

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA E PRÓTESE DENTÁRIA

**A INFLUÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO NAS
CÉLULAS MESENQUIMAIS
INDIFERENCIADAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL DE HUMANOS – ANÁLISE
COMPARATIVA *IN VITRO***

Rodrigo Gadelha Vasconcelos

Natal/ RN

2011



Rodrigo Gadelha Vasconcelos

**A INFLUÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO NAS
CÉLULAS MESENQUIMAIS
INDIFERENCIADAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL DE HUMANOS – ANÁLISE
COMPARATIVA *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós- Graduação em Odontologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, com área de concentração em Periodontia e Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza

Natal – 2011

DEDICATÓRIA

*Dedico a realização deste sonho, a **minha família**, principalmente aos meus pais, pela presença constante em minha vida com todo amor e carinho, que me fez vencer mais uma etapa com êxito. Aos seus conselhos e orientações que me fazem tornar um homem correto e digno e a lutar sempre pelos meus ideais.*

*À **Lucila**, pelo seu amor e por está sempre ao meu lado alegrando a minha vida dividindo os momentos felizes e me apoiando nos momentos difíceis.*

Vocês estão guardados no meu coração... Acima de tudo vocês, realmente, são os meus verdadeiros amigos.

Amo todos vocês!

“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.”

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

*Obrigado meu **Deus**, por estás tão presente em minha vida!*

Obrigado, por me fazer encontrar a paz e me doar forças em momentos de tristeza e desânimo; enfim sei que és a luz do meu caminho e enquanto confiar em ti continuarás sendo concreto para mim!

*Obrigado **Nossa Senhora Maria Auxiliadora**, pela realização deste sonho que eu tive ousadia em sonhar; pelo meu constante desenvolvimento pessoal e profissional; por todas as decisões certas que tomei quando pensava em ti; por todos os obstáculos vencidos; por me manter alerta e por me fazer acreditar, no valor que tenho, tornando-me forte e capaz com uma enorme coragem para sempre querer vencer...*

“Acorde todas as manhãs com um sorriso... Acredite, seu valor está em você mesmo. Não se deixe vencer, não seja igual, seja diferente. Se nos deixarmos vencer, não haverá surpresas, nem alegrias...”

(Roberto Shinyashiki)

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza**, pelos seus ensinamentos, entusiasmo e incentivos dedicados a minha pessoa; pela confiança depositada em meu trabalho tanto na pesquisa quanto na iniciação à docência.*

Obrigado por todo tempo a mim despendido, pela tolerância e paciência...

Obrigado por me compreender, me estimular e me enriquecer com sua presença e seu saber!

O trabalho foi árduo e difícil, mas enfim, juntos vencemos! Meus agradecimentos...

*Ao chefe do departamento de Odontologia da UFRN, **Prof. Dr. Antônio Ricardo Calazans Duarte**, por me ter apoiado, incentivado e acreditado que eu era capaz de ser aprovado no mestrado, pela atenção e ajuda na minha pesquisa.*

*À pro-reitora de pós-graduação **Profa. Dra. Edna Maria da Silva**, pela sua atenção, sinceridade e colaboração durante os dois anos de mestrado. Sinceramente, muito obrigado!*

*Aos alunos de iniciação científica do curso de Biomedicina da UFRN, **Fernanda Ginani e Redson Paulo** pelos ensinamentos, disponibilidade de tempo e paciência para a realização deste trabalho.*

*Ao Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais do Brasil - **REUNI**, pela assistência prestada ao ensino, pelo estímulo e capacitação aos alunos tornando-os aptos a futuros professores; e pelo apoio financeiro proporcionado para elaboração deste ensaio científico.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pela oportunidade e pelo apoio financeiro proporcionado para elaboração deste ensaio científico.

Ao Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, pelo apoio, amizade e confiança, além do espaço e estrutura cedidos no laboratório de cultura de células do Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências da UFRN, para o cultivo celular.

*Aos meus colegas de turma, pela convivência amigável e alegre durante todo o curso. Em especial ao amigo **Rodrigo Ribeiro Alves** por dedicar grande parte do seu tempo para a realização desta pesquisa.*

*Aos meus amigos do laboratório de cultivo de células em especial a **Raniere e Ruth**, pela convivência amigável e alegre e ajuda prestada durante a realização dos experimentos deste estudo.*

*Aos Professores **Dra. Ruthnéia Diógenes Alves Uchoa** e **Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura**, pela participação na banca de qualificação, o que contribuiu para a qualidade desta dissertação.*

*Ao Prof. Dr. **Kênio Costa Lima**, pela contribuição na análise estatística deste trabalho.*

*Aos **Professores, alunos de Residência e da graduação** das disciplinas de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais do departamento de Odontologia da UFRN, pela atenção disponibilizada durante o processo de obtenção das amostras.*

*À **TODOS** os **professores** que fizeram parte do programa de pós graduação em Odontologia da UFRN, que contribuíram com o seus conhecimentos.*

*Ao Laboratório de Cronobiologia do Departamento de Morfologia da UFRN, na pessoa da **Prof. Dra. Miriam Stela Maris de Oliveira Costa**, pelo armazenamento das células utilizadas neste trabalho.*

*Aos funcionários **Canidé, Ana Cristina, Márcia, Rosário, Sandra Abrantes, Ocian, Socorro, Melina e Cecília** agradeço ao apoio, a paciência, ao auxílio e a disponibilidade que a mim prestaram ao longo desta caminhada para a concretização deste trabalho. Obrigado pelas manifestações de carinho e confiança!! Sou grato a todos vocês!!*

*Enfim, agradeço à **todos** que torceram por mim!*

RESUMO

A criopreservação é um processo em que células ou tecidos biológicos são preservados através do congelamento a temperaturas muito baixas e objetiva cessar reversivelmente, de forma controlada, todas as funções biológicas dos tecidos vivos; ou seja, manter a preservação celular de maneira que esta possa recuperar-se com alto grau de viabilidade e integridade funcional. Este trabalho se propôs avaliar *in vitro* a influência da criopreservação nas células mesenquimais indiferenciadas procedentes do ligamento periodontal de terceiros molares humanos. Para tanto, foram utilizados 6 dentes sadios os quais tiveram as referidas células removidas e cultivadas em meio de cultura α -MEM contendo antibióticos e suplementado com 15% de FBS, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37° C. As células isoladas de cada amostra foram divididas em dois grupos: Grupo I – cultivo celular imediato (células frescas não criopreservadas) e Grupo II – criopreservação celular, durante um período de 30 dias. As análises dos índices de adesão e proliferação celular nos diferentes grupos foram realizadas através das contagens das células aderidas às superfícies dos poços de cultivo celular, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após o início do cultivo. O número de células em cada poço foi obtido pela contagem das células viáveis através do uso do hemocítômetro e o método de exclusão das células coradas pelo azul de trypan. A diferença entre os grupos para cada um dos tempos foi analisada pelo teste de Wilcoxon. Em relação à evolução temporal para cada um dos grupos, a análise foi feita pelo teste de Friedman para verificar a existência de diferença entre os tempos e, quando ela existiu, foi aplicado o teste de Wilcoxon com penalização. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos analisados neste estudo. Portanto, conclui-se que o processo de criopreservação, após um período de 30 dias, não exerceu influência no tipo celular estudado; não havendo, portanto, nenhuma diferença na capacidade de crescimento *in vitro* entre os grupos.

Palavras Chaves: Criopreservação; Cultura de células; Dentes; Ligamento periodontal; Células mesenquimais indiferenciadas.

ABSTRACT

Cryopreservation is a process where cells or biological tissues are preserved by freezing at very low temperatures and aims to cease reversibly, in a controlled manner, all the biological functions of living tissues, i.e., maintain cell preservation so that it can recover with high degree of viability and functional integrity. This study aimed to evaluate the influence of cryopreservation on the mesenchymal stem cells originating from the periodontal ligament of human third molars by *in vitro* experiments. Six healthy teeth were removed and the periodontal cells grown in culture medium containing α -MEM supplemented with antibiotics and 15% FBS in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37° C. Cells isolated from each sample were divided into two groups: Group I - immediate cell culture (not fresh cryopreserved cells) and Group II - cell cryopreservation, during a period of 30 days. Analyses of rates of cell adhesion and proliferation in different groups were performed by counting the cells adhered to the wells, in intervals of 24, 48 and 72 hours after the start of cultivation. The number of cells in each well was obtained by counting viable cells with the use of hemocytometer and the method of exclusion of cells stained by trypan blue. The difference between groups for each of the times was analyzed by Wilcoxon test. Regarding the temporal evolution for each group, analysis was done by Friedman's test to verify the existence of differences between times and, when it existed, the Wilcoxon penalty was applied. The results showed no statistically significant difference between the two groups analyzed in this study. Therefore, we conclude that the cryopreservation process, after a period of 30 days, did not influence the cell type studied, and there was no difference in growth capacity *in vitro* between the groups.

Keywords: Cryopreservation; Cell culture; Teeth; Periodontal ligament; Undifferentiated mesenchymal cells

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Elemento dentário extraído armazenado em tubos tipo Falcon de 50 mL.

Figura 2. Tubo tipo Falcon de 50 mL contendo o elemento dentário extraído, mantido em condição hipotérmica.

Figuras 3 e 4. Raspagem do ligamento periodontal.

Figura 5. Filtro de 70 μm acoplado em um tubo tipo Falcon de 50 mL.

Figura 6. Tubo tipo Falcon de 50 mL após a centrifugação a 1200 rpm durante 5 minutos. As células precipitadas (em destaque na seta amarela) foram ressuspensas e cultivadas.

Figura 7. Câmara de Neubauer (hemocitômetro).

Figura 8. Cultivo das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal mostrando o grupo controle (lado esquerdo) e o grupo experimental (lado direito).

Figura 9. Box-plot do padrão de crescimento (adesão e proliferação) das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos cultivadas de imediato nos três intervalos de tempo estudados. Os intervalos de tempo estão apresentados em horas e as quantidades celulares em LOG_{10} .

Figura 10. Box-plot do padrão de crescimento das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos cultivadas após a criopreservação nos três intervalos de tempo estudados. Os intervalos de tempo estão apresentados em horas e as quantidades celulares em LOG_{10} .

Figura 11. Box-plot da análise comparativa da adesão e proliferação entre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos frescas e criopreservadas para o tempo de 24 horas. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados. As quantidades de células estão apresentadas em LOG_{10} .

Figura 12. Box-plot da análise comparativa da adesão e proliferação entre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos frescas e criopreservadas para o tempo de 48 horas. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados. As quantidades de células estão apresentadas em LOG_{10} .

Figura 13. Box-plot da análise comparativa da adesão e proliferação entre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos frescas e criopreservadas para o tempo de 72 horas. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados. As quantidades de células estão apresentadas em LOG_{10} .

Figura 14. Curva de crescimento das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal dos terceiros molares humanos frescas e criopreservadas em diferentes intervalos de tempo. Os intervalos de tempo estão apresentados em horas e a quantidade de células em LOG_{10} .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise da quantidade (em LOG_{10}) de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos cultivadas de imediato. Natal/RN, 2010.

Tabela 2. Análise da quantidade (em LOG_{10}) de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos cultivadas após a criopreservação. Natal/RN, 2010.

Tabela 3. Análise comparativa da adesão e proliferação entre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos frescas e criopreservadas. Valores expressos em LOG_{10} . Natal/RN, 2010.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ALP- Fosfatase alcalina (expressão)
- α -MEM - Meio essencial mínimo tipo alfa
- β -FGF- Fator de crescimento fibroblástico beta
- °C - Grau Celsius
- °C/min - Grau Celsius por minutos
- CD - Marcador de superfície celular
- cm - Centímetro
- cm² - Centímetro quadrado
- CO₂ - Gás carbônico
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- dp - desvio padrão da média
- EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EG- Etileno Glicol
- EGF- Fator de crescimento epidérmico
- FBS - Soro fetal bovino
- Flk-1 - Anticorpo de superfície celular
- g - Grama
- GFAP - Proteína glial ácida fibrilar
- HA/TCP - Carreador de células-tronco mesenquimais
- IGFI - Fator de crescimento presente nas plaquetas
- KH₂PO₄ - Dihidrogenofosfato de potássio
- LOG₁₀ – Logaritmo na base 10 (decimal)

- M - Molar
- MEV - Microscopia eletrônica de varredura
- mg/L - Miligramas por litro
- mg/mL - Miligramas por mililitro
- MHC Classe I - Complexo de imunohistocompatibilidade I
- MHC Classe II - Complexo de imunohistocompatibilidade II
- min. - Minutos
- mL- Mililitro
- mm - Milímetro
- mm² - Milímetro quadrado
- mM - Milimolar
- mmol/L- Milimolar por litro
- mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
- µl - Microlitro
- µm - Micrômetros
- µg/ml - Microgramas por mililitro
- NFM - Neurofilamento M
- PBS - Tampão fosfato-salino
- PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular
- PDGF - Fator de crescimento presente nas plaquetas
- PG - Propilenoglicol
- pH - Potencial hidrogeniônico
- PRP - Plasma rico em plaquetas
- P1 - Primeira passagem (subcultivo) celular
- P3 - Terceira passagem (subcultivo) celular

- rpm - Rotação por minuto
- RTG - Regeneração tecidual guiada
- RT-PCR - Transcriptase reversa da reação em cadeia do DNA-polimerase
- SH2 (CD105) - Molécula de superfície celular
- SH3 - Molécula de superfície celular
- SH4 - Molécula de superfície celular
- Slug - Fator de transcrição associado à crista neural
- STRO-1 - Marcador de superfície de células-tronco mesenquimais
- Sox 2 - Fator de transcrição associado à crista neural
- Sox 9 - Fator de transcrição associado à crista neural
- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TGF- β - Fator de crescimento presente nas plaquetas
- Twist - Fator de transcrição associado à crista neural
- U.I. - Unidades internacionais
- Vol. - Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Células-tronco ou progenitoras: generalidades.....	20
2.2 Células mesenquimais indiferenciadas adultas.....	22
2.3 Células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal.....	25
2.4 Engenharia Tecidual – Medicina Regenerativa – Terapia Celular.....	28
2.5 Criopreservação.....	32
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4. METODOLOGIA	43
4.1 Implicações éticas.....	43
4.2 Caracterização do estudo.....	43
4.2.1 Tipo do estudo.....	43
4.2.2 Desenho do estudo.....	43
4.3 População.....	43
4.4 Amostra.....	44
4.4.1 Critérios de inclusão.....	44
4.4.2 Critérios de exclusão.....	44
4.5 Local da pesquisa.....	44
4.6 Obtenção e processamento dos elementos dentários.....	45
4.7 Extração das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal...	45
4.8 Cultivo das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal....	47
4.9 Contagem das células em Câmara de Neubauer.....	48
4.10 Delineamento do Estudo.....	49
4.11 Criopreservação das células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamentoperiodontal.....	50
4.12 Análise do índice de adesão e proliferação celular.....	50
4.13 Análise e estatística.....	51
5. RESULTADOS	52
5.1 Adesão e proliferação celular.....	52

5.1.1 Células Frescas (cultivadas de imediato após a sua obtenção).....	52
5.1.2 Células Criopreservadas.....	53
5.2 Análise comparativa da adesão e proliferação celular entre os grupos estudados	55
5.3 Curva de crescimento nos diferentes grupos analisados.....	59
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	81

1. INTRODUÇÃO

As células mesenquimais indiferenciadas, ou células-tronco como são conhecidas, são células com elevada capacidade de auto-renovação e de produzir pelo menos um tipo celular altamente especializado. Existem duas categorias de células-tronco: as células-tronco embrionárias pluripotentes que são procedentes do embrioblasto durante a fase de blástula do embrião e que são capazes de originar todas as linhagens celulares do corpo; e a categoria de células multipotentes ou unipotentes, denominadas de células-tronco adultas, as quais possuem a capacidade de originar tipos celulares específicos (SOUZA et al, 2003; SOARES et al, 2007).

