

Rendimento de células mesenquimais do ligamento periodontal humano submetidas a diferentes protocolos de criopreservação

Yield of human periodontal ligament mesenchymal cells under different protocols of cryopreservation

Diego Moura SOARES^a, Fernanda GINANI^a, Carlos Augusto Galvão BARBOZA^a

^aDepartamento de Morfologia, Centro de Biociências, UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59072-970 Natal – RN, Brasil

Resumo

Introdução: A técnica de criopreservação tem como característica cessar reversivelmente todas as funções biológicas dos tecidos vivos em baixas temperaturas e tem sido aplicada a diversas células humanas, visando à sua utilização posterior. **Objetivo:** Avaliar a proliferação de células mesenquimais do ligamento periodontal humano após a criopreservação por dois diferentes protocolos. **Método:** As células do ligamento periodontal foram obtidas a partir de dois dentes (terceiros molares) hígidos, com indicação de remoção cirúrgica. Após o processamento, as células foram cultivadas em placas de Petri e mantidas a 37 °C em 5% de CO₂, até atingirem 70-90% de confluência, com troca de meio a cada três dias. Na primeira passagem, as células foram divididas em dois grupos e criopreservadas: Grupo -80 °C – criopreservação em ultrafreezer por 45 dias; Grupo -196 °C – criopreservação em nitrogênio líquido por 45 dias. Decorrido esse tempo, as células dos dois grupos foram descongeladas e plaqueadas para o experimento. A curva de crescimento dos grupos estudados foi traçada a partir de contagem em Câmara de Neubauer e pelo método de ensaio do MTT, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram analisados por meio do teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%. **Resultado:** Verificou-se um crescimento ascendente nos dois protocolos utilizados, porém uma maior taxa proliferativa foi verificada no grupo criopreservado em nitrogênio líquido ($p < 0,05$). **Conclusão:** Ambos os protocolos de criopreservação estudados foram eficazes, porém a criopreservação em nitrogênio líquido (-196 °C) manteve uma maior taxa de proliferação celular em todos os intervalos de tempo.

Descritores: Ligamento periodontal; criopreservação; proliferação de células.

Abstract

Introduction: Cryopreservation aims to stop reversibly the biological functions of living tissues at low temperatures, and is an important resource for the storage of human cells for later use. **Aim:** To assess the proliferation of mesenchymal cells from human periodontal ligament cryopreserved by two different protocols. **Method:** Periodontal ligament cells were obtained from third molars with an indication for surgical removal. After processing, cells were grown and maintained at 37 °C in 5% CO₂ until they reached 70-90% confluency, with medium changing every three days. In the first passage cells were divided into two groups, according to the protocol used: Group -80 °C - cryopreserved in ultrafreezer for 45 days, Group -196 °C - cryopreserved in liquid nitrogen for 45 days. After this time, cells from both groups were thawed and plated for the experiment. The growth curve of the groups was drawn from counting cells in a Neubauer chamber and by the MTT assay method, in the intervals of 24, 48 and 72 hours. The data were analyzed using the Mann-Whitney test with a significance level of 5%. **Result:** There was an upward cell growth in both protocols used, but a higher proliferative rate was observed in group cryopreserved in liquid nitrogen ($p < 0.05$). **Conclusion:** Cryopreservation has proven to be an effective technique for the storage and of mesenchymal cells from the periodontal ligament, especially when stored at a temperature of -196 °C.

Descriptors: Periodontal ligament; cryopreservation; cell proliferation.

INTRODUÇÃO

As células mesenquimais de origem dental têm sido amplamente investigadas nos últimos anos por apresentar características de autorrenovação e diferenciação em tipos celulares especializados¹⁻³, sendo, assim, uma alternativa viável para regeneração tecidual de estruturas dentais comprometidas.

Dentre as fontes de células mesenquimais originadas do elemento dentário, destacam-se a polpa dental^{4,5}, a papila apical⁶ e o ligamento periodontal^{7,8}. As células mesenquimais do ligamento periodontal são células de fácil isolamento e obtenção, além de possuírem capacidade de diferenciação em osteoblastos,

fibroblastos e cementoblastos, sendo essenciais para a reparação dos tecidos periodontais^{8,9}.

