

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ODONTOPEDIATRIA**

**Efeito da criopreservação nas características das células-tronco
mesenquimais pulpares de dentes decíduos humanos**

DANIELE LINDEMANN

Porto Alegre, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ODONTOPEDIATRIA**

Linha de Pesquisa

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

DISSERTAÇÃO

**Efeito da criopreservação nas características das células-tronco
mesenquimais pulpares de dentes decíduos humanos**

DANIELE LINDEMANN

Orientação:

Prof. Dr. Luciano Casagrande

Co-orientação:

Profa. Dra. Patrícia Pranke

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica – Odontopediatria

Porto Alegre, 2013.

DEDICATÓRIA

À minha pequena **Luiza**, minha obra perfeita.

À minha mãe, **Tânia**, de todas as ausências, a mais doída.

Ao meu marido, **Cristiano**, meu amor.

Agradecimentos Especiais

Ao meu marido, **Cristiano**, que representa a segurança da minha vida. Muito obrigada por me deixar passar pelos momentos mais difíceis ao teu lado.

À minha filha, **Luiza**, forma mais pura de amor, luz da minha vida. Obrigada pelos teus sorrisos lindos nos dias mais duros.

Aos meus pais, **Carlos** e **Tânia**, fonte inspiradora na criação de meus valores, especialmente na coragem para perseguir os meus sonhos. Ah quanta saudade!

Às minhas irmãs, **Roberta** e **Mariane**, pela imensa paciência e incentivo. E pelas risadas intermináveis e cafés nos dias de desespero.

Ao meu cunhado, **Fernando**, por usar seu imenso talento fotográfico e me ajudar na edição das fotos.

Aos meus tios, **Alexandre**, **Adriana**, **Márcia** e **Andréa** pelo apoio e incentivo.

Aos meus avós, **Balthazar** e **Donacy**, por me ensinarem o que significa amor.

Agradecimentos Especiais

Ao professor **Dr. Luciano Casagrande**, pela autoria do projeto e pela confiança depositada em mim para a realização desse trabalho inaugural.
Obrigada!

À professora **Dra. Patrícia Pranke**, para quem na pesquisa apenas o céu é o limite. Obrigada pela grande inspiração que é trabalhar contigo no laboratório que montastes apesar de todas as dificuldades que a pesquisa enfrenta. Obrigada pelos conselhos!

Ao professor **Dr. Fernando Borba de Araujo**, que desde meus tempos de internato, inclusive durante o período que estive longe, nunca deixou de me apoiar. Muito obrigada!

À colega **Stefanie Bressan Werle**, pessoa muito especial, que chegou em meu socorro em um dos piores momentos, quando todo o trabalho tinha sido perdido por contaminação e me ajudou a recomeçar. Muito obrigada pelas noites, natais, reveillons e carnavais de laboratório... e pelas longas risadas.
Toda minha admiração!

Agradecimentos

Aos colegas de mestrado, em especial à **Joanna Pereira** e **Renata de Oliveira** pelos momentos de descontração e apoio, e aos doutorandos **Lizandra Guimarães, Fabiane Piva, Cristiane Assunção, Patrícia Blaya Luz, Gerson Acasigua, Renata Franzon** e **Letícia Bento** pelos conselhos e amizade.

À minha querida **Lisiane Bernardi**, pessoa muito especial, coração gigante, sempre disponível!

Ao professor **Dr. Marcelo Lamers** pela atenção e ajuda na avaliação morfológica.

À **Faculdade de Farmácia da UFRGS**, agradeço pelo espaço cedido no Laboratório de Hematologia e Células-tronco e pela disponibilidade da sala de cultivo e reagentes.

Aos queridos colegas de “lab”, **Dani Steffens, Dai, Thay, Ker, Anne, Simone Luisi, Natasha, Andrea, Pedro, Cristiane, Régis, Eduardo, Virgínia, Janine, Bruna, Gabriel, Martina, Daniela, Yakime, Fe Zamboni** e **Fe Klein** por me acolherem absolutamente “verde” e me ensinarem tudo que sei de laboratório de cultivo celular!

Agradecimentos

À Odontopediatria...

Aos professores, **Jorge, Márcia, Ângelo, Viviane e Luciana**, obrigada pelos ensinamentos.

Aos queridos professores **Adriela Mariath e Jonas Rodrigues**, minha enorme admiração. Obrigada pelas risadas e momentos descontraídos tão importantes quanto os momentos de estudo!

Aos amados colegas do curso de **especialização 2011-2013, Luciano, Paula, Laura, Gabi, Marcele, Karina, Grasi, Veri, Cláudia e Isa** sempre dispostos a ajudar, pelos lanches divertidos e amizade. Em especial, à **Ju Brustolin e Claudinha Azevedo** que participaram ativamente na coleta de dentes. Muito obrigada!

À funcionária **Julcelaine**, por nossas conversas divertidas e pela imensa força nos dias de correria!

E a todos que de alguma forma contribuíram na realização desse trabalho, meu muito obrigada!

Sumário

Lista de abreviaturas	9
Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução	12
1.1. Células-tronco mesenquimais	12
1.1.1. Células-tronco mesenquimais de tecidos dentários	13
1.1.2. Células-tronco mesenquimais da polpa de dentes deciduous	13
1.2. Criopreservação	14
1.2.1. Criopreservação e tecidos humanos inteiros	15
2. Objetivos	17
3. Artigo	18
4. Considerações Finais	36
Referências Bibliográficas	38
Anexo	42

Lista de Abreviaturas

%	por cento
μ g/mL	micrograma por mililitro
μ g/ μ mol	micrograma por micromole
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
<	Menor
>	Maior
\geq	maior ou igual
\leq	menor ou igual
CTM	Célula-tronco Mesenquimal
DPSC	Dental Pulp Stem Cell – célula-tronco de polpa dental
MSC	Mesenchymal Stem Cell
SHED	Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth - célula-tronco de polpa de dente decíduo humano exfoliado
IDPSC	Immature Dental Pulp Stem cell – célula-tronco imatura de polpa de dente decíduo
DTSC	Deciduous Teeth Stem Cell – célula-tronco de dente decíduo
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium – meio de Eagle modificado por Dulbecco
HEPES	n-2 hidroxietil piperazine- n'2 ácido sulfônico etano
FBS	Fetal Bovine Serum – soro fetal bovino
SFB	Soro Fetal Bovino
CD	Clusters of Differentiation – aglomerado de diferenciação
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
PE	Ficoeritrina
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen major histocompatibility complex class II cell surface receptor
STRO-1	Stromal cell marker 1
WST8	Water-Soluble Tetrazolium monosodium salt cell counting Kit 8
DMSO	Dimethylsulfoxide – solução crioprotetora
IgG	Imunoglobulina G
7AAD	7- amino Actinomicina D
TGF β 1	Fator de crescimento transformador beta 1
PBS	Phosphate Buffered Saline – tampão fosfato-salino
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole – fluorescência
n	número de amostra
mL	Mililitro
mg/mL	miligrama por mililitro
U/mL	unidade por mililitro
CO ₂	gás carbônico
ng/mL	nanograma por mililitro
\pm	mais ou menos

Resumo

As células-tronco mesenquimais (CTMs) tornaram-se um grande interesse para a ciência por serem capazes de estimular a regeneração tecidual, apresentarem habilidade de se expandir e diferenciar em cultura e, conseqüentemente, apresentarem diversas possibilidades terapêuticas, bem como para a engenharia de tecidos. Muitos dos tecidos dentários também apresentam nichos de CTMs. O fácil acesso à polpa dos dentes decíduos, em virtude da esfoliação dental, a torna uma fonte muito atraente para a terapêutica e a engenharia de tecidos. Todos os avanços advindos das terapias baseadas em células-tronco tornam a preservação das fontes celulares, por longos períodos de tempo, um assunto de suma importância. Para que isso possa ocorrer, métodos de armazenamento devem ser adotados, tanto para as culturas celulares já estabelecidas, quanto para os tecidos inteiros. Uma das formas mais comuns de manutenção de culturas e de tecidos é a criopreservação em nitrogênio líquido. Contudo, existem poucas evidências no sentido de estabelecer um protocolo eficaz para o congelamento do dente decíduo intacto. Dessa forma, esse trabalho objetivou isolar, cultivar e caracterizar, para parâmetros apresentados para CTMs, as células pulpares após a criopreservação de dentes decíduos intactos por 7 dias. Para isso, vinte e seis dentes decíduos foram alocados em 2 grupos experimentais, sendo: grupo 1, células pulpares de dentes decíduos criopreservados intactos (grupo Crio) e grupo 2, células pulpares de dentes decíduos isoladas imediatamente após a exodontia (grupo fresco - controle). As células pulpares de ambos os grupos foram isoladas, cultivadas, analisadas por citometria de fluxo (CD14, CD29, CD34, CD45, CD73, CD90 e HLA-DR), submetidas aos protocolos de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, e aos ensaios de proliferação celular (WST-8). A morfologia celular de ambos os grupos foi avaliada por microscopia confocal. Os resultados demonstraram uma taxa de cultivo de 30% para o grupo Crio e 61% para o grupo Fresco. Não houve diferença estatística entre os grupos para os marcadores de superfície analisados. As células de ambos os grupos foram capazes de se diferenciar em células das 3 linhagens testadas. Para o ensaio de proliferação, não houve diferença estatística entre os grupos ao longo dos tempos testados ($p > 0,05$), embora a média de dias entre o isolamento e a quinta passagem foi menor para o grupo controle ($p = 0,035$). As células do grupo Crio mostraram morfologia alterada. Assim, conclui-se ser possível obter células-tronco da polpa de dentes decíduos congelados pelo protocolo sugerido, sem alterações imunofenotípicas. No entanto, esse protocolo demonstrou baixas taxas de sucesso de isolamento, menor capacidade de diferenciação e de proliferação, além de alteração da morfologia celular.