A maior vantagem do uso de células-tronco embrionárias deve-se a sua capacidade de proliferação e de diferenciação em diversos tipos celulares (plasticidade). Contudo, existem limitações, como a sua instabilidade genética, a obrigatoriedade de sua transplantação para hospedeiros imunocomprometidos, o risco de formação de teratomas e a questão ética. Já as células-tronco adultas apresentam a vantagem de serem autogênicas, não incorrendo em limitações morais e responsivas aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro. No entanto, também apresentam limitações, como o fato de não serem pluripotentes, a dificuldade de obtê-las, purificá-las e cultivá-las *in vitro*, além de apresentarem-se em menor quantidade nos tecidos (SONG et al, 2004; SOARES et al, 2007).

Os protocolos científicos têm atribuído grande destaque à engenharia de tecidos, um campo interdisciplinar cujos princípios de engenharia e ciências biológicas são utilizados para o desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de restaurar, manter ou melhorar a função (LANGER; VACANTI, 1993). A bioengenharia tem sido utilizada para a construção ou para regeneração dos tecidos danificados ou perdidos - decorrentes de doenças degenerativas, trauma, câncer ou doença periodontal - tais como o tecido ósseo e se baseia na terapia celular envolvendo o uso das células mesenquimais indiferenciadas associadas ou não aos biomateriais (SILVÉRIO et al, 2008).

A principal fonte de células-tronco adultas é a medula óssea. Essas células constituem uma pequena população celular que podem ser expandidas com eficiência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares em condições de cultura definidas. O interesse nesse tipo celular cresceu vertiginosamente nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados em virtude da sua elevada capacidade de diferenciação, o que demonstra sua alta plasticidade (PITTENGER et al, 1999; ROSADA et al, 2003; SHORT et al, 2003; BARRY; MURPHY, 2004).

Diversos estudos também têm isolado células mesenquimais indiferenciadas derivadas dos tecidos orais, tais como polpa dentária (GRONTHOS et al, 2000; SHI; ROBEY; GRONTHOS, 2001; GRONTHOS et al, 2002; MIURA et al, 2003; SHI; GRONTHOS, 2003; SLOAN; SMITH, 2007) e ligamento periodontal (SEO et al, 2004; AKIZUKI et al, 2005; CHEN et al, 2006; NAGATOMO et al, 2006; GRONTHOS et al, 2006). A identificação dessa população celular nos tecidos dentários tem estimulado o interesse no potencial regenerativo e na sua aplicabilidade na engenharia tecidual ou bioengenharia (LEON et al, 2007).

A necessidade de manter os órgãos vivos por um longo período de tempo sem perda da função celular levou ao estudo da criopreservação (OH et al, 2005). Até o presente momento, não está bem definido na literatura até que ponto os diversos tipos celulares conseguem manter a sua capacidade de diferenciação e propriedades morfofuncionais após um longo período de criopreservação. Essa informação torna-se importante para avaliar o seu potencial de armazenamento em longo prazo com vista à posterior utilização em terapias de regeneração tecidual (PAPACCIO et al, 2006; HUANG et al, 2010).

Devido ao importante papel das células mesenquimais indiferenciadas nos processos de reconstruções teciduais, incluindo a regeneração das estruturas periodontais, o presente estudo avaliou a influência da criopreservação nas células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos, através da capacidade de adesão e proliferação dessas células em um ensaio experimental *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células-tronco ou progenitoras: generalidades

O termo célula-tronco, em inglês *stem cell*, diz respeito às células precursoras que possuem a capacidade de diferenciação e auto-renovação ilimitadas, podendo originar uma variedade (múltiplas linhagens) de tipos teciduais (SOUZA et al, 2003). Elas podem ser encontradas nos tecidos embrionários ou extra embrionários (GRONTHOS et al, 2006).

Normalmente, entre uma célula-tronco e sua progênie totalmente diferenciada existe uma população intermediária conhecida como células amplificadoras transitórias, que possuem uma capacidade proliferativa mais limitada e um potencial de diferenciação restrito. A presença dessas células amplificadoras transitórias também explica como um tecido pode manter uma produção elevada de células diferenciadas a partir de um pequeno número de células-tronco. Como, normalmente, as células-tronco possuem um ciclo celular lento, muitas das células em divisão em um determinado tecido são células amplificadoras transitórias, que estão destinadas a se diferenciar após a um determinado número de divisões. Desse modo, a capacidade de divisão celular não é por si mesma, um indicador da condição de célula-tronco (SLACK, 2000).

Classicamente, as células-tronco são definidas com base em três de suas principais características: a) capacidade de auto-renovação, ou habilidade de gerar no mínimo uma célula-filha com características similares às da célula mãe; b) capacidade de uma única célula se diferenciar em múltiplas linhagens celulares; c) capacidade de reconstituir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado (VERFAILLIE, 2002). Essas características foram demonstradas nas células-tronco hematopoéticas e nas células-tronco embrionárias, mas com o avanço da ciência, outras células foram isoladas e conceituadas como células-tronco, mesmo sem compartilhar todas essas propriedades, como as células-tronco mesenquimais (PRATA, 2006).

Outros autores como, Cai; Weiss; Rao, (2004), definem as células-tronco como populações de células que se auto-renovam por divisão simétrica ou assimétrica ou que são capazes de se diferenciarem em múltiplos tipos de células especializadas, sem serem tão rigorosos quanto aos critérios de auto-renovação ilimitada e substancial contribuição para o tecido em desenvolvimento.

Quanto ao seu potencial de diferenciação, as células-tronco podem ser subclassificadas em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As totipotentes, em condições propícias diferenciam-se nas membranas e tecidos extra-embrionários, no embrião e em todos os tecidos e órgãos fetais, ou seja, são capazes de gerar todos os tipos celulares necessários à formação de um novo indivíduo, podem ser identificadas na célula ovo ou zigoto. As pluripotentes possuem a capacidade de originar as células dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), ou seja, qualquer célula do organismo, mas são incapazes de gerar um novo indivíduo (VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002). Já as multipotentes possuem a capacidade de gerar apenas alguns tipos celulares do indivíduo, dependendo de sua origem; podem se diferenciar em quatro ou mais linhagens celulares (ex.: células-tronco mesenquimais e células-tronco hematopoéticas). Também podem ser tri, bi ou unipotentes se originarem três, dois ou apenas um tipo celular, respectivamente (YOUNG; BLACK Jr., 2004).

Classicamente, as células totipotentes ou pluripotentes são de origem embrionária enquanto as células multipotentes ou unipotentes são encontradas no feto, na criança e no adulto (PRATA, 2006). Em relação à origem, considera-se como célula-tronco embrionária aquela que constitui a massa interna do blastocisto (embrioblasto) e que pode ser removida e cultivada em laboratório. Essa pode se proliferar indefinidamente, mantendo o seu potencial de diferenciação em todos os tecidos do organismo em desenvolvimento (DALEY; GOODELL; SNYDER, 2003).

Atualmente, não há estudos de terapia celular utilizando as células-tronco embrionárias humanas. Três características tornam essas células mais atrativas do que as células-tronco adultas: a) podem crescer indefinidamente em cultura; b) podem ser geneticamente manipulada mais facilmente, o que permite a correção, pela introdução de transgenes, da perda de genes funcionais; c) podem gerar quase todos os tipos celulares, apresentando aplicação potencial em inúmeras doenças (WOBUS; BOHELER, 2005).

Sabe-se que as células-tronco podem permanecer em estado quiescente até a fase adulta, através da auto-replicação, ou diferenciar-se em diversos tecidos a partir da expressão de determinados genes e exercerem funções específicas. Essas células podem ser utilizadas na terapia de várias doenças, cujos resultados obtidos até então são bastante promissores, o que faz acreditar que as células-tronco representem a terapia do futuro, podendo significar fontes promissoras na regeneração dentino-pulpar, periodontal, óssea, bem como para a cura de determinadas doenças, tais como diabetes, cardiopatias, câncer e mal de Alzheimer e ainda no desenvolvimento de novos dentes (SOARES et al, 2007).

No ser humano, a medula óssea é a principal fonte de células-tronco adultas. Mas, as células-tronco mesenquimais também já foram isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como a medula óssea vertebral (AHRENS et al, 2004), ligamento periodontal (SEO et al, 2004), pulmão (SABATINI et al, 2005), dentre outros como polpa dentária (PAPACCIO et al, 2006), papila apical (DING et al, 2010), cordão umbilical e placenta (SABATINI et al, 2005).

As células-tronco (mesenquimais indiferenciadas) podem se diferenciar em osteoblastos e promover mineralização quando cultivadas na presença de ácido ascórbico, betaglicerol fosfato e dexametasona (MAEDA et al, 2007). Elas adquirem morfologia de osteoblastos após um período de 14 a 21 dias (KIM et al, 2004) com aumento da atividade da fosfatase alcalina, deposição de uma matriz extracelular rica em cálcio (BARRY; MURPHY, 2004) e formação de cristais de hidroxiapatita (BARRY, 2003).

2.2 Células mesenquimais indiferenciadas adultas

Células-tronco mesenquimais ou células mesenquimais indiferenciadas adultas são células multipotentes capazes de originar células mesodérmicas, que irão fazer parte da estrutura óssea, da cartilagem, do tendão, do tecido adiposo e muscular, fazendo com que sejam candidatas promissoras a engenharia tecidual para a reparação dos tecidos maxilofaciais perdidos ou danificados. Até o momento, as células-tronco mesenquimais foram isoladas de um grande número de tecidos adultos. Essas células-tronco pós-natal, conhecidas como células-tronco adultas, foram isoladas e caracterizadas a partir de uma ampla variedade de tecidos, e o seu potencial de diferenciação pode refletir em seu meio ambiente local. Sabe-se que as células-tronco mesenquimais apresentam expressão variável de inúmeras moléculas de superfície celular, como SH2 (CD105), SH3, SH4, CD44 e STRO-1. No entanto, nenhum desses epítomos é considerado marcador específico de células-tronco, pois eles também foram detectados em outras células mesenquimais, endoteliais e epiteliais. Por outro lado, as células-tronco mesenquimais que não expressarem marcadores de superfície típicos de células hematopoiéticas, ou seja, CD34, CD45 e CD14 não são consideradas como sendo células-tronco mesenquimais. Até o momento, nenhum marcador único que definitivamente designe as células-tronco mesenquimais *in vivo* foi identificado, levando a significativa controvérsia (SHANTI et al, 2007).

A aplicabilidade clínica das células-tronco mesenquimais é reforçada por suas propriedades imunológicas. Elas são geralmente descritas como não imunogênicas, com base

em seus fenótipos MHC Classe I, MHC Classe II, CD40, CD80 e CD86. Vários grupos de células-tronco mesenquimais foram co-cultivados *in vitro* com linfócitos T e relataram o papel do fenótipo na indução de tolerância imunológica. O mecanismo desta imunossupressão ainda permanece incerto (SHANTI et al, 2007).

Pagliosa e Alves (2007) relataram os efeitos positivos das células mesenquimais indiferenciadas na recuperação óssea em fraturas. Elas foram capazes de recrutar fatores de crescimento ao foco da fratura, estimulando, assim, o recrutamento adicional de outras células mesenquimais indiferenciadas presentes no tecido ósseo (JAVAZON et al, 2004). Apesar dessa capacidade, a ação osteogênica das células mesenquimais indiferenciadas, quando combinadas com fatores de crescimento em enxertos ósseos, apresentaram-se mais eficiente (BARRY; MURPHY, 2004). Por outro lado, o ambiente tissular ou molecular desfavorável pode inibir ou mesmo alterar a função osteogênica das células mesenquimais indiferenciadas, estimulando-as à produção de cicatriz (STOCUM, 2001).

Em fraturas, as células mesenquimais indiferenciadas atuam na recuperação óssea através da formação de calo ósseo por meio da osteoindução. Acredita-se que essas migram para o foco de fratura, na qual se diferenciam em condroblastos e osteoblastos, especialmente em resposta ao estímulo dos fatores de crescimento (MARTINEZ; WALKER, 1999; REMEDIOS, 1999).

Kadiyala; Jailswal e Bruder (1997) avaliaram o efeito da utilização de células-tronco mesenquimais cultivadas de ratos transportadas em um carreador de HA/TCP e implantadas em defeitos críticos criados em fêmures de ratos, em intervalos de quatro e oito semanas. Passadas quatro semanas, os defeitos apresentaram um preenchimento ósseo de 20%, chegando a 40% no período de oito semanas. Esses resultados foram superiores aos observados em sítios controles, que receberam apenas o carreador, os quais demonstraram preenchimentos em menos de 10% e 17%, respectivamente. Os autores do estudo sugerem que as células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas para estimular o reparo de defeitos ósseos.

Kraus e Kirker-Head (2006) utilizaram cães como modelo animal para avaliar a cicatrização de defeitos segmentários em fêmures. Os autores criaram um defeito com 21 mm e fixaram o mesmo com placas de alongamento, com intuito de provocar uma união não-atrôfica. Após 16 dias da criação do defeito, células-tronco mesenquimais foram colhidas dos animais, isoladas e cultivadas. Após cultura, essas células foram colocadas em cilindros de hidroxiapatita e implantadas no fêmur dos cães dos quais elas haviam sido colhidas. A adição

de células-tronco mesenquimais resultou em estímulo para neoformação óssea em áreas adjacentes ao implante.

A explicação relevante para a regeneração tecidual após aplicação de células-tronco deve-se a liberação de citocinas e fatores tróficos no local da lesão. A maioria das células-tronco apresentam a capacidade de identificarem e migrarem até o local lesionado, demonstrando o seu potencial de responder a fatores quimiotáticos (liberados pelo tecido lesionado). Existem ainda evidências de que essas células, por sua vez, podem ser capazes de liberar outras moléculas em resposta aos estímulos quimiotáticos recebidos. Há várias hipóteses quanto às supostas funções de tais fatores na lesão, dentre elas: liberação de moléculas que previnem a morte celular, recrutamento de células-tronco adjacentes do próprio tecido (com subsequente diferenciação), interferência na inflamação provocada pelo dano tecidual (modulando a resposta do sistema imune), suporte de moléculas ou enzimas que suprem defeitos metabólicos (SCHWINDT et al, 2005).

Nesse contexto, supõe-se que as células-tronco permaneçam quiescentes (sem se dividirem) nos tecidos que constituem seu habitat, até que sejam ativadas por doenças, inclusive tumores ou traumatismos, e também para fazer a reposição de células “gastas” no organismo ao longo da vida através da liberação no sangue circulante de células progenitoras, que seriam mobilizadas para os locais onde se fizessem necessárias. Essa mobilização seria feita por substâncias liberadas no local da lesão (ASAHARA et al, 1999).