A necessidade de manter essas células vivas por um longo período de tempo para uma posterior aplicação clínica, sem a perda de suas funções, levou ao desenvolvimento de diversas técnicas e protocolos de criopreservação. Este procedimento tem como objetivo cessar reversivelmente, de forma controlada, todas as funções biológicas dos tecidos vivos em uma temperatura ultrabaixa¹⁰. A criopreservação vem sendo utilizada há vários anos em diferentes tipos celulares, como células mesenquimais da medula óssea¹¹, tecido adiposo¹², cordão umbilical¹³, polpa dental¹⁴ e ligamento periodontal¹⁵.

A viabilidade das células submetidas ao processo de criopreservação depende basicamente de sua capacidade de resistir à desidratação e ao dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo no seu interior¹⁶. Portanto, o processo de congelamento ideal deve evitar a formação de cristais de gelo no interior das células e posterior lesão celular. Para isso, deve-se aplicar uma velocidade de congelamento adequada, de acordo com o tipo celular em questão¹⁷.

A maioria dos estudos visa a determinar se o processo de criopreservação afeta a capacidade proliferativa ou o potencial de diferenciação das células criopreservadas em comparação com células não submetidas à criopreservação^{15,17,18}. Os resultados desses estudos demonstraram que, após o descongelamento, as células mantêm a sua viabilidade, bem como o potencial de diferenciação em vários tipos celulares. Face ao exposto, o presente estudo propõe avaliar, por meio de experimentos *in vitro*, a influência de dois diferentes protocolos de criopreservação no rendimento de células mesenquimais do ligamento periodontal.

METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEP/UFRN (parecer n.º 080/2010) e os voluntários receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido explicando a realização do estudo, os objetivos, os riscos e os benefícios aos quais estariam expostos, de acordo com as Diretrizes e Normas Reguladoras do Conselho Nacional de Saúde (Resolução n.º 196/96).

Para a obtenção das células do ligamento periodontal, foram utilizados dois dentes permanentes humanos hígidos (terceiros molares), removidos por indicação ortodôntica. Após a exodontia, os elementos dentários foram imediatamente armazenados em tubos tipo Falcon de 50 mL (TTP®, USA) contendo 10 mL de meio de cultura alfa-MEM (Cultilab, Brasil). Em capela de fluxo laminar, os dentes foram submetidos a três lavagens em solução contendo meio alfa-MEM (Cultilab) enriquecido com antibióticos e antifúngicos (Gibco, USA), objetivando eliminar possível contaminação.

A obtenção das células-tronco foi realizada com base no protocolo utilizado por Vasconcelos et al.¹⁵ (2011). As fibras do ligamento periodontal foram cuidadosamente removidas por meio da raspagem delicada da superfície radicular, com o uso de

uma lâmina de bisturi. O extrato celular foi submetido à digestão enzimática com colagenase I (Gibco) e dispase (Gibco), por uma hora a 37 °C. As culturas foram então mantidas em meio alfa-MEM, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C, até atingirem 70 a 90% de confluência, com troca de meio a cada três dias.

No primeiro subcultivo (P1), alíquotas de 1×10^6 células foram separadas em criofrascos contendo soro fetal bovino com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e divididas em dois grupos distintos, de acordo com o protocolo de criopreservação utilizado: GRUPO -80 °C: 2 horas a -4 °C, 18 horas a -20 °C e então conservadas a -80 °C em ultrafreezer; GRUPO -196 °C: 2 horas a -4 °C, 18 horas a -20 °C, 24 horas a -80 °C e então mantidas a -196 °C em nitrogênio líquido.

Para caracterizar a natureza multipotencial das células do ligamento periodontal, alíquotas das mesmas foram cultivadas em meios de diferenciação osteogênico e adipogênico (StemPro® Differentiation Kits, Invitrogen, USA) por até 21 dias. Após este período, as células exibiram características morfológicas de células osteoblásticas e adiposas, com depósitos de cálcio corados pelo Alizarin Red e vacúolos lipídicos corados pelo Oil Red.