Palavras-chave: células-tronco, polpa dentária, dente decíduo, criopreservação

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) became of great value for science for being capable of stimulating tissue regeneration and showing ability to proliferate and differentiate when cultured properly. Dental tissues also present MSC niches as well. Mesenchymal stem cells from the pulp of deciduous teeth are considered an easy access source during a specific period of time in the patients life, when teeth are undergoing exfoliation; therefore, very attractive for cell based therapeutics and tissue engineering. All advances seen in cell based therapies for the last years depend on cell or tissue preservation for long periods of time. Thus, storage methods must be adopted for cultures of cells and whole tissues. The most common technique to preserve cell cultures and tissues is cryopreservation with liquid nitrogen. However, fragile evidence concerns the cryopreservation of intact deciduous teeth. This research aimed to isolate, cultivate and characterize the dental pulp cells of intact cryopreserved deciduous teeth and compare to the dental pulp cells of non-cryopreserved deciduous teeth. Thirteen pairs of deciduous teeth were donated from patients in orthodontic treatment and were randomly allocated in two different groups. The first group was made of cryopreserved intact deciduous teeth (Cryo group), and in second group pulp cells were isolated from fresh teeth (Fresh group). The cells of both groups were isolated, cultivated and characterized for mesenchymal stem cell parameters, and then compared for isolation and proliferation rates, surface markers expression (CD14, CD29, CD34, CD45, CD73, CD90 and HLA-DR), differentiation ability and morphology. The culture rate was 30% for the cryopreserved group and 61% for the fresh. There were no statistical differences between the groups for the surface markers tested. Cells in both groups were capable of differentiating in the 3 mesenchymal lineages. For the proliferation assay, there was no statistical difference between groups throughout the time tested although the mean time between isolation and the fifth passage was lower for the control group ($p=0,035$). Cells from Cryo group showed altered morphology. The present study showed that Dental Pulp Stem Cells can be obtained from cryopreserved intact deciduous teeth without changes in the immunophenotypical profile, however low success rates for isolation, differentiation ability and morphological alterations were observed.

Keywords: stem cells, deciduous teeth, dental pulp, cryopreservation

1. INTRODUÇÃO

Quanto à origem, as células-tronco podem ser classificadas como embrionárias e adultas. O uso da primeira ainda é polêmico, visto que envolve questões éticas e religiosas. O trabalho com células-tronco adultas, especialmente as de origem mesenquimal, amenizou essa dificuldade para determinados ensaios clínicos e uso em pesquisa. Até algum tempo atrás, as células-tronco mesenquimais (CTMs) usadas como referência eram isoladas da medula óssea (GIORDANO *et al.*, 2011). Sua obtenção, porém, é associada à dor e morbidade para o paciente, um dos motivos pelo qual se buscou células-tronco em outros órgãos e tecidos. A busca e identificação de CTMs em praticamente todos os tecidos do corpo humano (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006), tornou-se importante para que esses aspectos negativos sejam contornados. As CTMs já provaram ser capazes de estimular a regeneração tecidual, expandir em cultura e conseqüentemente, apresentar diversas possibilidades de terapêutica e para a engenharia de tecidos.

1.1. Células- tronco mesenquimais

Durante muito tempo não existia consenso na literatura para a caracterização das células-tronco mesenquimal. A ampla variação de fontes de células, sua preparação e cultivo, provoca grandes questionamentos nos pesquisadores no momento de comparar os resultados, especialmente quando a terapia celular estava envolvida. Atualmente, para que as células isoladas e cultivadas de qualquer tecido humano sejam consideradas CTMs, algumas características durante o cultivo *in vitro* devem ser observadas. Segundo Dominici e colaboradores (2006), representando a posição da Sociedade Internacional para Terapia Celular, a CTM humana deve apresentar 3 características básicas: manter-se aderente ao plástico dos dispositivos de cultura em condições normais de cultivo; expressar marcadores de superfície específicos mesenquimais (CD73, CD90 e CD105,) e não expressar outros como CD14, CD34, CD45, e HLA-DR (marcadores para progenitores hematopoéticos) e apresentar a capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica quando cultivada em condições específicas *in vitro*.

1.1.1. Células-tronco mesenquimais de tecidos dentários

Muitos dos tecidos dentários também apresentam nichos de CTMs. Gronthos e colaboradores (2000) demonstraram ser possível isolar CTMs da polpa dos dentes permanentes, nesse caso, terceiros molares. Desde então, muitos outros trabalhos também usaram dentes terceiros molares (GRONTHOS *et al.*, 2002; HOSSEINI *et al.*, 2010) e seus tecidos adjacentes para o isolamento e caracterização de CTMs, como por exemplo do ligamento periodontal (SEO *et al.*, 2004, JO *et al.*, 2007), folículo dentário (MORSCZECK *et al.*, 2005; MORSCZECK *et al.*, 2009; JO *et al.*, 2007), papila apical (SONOYAMA *et al.*, 2008) e inclusive de polpa de dente supranumerário (HUANG *et al.*, 2008).

1.1.2. Células-tronco mesenquimais da polpa de dentes decíduos

Há dez anos, uma nova fonte de células-tronco foi descoberta na polpa de dentes decíduos (MIURA *et al.*, 2003). O fácil acesso a essa fonte durante o período de esfoliação dental, torna-a muito atraente tanto para a pesquisa, quanto para a terapêutica e engenharia tecidual. Os estudos nessa área mostram que as CT de dentes decíduos apresentam grande capacidade de proliferação e expansão em cultura (MIURA *et al.*, 2003; KERKIS *et al.*, 2006; HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009; KERKIS; CAPLAN, 2012). Ainda, as CT de dentes decíduos mostraram habilidade de se diferenciarem em uma maior variedade de tipos celulares (NAKAMURA *et al.*, 2009; KOYAMA *et al.*, 2009; GOVINDASAMY *et al.*, 2010; HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009; WANG *et al.*, 2012), quando comparadas às CT de dentes permanentes.

Artigos publicados recentemente indicam que o fato das células-tronco de dentes decíduos apresentarem origem em crista neural confere, além de uma marcação positiva para marcadores neurogênicos como β III tubulina, habilidade das células em diferenciarem -se em linhagens neurais. Segundo Baghaban Eslaminejad e colaboradores (2010), embora as CT de dentes permanentes não tenham exibido marcadores neurais como β III tubulina e Tau, esses epítomos apareceram em mais de 90% nas células das culturas de dentes decíduos. No estudo de Zhang e colaboradores (2006), após o uso de meio indutor para diferenciação neurogênica, as células de dentes decíduos apresentaram diferenças morfológicas expressivas quando comparadas aos controles, formando prolongamentos extensos com braços secundários, características típicas de neurônios. A tendência à diferenciação neurogênica,

além da osteo/odontogênica, adipogênica e condrogênica, já bem consagrada na literatura (ZHENG *et al.*, 2009; KERKIS; CAPLAN, 2012; JO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012), confere aos dentes decíduos uma característica particular. Se a capacidade de diferenciação neurogênica for confirmada por mais estudos que envolvam, por exemplo, testes eletrofisiológicos, as células de dentes decíduos podem representar uma grande perspectiva no tratamento das doenças degenerativas do sistema nervoso, tais como Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer, por exemplo (BYDŁOWSKI *et al.*, 2009).

1.2. Criopreservação

A água é o componente principal do organismo humano e as células não vivem em sua ausência. De fato, todo o metabolismo celular é interrompido a medida que a água, em sua forma líquida, se converte em gelo. Quando se estuda a criopreservação de células humanas é importante perceber que a formação de cristais de gelo determina a remoção da água do citoplasma, levando a um desequilíbrio osmótico e à desidratação (JANZ, 2010). Para prevenir a formação de gelo intracelular no momento do congelamento e reduzir o estresse osmótico pela reposição da água durante o descongelamento, crioprotetores devem ser adicionados ao meio de cultura durante esses processos (JANZ, 2010; MORRIS; ACTON, 2012).