Modelos experimentais de defeitos ósseos tratados com células-tronco mesenquimais têm demonstrado que ambientes biológicos e mecânicos favoráveis resultaram em proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos e condrócitos, e que a presença de células-tronco em defeitos ósseos experimentais diminuíram o tempo de cicatrização dos defeitos (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

Quatro tipos de células-tronco dentárias já foram isoladas e caracterizadas: células-tronco da polpa dentária, células-tronco de dentes decíduos esfoliados, células-tronco da papila apical e células-tronco do ligamento periodontal. Todas, à exceção das células-tronco dos dentes decíduos esfoliados, são provenientes de dentes permanentes. Essas células-tronco dentárias são consideradas como células-tronco mesenquimais e possuem diferentes níveis de capacidade para se tornar um determinado tecido. Quando cultivada em culturas e induzidas sob condições específicas, elas podem se diferenciar em neurônios, células adiposas e odontoblastos. Alguns estudos, como os de Seo et al. (2004), Nagatomo et al. (2006) e Zang et al. (2006), mostram que essas células apresentam potencial condrogênico e osteogênico, entretanto em menor grau quando comparado com as células-tronco da medula óssea. As

células-tronco da papila apical e do ligamento periodontal são capazes de formarem uma estrutura semelhante a da raiz, quando semeadas em arcabouço de hidroxiapatita (HUANG, 2008).

Assim, observa-se que as células-tronco de origem dentária podem, potencialmente, ser utilizadas para a regeneração dos tecidos do complexo dentino-pulpar e periodontal. Mais importante ainda, a identificação dessas células fornece uma melhor compreensão da biologia pulpar e do ligamento periodontal como potencial de regeneração após uma lesão tecidual (HUANG, 2008).

2.3 Células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal

O ligamento periodontal ou desmodonto é a parte do periodonto originado do folículo dentário responsável pela inserção dos dentes (através do cimento) no osso alveolar circunjacente, estabelecendo, desta maneira, uma articulação (gonfose) entre ambos. Trata-se de um tecido conjuntivo frouxo não mineralizado interposto entre os dois constituintes mineralizados do periodonto de inserção, isto é, o cimento e o osso alveolar. Suas fibras, periodontais, as quais formam uma verdadeira malha dispostas em várias direções se estendem desde o cimento aderido firmemente aos dentes até o osso alveolar; na qual está ancorada fortemente através da sua porção mineralizada - as fibras de Sharpey. O ligamento periodontal apresenta a função de: suporte (sustentação do dente no alvéolo), proteção (alojamento de vasos e nervos protegendo-os), sensibilidade (propriocepção), nutrição (vascularizado), homeostase, reparo (função formativa/remodeladora) e ainda tem a propriedade de amortecer e transmitir as forças mastigatórias ao osso (ARANA; KATCHBURIAN, 2004; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2008).

No ligamento periodontal do dente formado existe uma população de células ectomesenquimais (células mesenquimais indiferenciadas) que permite diferenciação, quando necessário, em novas células de natureza conjuntiva. Estruturalmente, por serem células muito pequenas e fusiformes, apresentam aspecto de fibroblastos inativos localizando-se próximos aos vasos sanguíneos. É provável que essas células originadas a partir do espaço endosteal do osso alveolar (CHEN et al, 2006), continuem como precursoras dos fibroblastos do ligamento, bem como cementoblastos e osteoblastos no dente formado; podendo diferenciar-se em qualquer das células do tecido caso as populações celulares sejam danificadas (ARANA; KATCHBURIAN, 2004; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2008).

O conceito de que células mesenquimais indiferenciadas podem estar presentes no ligamento periodontal foi inicialmente proposto por Melcher, em 1976, ao observar que essas células presentes no ligamento periodontal eram capazes de formarem fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos. A partir de então, a capacidade regenerativa das células do ligamento periodontal tem sido pesquisada através de vários estudos (BARTOLD; SHI; GRONTHOS, 2006; SOARES et al, 2007; CHEN et al, 2010).

Células-tronco adultas multipotentes têm sido isoladas de vários tecidos não neurais. Techawattanawisal et al. (2007) relataram pela primeira vez o isolamento de células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal com características de células-tronco neurais primitivas. Células mesenquimais multipotentes do ligamento periodontal de ratos foram cultivadas utilizando sistema de cultura formadora de neuroesferas. As células foram dissociadas enzimaticamente e cultivadas em meio básico livre de soro contendo EGF e β -FGF. Esferas livres expressando GFAP e vimentina foram formadas em sete dias de cultura. Em adição, as esferas expressaram RNAm de fatores de transcrição associados à crista neural: *Twist*, *Slug*, *Sox 2* e *Sox 9*. As esferas derivadas do ligamento periodontal diferenciaram-se em miotubos multinucleados, células semelhantes a neurônios NFM-positivas, células semelhantes à astrócitos e a oligodentrócitos. A análise da formação de colônias de metilcelulose revelou que uma simples célula do ligamento periodontal poderia formar uma esfera numa frequência de aproximadamente 0,01% do total de células. Esses dados indicam que as esferas derivadas do ligamento periodontal contêm células-tronco adultas multipotentes capazes de se diferenciarem em ambas as linhagens, neural e mesodermal, sugerindo que o ligamento periodontal pode ser uma nova fonte de células-tronco adultas multipotentes, e que elas possam ser utilizadas no tratamento de várias doenças tais como doenças neuronais degenerativas e distrofia muscular.

Seo et al. (2004) sugeriram a hipótese de que o ligamento periodontal poderia apresentar células indiferenciadas multipotentes e que essas células poderiam ser utilizadas para regenerar cemento e ligamento periodontal *in vivo*. Os autores isolaram células do ligamento periodontal de terceiros molares extraídos de humanos e analisaram através da imunohistoquímica, objetivando identificar marcadores de células-tronco. Quando foram transplantadas em ratos imunocomprometidos, as mesmas mostraram a capacidade de formar estruturas como cemento e ligamento periodontal, contribuindo, desta forma, para o reparo tecidual periodontal. Os resultados da pesquisa mostraram que células do ligamento periodontal expressaram os marcadores de células-tronco mesenquimais: STRO-1 e CD146/MUC18.

Nagatomo et al. (2006) isolaram células do ligamento periodontal de pré-molares e terceiros molares extraídos de humanos a fim de verificar as propriedades de renovação, multiplicação e a expressão dos marcadores dessas células. Análise de fluorescência ativada revelou que essas células expressaram marcadores de células-tronco CD105, CD166, e STRO-1. Os resultados foram fortemente sugestivos de que as células do ligamento periodontal incluem células-tronco mesenquimais juntamente com outras células progenitoras.

Adicionalmente, Chen et al. (2006) realizaram um estudo com o objetivo de identificar e localizar células indiferenciadas no ligamento periodontal humano sadio e doente usando marcadores de superfície celular para células mesenquimais (STRO-1, CD146 e CD44). Para isso, os dentes afetados pela doença periodontal e os sadios foram coletados, fixados em formol a 10%, descalcificados e embutidos em parafina para análise imunohistoquímica. Anticorpos contra STRO-1, CD146 e CD44 foram usados para identificar células-tronco no ligamento periodontal. Os resultados mostraram que células mesenquimais indiferenciadas foram identificadas tanto no ligamento de periodonto sadio quanto no doente.

Gay; Chen e Macdougall (2007) realizaram um estudo cujas células do ligamento periodontal de humanos foram isoladas, marcadas para STRO-1 e separadas em meio de cultura com o objetivo de analisar a sua capacidade de diferenciação em osso, cartilagem e tecido adiposo. Células da medula óssea foram usadas como controle nas mesmas condições de cultivo e indução. Os autores concluíram que entre as células do ligamento periodontal também estão presentes células mesenquimais com potencial de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos, semelhantes às células-tronco da medula óssea.

A fim de identificar e localizar células mesenquimais indiferenciadas em biópsias (em bloco) e em cultura de expansão celular dos tecidos periodontais humanos regenerados, Lin et al. (2008) utilizaram a técnica de regeneração tecidual guiada com membranas em defeitos de furca e em superfície dentária de terceiros molares de voluntários humanos. Após o período de cicatrização de seis semanas, os dentes e os tecidos ao seu redor (tecidos regenerados, incluindo o osso alveolar) foram removidos cirurgicamente para o preparo das amostras em bloco, as quais foram processadas para análise imunohistoquímica e para a obtenção de células para cultura. Os marcadores de células-tronco mesenquimais STRO-1, CD146 e CD44 foram utilizados para a identificação das referidas células. Culturas celulares obtidas dos tecidos regenerados foram analisadas pela citometria de fluxo e os resultados revelaram positividade para tais marcadores. A mineralização, a concentração de cálcio e o potencial adipogênico das células dos tecidos regenerados foram identificados e comparados com aqueles das células mesenquimais do ligamento periodontal, das células-tronco da medula

óssea e dos fibroblastos gengivais. Os resultados evidenciaram a capacidade destes tecidos formarem depósitos minerais e adipócitos. Entretanto, o nível de mineralização das células do tecido regenerado foi mais baixo do que o das células mesenquimais do ligamento periodontal e das células-tronco da medula óssea.

Akizuki et al. (2005), em um estudo piloto, isolaram e cultivaram células do ligamento periodontal de pré-molares extraídos de cães e, posteriormente, aplicaram essas células juntamente com condutor de ácido hialurônico em cinco defeitos ósseos produzidos cirurgicamente nas superfícies mesiais das raízes dos primeiros molares mandibulares de uma hemi-arcada de cada cão. A outra hemi-arcada foi utilizada como grupo controle, em que foram criados os mesmos defeitos e neles aplicados apenas o condutor de ácido hialurônico. Após oito semanas, os animais foram sacrificados e os espécimes preparados a fim de avaliar histologicamente e histometricamente a cicatrização dos defeitos periodontais. Os resultados mostraram ausência de inflamação clínica ou recessão gengival em ambos os lados. No grupo experimental, foi observada a cicatrização periodontal com formação de osso, ligamento periodontal e cemento em três dos cinco defeitos, enquanto no grupo controle não foi constatado a formação de tecido periodontal, exceto em, apenas, um defeito. A análise histométrica revelou que a formação de novo cemento no grupo experimental foi bastante significativa quando comparada à do grupo controle. Os autores concluíram que as células do ligamento periodontal têm o potencial de promover regeneração tecidual, sendo assim de grande importância para a terapia regenerativa.

Células-tronco multipotentes que residem nos espaços perivasculares da polpa madura, do ligamento periodontal ou da medula óssea têm o potencial de se diferenciarem em fibroblastos maduros, cementoblastos e osteoblastos para a regeneração funcional dos tecidos periodontais. Progressos nas técnicas de expansão de células-tronco e o controle de sua linhagem em vários tipos de células acabarão por levar ao desenvolvimento de células-tronco imunocompatíveis para a regeneração dos tecidos periodontais (CHEN; JIN, 2010).

2.4 Engenharia Tecidual – Medicina Regenerativa – Terapia Celular

Nos últimos anos uma nova área da medicina, chamada medicina regenerativa, vem sendo desenvolvida possibilitando perspectivas inovadoras para o tratamento de doenças crônico-degenerativas. Ela possibilita a utilização de células, biomateriais e fatores de

proliferação e diferenciação celular permitindo, desta maneira, que o próprio organismo seja capaz de reparar tecidos e órgãos lesados. Alguns dos alvos terapêuticos são órgãos considerados por muito tempo como incapazes de desenvolver quaisquer processos de reparação, como o cérebro e o coração. O princípio da terapia celular consiste em restaurar a função de um órgão ou tecido com a substituição das células perdidas por uma doença ou células que não funcionam adequadamente devido a um defeito genético, vascular ou iatrogênico por células saudáveis. As células-tronco mesenquimais estão sendo amplamente estudadas para tentar melhorar o tempo e a qualidade cicatricial de diversos tecidos, tanto em animais quanto em humanos (CORDEIRO et al, 2008; OLIVEIRA, 2008).

As condutas clínicas em relação aos defeitos teciduais resultantes das doenças periodontais representam um desafio médico e sócio-econômico. A concentração de esforços foi e ainda estão sendo feitas para acelerar e aumentar a regeneração óssea dos tecidos periodontais, incluindo uma série de procedimentos regenerativos cirúrgicos, o desenvolvimento de uma variedade de materiais de enxertia e a utilização de fatores de crescimento recombinante. Mais recentemente, estratégias de engenharia tecidual, incluindo novas matrizes celulares, estão sendo desenvolvidas, analisadas e utilizadas para terapias regenerativas periodontais (CHEN; JIN, 2010).

A engenharia de tecidos em periodontia aplica os princípios de engenharia e ciências biológicas para o desenvolvimento de técnicas biológicas que podem restaurar o osso alveolar, o ligamento periodontal e o cimento perdido na progressão da doença periodontal; é baseada na compreensão do processo de formação periodontal visando o crescimento de novos tecidos funcionais ao invés de novos substitutos para o periodonto. Embora a engenharia tecidual tenha caminhado ao encontro da criação de mais oportunidades para a regeneração dos tecidos periodontais, a técnica previsível e o projeto ideal, para estudos pré-clínicos e clínicos continuam em seus estágios iniciais. Até a data, a reconstrução de pequenos a moderados tamanhos de defeitos ósseos periodontais utilizando arcabouços celulares constitui-se tecnicamente viável, e alguns dos conceitos desenvolvidos atualmente podem representar alternativas para certos cenários clínicos ideais. No entanto, a reconstrução ideal da estrutura normal, a funcionalidade de um dente e aparelhos de apoio ainda continua difícil (CHEN; JIN, 2010).

A engenharia tecidual com células-tronco traz uma perspectiva importante de agregar qualidade aos materiais de substituição óssea, pois permite adicionar componente celular autólogo ao material e, com isso, conferir-lhe a propriedade osteogênica. Reside aqui, provavelmente, a maior perspectiva do uso clínico desta moderna tecnologia, surgindo como

uma alternativa de resolução para o paciente com enfermidade sem uma solução aparente. O ligamento periodontal e a polpa dentária representam uma fonte particularmente atrativa de células estromais (tronco) com potencial osteogênico para essa finalidade. Desta maneira, o ligamento periodontal tem sido de fundamental importância no processo de reparo e regeneração do periodonto, uma vez que apresenta células como cementoblastos, osteoblastos, miofibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e células nervosas, além de “células progenitoras” ou células mesenquimais indiferenciadas (células-tronco) que têm sido identificadas (IVANOVSKI et al, 2006).

Com os avanços, a medicina regenerativa vem alcançando bons resultados no desenvolvimento de materiais que estimulem a atividade osteoblástica do tecido ósseo adjacente. Entre estes materiais o plasma rico em plaquetas (PRP) tem se mostrado eficiente nas cirurgias orais, maxilofaciais e na implantodontia, principalmente quando associado à enxertos ósseos (AJEN, 2005).