Após um período de 45 dias de criopreservação, as células dos dois grupos foram descongeladas pelo contato imediato em água a 37 °C em banho-maria. Em seguida, a suspensão celular de cada criofrasco foi diluída em 10 mL de meio alfa-MEM e centrifugada a 1200 rpm por três minutos, a fim de remover o DMSO e evitar o seu efeito citotóxico. Todo o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em 4 mL de meio e mantidas nas mesmas condições de cultura.

Na terceira passagem (P3), as células dos dois grupos foram cultivadas em placas de 24 poços, na densidade de 3×10^4 /poço. Todo o experimento foi realizado em quadruplicata (n = 4), sendo quatro poços para cada grupo em cada intervalo de tempo estudado. A fim de avaliar o rendimento celular e obter a curva de crescimento nos dois grupos estudados, as células foram submetidas à análise da proliferação e viabilidade celular utilizando-se o azul de tripan e a câmara de Neubauer, durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Nesta etapa, as contagens celulares foram realizadas no sistema duplo cego, por dois examinadores previamente calibrados ($\kappa = 0,83$).

Outro método utilizado para avaliar a viabilidade celular e traçar as curvas de crescimento celular, nos dois grupos estudados e nos mesmos intervalos de tempo, foi o ensaio de MTT, que avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], sendo a sua concentração determinada por meio de densidade óptica a 570 nm.

Os dados quantitativos referentes às contagens celulares foram submetidos a testes de normalidades (Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) e observou-se que os mesmos não apresentaram um padrão de distribuição normal; por isso, foram submetidos à análise não paramétrica. A diferença entre os grupos para cada um dos intervalos de tempo estudados (24, 48 e 72 horas) foi analisada pelo teste estatístico de Mann-Whitney, considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADO

A capacidade proliferativa das células mesenquimais derivadas do ligamento periodontal humano criopreservadas foi mantida no decorrer do tempo experimental nos dois protocolos estudados. A partir do método de exclusão por azul de tripan, podem-se observar maiores médias para o grupo criopreservado em nitrogênio líquido quando comparado com o grupo criopreservado em ultrafreezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, com significância estatística ($p < 0,05$) em todos os intervalos de tempo estudados (Tabela 1).

Os resultados obtidos pelo método de ensaio de MTT confirmam os achados do método de exclusão por azul de tripan, tendo em vista que o grupo criopreservado a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ teve uma maior absorbância quando comparado ao grupo criopreservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo significativo em todos os intervalos de tempo (Figura 1).

DISCUSSÃO

As células mesenquimais de origem dental têm sido submetidas à criopreservação e sua atividade biológica vem sendo testada após descongelamento por diversos autores^{15,17,19}. Esses estudos mostram a manutenção tanto da viabilidade e do potencial proliferativo das células, como ficou evidente no presente trabalho, quanto da sua potencialidade de diferenciação em diversos tipos celulares. Os resultados dessas pesquisas podem

Tabela 1. Valores referentes às médias e ao desvio-padrão do número de células e percentual de viabilidade celular em cada grupo

	$-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-196\text{ }^{\circ}\text{C}$	<i>P</i>
T24	$2,4 \pm 0,5$ 95%	$3,4 \pm 0,3$ 100%	0,040
T48	$3,5 \pm 0,4$ 93,3%	$7,4 \pm 1,1$ 90,8%	0,029
T72	$7,0 \pm 0,9$ 98,3%	$11,4 \pm 1,9$ 95,8%	0,028