Ainda precisa ser esclarecido o mecanismo pelo qual o crioprotetor penetra através de um tecido duro, como a dentina e o esmalte, para alcançar as células pulpares. Artigos na literatura mostram que as células-tronco sobrevivem às baixas temperaturas da criopreservação, desde que dispersas em crioprotetores (PAPACCIO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2006; SEO *et al.*, 2005). Por exemplo, as células isoladas de tecidos periodontais que foram cultivadas com sucesso após 6 meses de criopreservação (SEO *et al.*, 2005). Todavia, pouco se sabe sobre os métodos e alternativas para a estabilização das células da polpa dentária durante o processo de criopreservação dos dentes decíduos intactos, medida necessária para que essas possam ser congeladas e descongeladas apenas quando necessário para terapêutica ou pesquisa e objetivo principal dos bancos de dentes. A maior parte do conhecimento gerado até o momento diz respeito ao uso das células isoladas e cultivadas imediatamente após a extração dentária (GRONTHOS *et al.*, 2000; HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009; TZIAFAS; KODONA, 2010; BERNARDI *et al.*, 2011) especialmente em pesquisa. A possibilidade de se isolar e cultivar as células pulpares alguns dias, ou até mesmo

meses após a exodontia, significa um grande avanço para a ciência.

1.2.1. Criopreservação e tecidos humanos inteiros

Todos os avanços advindos das terapias baseadas em células-tronco e da engenharia tecidual, tornam a preservação das fontes de células um assunto de suma importância. Células só devem ser cultivadas quando necessário, considerando-se o grande custo financeiro e de tempo que o seu isolamento e cultivo demanda. Ainda, o cultivo de linhagens celulares indefinidamente aumenta o risco de contaminação das culturas, diferenciação espontânea (KERKIS; CAPLAN, 2012) e de aparecimento de anormalidades cromossômicas (LIZIER *et al.*, 2012). Para a aplicação terapêutica, as amostras precisam ser mantidas congeladas por longos períodos de tempo, o que requer a manutenção da viabilidade e proliferação celular das linhagens. Para que isso possa ocorrer, métodos de armazenamento devem ser adotados, tanto para as culturas celulares já estabelecidas, quanto para os tecidos inteiros. Uma das formas mais comuns de manutenção de culturas e de tecidos na engenharia tecidual é a criopreservação em nitrogênio líquido (SEDGLEY; BOTERO, 2012). Há anos células hematopóéticas criopreservadas são utilizadas em tratamentos de doenças graves, especialmente em leucemias. Esses relatos mostram que as células do sangue do cordão umbilical permanecem congeladas e viáveis por 15 anos (BROXMEYER *et al.*, 2003).

Alguns estudos mostram a obtenção de células-tronco de tecidos humanos congelados em seu estado sólido e o efeito que a criopreservação exerce sobre as características imunofenóticas, proliferativas e de diferenciação das células-tronco dos tecidos dentários. Seo e colaboradores (2004) isolaram e caracterizaram as células-tronco de ligamento periodontal humano congelado e essas mostraram-se capazes de se diferenciar em cemento e ligamento, com uma taxa de sucesso de cultivo de 40%. Ding e colaboradores (2010) mostraram que a criopreservação não afetou as propriedades morfológicas e fenotípicas das células-tronco da papila apical de terceiros molares humanos, quando congeladas por 6 meses. Essas células ainda mantiveram seu potencial de diferenciação adipogênica e odontogênica. Perry e colaboradores (2008) estudaram dois grupos de células obtidas a partir de dentes permanentes: células de dente fresco congeladas após o estabelecimento da cultura e células cultivadas após a criopreservação do dente intacto. Os autores relataram que todas as linhagens celulares congeladas permaneceram viáveis. Por outro lado, 7 de 10 dentes permanentes congelados intactos iniciaram cultura. Contudo, um ano após, o mesmo grupo (WOODS *et al.*, 2009) publicou os seguintes resultados com relação às novas amostras

descongeladas: de 10 dentes intactos descongelados cujas células foram cultivadas por 28 dias, 3 não apresentaram nenhuma célula aderida no fundo da placa de cultivo; 5 apresentaram células aderidas, mas demonstraram um crescimento limitado e, mesmo depois dos 28 dias de cultivo, não estabeleceram culturas proliferativas e 2 apresentaram células que aderiram imediatamente ao frasco e cresceram com as taxas de proliferação características das culturas frescas atingindo confluência em 15 dias. Ou seja, uma taxa de cultivo para dentes congelados intactos de 20%. Esses autores, por fim, concluíram que a criopreservação de dentes permanentes intactos, para fins de posterior isolamento de células-tronco, não é uma técnica confiável e reproduzível. Ainda, para uma segunda amostra constituída de tecido pulpar digerido e não cultivado, os mesmos autores concluíram que, ainda que tenham sido estabelecidas culturas, as células não proliferaram na mesma taxa que as células das culturas de dentes frescos e que no mínimo o dobro do tempo foi necessário para que se obtivesse o mesmo número de células.

Ao contrário dos dados encontrados por Woods e colaboradores, e ainda que com o uso de protocolos diferentes de congelamento, em 2010 Lee e colaboradores obtiveram uma taxa de sucesso de 73% no estabelecimento de cultura de células-tronco pulpares de dentes permanentes congelados intactos.

Apenas em 2012, o primeiro estudo sobre o efeito da criopreservação sobre as células pulpares de dentes decíduos foi publicado (MA *et al.*, 2012). Para esses autores, a criopreservação do tecido pulpar de dentes decíduos humanos esfoliados não afetou as características biológicas, imunológicas e terapêuticas dessas células.

Todavia, até o momento, ainda não existe informação sobre o efeito da criopreservação dos dentes decíduos congelados intactos sobre as características imunofenóticas, proliferativas e de diferenciação das células pulpares.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Isolar e cultivar células provenientes da polpa de dentes decíduos hígidos humanos criopreservados intactos e caracterizá-las para parâmetros apresentados por células-tronco mesenquimais.

Objetivos Específicos

- Estabelecer uma metodologia de congelamento e descongelamento, isolamento e cultivo de células pulpares de dentes decíduos humanos criopreservados intactos;
- Avaliar, *in vitro*, a capacidade de proliferação celular das células provenientes da polpa de dentes decíduos humanos criopreservados intactos;
- Analisar, *in vitro*, a capacidade de diferenciação celular em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas dessas células;
- Avaliar a expressão de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais nas células pulpares provenientes de dentes decíduos criopreservados intactos;
- Analisar características morfológicas apresentadas pelas células pulpares provenientes de dentes decíduos criopreservados intactos;
- Comparar os parâmetros obtidos pelas células pulpares de dentes decíduos criopreservados intactos com células pulpares de dentes decíduos não criopreservados.

3. ARTIGO

-A ser submetido ao periódico internacional “*Journal of Endodontics*”-
Qualis A1

Effects of cryopreservation on the characteristics of dental pulp stem cells of deciduous teeth

Abstract

The aim of this study was to isolate and cultivate cells from cryopreserved intact sound deciduous human teeth and evaluate the effect of cryopreservation on the parameters of dental pulp stem cells. **Method:** Twenty six deciduous teeth were collected and allocated in two groups: immediate pulp isolation and culture (Fresh group) and cryopreservation (Cryo group). The teeth were cryopreserved using dimethyl-sulfoxide and fetal bovine serum medium (1:9) for seven days and recovered in culture medium with 20% FBS for two weeks. Success rate of isolation, growth curves, morphology, stem cell-specific markers (CD14, CD29, CD34, CD45, CD73, CD90 and HLA-DR) and differentiation capacity were evaluated and compared. **Results:** Isolation success rate was 30% for the cryopreserved group and 61% for the fresh group. There were no statistical differences between the groups for the tested surface markers. Cells in both groups were capable of differentiating in three mesenchymal lineages. There was no statistical difference in proliferative potential between the groups throughout the testing time but the mean time between isolation and the fifth passage was shorter in the fresh group ($p=0,035$). The morphology of the cells was considered altered in the cryopreserved group. **Conclusion:** Dental pulp stem cells were obtained from cryopreserved intact deciduous teeth using the tested protocol without changes in the immunophenotypical characteristics; however, low success rates for isolation, differentiation ability and morphological alterations were observed.

Keywords: stem cells, deciduous teeth, dental pulp, cryopreservation

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been identified and isolated from almost every postnatal tissue in the human organism (1). Since the first time MSCs were isolated from dental pulp (DPSCs) (2), a number of studies have proved them to be reliable as a postnatal source for research in regenerative medicine because they exhibit abilities of proliferation and differentiation into a variety of other cell types (3-10). Stem cells from deciduous dental pulp (DTSCs) were also isolated, cultivated and characterized as MSCs and show greater capability to proliferate and differentiate when compared to DPSCs (3-7). A great number of technical and cost/benefit issues become relevant when the culture of DPSCs is considered. For instance, to cultivate cell lineages indefinitely is as expensive and time consuming, as risky for contaminations and spontaneous differentiation (10). However, most of the knowledge generated so far concerns the use of cells isolated and cultivated immediately after tooth extraction. Considering that the process for storing human tissue is unlikely to happen immediately after tooth extraction, research and therapeutic procedures require cell/tissue storage (11).