O processo de reparo do periodonto de inserção (sustentação), destruído como resultado da progressão da doença periodontal, tem sido a meta principal da terapia periodontal. A regeneração periodontal busca a formação de novo cemento e novo osso alveolar além da nova inserção e reinserção das fibras do ligamento periodontal ao novo cemento e superfície radicular (BARTOLD et al, 2000). O objetivo principal da engenharia de tecidos periodontais é aproveitar a própria capacidade do corpo para se regenerar e tornar funcionalmente ativo os tecidos periodontais que fisiologicamente respondem a estímulos metabólicos, em vez de substituir o tecido com auto-enxertos, aloenxertos ou dispositivos metálicos que estão atualmente disponíveis no mercado (CHEN; JIN, 2010).

Desde a década de 70, inúmeras técnicas têm sido utilizadas a fim de interromper a progressão da doença e obter a reconstituição da arquitetura e função das estruturas de suporte perdidas. A terapia periodontal inclui raspagem e alisamento radicular, cirurgias para descontaminação e biomodificação da superfície radicular, enxertos, substitutos ósseos, biomateriais, fatores de crescimento e regeneração tecidual guiada (RTG) (POLIMENI; XIROPAIDIS; WIKESJO, 2006). Uma abordagem da regeneração óssea guiada utiliza a implantação de células-tronco no local afetado, sem a necessidade de enxertos ósseos, utilizando um biomaterial como veículo (BORDJI et al, 1996). A associação dos implantes de titânio com o tecido ósseo em cultura poderá contribuir para a engenharia tecidual dando ênfase ao sucesso na regeneração periodontal e osseointegração (FRANZOLIN et al, 2008).

Entretanto algumas dessas terapias são limitadas pela severidade da doença periodontal, tipo de defeito e por fatores locais e sistêmicos, dentre outros. Desta forma, busca-se uma nova terapia de reconstrução do periodonto destruído pela doença periodontal. Recentes técnicas de engenharia tecidual baseadas na biologia de células-tronco têm sido propostas para desenvolver tal terapia (NEEDLEMAN et al, 2006; GRONTHOS et al, 2006; FUJII et al, 2008).

Choi (2000) cultivou células do ligamento periodontal de cães e investigou se essas células eram capazes de formar uma nova inserção do ligamento periodontal quando utilizadas sobre a superfície de implantes de titânio. Os implantes com as células cultivadas do ligamento periodontal foram colocados nas mandíbulas dos cães. Após três meses de cicatrização, o exame histológico revelou que em algumas superfícies dos implantes, havia uma camada tecidual semelhante ao cimento, com inserção de fibras colágenas. Estes resultados demonstraram que as células cultivadas dos ligamentos periodontais podem formar tecidos semelhantes a um verdadeiro ligamento periodontal ao redor do titânio.

Trubiani et al. (2008) utilizaram células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal de humanos, as quais foram induzidas à osteogênese, semeadas em arcabouços tri-dimensionais biocompatíveis (esponja de fibrina, substitutos de derivados ósseos) e examinadas usando microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão. As observações morfológicas mostraram um crescimento extensivo da biomassa celular cobrindo parcialmente os arcabouços após quatro semanas de incubação no meio de mineralização. Esse resultado indicou que o ligamento periodontal pode se tornar, facilmente, uma eficiente fonte autóloga de células mesenquimais indiferenciadas com uma grande capacidade de expansão e habilidade de se diferenciarem em células osteogênicas, as quais podem colonizar e crescer quando conectadas a um arcabouço biocompatível.

A aquisição de uma fonte confiável de células teciduais para reparação é um grande desafio no campo da medicina regenerativa. Números significantes de células-tronco adultas diferenciadas e estáveis de origem fisiológica são frequentemente encontradas em tecidos do corpo. Entre estes, a polpa dentária é particularmente rica em células-tronco, assim tanto essas células quanto as células-tronco provenientes de dentes decíduos esfoliados de origem humana são capazes de produzir estroma ósseo em condições *in vitro*, que podem, particularmente, produzir osso tridimensional. Este tecido ósseo, após o transplante *in vivo*, é rapidamente remodelado em um osso lamelar (LAINO et al, 2005).

2.5 Criopreservação

O processo de criopreservação é conhecido há várias décadas e tem como objetivo cessar reversivelmente, de forma controlada, todas as funções biológicas dos tecidos vivos em uma temperatura ultra-baixa (por volta de -196°C). Durante esse processo é essencial que não se forme cristais de gelo intracelular. A contração das células durante o congelamento lento é resultante da saída de água intracelular, o que é essencial para a prevenção de lesões celulares durante o processo de congelamento. Agentes crioprotetores como dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol são eficazes contra as lesões celulares causadas pelo congelamento reduzindo (neutralizando) a formação de cristais de gelo intracelular e reduzindo, também, a osmolaridade das membranas celulares (TEMMERMAN et al, 2008). Como forma de evitar o congelamento intracelular, o tecido vivo deve ser resfriado lentamente, de forma suficiente para permitir que o seu teor de água aproxime-se do valor de equilíbrio antes que ele tenha atingido a sua temperatura de solidificação (OH et al, 2005).

O resfriamento das células a temperaturas pouco superiores a 0°C reduz o seu metabolismo sem eliminá-lo, de modo que elas continuam a sofrer o processo de deterioração progressiva em uma menor taxa de velocidade. Além disso, as várias vias metabólicas sofrem heterogeneamente as consequências das baixas temperaturas, isso se torna um fator adicional para a perda da viabilidade dessas células quando são mantidas a essas temperaturas por um período de tempo muito prolongado. Os efeitos mais conhecidos do resfriamento são: a diminuição da atividade da bomba de sódio, a mudança de fase dos lipídios de membrana (que podem interferir com a função das enzimas) e a precipitação de substâncias (que podem resultar em alterações na composição da solução e do seu pH). No entanto, quando o resfriamento ocorre de maneira rápida, podem ocorrer lesões e mortes celulares por mecanismos ainda mal estabelecidos. Além disso, o processo de congelamento por si só já implica em riscos para a manutenção da viabilidade celular (SANTIS; PRATA, 2009).

Supõe-se que esses mecanismos poderiam estar relacionados com o conteúdo de sais intracelulares ou com as características dos componentes das membranas celulares. Todos os tipos celulares apresentam limitações específicas quanto à sua estabilidade, quando se encontram em um meio anisotônico. A exposição celular em um meio hipertônico que exceder os limites de sua tolerância pode provocar alterações em sua membrana, particularmente no que diz respeito a permeabilidade, a integridade e a sua função. Cada tipo celular também apresenta um limite distinto de resistência quando expostas a um meio

hipotônico. Além das características do meio, também é importante enfatizar a temperatura da suspensão celular, pois essa pode retardar ou acelerar a movimentação de água e eletrólitos entre a célula e o meio que a envolve. A manutenção da viabilidade da célula submetida ao processo de criopreservação depende basicamente da sua capacidade em resistir a dois tipos de lesão: a desidratação e o dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo em seu interior (MERYMAN, 1971).

Em geral, esses dois tipos de lesões estão correlacionados à velocidade em que a suspensão celular é congelada: o primeiro, em baixas velocidades, enquanto que o segundo, em altas velocidades. A formação de cristais de gelo requer pelo menos um evento inicial de nucleação, que depois aumenta progressivamente de tamanho pela incorporação de outras moléculas de água livre se expandindo por toda a solução ou suspensão celular; na dependência da velocidade e intensidade da queda de temperatura e da composição do soluto. O congelamento rápido resulta na formação simultânea de vários pontos de nucleação. Isso confere a cada cristal um tamanho relativamente menor comparado a aquele que surge com baixas velocidades de congelamento (SANTIS; PRATA, 2009).

Quando se trata de suspensão celular, geralmente a nucleação do gelo ocorre primeiro no espaço extracelular, principalmente em baixas velocidades de congelamento. Os pontos iniciais de formação dos cristais de gelo recrutam moléculas de água e, de certa forma, “expulsam” o soluto para as porções ainda líquidas da solução, que, por sua vez, têm o seu ponto de congelamento progressivamente reduzido à medida que a concentração de soluto aumenta. A solução mais concentrada (e com maior viscosidade) se localiza mais próxima das células, que, expostas ao meio hipertônico, sofrem processo de desidratação. Em determinado momento, a concentração de solutos torna-se tão alta que ocorre o fenômeno da vitrificação, quando então cessa todo movimento de água e, conseqüentemente cessa o aumento do tamanho dos cristais de gelo (SANTIS; PRATA, 2009).

Nos congelamentos realizados em alta velocidade podem ocorrer a formação de cristais de gelo, simultaneamente, nos espaços intra e extracelulares. Dependendo do tamanho dos cristais, pode ocorrer lesão mecânica das organelas intracelulares e da membrana celular. Idealmente, o processo de congelamento deve evitar que ocorra a formação de cristais de gelo no interior das células e induzir o processo de vitrificação. Para evitar esses danos celulares lança-se mão de duas maneiras: aplicar uma velocidade de congelamento ideal para o tipo de célula em questão e empregar agentes crioprotetores os quais minimizam a formação de cristais de gelo além de diminuir a intensidade da desidratação celular (SANTIS; PRATA, 2009).

O glicerol é um agente crioprotetor atóxico para as células, mesmo em altas concentrações. Ele diminui a desnaturação das proteínas quando as células são expostas a baixas temperaturas. A sua penetração celular ocorre de forma lenta, o que constitui uma limitação em seu emprego para a criopreservação de diversos tipos celulares. Outro agente crioprotetor bastante utilizado é o dimetilsulfóxido (DMSO), um composto higroscópico, polar, incolor, inodoro, de baixo peso molecular, composto por um grupo sulfóxido, que é hidrofílico, e dois grupos metila, que são hidrofóbicos. Esse, de fato tem sido o crioprotetor mais usado para a criopreservação celular, geralmente nas concentrações entre 5 e 10%. A função deste agente parece ser essencialmente coligativa, ou seja, de “captura” das moléculas de água livre, o que leva a redução da quantidade de gelo formada, diminuição da temperatura do ponto de congelamento e aumento do ponto de vitrificação. Esta substância penetra em tecidos e células com uma velocidade maior que a do glicerol à temperatura ambiente, o que constitui uma vantagem apreciável. No entanto, nesta temperatura, o DMSO é mais tóxico que o glicerol (SANTIS; PRATA, 2009).

A abordagem da criopreservação, atualmente utilizada, para preservar células-tronco embrionárias refere-se a um equilíbrio (controle) próximo da refrigeração. Esse equilíbrio do resfriamento depende da formação de gelo extracelular que conduz a progressiva desidratação celular, concentrando-se efetivamente a solução intracelular em um estado vítreo, estado em que após mais arrefecimento o citoplasma torna-se com aspecto de “vidro”. O termo, “vitrificação” é mais frequentemente utilizado para descrever os protocolos de resfriamento que provocam uma elevação extrema da viscosidade de uma solução extracelular, ou seja, a formação de um “vidro”, na ausência da cristalização do gelo. Normalmente, isso exige protocolos rápidos de resfriamento na presença de altas concentrações de agentes crioprotetores. No entanto, o uso da refrigeração equilibrada objetivando tornar uma célula para um estado mais vítreo através da desidratação controlada, uma idéia elucidada por Pegg e Diaper em 1990, só ganhou apoio consistente, recentemente (BENSON et al, 2008).

Os danos celulares que ocorrem durante um protocolo de criopreservação, utilizando a abordagem do controle da refrigeração, podem ser explicados devido a três fatores principais: o dano osmótico devido ao influxo e efluxo de água durante a adição e remoção de agentes crioprotetores (por exemplo, Dimetilsulfóxido - DMSO), o dano mecânico, devido à formação de cristais de gelo intracelular, e os efeitos dos solutos, geralmente descrito como danos químicos que ocorrem devido a um aumento na concentração intracelular de íons como consequência do congelamento. O grau dos danos causados por esses fatores variam de

acordo com a concentração dos agentes crioprotetores, da forma de resfriamento e do perfil de aquecimento durante o processo de descongelamento (BENSON et al, 2008).

Bartlett e Reade, em 1972, estavam entre os primeiros cientistas a realizarem experiências com a criopreservação de tecido dentário. Eles extraíram germes dentários de ratos, preservaram a 196° C negativos, e após o descongelamento os transplantaram em olhos de ratos. Eles verificaram que as estruturas dentárias se desenvolveram bem, o que significou que as células desses tecidos sobreviveram ao processo de congelamento. Diversas experiências com animais envolvendo criopreservação e auto-implante dentário já foram realizadas, mas inúmeras questões ainda permanecem sobre as possíveis reações as quais o tecido dental sofre após a realização destes procedimentos (TEMMERMAN et al, 2006).

A criopreservação de células e tecidos, principalmente do sistema reprodutivo, tem sido recentemente, significativamente melhorada, mas até agora só as células-tronco hematopoéticas foram criopreservadas e em seguida utilizadas com sucesso para o transplante (PAPACCIO et al, 2006).

Oh et al. (2005) verificaram em seus estudos que a criopreservação parece não exercer influência negativa sobre a viabilidade e a capacidade de diferenciação dos fibroblastos do ligamento periodontal quando combinada com uma taxa de congelamento controlado. Também foi observado que o uso DMSO garantiu a sobrevivência da maioria das referidas células periodontais. Nesse estudo foi realizada a análise imuno-histoquímica para a atividade da fosfatase alcalina (utilizada como biomarcador dos fibroblastos do ligamento periodontal) para expressar a capacidade de diferenciação dessas células após congelamento e descongelamento. Como resultado, tanto no grupo controle quanto no grupo experimental (dentes congelados) observaram-se positividade celular de mesma intensidade para a fosfatase alcalina, não havendo, portanto, divergências significativas entre os dois grupos estudados.

Seo et al. (2005) utilizaram o ligamento periodontal de humanos para testar a hipótese de que o ligamento periodontal criopreservado conteria células-tronco pós-natais recuperáveis. Estas células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal, preservadas pelo congelamento, mantiveram as mesmas características normais das células mesenquimais indiferenciadas presentes no ligamento periodontal não criopreservado, incluindo: a expressão do marcador de superfície celular STRO-1, a formação de colônias celulares, o potencial de diferenciação, a formação de tecido de regeneração (semelhante ao cemento e ao ligamento periodontal), além de um cariótipo diplóide normal. O estudo demonstrou que as células-tronco pós-natal podem ser recuperadas a partir do ligamento

periodontal criopreservado, promovendo, desta forma uma prática clínica para a posterior utilização destes tecidos criopreservados.

