S.H.; LEE, S.J.; KIM, J. Evaluation of vitrification for cryopreservation of teeth. **J Periodontal Implant Sci**, Korea, v.40, n.3, p.111-8, 2010.
- CHEN, Y.K.; HUANG, A.H.; CHAN, A.W.; SHIEH, T.Y.; LIN, L.M. Human dental pulp stem cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues of diseased teeth. **J Oral Pathol Med**, Taiwan, v.40, n.10, p.793-800, 2011.
- LINDEMANN, D.; WERLE, S.B.; STEFFENS, D.; GARCIA-GODOY, F.; PRANKE, P.; CASAGRANDE, L. Effects of cryopreservation on the characteristics of dental pulp stem cells of intact deciduous teeth. **Arch Oral Biol**, Brazil, v.59, n.9, p.970-6, 2014.
- PARK, B.W.; JANG, S.J.; BYUN, J.H.; KANG, Y.H.; CHOI, M.J.; PARK, W.U.; et al. Cryopreservation of human dental follicle tissue for use as a resource of autologous mesenchymal stem cells. **J Tissue Eng Regen Med**, Korea, 2014.
- LEE, S.Y.; CHIANG, P.C.; TSAI, Y.H.; TSAI, S.Y.; JENG, J.H.; KAWATA, T.; et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. **J Endod**, Taiwan, v.36, n.8, p.1336-40, 2010.
- LIN, S.L.; CHANG, W.J.; LIN, C.Y.; HSIEH, S.C.; LEE, S.Y.; FAN, K.H.; et al. Static magnetic field increases survival rate of dental pulp stem cells during DMSO-free cryopreservation. **Electromagn Biol Med**, Taiwan, v.34, n.4, p.302-8, 2015.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTHEMBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Italy, v.8, n.4, p.315-7, 2006.



- DAVIES, O.G.; SMITH, A.J.; COOPER, P.R.; SHELTON, R.M.; SCHEVEN, B.A. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. **Cryobiology**, UK, v.69, n.2, p.342-7, 2014.
- KUMAR, A.; BHATTACHARYYA, S.; RATTAN, V. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. **Cell Tissue Bank**, India, v.16, n.4, p.513-22, 2015.
- PAPACCIO, G.; GRAZIANO, A.; D'AQUINO, R.; GRAZIANO, M.F.; PIROZZI, G.; MENDITTI, D.; et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. **J Cell Physiol**, Italy, v.208, n.2, p.319-25, 2006.
- KODONAS, K.; GOGOS, C.; PAPADIMITRIOU, S.; KOUZI-KOLIANKOU, K.; TZIAFAS, D. Experimental formation of dentin-like structure in the root canal implant model using cryopreserved swine dental pulp progenitor cells. **J Endod**, Greece v.38, n.7, p.913-9, 2012.
- MA, L.; MAKINO, Y.; YAMAZA, H.; AKIYAMA, K.; HOSHINO, Y.; SONG, G.; et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. **PLoS One**, Japan, v.7, n.12, 2012.
- LEE, S.Y.; HUANG, G.W.; SHIUNG, J.N.; HUANG, Y.H.; JENG, J.H.; KUO, T.F.; et al. Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells. **Cells Tissues Organs**, Taiwan, v.196, n.1, p.23-33, 2012.
- LEE, S.Y.; SUN, C.H.; KUO, T.F.; HUANG, Y.H.; JENG, J.H.; YANG, J.C.; et al. Determination of cryoprotectant for magnetic cryopreservation of dental pulp tissue. **Tissue Eng Part C Methods**, Taiwan, v.18, n.6, p.397-407, 2012.
- VASCONCELOS, R.G.; RIBEIRO, R.A.; VASCONCELOS, M.G.; LIMA, K.C.; BARBOZA, C.A. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. **Cell Tissue Bank**, 13:461-9, 2012.
- DOGAN, A.; YALVAC, M.E.; YILMAZ, A.; RIZVANOV, A.; SAHIN, F. Effect of F68 on cryopreservation of mesenchymal stem cells derived from human tooth germ. **Appl Biochem Biotechnol**, Turkey, v.171, n.7, p.1819-31, 2013.