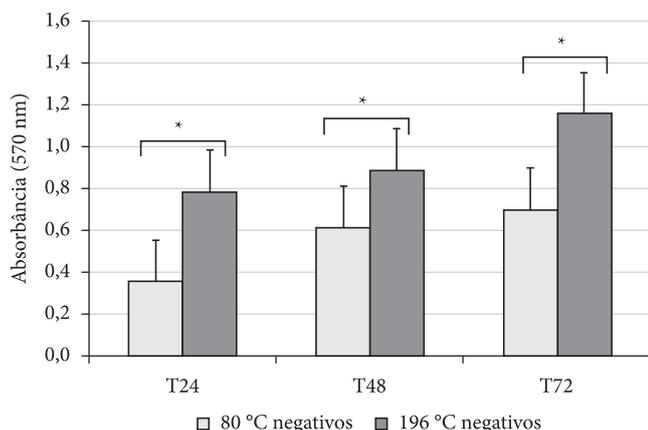


Figura 1. Proliferação das células mesenquimais do ligamento periodontal humano analisadas pelo método de MTT nos diferentes grupos ($*p < 0,05$).

favorecer a criação de bancos de células mesenquimais dentais, mais especificamente do ligamento periodontal, conforme preconizam alguns autores^{18,20,21}.

A maioria dos estudos apresentados na literatura realiza a criopreservação das células mesenquimais do ligamento periodontal em uma temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrogênio líquido)^{8,17}. Temmerman et al.¹⁷ (2008) analisaram a integridade da membrana (viabilidade celular), a capacidade de crescimento e a expressão da fosfatase alcalina em fibroblastos do ligamento periodontal criopreservados a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 horas e observaram que esses fatores não foram influenciados pela criopreservação. Outro estudo de Vasconcelos et al.¹⁵ (2011) comparou células mesenquimais do ligamento periodontal criopreservadas em $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 dias com células não criopreservadas e verificou uma taxa proliferativa semelhante nos dois grupos em todos os intervalos de tempo estudados (24, 48 e 72 horas). No presente estudo, comparou-se um protocolo que vêm sendo amplamente utilizado, porém com uma menor acessibilidade e maior custo para sua manutenção (uso do nitrogênio), com outro protocolo mais simples, de baixo custo e acessível à maioria dos laboratórios de pesquisa (criopreservação em ultrafreezer). Os resultados deste estudo mostraram uma maior taxa proliferativa no grupo criopreservado a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, mas este fato não inviabiliza a utilização de temperaturas mais altas, como $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, visto que a viabilidade celular foi mantida nos dois protocolos.

A literatura diverge entre os tempos utilizados nos estudos para criopreservação de células mesenquimais; esse tempo varia desde um dia^{11,17}, a intervalos maiores, como meses e anos^{12,19}. O intervalo de tempo de 30 dias também é avaliado por diversos autores^{15,20}. O tempo de criopreservação utilizado neste estudo (45 dias) mostrou não alterar a capacidade proliferativa das células estudadas. Com base nos achados referentes à criopreservação de células mesenquimais¹², é provável que se possa prolongar o período de criopreservação, embora a segurança de fazê-lo ainda precise ser analisada.

O efeito físico que o processo de congelamento e descongelamento pode causar na integridade das células submetidas à criopreservação é bem descrito na literatura^{22,23}. Estudos mostram que a velocidade do congelamento pode ser outro fator crucial para a viabilidade celular após a criopreservação e deve ser determinada para cada tipo celular específico, a fim de evitar lesão na membrana e morte celular²⁴. O decréscimo progressivo da temperatura utilizado neste trabalho, nos dois protocolos estudados, mostrou-se eficiente para manter a viabilidade e a capacidade de proliferação celular, sendo bastante efetivo para as células mesenquimais do ligamento periodontal.

Os agentes crioprotetores também podem afetar significativamente a taxa de sobrevivência e o potencial de proliferação após o descongelamento. A escolha do DMSO neste estudo baseou-se na sua eficiência em outros tipos celulares; além disso, optou-se pela sua associação com o soro fetal bovino, o que, segundo Gonda et al.¹² (2008), contribui para a preservação

da viabilidade das células durante o processo de congelamento e descongelamento.

Esforços de pesquisas atuais, como as citadas neste estudo, são direcionados à melhoria do processo de criopreservação de células mesenquimais para futuras aplicações clínicas^{15,20,21}. Neste estudo, foram avaliados dois protocolos distintos de criopreservação, os quais demonstraram eficiência na manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal. Considerando-se o potencial de aplicação dessas células para acelerar os processos de reparo dos tecidos periodontais, é de extrema importância o aprofundamento dos estudos que avaliem a segurança da

criopreservação por longos períodos de tempo e o seu impacto na capacidade de diferenciação celular.