Adicionalmente, Papaccio et al. (2006) utilizaram células-tronco da polpa dentária de ratos e seus osteoblastos diferenciados *in vitro*, para posterior transplante após 2 anos de criopreservação celular. Os anticorpos CD117 (c-kit), CD34, flk-1, e STRO-1 foram utilizados no experimento e apenas as células que expressaram positividade a todos os marcadores foram selecionadas para o estudo a fim de se obter uma homogeneidade da população. A ordem de utilização dos anticorpos foi a seguinte: inicialmente o CD117 e CD34 e, em seguida, STRO-1 e flk-1. Na sequência do trabalho, a partir do momento que as células exibiam sinais de diferenciação foram aplicados os seguintes anticorpos: CD44, osteocalcina e RUNX-2. Salienta-se que tanto as células-tronco quanto as diferenciadas foram criopreservadas. As células foram ressuspensas em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 10% e permaneceram congeladas nos criotubos durante 2 anos em nitrogênio líquido. No final do período, as células foram rapidamente descongeladas pela adição de 1 mL de meio α -MEM a 37° C e, em seguida, adicionado 10 mL do mesmo meio. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e meio de cultura a temperatura ambiente foi adicionado ao tubo. As células foram então colocadas em frascos de cultivo celular e mantidas a 37° C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras dos tecidos *in vitro* dos osteoblastos recuperados, medindo aproximadamente 1,5 cm, foram removidos e transplantados por via subcutânea na superfície dorsal dos ratos. Os transplantes foram removidos quatro semanas após o transplante, fixados em formalina a 4%, descalcificados em EDTA a 10% tamponado (pH 7,4) e embutidos em parafina. Os resultados do estudo forneceram evidências de que as células-tronco da polpa dentária e seus osteoblastos diferenciados em cultura *in vitro* podem ser facilmente criopreservados e recuperados; revelando, ainda, que não houve nenhuma diferença significativa na proliferação entre as células quando mantidas a uma temperatura convencional e criopreservadas. O tempo necessário para a recuperação e reinício da proliferação foi de dois a três dias; evidenciando que osteoblastos são capazes de produzirem rapidamente tecido ósseo, semelhante às culturas frescas. As células criopreservadas indicaram que não houve morte celular por apoptose embora um número de células fosse perdido por necrose, devido à formação de gelo intracelular letal. Isso as torna potencialmente úteis e uma fonte confiável de células para terapias para reparação tecidual.

Zang et al. (2006) objetivaram avaliar o potencial de diferenciação das células-tronco isoladas a partir da polpa dentária de terceiros molares humanos em múltiplas linhagens

celulares após o processo de criopreservação. As células foram isoladas através de processos enzimáticos e congeladas em nitrogênio líquido até o momento do uso. Os dentes, imediatamente após a extração, eram colocados em meio α -MEM enriquecido com 0,5 mg/mL de gentamicina e 3 g/mL de anfotericina B. Parte da porção coronária da polpa era triturada e digerida com 3 mg/mL de colagenase tipo I a 37° C durante 1 hora e agitada suavemente. A suspensão celular obtida pela passagem completa da solução digerida através de um filtro de 100 μ m era semeada em frascos de cultura contendo meio α -MEM com 20% de soro fetal bovino e incubados a 37° C com 5% de CO₂. As células permaneceram armazenadas em nitrogênio líquido durante 1 mês. Após a criopreservação, todas as culturas de células da polpa dentária foram recuperadas e cultivadas em frascos de cultura de 80 cm² em meio α -MEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino. Todas as culturas de células obtidas foram tripsinizadas após a confluência e subcultivadas repetidamente. Apenas as culturas que foram mantidas por 25 passagens foram selecionadas. Na 26ª passagem as células foram cultivadas em meio de cultura α -MEM com 10% de soro fetal bovino, 5 mmol/L de KH₂PO₄, 50 μ g/mL de ácido L-ascórbico e 50 μ g/mL de gentamicina. Após o descongelamento, as células que expressaram o marcador de células-tronco STRO-1 foram cultivadas em meios indutivos com potencial de diferenciação neurogênico, osteogênico/odontogênico, adipogênico, miogênico e condrogênico, e analisados com base na morfologia, imuno-histoquímica, e transcriptase reversa da reação em cadeia do DNA-polimerase (RT-PCR) para genes marcadores específicos. Os resultados mostraram que sob a influência destes cinco diferentes meios, as células apresentaram potencial de proliferação e diferenciação. Em conclusão, resultados demonstraram que células da polpa dentária de terceiros molares podem servir como uma fonte de células-tronco multipotentes, aplicáveis para a regeneração do tecido autólogo e terapias celulares, mesmo após a criopreservação.

Perry et al. (2008) realizaram um experimento com culturas de células-tronco extraídas da polpa dentária de terceiros molares humanos e observaram que tais células ainda conseguiam manter a sua viabilidade após 24 horas e por pelo menos 5 dias após extração dentária, quando os dentes eram armazenados a 4° C em frascos estéreis contendo 20 mL de *Hypo ThermoSol* ou meio básico *Mesen Cult* ou tampão fosfato-salino (PBS). Isso implica que não há uma exigência quanto ao imediato processamento do material para a obtenção do sucesso na criação de bancos de células-tronco dentária facilitando, sobremaneira, o desenvolvimento e aprimoramento de futuros protocolos. Todas as células-tronco (100%) presentes na polpa dentária criopreservada foram recuperadas a partir do processamento ao passo que 70% foram recuperadas quando dentes intactos eram criopreservados. O padrão de

criopreservação utilizado foi: cada criofrasco continha 10% de dimetil-sulfóxido, cerca de 1,3 M, de meio *Mesen Cult* e 0,5 a 1,5 X 10⁶ em suspensão de células-tronco da polpa dentária. A suspensão das células-tronco da polpa dentária foi, então, resfriada de -1° C/min para -85° C e mantidas em nitrogênio líquido. Todas as células foram congeladas em criofrascos de 2 mL. Em geral os mesmos procedimentos de congelamento foram seguidos para os dentes intactos, com duas exceções. Dentes inteiros foram congelados em frascos criogênicos de 15 mL e permaneciam em solução crioprotetora durante 1 hora a 4° C antes do congelamento para facilitar a penetração do crioprotetor no tecido. As células e os dentes foram congelados por pelo menos 1 mês antes do descongelamento. Os resultados da pesquisa evidenciaram a viabilidade de bancos de células-tronco da polpa dentária criopreservada, bem como, o de dentes inteiros criopreservados para futuras aplicações na medicina regenerativa.

A imediata criopreservação dos tecidos obtidos para posterior isolamento e cultivo celular torna-se mais prático que a obtenção, isolamento e cultivo de imediato destas células. O isolamento de células-tronco da polpa dentária pode ser trabalhoso, demorado e caro, portanto, a criopreservação de todo o dente ou tecido dental isolado pode ser mais vantajosa para o banco de espécimes (WOODS et al, 2009).

Nesse mesmo estudo, Woods et al. (2009) puderam concluir que a viabilidade celular após a criopreservação não é limitada pela concentração de células congeladas, pelo menos até 2 x10⁶ células/mL. As células-tronco da polpa dentária expandidas em cultura podem, ainda, ser armazenadas sem nenhuma diferença significativa tanto em -85° C como em -196° C, por um período de seis meses, mantendo a capacidade de diferenciação em linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica, indicando a preservação funcional após o descongelamento. Resultados satisfatórios em relação ao cultivo celular após o descongelamento também foram alcançados através do isolamento e criopreservação do extrato tecidual da polpa dentária submetidas à digestão enzimática. A recuperação celular foi um pouco maior que 85%. As células isoladas após o descongelamento tecidual continuaram mantendo as características morfológicas e a capacidade de desenvolvimento, demonstrando potencial de diferenciação em linhagem trilinear. O isolamento e a criopreservação do extrato tecidual da polpa dentária para posterior digestão enzimática permitiram resultados mais satisfatórios em relação ao cultivo celular após o descongelamento.

A sobrevivência e a manutenção da função das células periodontais, incluindo as células-tronco mesenquimais, são essenciais para a cura e um bom prognóstico de um dente enxertado. Desta forma, a criopreservação parece não exercer nenhuma influência negativa na capacidade de reparação do ligamento periodontal. Em combinação com uma taxa de

congelamento controlado, o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) garante a sobrevivência das inúmeras células periodontais, embora o processo de reparação seja mais lento, a regeneração periodontal de dentes criopreservados foi semelhante aos dos dentes imediatamente transplantados; não apresentando sinais de reabsorção radicular progressiva, indicando que os dentes criopreservados são adequados para uso clínico, já que as células periodontais são capazes de manter a sua vitalidade após o processo de criopreservação (TEMMERMAN et al, 2006).

Outro estudo de Temmerman et al. (2008), objetivando examinar o efeito de um processo de criopreservação controlada em culturas de células (fibroblastos) do ligamento periodontal obtidos a partir de terceiros molares humanos, mostraram que os parâmetros observados (integridade da membrana; capacidade de crescimento e fosfatase alcalina - expressão ALP) não foram influenciados pela criopreservação. O teste de Wilcoxon para comparação pareada entre as células criopreservadas (grupo experimental) e não-criopreservadas (grupo controle) realizado para cada parâmetro não foi estatisticamente significativo. As células não criopreservadas foram ligeiramente mais positivas para a expressão ALP. Segundo esses autores, a presença de um ligamento periodontal saudável e funcional aumenta a taxa de sucesso desse procedimento.

Em um estudo mais recente, Temmerman et al. (2010) avaliaram a viabilidade *in vitro* de tecidos pulpaes humanos isolados de terceiros molares após a submissão de um processo de criopreservação. O estudo foi dividido em três diferentes experimentos. No primeiro, os tecidos pulpaes foram isolados e divididos em segmentos horizontais a partir de 19 terceiros molares, em que cada segmento foi cultivado separadamente para avaliar se existia diferença na capacidade de crescimento entre os fibroblastos provenientes da parte coronal, média e apical do tecido pulpar. No segundo experimento, tecidos pulpaes isolados de 27 terceiros molares foram divididos em duas porções (mesial e distal), de forma que uma parte foi criopreservada durante 30 dias antes do cultivo celular, a outra parte foi cultivada imediatamente, para comparar a capacidade de crescimento desses tecidos. Já no terceiro experimento, 43 terceiros molares íntegros foram criopreservados por um período variando entre seis a onze meses. Após o descongelamento, as dimensões dos forames apicais foram medidas e as polpas foram isoladas, segmentadas horizontalmente e cultivadas para serem realizadas comparações em relação à capacidade de crescimento. Os resultados dos dois primeiros experimentos não mostraram diferença significativa na capacidade de crescimento entre fibroblastos originários de diferentes segmentos pulpaes do mesmo dente (sem criopreservação) e entre os fibroblastos criopreservados e não criopreservados isolados dos

tecidos pulpares. Assim, a viabilidade do tecido pulpar isolado pode ser mantida durante a criopreservação quando um agente crioprotetor e os procedimentos padrões são utilizados. O terceiro experimento demonstrou uma correlação positiva entre a dimensão do forame apical e viabilidade pulpar após a criopreservação. Uma dimensão mínima de $9,42 \text{ mm}^2$ permite a penetração do agente crioprotetor capaz de proteger suficientemente o tecido pulpar do ápice até a coroa, mantendo desta forma, uma viabilidade de 90,9%.

Objetivando a otimização de protocolos de criopreservação em células-tronco provenientes da polpa dentária, Woods et al. (2009) verificaram que o agente crioprotetor Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M produziram melhores resultados em relação a viabilidade celular do que os crioprotetores Propilenoglicol (PG) e Etileno Glicol (EG), nas mesmas concentrações indicadas. O presente estudo ainda demonstrou que se torna melhor criopreservar (com a utilização de 10% DMSO) o extrato de tecidual do que as células já submetidas ao processo de digestão enzimática prévia, pois acredita-se que o tecido submetido à digestão enzimática antes da criopreservação sofre em algum grau um comprometimento primário na estrutura da membrana celular, além do estresse em potencial causado nessa membrana pelo agente crioprotetor. A criopreservação de dentes inteiros não produziu resultados satisfatórios.

Em contrapartida, Ding et al. (2010) constataram que não houve diferença estatística em relação às propriedades biológicas (viabilidade celular, eficiência nas unidades formadoras de colônias e na proliferação celular) das células mesenquimais indiferenciadas extraídas da papila apical de terceiros molares humanos submetidos, durante seis meses, ao processo de criopreservação. Foram observados os efeitos de três agentes crioprotetores: 10% de DMSO associado à 90% de FBS; 10% de glicerol associado à 90% FBS e 10% de etileno glicol com 90% de FBS.

Ding et al. (2010) avaliaram também o efeito da criopreservação, durante 6 meses, em células mesenquimais indiferenciadas da papila apical de terceiros molares humanos através da taxa de proliferação celular, eficiência na formação de colônias, potencial de diferenciação multilinear, marcadores de células-tronco mesenquimais, cariotipagem e ensaios imunológicos. O estudo demonstrou que as propriedades biológicas e imunológicas das células mesenquimais indiferenciadas da papila apical criopreservadas não foram afetadas, apoiando a viabilidade dessas células quando submetidas criopreservação em nitrogênio líquido.

Em um estudo recente, uma combinação de quatro soluções de congelamento foram utilizadas para criopreservação de células-tronco derivadas do tecido adiposo, incluindo 1%

de DMSO, 9% de trealose e 90 FBS%; 4% de DMSO, 6% de trealose e 90% de FBS; 8% de DMSO, 2% de trealose e 90% de FBS; 10% DMSO e 90% FBS. Os resultados demonstraram que a solução com 4% DMSO, 6% trealose e 90% FBS se comportou como o melhor agente crioprotetor. Foram levados em consideração o grau de viabilidade celular, o potencial de diferenciação e o grau de redução dos efeitos adversos provocados pelo DMSO (DE ROSA et al, 2009).

Lee et al. (2010) avaliaram o efeito da criopreservação, após um período de 7 dias, utilizando células-tronco da polpa dentária de pré-molares humanos. A taxa de sucesso do isolamento, as curvas de crescimento, morfologia, marcadores específicos de células-tronco, e a capacidade de diferenciação das células isoladas foram avaliadas e comparadas. Os resultados demonstraram que a taxa de isolamento das células dos dentes criopreservados foi de 73%. Após o cultivo por 5 gerações, não houve diferença significativa na viabilidade celular entre as células frescas e as células isoladas após o processo de criopreservação do elemento dental. Também não houve diferenças visíveis em relação à morfologia celular, expressão dos marcadores SRO-1, CD34 e CD44. As células frescas apresentaram uma intensidade ligeiramente maior para o STRO-1 que o grupo controle, os dois grupos mostraram expressões negativas para o CD34, mas positivo para a expressão CD44 e STRO-1. As células-tronco isoladas da polpa dentária dos dentes criopreservados mantiveram o seu potencial de crescimento, e também, a sua capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar, através de experimentos *in vitro*, a influência da criopreservação nas células mesenquimais indiferenciadas procedentes do ligamento periodontal de terceiros molares humanos.

3.2 Específicos

- Avaliar a influência da criopreservação, após um período de 30 dias, na capacidade de adesão e proliferação das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos, em intervalos de 24, 48 e 72 horas.

- Executar uma análise comparativa entre as células criopreservadas por um período de 30 dias com as células cultivadas de imediato, em relação à adesão e à proliferação celular.

4. METODOLOGIA

4.1 Implicações Éticas

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP/UFRN) com o protocolo nº 018/10, tendo sido aprovado com o Parecer 080/2010 (Anexo A). Todos os voluntários da pesquisa receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo B), explicando a realização do estudo, os objetivos, os riscos e os benefícios aos quais estariam expostos, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96). O estudo foi iniciado após assinatura, por cada paciente, do TCLE.

4.2 Caracterização do Estudo

4.2.1 Tipo do Estudo

Ensaio experimental *in vitro*.

4.2.2 Desenho do Estudo

Estudo do tipo longitudinal, prospectivo e controlado.

4.3 População

A população e o espaço amostral foram constituídos por pacientes que compareceram ao serviço de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte com indicação cirúrgica de exodontia em terceiros molares, registrados e diagnosticados por esse mesmo serviço.