In the literature, it has been shown that stem cells normally survive in low temperatures as long as they are dispersed in cryoprotectants (12-15). Some researchers have studied cells which have been isolated and cultivated from dental pulp of permanent teeth after cryopreservation (12, 16, 17). Yet, cells isolated from primary human pulp tissue have been successfully cultivated after the cryopreservation of the intact pulp for two years (18). Nevertheless, little is known about methods and alternatives for stabilization of the dental pulp cells during cryopreservation of the intact deciduous tooth for future clinical applications.

The aim of this study was to cryopreserve intact sound deciduous human teeth, isolate and cultivate cells from the pulp after thawing, evaluate them for mesenchymal stem cells parameters and compare them with stem cells which have been isolated, cultivated and characterized from the pulp of non-cryopreserved intact sound deciduous.

Materials and method

Ethics statement

Procedures with human patients were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) Ethics Committee (Protocol n. 20865). Prior to the extractions, parents filled out a questionnaire regarding general health information on the patients and were fully informed about the clinical procedures. Parents or legal guardians also signed a term of consent and donation of biological tissues (deciduous teeth), approved by the UFRGS Ethics Committee. A graduate student, not related to this research, planned the extractions as part of an orthodontic treatment programmed for each patient.

Human subjects

Thirteen patients, aged 7 to 13, with two paired healthy primary teeth in process of root resorption were selected for this study. All the teeth extractions were made under local anesthesia. Samples were collected according to the following criteria: a) patient: no systemic illnesses, no use of chronic medications, presence of two sound deciduous teeth in the process of resorption and indicated for extraction; and b) teeth: deciduous teeth with no carious lesions or restorations, no sectioning during extraction, absence of ankylosis verified through clinical and radiographic examinations, no reported trauma, no clinical or radiographic signs of pulpal disease, presence of at least 1/3 of physiologic root resorption (8).

Cryopreservation of Intact Deciduous Human Teeth and Pulp Cell Isolation and Culture

Within 6 hours after the extraction, the teeth were taken to the laboratory in a 4°C 15mL falcon tube with 2 mL of culture medium DMEM/HEPES (Dulbecco's modified Eagle medium – Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) supplemented by 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), 100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin and 0.45mg/mL gentamicin (Gibco, Grand Island, NY). In a laminar flow hood under sterile conditions, the teeth were removed from the flask, crown facing down and placed in gauze moistened in 0.12% chlorhexidine solution for disinfection. The teeth were randomly allocated into two groups: control (fresh – isolated immediately) and test (cryo - cryopreserved for 7 days). The protocols for cryopreservation and thawing used in this study were adapted from Woods and colleagues (2009) (17). A previous pilot study was carried out to establish the parameters (data not shown).

Intact teeth selected for the cryopreserved group were dropped into 2mL vials containing 1.5 mL dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) and FBS in a concentration of 1:9. The vials were placed into a 4°C refrigerator for 1 hour for the cryoprotectant to penetrate into the soft tissue through the resorbed area. After this first period of cooling, the vials were subjected to a dump-freeze method consisting of the suspension of vials into an isopropanol bath (Mr. Frosty –Nalgene™ Cryo 1⁰C Freezing Container) with a -1°C /min cooling rate in a -80°C mechanical freezer (VIP™ Series Ultra-Low Temperature Freezer, Sanyo Scientific, Bensenville, IL) for 24 hours. The following day, the vials were transferred to a -196°C liquid nitrogen tank, where they remained for seven days. After the freezing period, the vials were recovered from the liquid nitrogen and plunged for less than 1 minute in a 37°C water bath. The partially frozen teeth were removed from the tube and washed with cold culture medium supplemented with 20% FBS (DMEM/HEPES, 20% FBS, 2% antibiotics - 200U/mL penicillin, 200mg/mL streptomycin and 0.90mg/mL gentamicin) until the pulp tissue showed elasticity on probing.

The pulp tissue was separated from the mineralized portion of the teeth, placed in a 0.2% type I collagenase solution (Gibco, Grand Island, NY) for 60 minutes in a 37°C bath and centrifuged (4°C, 800G/10 min.). The supernatant was discarded and the remaining pellet was re-suspended and seeded onto a 12 well plate with culture medium supplemented with 20% FBS. The first medium change occurred after 2 days and every 3 to 4 days after that. During the first two weeks, the culture medium used was supplemented by 20% FBS, 200U/mL penicillin, 200mg/mL streptomycin and 0.90mg/mL gentamicin and then replaced by a culture medium supplemented by 10% FBS. The passages were performed when the cultures reached 90% confluence using a 0.5% trypsin- EDTA (Sigma –Aldrich, St Louis, MO) solution. In each passage the cells were stained with trypan blue, counted in hemacytometer and the number of cells was registered. Cell suspensions were seeded onto new plates, respecting the proportion of 5,000cells/cm². All the tests were carried out with the cells in the fifth passage (P5). During this whole period, the cells were incubated in a 37°C, 5% CO₂ environment. Teeth for fresh group went through the same isolation and cultivation protocols as the teeth from the cryopreserved group.

Flow cytometric analysis for dental pulp stem cells

For the cytometry analysis, a total of 10⁵ cells were incubated with the following types of conjugated antibodies for cells in the fresh group (n= 5) and cryopreserved (n=3):

CD14/FITC, CD29/PE, CD34/PE, CD45/FITC, CD73/PE, CD90/FITC and HLA-DR/FITC, according to the International Society of Cellular therapy (Dominici, 2006). Unstained cells and mice IgG isotype controls conjugated with PE and FITC were used as controls. Only living cells were analyzed in all the samples by excluding dead cells that were positive for 7AAD (7-Amino Actinomicina D - Invitrogen). Two cell surface markers were evaluated simultaneously using the monoclonal antibodies against antigens, as described previously. Data was acquired using the FACS – Aria flow cytometer (BD Bioscience) and 10,000 events were analyzed using FACSDiva 6.1.3 version software (BD Bioscience).

Proliferation assay

A water-soluble tetrazolium monosodium salt cell counting kit 8 (WST-8, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was used for colorimetric cell viability and proliferation assays. A total of 2.5×10^3 cells/well of each cryopreserved (n=3) and fresh samples (n=5) were seeded onto 3 wells of a 24 well plate and incubated with 1mL culture medium. Tests were performed according to the manufacturer’ s instructions. The cells were incubated for 6 hours and the culture medium was replaced by 190 μ L of culture medium to which 10 μ L of WST-8 reagent solution was added. It was then incubated again for another 2 hours (day 0). After the incubation period, the 200 μ L was transferred to a 96 well plate in order to read the level of absorbance with a wavelength of 450nm/690nm. The same analysis was performed on day 1, 3, 5 and 7 after seeding (Figure 1). Three wells filled with culture medium added with WST-8 without cells were used as the internal control.

Proliferation was also evaluated using the mean time between the isolation and the fifth passage for samples of both groups.

In vitro multipotent assay

To confirm the multi-lineage differentiation ability of the cells, 10^4 cells were seeded onto 12 well plates and were cultivated in culture medium until confluence reached 70%. The medium was then replaced by a differentiation-inducing medium and the cells were maintained in these conditions for 28 days (n=8). For each experiment, a negative control consisting of the same cells cultured in a conventional culture medium was used.

For the osteogenic differentiation, the medium used was DMEM/HEPES supplemented with 10% FBS; 0.1% dexamethasone, 10^{-5} mol/L; 10% b- glycerophosphate, 10nmol/L and

ascorbic acid 2-phosphate, 5mg/mL. For the chondrogenic differentiation medium, DMEM/HEPES was supplemented with 6.25mg/mL bovine insulin (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), 50nmol/L ascorbic acid 2-phosphate and 10ng/mL transforming growth factor – beta 1 (TGF-b1) (Millipore, Tokyo, Japan). The adipogenic induction medium consisted of Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% FBS, 1 μ L/mL bovine insulin, 5 μ M/L rosiglitazone, 10^{-7} M/L dexamethasone, 5 μ M/L indomethacin and 1mL/10mL.

After the period of induction, the cells were washed with deionized water and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 minutes (chondrogenic and osteogenic) to 1 hour (adipogenic). Alizarin red was used to stain calcium depositions in osteogenic differentiation. Oil-Red-O was used to stain lipid vacuoles in adipogenic differentiation and Alcian blue to stain extracellular matrix in chondrogenic differentiation.

Morphology under confocal microscopy

The morphology of the cells from the fresh (n=1) and cryopreserved (n=2) groups was observed by confocal microscopy. The cells were plated at a density of 10^4 cells per well in plates of 6 wells. After 14 days of incubation, the MSCs were washed with PBS 1x, fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes and permeabilized with Triton X-100 0.1% for 10 minutes. They were then stained with 50 μ g/mL rhodamine conjugated phalloidin for 40 minutes in order to show the actin cytoskeleton of the cell. Following phalloidin staining, the samples were washed with PBS 1x and stained with 0.5 μ g/ml of DAPI for 1 minute. Photographs representing the different samples were obtained at 10x magnification using a SV1000 Olympus confocal microscope. From these images, 3x digital zoom were obtained for better observation of the cells (Figure 3).

Statistical Analysis

For the flow cytometry analysis, the means for each surface marker were submitted to Two way ANOVA for the comparison between the groups.