CONCLUSÃO

Conclui-se que ambos os protocolos de criopreservação estudados foram eficazes na manutenção do rendimento *in vitro* das células mesenquimais do ligamento periodontal humano; porém, a criopreservação com nitrogênio líquido (-196 °C) proporcionou uma maior taxa de proliferação celular em todos os intervalos de tempo.

REFERÊNCIAS

1. Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003;69:250-6. PMID:14671778. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrc.10021>
2. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23:699-708. PMID:15940242. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1102>
3. Freshney IR, Stacey GN, Aurebach JM. *Culture of human stem cells: culture of specialized cells*. New York: Wiley; 2007. PMID:17987034 PMCid:2360285. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470167526>
4. 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. PMID:11087820 PMCid:17626. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.240309797>
5. 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 USA*. 2003;100:5807-12. PMID:12716973 PMCid:156282. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0937635100>
6. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of *in vitro* osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*. 2011;56:709-21. PMID:21227403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.12.008>
7. Kramer PR, Nares S, Kramer SF, Grogan D, Kaiser M. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament *in vitro*. *J Dent Res*. 2004;83:27-34. PMID:14691109. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910408300106>
8. Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*. 2005;84:907-12. PMID:16183789. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910508401007>
9. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontol Res*. 2006;41:547-53. PMID:17076780. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00904.x>
10. De Santis GC, Lima Prata K. Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2009;42:36-47.
11. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997;64:278-94. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(199702\)64:2<278::AID-JCB11>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(199702)64:2<278::AID-JCB11>3.0.CO;2-F)
12. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121:401-10. PMID:18300956. <http://dx.doi.org/10.1097/01.prs.0000298322.70032.bc>
13. Lima Prata K, de Santis GC, Orellana MD, Palma PV, Brassesco MS, Covas DT. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. *Cytotherapy*. 2012;14:694-700. PMID:22519634.
14. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, 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*. 2006;208:319-25. PMID:16622855. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20667>
15. Vasconcelos RG, Ribeiro RA, Vasconcelos MG, Lima KC, Barboza CA. *In vitro* comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. *Cell Tissue Bank*. 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-011-9271-3>
16. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*. 1963;47:347-69. PMID:14085017 PMCid:2195343. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>
17. Temmerman L, Dermaut LR, De Mil M, Van Maele G, Beele H, De Pauw GA. Influence of cryopreservation on human periodontal ligament cells *in vitro*. *Cell Tissue Bank*. 2008;9:11-8. PMID:17541731. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-007-9047-y>
18. Oh YH, Che ZM, Hong JC, Lee EJ, Lee SJ, Kim J. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank--a preliminary study. *Cryobiology*. 2005;51:322-9. PMID:16297377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.08.008>
19. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol*. 2010;223:415-22. PMID:20082304.

20. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009;59:150-7. PMID:19538953 PMCid:2757034. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.06.005>
21. Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, Tsai SY, Jeng JH, Kawata T, et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod*. 2010;36:1336-40. PMID:20647092. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.015>
22. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Transport phenomena during freezing of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 2005;92:372-83. PMID:16155954. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20615>
23. Thirumala S, Zvonic S, Floyd E, Gimble JM, Devireddy RV. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Prog*. 2005;21:1511-24. PMID:16209556. <http://dx.doi.org/10.1021/bp050007q>
24. Hubel A. Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev*. 1997;11:224-33. PMID:9243775. <http://dx.doi.org/10.1053/tmrv.1997.0110224>

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Carlos Augusto Galvão Barboza
Departamento de Morfologia, Centro de Biociências, UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
Av. Salgado Filho, 3000, Campus Universitário, 59072-970 Natal - RN, Brasil
e-mail: cbarboza@cb.ufrn.br

Recebido: 24/08/2012

Aprovado: 03/12/2012