4.4 Amostra

Foram utilizados no experimento seis dentes (terceiros molares hígidos) humanos, que seriam desprezados após a cirurgia, para a obtenção das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal. Os elementos dentários foram extraídos de seis pacientes distintos que apresentaram indicação cirúrgica prévia para remoção desses elementos dentários.

4.4.1 Critérios de inclusão da amostra

Foram incluídos na amostra terceiros molares obtidos de pacientes de ambos os sexos, independente de raça, com idade entre 18 a 30 anos, que apresentaram um bom estado de saúde sistêmica e bucal e que desejaram contribuir para o estudo doando os elementos dentários extraídos através da assinatura do TCLE. Os dentes obrigatoriamente tinham indicação prévia para exodontia (dentes inclusos; semi-inclusos; erupcionados) e apresentavam rizogênese completa.

4.4.2 Critérios de exclusão da amostra

Foram excluídos do estudo, os casos de contaminação das amostras por fungos e bactérias.

4.5 Local da pesquisa

As cirurgias para a obtenção dos dentes (terceiros molares com indicação cirúrgica) e o seu processamento inicial (acondicionamento em meio de cultura apropriado após as exodontias) foram executados nas salas cirúrgicas da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

O ensaio *in vitro* das células mesenquimais indiferenciadas isoladas do ligamento periodontal foi realizado no laboratório de cultura de células do Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências da UFRN.

O processo de criopreservação foi realizado no laboratório de Neuroanatomia do Departamento de Morfologia do Centro de Biociências da UFRN.

4.6 Obtenção e processamento dos elementos dentários

Os dentes utilizados (terceiros molares) foram extraídos através de protocolo cirúrgico, utilizando técnicas cirúrgicas convencionais, obedecendo às rigorosas técnicas assépticas. Em seguida, cada dente obtido foi imediatamente mantido em um tubo tipo Falcon de 50 mL (TPP[®], Switzerland) contendo 5 mL de meio α -MEM (Cultilab, Brasil) – (figura 1). Esses tubos foram mantidos em condição hipotérmica (figura 2), até o seu adequado processamento em câmara de fluxo laminar.

Os elementos dentários foram submetidos a três lavagens de 10 minutos cada, com solução de manutenção, contendo meio α -MEM (Cultilab, Brasil), enriquecido com 10.000 U.I./mL de Penicilina (Gibco, USA), 10.000 μ g/mL de Estreptomicina (Gibco, USA), 100 mg/mL de Gentamicina (Gibco, USA) e 250 μ g/mL de Anfotericina B (Gibco, USA), objetivando eliminar possível contaminação. Após as lavagens, os elementos dentários obtidos estavam aptos para o processo de realização da extração e do cultivo das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal.

4.7 Extração das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal

As células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal foram removidas através da raspagem delicada da superfície radicular com o uso de uma lâmina de bisturi (figura 3 e 4) e em seguida foram submetidas à digestão enzimática com 3 mg/mL de colagenase I (Gibco, USA) e 4mg/mL de dispase (Gibco, USA), por 1 hora a 37° C. Em seguida a solução foi aspirada, processada em filtro de 70 μ m (BD Falcon, USA) – (figura 5) e centrifugada a 1200 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante (figura 6) foi removido com auxílio de pipeta Pasteur e bomba a vácuo e em seguida as células precipitadas foram ressuspensas e cultivadas.



Figura 1.



Figura 2.

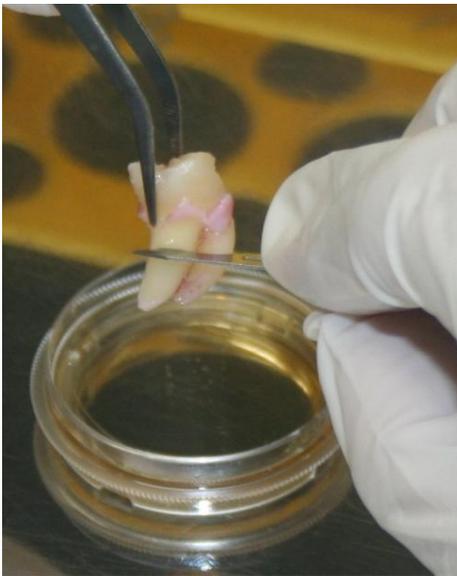


Figura 3.



Figura 4.



Figura 5.

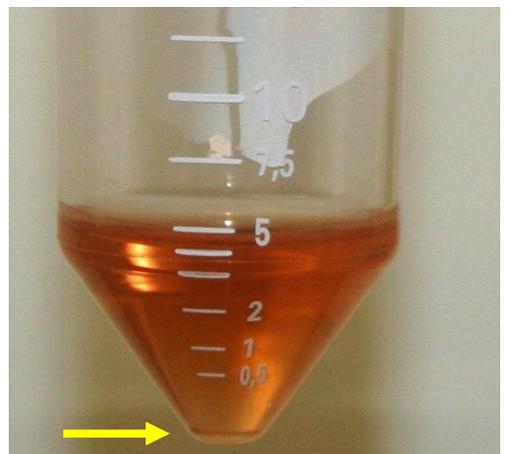


Figura 6.

Figura 1. Elemento dentário extraído armazenado em tubos tipo Falcon de 50 mL.

Figura 2. Tubo tipo Falcon de 50 mL contendo o elemento dentário extraído, mantido em condição hipotérmica.

Figuras 3 e 4. Raspagem do ligamento periodontal.

Figura 5. Filtro de 70 μm acoplado em um tubo tipo Falcon de 50 mL.

Figura 6. Tubo tipo Falcon de 50 mL após a centrifugação a 1200 rpm durante 5 minutos. As células precipitadas (em destaque na seta amarela) foram ressuspensas e cultivadas.

4.8 Cultivo das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal

Cada amostra de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal foi cultivada em garrafas de cultivo celular de 25 cm^2 (BD Falcon, USA), com meio básico α -MEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 15% de soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Brasil). As culturas foram mantidas a 37° C em 5% de CO_2 , com troca de meio a cada três dias, até atingirem 70 – 90% de confluência.

No subcultivo o meio básico era removido e então adicionado às garrafas 3 mL de tripsina/EDTA (0,25% de Tripsina contendo 1 mM de EDTA – Gibco/USA). A suspensão celular era então colocada em um tubo cônico de 50 mL (TTP[®], Switzerland) com o mesmo volume de meio α -MEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 15% de FBS (Cultilab, Brasil) com o objetivo de inativar a tripsina (Gibco/USA). A suspensão era centrifugada a 1200 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante removido, as células ressuspensas em 1 mL de meio α -MEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 15% de soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Brasil), e então uma alíquota dessa suspensão era separada para a contagem na Câmara de Neubauer (figura 7), utilizando o método da exclusão de células coradas pelo Azul de Trypan (Gibco, USA); conforme será descrito no item 4.9.

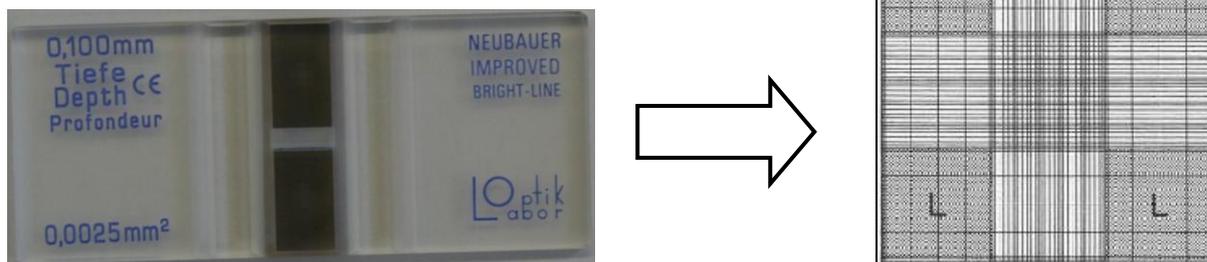


Figura 7. Câmara de Neubauer (hemocitômetro).

Na terceira passagem – P3 (subcultivo), cada amostra das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal foi cultivada em placas de cultivo com seis poços (TTP®, Switzerland), na densidade de 1×10^4 células por poço. Os poços continham meio básico α -MEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 15% de soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Brasil). As culturas foram mantidas a 37° C em 5% de CO₂ e as células eram contadas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, para a análise da adesão e proliferação celular.

4.9 Contagem celular na Câmara de Neubauer

A câmara de Neubauer (hemocitômetro) é um tipo especial de lâmina de microscópio que é dividida em 9 quadrantes de área definida, sobre o qual um determinado volume da suspensão celular é distribuído. Por meio da contagem de células neste volume e aplicando um cálculo apropriado pode ser aferido o número de células por mL da amostra.

O número de células colhidas de cada poço foi obtido pela contagem de células viáveis através do uso de hemocitômetro e o método da exclusão de células coradas pelo azul de trypan (Gibco, USA), obedecendo a seguinte equação matemática: Número total de células vitais contadas x Diluição da amostra x 10^4 / Número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem das células. O percentual de viabilidade da população celular foi obtido dividindo o número total de células viáveis pelo número total de células e o resultado, multiplicado por 100.

Para a contagem, foram utilizados 10 μ l da suspensão celular (10 μ l de azul de trypan e 10 μ l de meio de cultura). Esta suspensão celular foi transferida para a câmara de Neubauer com auxílio de pipeta de Pasteur e as células foram contadas, excluindo aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis).

O treinamento e a capacitação prévia fizeram-se necessário para uma satisfatória padronização e calibração da metodologia, procurando, com isso, possibilitar um procedimento com mínima variabilidade e com boa reprodutibilidade.

4.10 Delineamento do Estudo

Após a obtenção e expansão das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal, foram criados dois grupos de estudos (figura 8):

Grupo I (controle): cultivo imediato das células mesenquimais indiferenciadas isoladas do ligamento periodontal. Na terceira passagem (P3), as células foram distribuídas em três placas de seis poços para cultivo celular, para cada elemento dentário.

Grupo II (experimental): criopreservação, durante um período de 30 dias, das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal na primeira passagem (P1); para posterior cultivo dessas células, de modo semelhante ao grupo I.

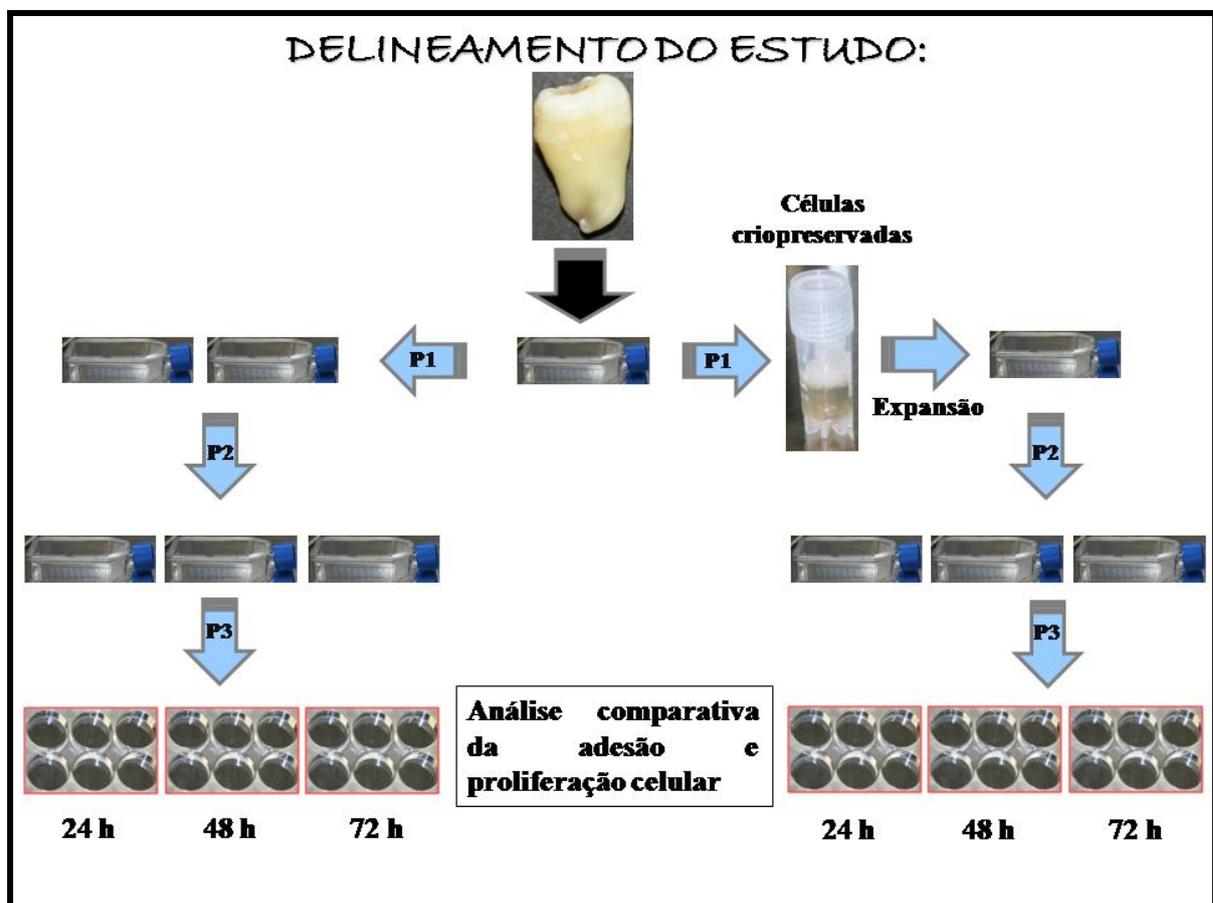


Figura 8. Cultivo das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal mostrando o grupo controle (lado esquerdo) e o grupo experimental (lado direito).

4.11 Criopreservação das células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal

As células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal (P1) que passaram pelo processo de criopreservação (grupo II), foram preservadas em soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Brasil) com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) – crioprotetor em criofrascos (TTP®, Switzerland) de 2 mL e submetidas ao protocolo de criopreservação: 2 horas a 4° C, 18 horas a -20° C, e então mantidas a -85° C por um período de 30 dias, após esse período, as mesmas foram descongeladas para poderem seguir com o protocolo de cultivo celular semelhante ao grupo I. Foi congelado 1 mL de solução contendo 1×10^6 células por criofrasco.

O descongelamento foi realizado através do contato imediato dos criotubos (TTP®, Switzerland) em água a 37° C (banho-maria). As células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal (P1) foram cuidadosamente processadas com 5 mL de meio α -MEM (Cultilab, Brasil) para remover (por diluição) o agente crioprotetor. Em seguida foi realizada centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos, aspiração do sobrenadante e ressuspensão do precipitado em 1mL do meio α -MEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 15% de soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Brasil). Em seguida foi realizado o cultivo das células em garrafas de cultivo celular de 25 cm² (BD Falcon, USA), com meio básico α -MEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 15% de soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Brasil).

4.12 Análise do índice de adesão e proliferação celular

Para as análises dos índices de adesão e proliferação celular bem como para a obtenção da curva de crescimento nos diferentes grupos analisados foram utilizados os valores obtidos através das contagens das células aderidas às superfícies de plástico dos poços de cultivo celular, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após o início do cultivo na placa de seis poços. O número de células colhidas em cada poço foi obtido pela contagem das células viáveis através do uso do hemocitômetro e o método de exclusão das células coradas pelo azul de trypan, conforme foi descrito anteriormente no item 4.9.