For the WST-8 assay, the data was submitted to statistical analysis using Repeated-measure ANOVA followed by Mann-Whitney's test for the comparison between the groups and Wilcoxon's test for the comparison within the groups. When comparing the mean time between isolation and the fifth passage Student's t test was used.

The significance determination level adopted was 5% and the statistical analysis was conducted using the Statistical Package for Social Sciences version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2011).

Results

Sample and Establishment of cultures

The full description of the sample is presented in Table 1. In this study, a cell culture was considered a successful outcome when adherent isolated or grouped cells were seen at the base of the well, within 30 days after isolation and reached confluence for the passage. Therefore, the isolation of the cells was considered successful in 4 of the 13 cultures (30%) of the cryo group. One culture was contaminated by fungus after the first passage (missing data), the other 3 were used in a series of experiments. In this group, the average time from day one to the first passage was 33.5 ± 7.9 days. For the control group, 8 out of 13 cultures (61%) were considered successful and the average time for the first passage was 27.1 ± 15.9 days. Despite the presence of cells, one culture never reached 90% confluence during P2 and was discarded.

Flow cytometry

Cells from samples of both groups were evaluated by flow cytometry (fresh $n=5$; cryo, $n=3$). More than 94% of the cells in each culture for both tested groups were positive for CD29, CD73 and CD90 and more than 99 % were negative for hematopoietic and endothelial markers, such as CD14, CD34, CD45 and HLA-DR. (Figure 1). No statistical difference ($p > 0.05$) was observed between the groups for the tested surface markers.

Proliferation Assay

No statistical difference was found for the WST-8 proliferation assay between the groups tested in the 7 day testing period, even when the samples were paired ($n=2$). When the analysis was made within the group, the averages for day 5 and 7 were significantly higher when compared to day 1 ($p < 0.001$) but no difference was seen when compared to day 0 and 3 ($p > 0.05$) for the cryo group. For the fresh group, significant difference was observed when the averages were compared from day 5 and 7 to day 3, 1 and 0 ($p < 0.05$). When the average time between isolation and fifth passage was calculated and analyzed for both groups, the mean for fresh group ($n=5$) was 49.3 ± 16.5 days and cryo group ($n=3$) was 87.6 ± 21.2 days, showing significant statistical difference ($p=0.035$).

In the fifth passage the average number of cells was 7.335.910 cells/culture for the fresh group and 1.506.717 cells/ culture for the cryo group.

In vitro multipotent assay

Dental pulp stem cell cultures from the cryopreserved group grown in the presence of an osteo-inductive medium for twenty-eight days, showed the ability to form Alizarin red positive condensed nodules of calcium. These deposits were sparsely scattered over the cells as shown in figure 2. Cultures from the fresh group, which were also positive for Alizarin red, produced wide sheets of calcified deposits over the whole adherent layer in 21 days of induction (Figure 2).

The potential to differentiate into adipocytes was also seen in the cell cultures of both groups submitted to the inductive medium, although for the cryopreserved group, the oil red positive lipid clusters were very tiny and sparsely grouped after 28 days. The fresh group showed better results regarding the number and size of the oil red positive lipid clusters in 21 days.

For chondrogenic differentiation, twenty eight days were necessary for the cells of both groups to show positive results, such as the formation of an Alcian blue stained extracellular matrix. Negative control consisting of the same cell cultures in a conventional culture medium was used for all tested well, and none of them showed differentiation (Figure 2).

Morphology under confocal microscopy

When observed under confocal microscopy, cells with a rounded shape cytoplasm were seen in the cultures of the cryo group. Cells in the fresh group showed spindle shaped cytoplasm. (Figure 3).

Discussion

The present research a protocol for cryopreservation of intact deciduous human teeth was tested and the characteristics of dental pulp stem cells were evaluated. The results showed that mesenchymal stem cells could be obtained from intact cryopreserved deciduous teeth with a success rate of 30%, whereas cells isolated from the fresh teeth showed a success rate of 61%. This data is in accordance with a similar study, which showed a 20% isolation success rate for cryopreserved permanent teeth (17).

During the period of cultivation, 4 cultures were lost due to bacterial/fungal contamination in the first 2 weeks after isolation, despite using antibiotics in the culture medium and following a rigorous antiseptic protocol. One explanation may be the fact that deciduous teeth, unlike permanent teeth, carry more bacterial colonization in the resorbed areas of the roots (19).

Recently, the identification of 2 different deciduous teeth stem cell populations – Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED) (3) and Immature Dental Pulp Stem Cell (IDPSCs) (10, 20)- showed important differences in the harvesting of deciduous teeth stem cells (DTSCs) in relation to the quantity of FBS added to the basal culture medium, enzymatic digestion, addition of growth factors and antibiotics or other changes to the stem cell isolation and cultivation protocols (10). These factors may contribute to the selection of certain type of stem cell population within the original culture. A previous pilot study performed by the group (data not shown) showed no cell retrieval when 10% FBS was used for cultivation in the first 2 weeks after thawing. This constitutes the reason why this research used such a high concentration of FBS (20%), even though it is widely known that the less FBS used in harvesting, the better for cell-based therapies.

There is not just one specific surface marker capable of characterizing mesenchymal stem cells (21, 22). Therefore, a panel of surface antigen markers, either to include or exclude our the cells as MSCs, was used in this research to assure that the heterogeneous population of MSCs was not confused with other adherent spindle shaped cell type. The cells in both groups met all the criteria established for MSCs. These results showed cryopreservation had no effect on the immunophenotypical expression of the surface antigen markers tested. This corroborates with the studies of Lee and colleagues (2010) (23).

When the results of the proliferation assays were analyzed, no statistical difference was found between the groups, even when the samples were paired. However, when the average time between isolation and the fifth passage was calculated for both groups, the mean

for the cryopreserved group was almost 44% higher when compared to the fresh group. A few conclusions may be drawn considering the data above. Firstly, the low success rates in cultivation reduced the sample size and that might explain the absence of statistical differences in the proliferation assay. Secondly, 7 days may not be enough time to show proliferation differences between the groups. Data on the fresh group showing significant difference only after the fifth day corroborates the fact that cells might take a few days to settle after seeding. And thirdly and most importantly, growth throughout the period of culture for the cryo group was longer when compared to the fresh group suggesting a lower proliferation rate. The latter is in accordance with Gioventù and colleagues (2012) (24).

The cells from both groups possessed the ability to differentiate into the tested phenotypes, although their differentiation capacity varied between the groups. During the time of induction pulp stem cells from the cryo group showed less differentiation products over a longer induction time, especially when adipogenesis was considered. A similar result was also reported by Miura and colleagues (2003) (3), which found that after 5 weeks of induction, only 5% of the cultured SHED possessed the potential to develop into fat cells.

During cultivation, the cultures in the cryo group showed different morphology patterns; consequently, their morphology was evaluated by staining the nucleus and cytoskeleton. Under confocal microscopy, cells with a rounded shape cytoplasm became evident in cultures of cryo group, confirming the findings of the inverted microscopy used during the time of cultivation. These results suggest senescence of the cells in the cryo group and are in accordance with Gioventù and colleagues (2012) (24) who also found defective morphology in the pulp cells retrieved from intact cryopreserved deciduous teeth.

Such low success rates must not be considered reliable when cell based therapies are involved. On the other hand, some modifications in the protocols, such as the use of a magnetic field freezer to cryopreserve intact teeth (23) or a laser piercing technique (24) to produce microchannels in enamel and dentin, are found in the literature and show better isolation rates.

The initial idea of creating a tooth bank for the cryopreservation of dental pulp stem cells for research would result in the postponement of any type of manipulation of the recent extracted tooth for until a more suitable time, in accordance with the patients, physician's or researcher's needs. If any additional procedure is to be adopted before freezing, the storage technique becomes more difficult, if not impossible, for the clinicians, at the time of the tooth extraction. Another complicating factor for tooth banking is the small amount of cells retrieved from the intact cryopreserved teeth in a longer period of time.

This research concludes that the cryopreservation of intact deciduous teeth for the purpose of tooth banking is still not reliable and the techniques found in the literature which, in fact, raise isolation success rates also increase the steps for the process of freezing.

References

1. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119:2204-13.
2. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13625–30.
3. Miura M, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 5807-12.
4. D'Aquino R, *et al.* Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 2009; 312B: 408-415.
5. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. Those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009, 88(9):792-806.
6. Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp and apical papilla progenitor cells. *J Endod* 2010; 36(5):781-9.
7. Sakai VT, *et al.* SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* 2010; 89(8):791-6.
8. Bernardi L, *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.
9. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol* 2012;57:1439-1458.
10. Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng* 2012; 18(2): 129-138.
11. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am.* 2012, 56(3): 549-61.
12. Zhang W, *et al.* Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng. part c.* 2006, 12(10), p. 2813-23.
13. Seo, B. M. *et al.* Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res* 2005, 84(10):907-912.
14. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent Summer* 2009; 33(4): 289-94
15. Papaccio, *et al.* Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their role as a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* 2008; 208(2):319-25.
16. Perry BC, *et al.* Collection, cryopreservation and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C*, 2008; 14(2):

149- 156.