4.13 Análise estatística

Cada dado das contagens correspondeu à média das 6 amostras (6 poços em cada intervalo de tempo para cada dente). Tais médias, em valores absolutos, foram transformadas em logaritmos de base 10 para reduzir a variabilidade das mesmas. Os dados, na forma de LOG_{10} , foram submetidos à análise não paramétrica. A diferença entre os grupos para cada um dos tempos (24; 48 e 72 horas) foi analisada pelo teste estatístico de Wilcoxon. Em relação à evolução temporal para cada um dos grupos, a análise foi feita pelo teste de Friedman para verificar a existência de diferença entre os tempos e, quando ela existiu, foi aplicado o teste de Wilcoxon com penalização de Bonferroni, a fim de se observar onde residia a diferença. O nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Adesão e proliferação celular

Os resultados evidenciaram que as amostras de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento peiodontal dos terceiros molares humanos apresentaram um comportamento crescente da adesão e proliferação celular em ambos os grupos (células frescas – não submetidas ao processo de criopreservação e células criopreservadas).

5.1.1 Células Frescas (cultivadas de imediato após a sua obtenção)

Os resultados relativos à adesão e proliferação das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal dos terceiros molares humanos que não foram submetidas ao processo de criopreservação são observados na tabela abaixo:

Tabela 1. Análise da quantidade (em LOG_{10}) de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos cultivadas de imediato. Natal/RN, 2010.

Intervalos de tempo	n	Mediana	Q ₂₅ – Q ₇₅	Média	Desvio Padrão	p*
24 Horas ^a	6	4,53	4,39 – 4,60	4,51	0,12	0,002
48 Horas ^b	6	4,70	4,59 – 4,74	4,66	0,12	
72 Horas ^c	6	5,12	4,79 – 5,34	5,13	0,40	

p* Friedman. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes de acordo com a penalização após o teste de Wilcoxon.

Os resultados apresentados na tabela 1 inferem o padrão de crescimento celular das seis amostras nos três intervalos de tempos estudados. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os três intervalos de tempo (24/48; 24/72 e 48/72). Diante destes resultados, comprova-se que as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos são capazes de se desenvolverem *in vitro* quando submetidas às técnicas adequadas de cultivo celular.

Os resultados mostrando o padrão de crescimento das células cultivadas de imediato após a sua obtenção também foram expressos através de um gráfico (figura 9):

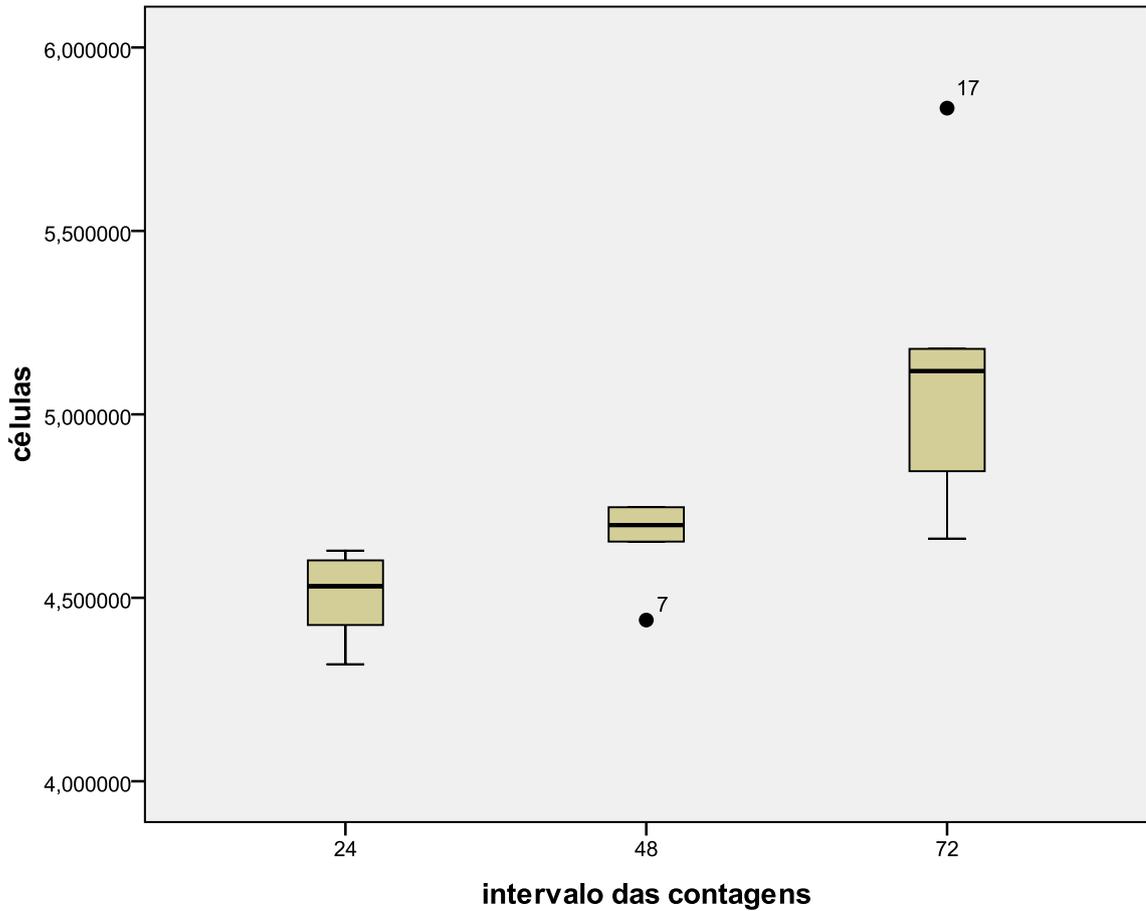


Figura 9. Box-plot do padrão de crescimento (adesão e proliferação) das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos cultivadas de imediato nos três intervalos de tempo estudados. Os intervalos de tempo estão apresentados em horas e as quantidades celulares em LOG_{10} .

5.1.2 Células Criopreservadas

Os resultados relativos à adesão e proliferação das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal dos terceiros molares humanos que foram submetidas ao processo de criopreservação (células criopreservadas) são observados na tabela 2:

Tabela 2. Análise da quantidade (em LOG_{10}) de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos cultivadas após a criopreservação. Natal/RN, 2010.

Intervalos de tempo	n	Mediana	Q ₂₅ – Q ₇₅	Média	Desvio Padrão	p*
24 Horas ^a	6	4,51	4,45 – 4,59	4,52	0,07	0,002
48 Horas ^b	6	4,70	4,62 – 4,73	4,68	0,07	
72 Horas ^c	6	4,94	4,76 – 5,00	4,90	0,14	

p* Friedman. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes de acordo com a penalização após o teste de Wilcoxon.

Os resultados apresentados na tabela 2 inferem o padrão de crescimento celular das seis amostras nos três intervalos de tempos estudados. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os três intervalos de tempo (24/48; 24/72 e 48/72). Diante destes dados, comprova-se que as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos são capazes de se desenvolverem *in vitro* após o processo de criopreservação por 30 dias.

Os resultados mostrando o padrão de crescimento das células criopreservadas também foram expressos através de um gráfico (figura 10):

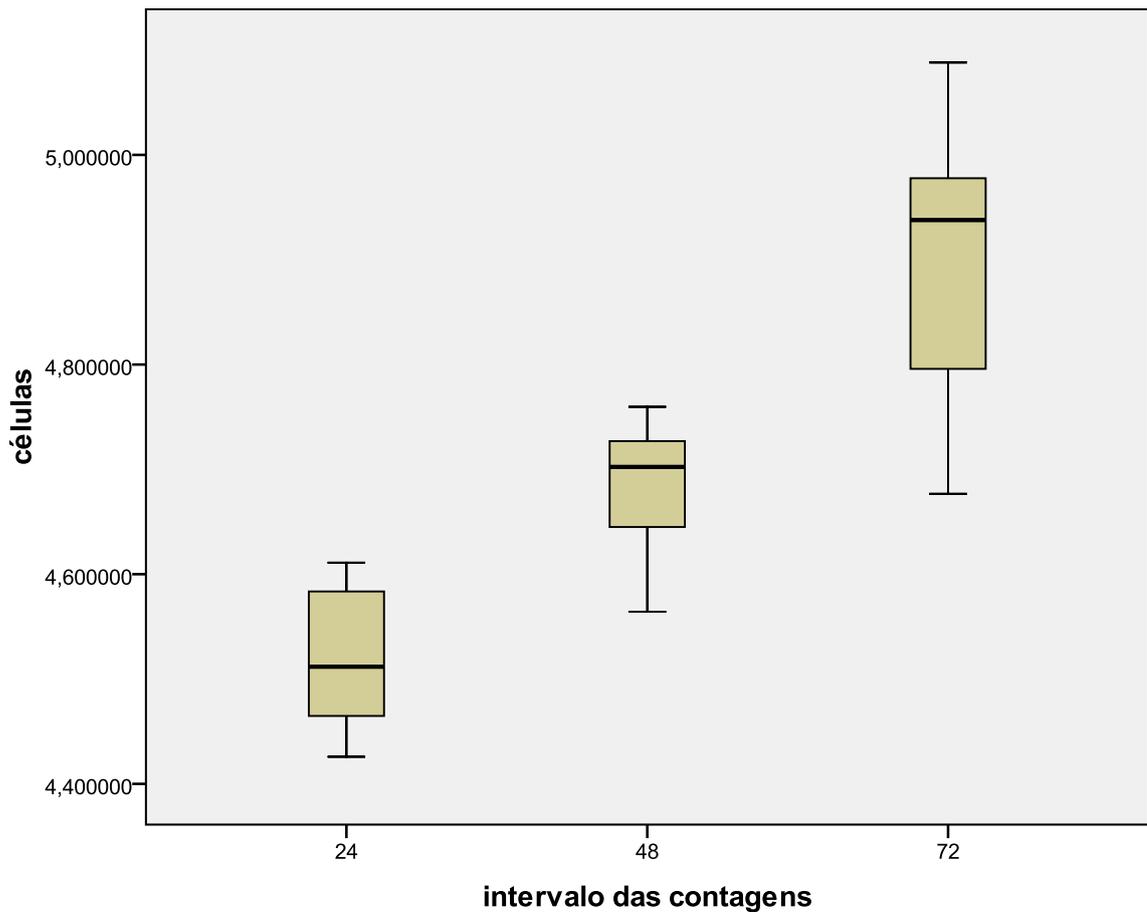


Figura 10. Box-plot do padrão de crescimento das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos cultivadas após a criopreservação nos três intervalos de tempo estudados. Os intervalos de tempo estão apresentados em horas e as quantidades celulares em LOG_{10} .

5.2 Análise comparativa da adesão e proliferação celular entre os grupos estudados

Os resultados relativos à análise comparativa da adesão e proliferação entre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal dos terceiros molares humanos frescas e criopreservadas são observados na tabela 3:

Tabela 3. Análise comparativa da adesão e proliferação entre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos frescas e criopreservadas. Valores expressos em LOG₁₀. Natal/RN, 2010.

Intervalos de tempo	Células	n	Mediana	Q₂₅ – Q₇₅	Média	Desvio Padrão	p*
24 Horas	Frescas	6	4,53	4,39 – 4,60	4,51	0,12	
24 Horas	Criopreservadas	6	4,51	4,45 – 4,59	4,52	0,07	0,753
48 Horas	Frescas	6	4,70	4,59 – 4,74	4,66	0,12	
48 Horas	Criopreservadas	6	4,70	4,62 – 4,73	4,68	0,07	0,500
72 Horas	Frescas	6	5,12	4,79 – 5,34	5,13	0,40	
72 Horas	Criopreservadas	6	4,94	4,76 – 5,00	4,90	0,14	0,249

p* Wilcoxon

Os resultados apresentados na tabela 3 inferem o padrão de crescimento celular das seis amostras nos três intervalos de tempos estudados entre o grupo de células frescas e criopreservadas. Foi observado que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados nos três intervalos de tempo (24; 48 e 72 horas). Diante destes dados, comprova-se que o processo de criopreservação não alterou o padrão de crescimento celular, ou seja, as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos apresentaram viabilidade *in vitro* nos dois grupos estudados.

Os resultados mostrando a análise comparativa do padrão de crescimento entre as células frescas e criopreservadas também foram expressos através dos gráficos (figura 11, 12 e 13), para cada um dos intervalos de tempo estudados:

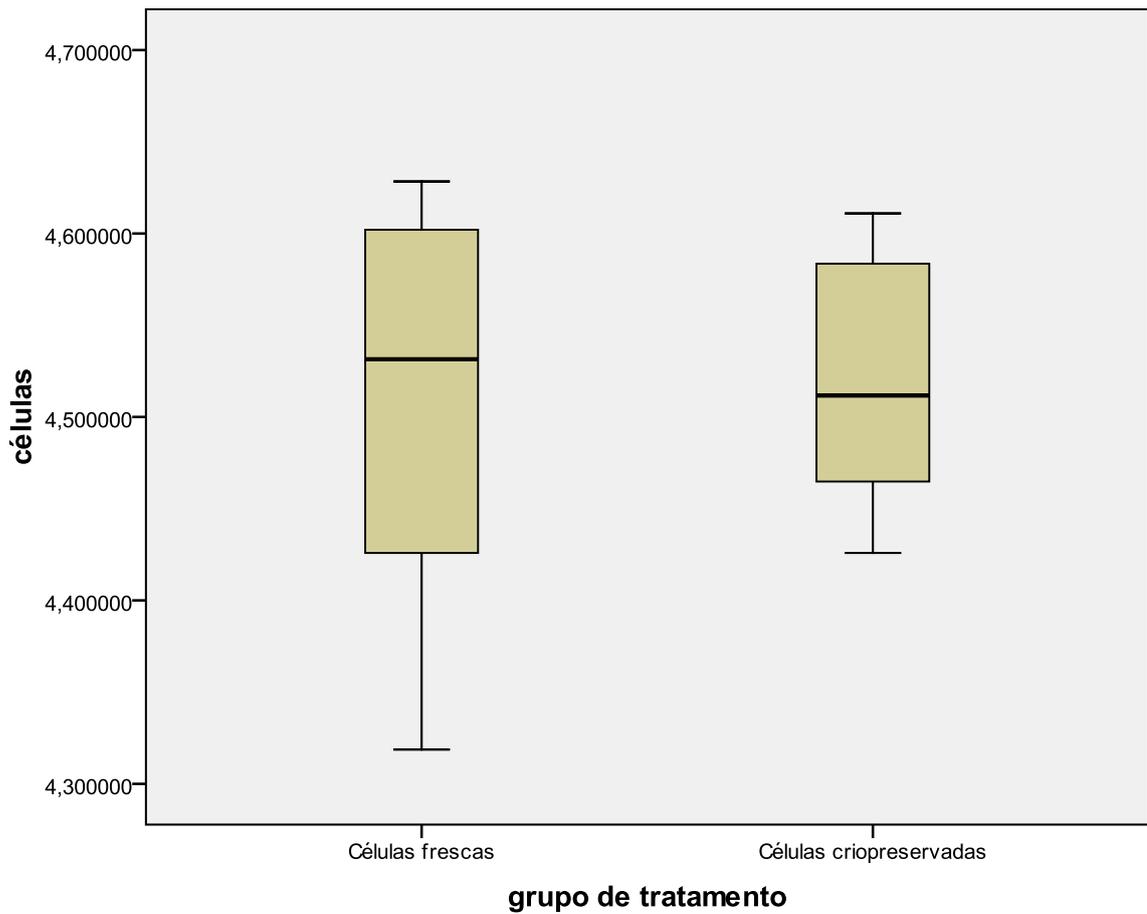


Figura 11. Box-plot da análise comparativa da adesão e proliferação entre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos frescas e criopreservadas para o tempo de 24 horas. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados. As quantidades de células estão apresentadas em LOG_{10} .