17. Woods EJ, *et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology* 2009; 59 (2):150-7.

18. Ma L, *et al.* Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS ONE* 2012; 7(12), e51777.

19. Shekar R, Ranganathan K. Phenotypic and growth characterization of human mesenchymal stem cells cultured from permanent and deciduous teeth. *Indian J Dent Res* 2012. Nov-Dec; 23(6):838-9.

20. Kerkis I, *et al.* Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells and other embryonic stem cell markers. *Cell Tissues Organs* 2006; 184(3-4): 105-16.

21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-7.

22. Mafi P, *et al.* Adult mesenchymal stem cell and cell surface characterization- a systematic review of the literature. *Open Orthop J* 2011; 5(2): 253-60.

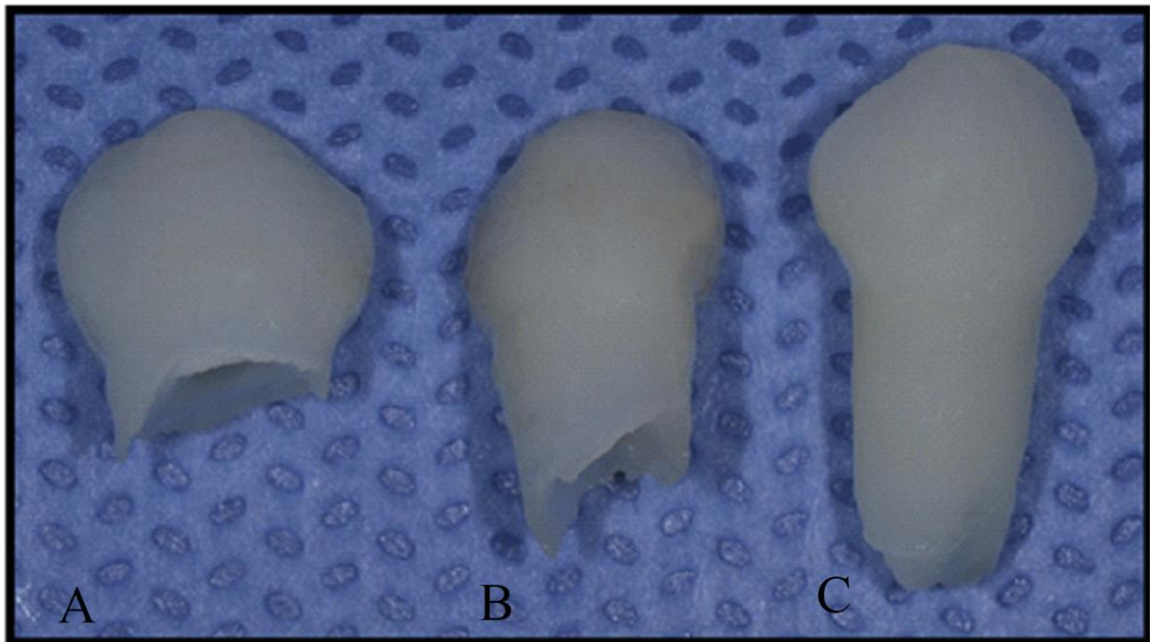
23. Lee SY, *et al.* Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod* 2010; 36(8):1336-40.

24. Gioventù S, *et al.* A novel method for banking dental pulp stem cells. *Transfus Apher Sci* 2012; 47(2):199-206.

Table 1. Dental sample characteristics

Sample	Age	Tooth	Root Resorption Level	Success	Contamination	Group
1 ♀	9	54	TR	yes	no	Fresh
		55	TR	yes	no	Cryo
2 ♂	10	51	TR	no	no	Fresh
		61	TR	no	no	Cryo
3 ♂	9	63	TR	yes	yes	Fresh
		65	TR	yes	yes	Cryo
4 ♀	11	63	2/3	no	no	Fresh
		53	2/3	no	no	Cryo
5 ♂	8	51	1/3	yes	no	Fresh
		61	1/3	yes	no	Cryo
6 ♀	9	53	1/3	yes	no	Fresh
		63	1/3	no	no	Cryo
7 ♀	8	73	1/3	yes	no	Fresh
		74	1/3	no	no	Cryo
8 ♀	9	84	2/3	no	no	Fresh
		83	2/3	no	no	Cryo
9 ♂	9	52	2/3	no	no	Fresh
		51	2/3	no	no	Cryo
10 ♂	9	62	2/3	no	no	Fresh
		61	1/3	no	no	Cryo
11 ♂	9	84	TR	yes	yes	Fresh
		55	TR	no	no	Cryo
12 ♀	9	54	TR	yes	no	Fresh
		64	TR	yes	no	Cryo
13 ♀	10	63	1/3	yes	no	Fresh
		53	2/3	no	no	Cryo

TR: root totally resorbed; **1/3:** 1/3 remaining root; **2/3:** 2/3 remaining root



	CD90	CD29	CD73	CD14	CD34	HLADR	CD45
Cryopreserved	98,23 ± 1,87	97,67 ± 1,30	97,47 ± 1,84	0,20 ± 0,22	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,16	0,07 ± 0,09
Fresh	94,33 ± 7,68	95,03 ± 3,84	94,52 ± 4,77	1,08 ± 2,03	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,07	0,00 ± 0,00

D

Figure 1. (A-C) Root resorption levels considered for tooth samples. (A) Root totally resorbed. (B) 1/3 remaining root. (C) 2/3 remaining root. (D) Cytometric evaluation. Representation of the percentage values by means and standard deviation obtained by analyzing the percentage expression of the markers of all samples.

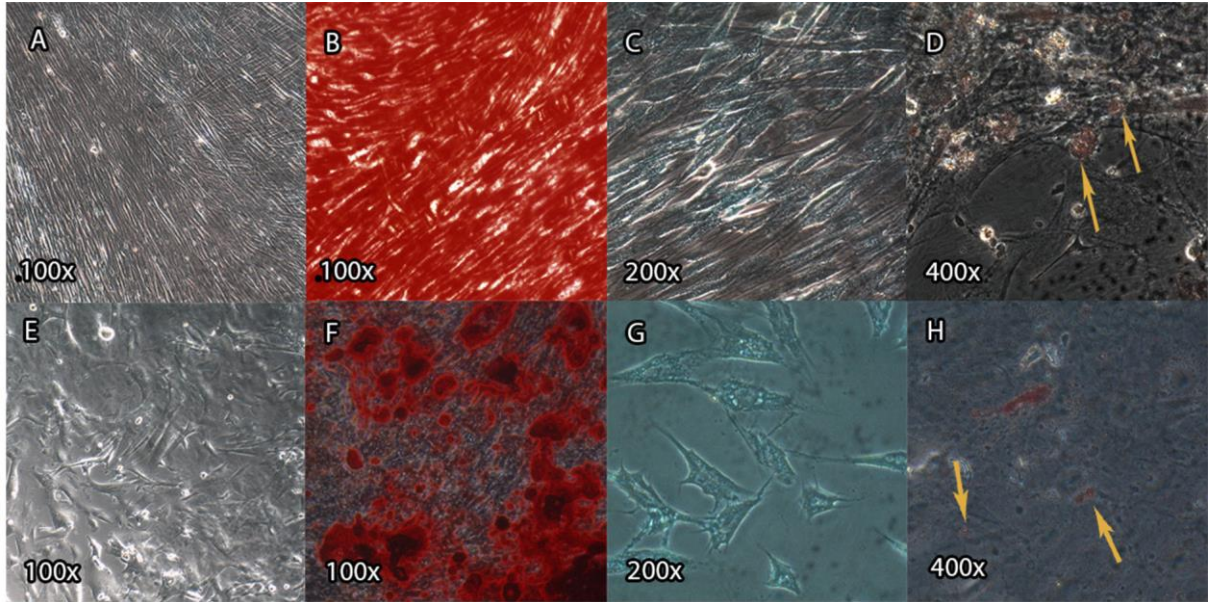


Figure 2. Multipotent assay. (A-D) Control group. (A) Pulp cell culture without induction medium for negative control. (B) Osteogenic differentiation showing wide calcium sheets stained with Alizarin red. (C) Chondrogenic differentiation visualized by Alcian blue staining of the glycosaminoglicans deposits. (D) Adipogenic differentiation showed by Oil red staining of lipid vacuoles. (E-H) Test (cryo) group. (E) Pulp cell culture without induction medium for negative control. (F) Osteogenic differentiation showing sparsely scattered calcium deposits stained with Alizarin red. (G) Chondrogenic differentiation visualized by Alcian blue staining of the glycosaminoglicans small deposits. (H) Adipogenic differentiation shown by Oil red staining of rare lipid vacuoles (yellow arrows).

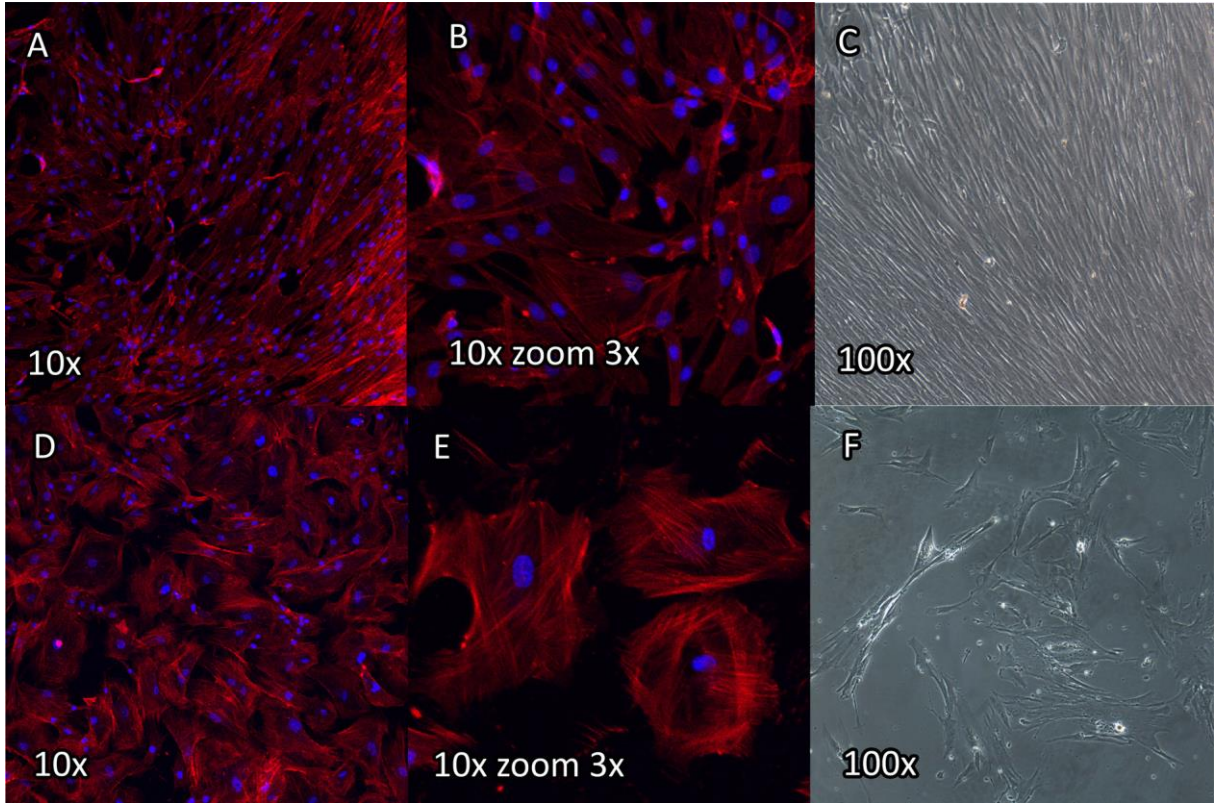


Figure 3. Morphology assay. (A-C) Fresh group. (A and B) Confocal microscopy. (C) Inverted microscopy. (D-F) Cryo group. (D and E) Confocal microscopy. (F) Inverted microscopy.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da metodologia utilizada nesse estudo, foi possível isolar, cultivar, caracterizar imunofenotipicamente e diferenciar as células pulpares de dentes decíduos criopreservados. Apesar de preencherem os critérios estabelecidos por Dominici e colaboradores (2006) para que essas células possam ser classificadas como células-tronco mesenquimais, o sucesso no cultivo foi observado em apenas 30% das culturas, o que demonstra a dificuldade no estabelecimento das culturas primárias das células pulpares dos dentes decíduos criopreservados. Padrões anormais de morfologia, proliferação e potencial de diferenciação celular também foram encontrados nas células pulpares desse grupo.

Assim, pode-se sugerir que o fato de os dentes decíduos serem congelados intactos, sem que a polpa seja removida previamente, pode influenciar na capacidade de proliferação e potencial de diferenciação das células pulpares. Sabe-se que as diferenças, particularmente associadas a cada laboratório e seus protocolos, podem influenciar a viabilidade e o comportamento de uma cultura. Lee e colaboradores (2010) obtiveram uma taxa de 70% de cultivo das células de dentes permanentes de ratos congelados intactos sob a ação de um freezer magnético.

A comparação de métodos e protocolos de congelamento de tecidos entre os estudos é difícil de ser realizada, especialmente em se tratando de tecidos dentais. A idéia inicial da criação de um banco de dentes seria o adiamento de qualquer tipo de manipulação do dente recém extraído, para um momento mais adequado, conforme necessidade da realização da pesquisa. Se para ocorrer o congelamento adequado do tecido, procedimentos adicionais precisam ser adotados, aumenta-se a dificuldade da técnica para a maioria dos dentistas clínicos e laboratórios de pesquisa. Outra dificuldade encontrada para o armazenamento em bancos de dentes, seria a quantidade de células recuperadas dos dentes criopreservados intactos e o tempo que as culturas celulares demoram para ser estabelecidas e atingirem o número suficiente de células necessárias para, por exemplo, justificar o seu uso em terapias celulares. O presente estudo mostrou que as células pulpares dos dentes decíduos criopreservados possuem lenta proliferação.

Dessa forma, o congelamento de dentes decíduos intactos para o estoque em banco de dentes com finalidade terapêutica ainda não constitui uma alternativa funcional e segura. Maiores conhecimentos relacionados à otimização de protocolos de criopreservação seriam

necessários para poder justificar que no futuro os pacientes pudessem vir a se beneficiar de terapias celulares a partir de seus próprios dentes criopreservados.

Esse estudo conclui que é possível isolar, cultivar e caracterizar, para parâmetros de células-tronco mesenquimais, as células pulpares de dentes decíduos hígidos que tenham sido congelados intactos, sem nenhuma manipulação de seu tecido pulpar ou de seus tecidos duros previamente ao congelamento. O congelamento dos dentes intactos seria uma forma prática de manutenção dessa fonte de células. Mas a padronização da metodologia de congelamento e descongelamento, isolamento e cultivo para as células dos dentes criopreservados é bastante complicada, visto que a viabilidade das células cai muito após o descongelamento do dente e as linhagens proliferam mais lentamente, comparado com a proliferação da linhagem celular não congelada. Esse achado deve-se, provavelmente, porque o congelamento parece desencadear a senescência celular, cuja hipótese pode ser explicada pelas alterações morfológicas encontradas. O número de células também é menor nas culturas de dentes criopreservados que nas culturas de dentes frescos, o que dificulta a realização de muitos ensaios. O estudo também mostrou que existe potencial de diferenciação nas células dos dentes criopreservados mas esse potencial é menor, e por isso é difícil imaginar o uso dessas células em terapias celulares. As células dos dentes congelados intactos mostram resultados pouco satisfatórios quando comparados as células onde o isolamento ocorreu logo após a exodontia, em todos os aspectos avaliados. Dessa forma, considerando os resultados obtidos somados ao conhecimento adquirido até o momento através desse trabalho, o presente estudo desencoraja o banqueamento de dentes intactos para fins terapêuticos uma vez que os resultados ainda não são previsíveis.

Agradecimentos

Ao CNPq, a PROPESQ-UFRGS e ao Instituto de Pesquisas com Células-tronco (IPCT) pelo financiamento do projeto e por ceder toda a sua estrutura para a realização do estudo.

Referências Bibliográficas

- AGHA-HOSSEINI F, *et al.* In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. **Clin Transplant**, v. 24,n. 2, p. E23-8, Mar-Apr, 2010.
- ARORA V, ARORA P, MUNSHI AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. **J Clin Pediatr Dent**, v. 33, n. 4, p.289-94, Summer, 2009.
- BAGHABAN ESLAMINEJAD MR, *et al.* In Vitro growth and characterization of stem cells from human dental pulp of deciduous versus permanent teeth. **Jornal of Dentistry**, Tehran, v.7, n.4, p.185-195, 2010.
- BERNARDI L, *et al.* The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **J Endod**, Chicago, v.37, n.7, p.973-9, jul, 2011.
- BROXMEYER HE, *et al.* High efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, p. 645-650, Jan, 2003.
- BYDLOWSKI SP, *et al.* Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. 1, p. 25-35. 2009.
- D'AQUINO R, *et al.* Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. **J Exp Zool Mol Dev Evol**, v.312B, n. 5, p. 408-415, Jul 2009.
- DING G, *et al.* Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papila. **J Cell Physiol**, v. 223, n. 2, p. 415-422, May, 2010.
- DOMINICI M, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Bymonthly, v.8, n. 4, p. 315-7, 2006.
- GIORDANO G. *et al.* Stem cells from oral niches: a review. **Ann Stomatol**. Roma, v. 2, n. 1-2, p. 3-8. Jan, 2011.
- GIOVENTÙ S, *et al.* A novel method for banking dental pulp stem cells. **Transfus Apher Sci**, v. 47, n. 2, p. 199-206, Oct, 2012.
- GOVINDASAMY V, *et al.* Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. **J Endod**, Chicago, v. 36, n. 9, p. 1504-1515. Sep, 2010.
- GRONTHOS S, *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v.97, n.25, p.13625-30. Dec, 2000.
- GRONTHOS S, *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J Dent Res**, Chicago, v. 81, n. 8, p. 531- 5, Aug, 2002.
- HOFFMANN DI, *et al.* Cryopreserved embryos in the United states and their availability for research. **Fertil Steril**, v.79, n.5, p.1063-1069, May, 2003.

HUANG AHC, *et al.* Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. **J Oral Pathol Med**, v.37, n. 9, p. 571-4, Oct, 2008.

HUANG GT, GRONTHOS S, SHI S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. Those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **J Dent Res**, Chicago, v. 88, n.9, p.792-806. Set. 2009.

JANZ FL. Características de expansão, diferenciação e criopreservação de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico no segundo trimestre de gestação [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2010.

JO YY, *et al.* Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. **Tissue Eng**, New Rochelle, v.13, n. 4, p.67-73, Apr, 2007.

KAWASHIMA N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 11, p. 1439- 58, Nov, 2012.

KERKIS I, CAPLAN A I. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. **Tissue Eng.**, v. 18, n. 2, p. 129-138, 2012.

KERKIS I, *et al.* Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, Basel, v.184, n.3-4, p.105-16, 2006.

KOYAMA N, *et al.* Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. **J Oral Maxillofac Surg**, v.67, n. 3, p. 501-6. Mar, 2009.

LEE SY, *et al.* Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. **J Endod**, Chicago, v.36, n.8, p.1336-40. Aug, 2010.

LIZIER NF, *et al.* Scalling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. **PLoS ONE**, v.7, n. 6, p.e 39885, Jun, 2012.

LUIZI SB, *et al.* Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta 1 and acidic fibroblast growth factor in culture. **J Endod**, Chicago, v. 33, n.7, p. 833-5, Jul, 2007.

MA L, *et al.* Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. **PLoS ONE**, v.7, n. 12, p.e51777, Dec, 2012.

MAFI P, *et al.* Adult mesenchymal stem cell and cell surface characterization- a systematic review of the literature. **Open Orthop J**, v. 5, n. 2, p. 253-60, 2011.

MEIRELLES LS, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all tissues. **J Cell Sci**. Cambridge, v. 1, n. 119(pt11), p. 2204-13. Jun, 2006.



MIURA M, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 100, n. 10, May 13, p. 5807-12, 2003.

- MORRIS JG, ACTON E. Controlled ice nucleation in cryopreservation – a review. **Cryobiology**, New York, v.66, n. 2, p. 85-92, Apr, 2013.
- MORSCZECK C, *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. **Matrix Biol**, v. 24, n. 2, p.155-65, Apr, 2005.
- MORSCZECK C, *et al.* Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. **Clin Oral Invest**, v.14, n.4, p. 433-40. Jul, 2009.
- NAKAMURA S, *et al.* Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. **J Endod**, Chicago, v.35, n. 11, p.1539-15-42. Nov, 2005.
- PAPACCIO G , *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**, Philadelphia, v. 208, n. 2, p.319-25, Aug, 2008.
- PERRY BC, *et al.* Collection, cryopreservation and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. **Tissue Eng Part C**, New Rochelle, v.14, n. 2, p.149- 156, Jun, 2008.
- SAKAI VT, *et al.* SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **J Dent Res**, v. 89, n. 8, p. 791-6, Aug, 2010.
- SEDGLEY CM, BOTERO TM. Dental stem cells and their sources. **Dent Clin North Am**, v. 56, n. 3, p. 549-61, Jul, 2012.
- SEO, B. M, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 149, 2004.
- SHEKAR R, RANGANATHAN K. Phenotypic and growth characterization of human mesenchymal stem cells cultured from permanent and deciduous teeth. **Indian J Dent Res**, v. 23, n. 6, p. 838-9, Nov-Dec, 2012.
- SONOYAMA W, *et al.* Characterization of the apical papilla and its residing cells from human immature permanent teeth: a pilot study. **J Endod**, Chicago, v.34, n. 2, p.166-171, 2008.
- TZIAFAS D, KODONAS K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp and apical papilla progenitor cells. **J Endod**, Chicago, v. 36, n.5, p.781-9, 2010.
- WANG X, *et al.* Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. **Arch Oral Biol**, v.57, n. 9, p. 1231-40. Sep, 2012.
- WOODS EJ, *et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. **Cryobiology**, New York, v.59, n.2, p.150-7. Oct, 2009.
- ZHANG W, *et al.* Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. **Tissue Eng**, New Rochelle, v.12, n.10, p. 2813-23, 2006.

ZHENG Y, *et al.* Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. **J Dent Res**, Chicago, v. 88, n. 3, p. 249-254, 2009.

ZHU Y, *et al.* Deciduous dental pulp stem cells are involved in osteoclastogenesis during physiologic root resorption. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 1, p. 207-15, Jan, 2013.

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética

	U F R G S UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs	
---	--	---	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:

Número: 20865
Título: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CONDIÇÕES IDEAIS DE ESTOQUE DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS


Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LUCIANO CASAGRANDE - coordenador desde 01/08/2011
FERNANDO BORBA DE ARAUJO - pesquisador desde 01/08/2011
MANOEL SANT ANA FILHO - pesquisador desde 01/08/2011
ANNA CHRISTINA MEDEIROS FOSSATI - pesquisador desde 01/08/2011
PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE - pesquisador desde 01/08/2011
JOSE ARTUR BOGO CHIES - pesquisador desde 01/08/2011
SIMONE BONATO LUISI - pesquisador desde 01/08/2011
MARCELO LAZZARON LAMERS - pesquisador desde 01/08/2011
ISABEL DA SILVA LAUXEN - Biólogo desde 01/08/2011
Daniele Lindemann - Aluno de Mestrado desde 01/08/2011
JANINE MACHADO DA SILVA - Aluno de Graduação desde 01/03/2012

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo , em reunião realizada em 19/04/2012 - Sala 01 de reuniões do Gabinete do Reitor, 6º andar do prédio da Reitoria, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 11 de Abril de 2013



BRUNO CASSELE NETO
Vice Pró-Reitor de Pesquisa

1

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA – NÍVEL MESTRADO
CLÍNICA ODONTOLÓGICA/ODONTOPEDIATRIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Pesquisa: “Efeito da Criopreservação de Dentes Decíduos nas características
Imunofenotípicas e genotípicas de Células-tronco Pulpares”**

Pesquisas recentes mostram que existem células-tronco dentro do dente de leite. A grande vantagem do uso do dente de leite para a obtenção destas células-tronco é que esses dentes iriam cair naturalmente. Ainda são necessários mais estudos para compreender melhor as características dessas células e, sendo assim, o objetivo deste estudo é realizar o cultivo das células do nervo do dente de leite que já foi extraído e avaliar a suas características quando frescas e após serem congeladas. A técnica de extração do dente de leite será a mesma utilizada habitualmente no ambulatório da Clínica Infante Juvenil desta Faculdade.

Toda e qualquer dúvida será esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa. Fica, ainda, assegurada a liberdade dos responsáveis pelo paciente, recusarem-se a participar do estudo. Não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum outro momento dessa pesquisa.

Eu, _____ como responsável pelo(a) menor _____, declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, autorizo meu (minha) filho (a) ou criança pela qual sou responsável a participar do estudo, estando disposto (a) a trazê-lo (a) nas consultas marcadas, assim como, doar seu dente de leite depois da extração.

Porto Alegre, ____ de _____ de 2012.

Responsável pelo Participante
RG: _____

Pesquisador Responsável: Luciano Casagrande
Telefones de contato: (51) 3308-5027

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO

Termo de Doação de Material Biológico

Pesquisa

“Efeito da Criopreservação de Dentes Decíduos nas características Imunofenotípicas e genotípicas de Células-tronco Pulpares”

Este estudo está sendo realizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e utiliza “dentes de leite” para estudar as células-tronco que existem no seu interior. A grande vantagem do uso do dente de leite para a obtenção destas células é que esses dentes são substituídos naturalmente.

O objetivo deste estudo é realizar o cultivo dessas células para o melhor conhecimento de suas características. As pesquisas são fundamentais para a descoberta de novos conhecimentos que beneficiarão muitos pacientes que buscam como você atendimento nesta Faculdade. Portanto, a sua ajuda doando o dente de seu filho para a disciplina é indispensável para o sucesso deste trabalho. Cabe salientar que não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum momento da pesquisa. Fica assegurada a liberdade dos participantes ou de seus responsáveis de recusar-se a participar do estudo, sem que isso traga conseqüências aos mesmos em relação ao tratamento que está sendo proposto.

Eu, _____ RG: _____, como responsável pelo(a) menor _____, declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, autorizo meu (minha) filho (a) ou criança pela qual sou responsável a participar do estudo, estando disposto (a) a trazê-lo (a) nas consultas marcadas, assim como, doar seu dente de leite depois da extração. Dente doado: _____
Porto Alegre, _____ de _____ de 2011.

Responsável pelo Participante

Pesquisador Responsável: Luciano Casagrande
Telefones de contato: (51) 3308-5027

Comitê de Ética em Pesquisa – UFRGS
Fone: (51) 3308-3738

Elaborado com base na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde publicada no DOU n. 201, 1996.