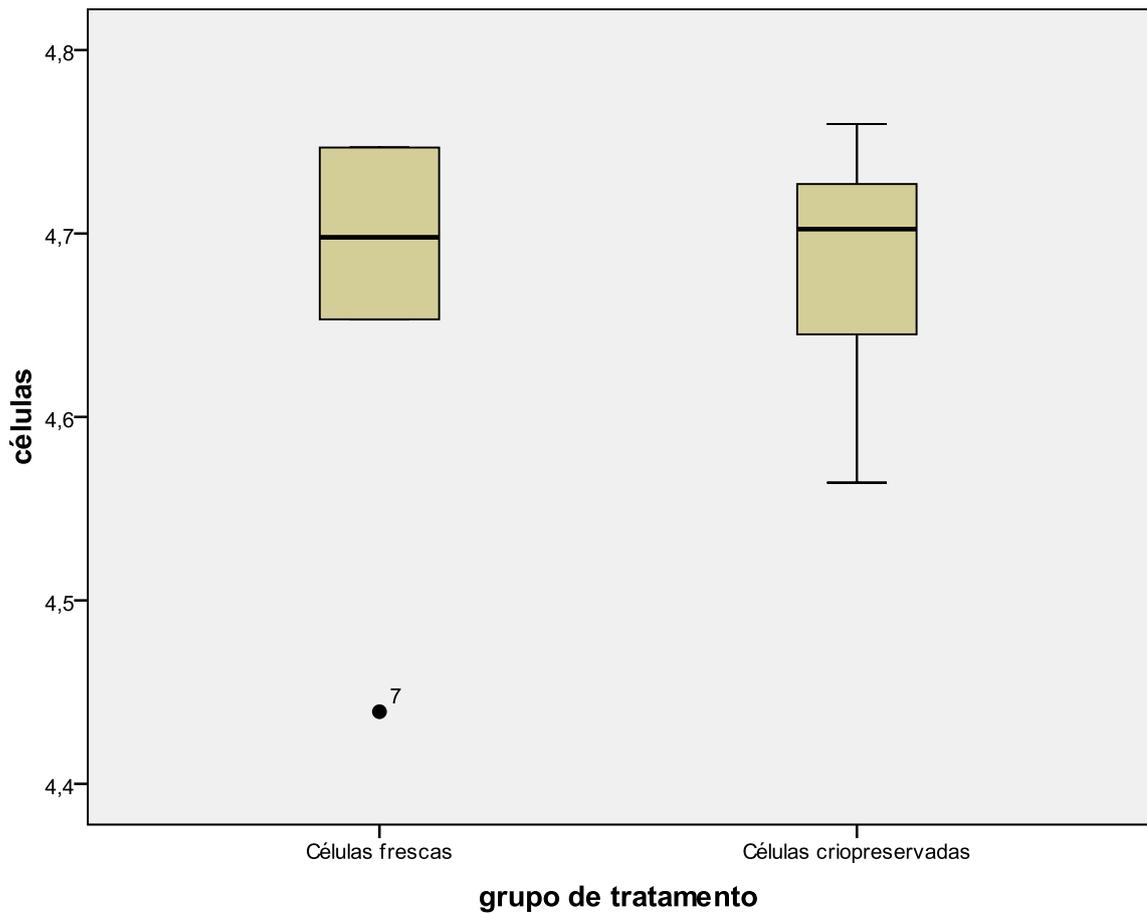


Figura 12. Box-plot da análise comparativa da adesão e proliferação entre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos frescas e criopreservadas para o tempo de 48 horas. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados. As quantidades de células estão apresentadas em LOG_{10} .

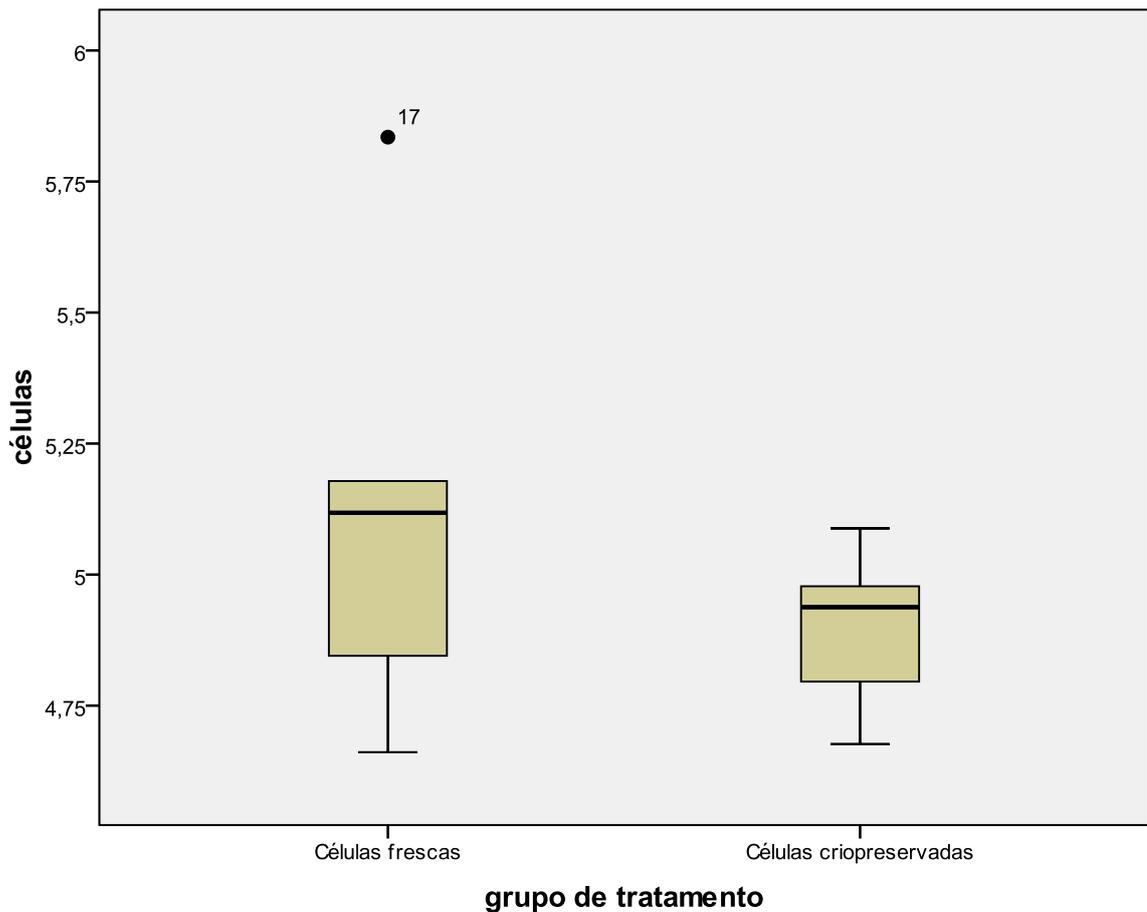


Figura 13. Box-plot da análise comparativa da adesão e proliferação entre as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos frescas e criopreservadas para o tempo de 72 horas. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados. As quantidades de células estão apresentadas em LOG_{10} .

Os resultados ilustrados através dos gráficos (figura 11, 12 e 13) mostram que nos três intervalos de tempo analisados houve uma menor variabilidade no grupo de células criopreservadas, principalmente nos períodos de 24 e 72 horas.

5.3 Curva de crescimento nos diferentes grupos analisados

Os resultados relativos à curva de crescimento das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal dos terceiros molares humanos frescas e criopreservadas são observados na figura 14:

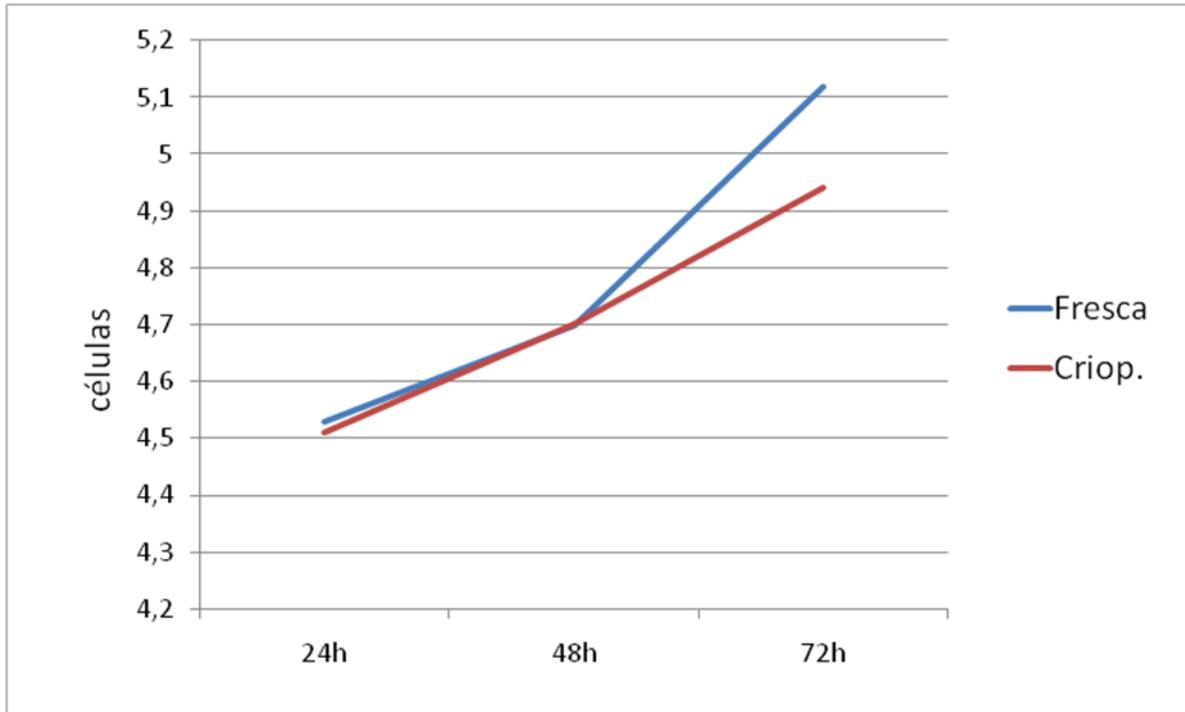


Figura 14. Curva de crescimento das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal dos terceiros molares humanos frescas e criopreservadas em diferentes intervalos de tempo. Os intervalos de tempo estão apresentados em horas e a quantidade de células em LOG₁₀.

A análise da curva de crescimento das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos evidencia uma tendência, apresentando um padrão linear, semelhante em relação a proliferação celular nos dois grupos estudados, para os diferentes intervalos de tempo. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados.

6. DISCUSSÃO

Além do embrião, as células-tronco também são encontradas em vários órgãos e tecidos do indivíduo adulto. Elas participam da homeostase tecidual, gerando novas células devido à renovação fisiológica e abrindo novas perspectivas para a regeneração e recuperação de tecidos e órgãos, pois são entidades capazes de se auto-renovarem e se diferenciarem em células de diversos tecidos. Tais populações celulares, ou células-tronco adultas, têm sido facilmente identificadas pela sua morfologia e localização em alguns tecidos que são fontes principais das células mesenquimais indiferenciadas, como a medula óssea. Já em outros tecidos orais – como ligamento periodontal, polpa dentária e papila apical – a presença destas células mesenquimais foi identificada através de marcadores celulares específicos tais como: STRO-1, CD146, CD44, CD105 e CD166. A regeneração periodontal que deseja reconstituir os tecidos destruídos ou lesados pelo avanço da doença tem ganhado novas perspectivas através da identificação dessas células devido a sua aplicabilidade na bioengenharia ou engenharia tecidual (GRONTHOS et al, 2000; SEO et al, 2004; SEO et al, 2005; CHEN et al, 2006; NAGATOMO et al, 2006; GRONTHOS et al, 2006; KAWANABE; MURAKAMI; YAMAMOTO, 2006; LEON et al, 2007; GAY; CHEN; MACDOUGALL, 2007; FUJII et al, 2008; COURA, 2008; LIN et al, 2008; OHTA et al, 2008; ZHOU et al, 2008).

Alguns estudos têm identificado os fatores regulatórios que regem as interações de tais entidades celulares, os quais incluem quatro principais famílias de proteínas: 1. Família do fator de crescimento de fibroblastos (*FGF*). 2. Família Hedgehog (*Shh*). 3. Família Wingless (*Wnt*). 4. Superfamília do fator de crescimento transformador β (*TGF- β*), a qual inclui as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAM, 2004; NAKASHIMA; REDDI, 2003). No complexo craniofacial, essas famílias governam a padronização e morfogênese do dente e das estruturas periodontais associadas, incluindo o osso alveolar, cemento, ligamento periodontal e gengiva (HAU et al, 2006; SOARES et al, 2007).

Pesquisas desenvolvidas por um grupo do *National Institute of Dental and Craniofacial Research* (NIDCR, EUA) demonstraram a existência de células-tronco adultas na polpa de dentes decíduos e permanentes e no ligamento periodontal, as quais mantêm grande capacidade de diferenciação. Esse grupo de pesquisadores desenvolveu um protocolo para isolamento e cultivo de células-tronco de origem dentária, bastante semelhante ao utilizado na nossa pesquisa (GRONTHOS et al, 2000; GRONTHOS et al, 2002; MIURA et al, 2003; SEO et al, 2004). Segundo esse protocolo, as células-tronco após serem separadas da

matriz extracelular da polpa e do ligamento periodontal, foram semeadas em placas de cultivo celular que continham meio de cultura específico. Essas eram incubadas a 37° C em 5% de CO₂ para verificar a capacidade de proliferação e formação de colônias, sendo consideradas colônias quando apresentavam mais de cinquenta células agregadas.

De acordo com a literatura, o ligamento periodontal pode ser uma fonte autógena fácil e eficiente de células mesenquimais indiferenciadas, com capacidade de expansão e habilidade de se diferenciarem em células fibroblásticas, cementoblásticas e osteoblásticas. A plausibilidade da engenharia tecidual baseada na utilização de células-tronco na regeneração periodontal é suportada por estudos em animais, demonstrando que as células do ligamento periodontal cultivadas *in vitro* podem ser reimplantadas com sucesso em defeitos periodontais promovendo a regeneração periodontal (ISAKA et al, 2001; HASEGAWA et al, 2005, AKIZUKI et al, 2005; IVANOVSKI et al, 2006). As células mesenquimais indiferenciadas podem, também, ser expandidas em algum arcabouço ou ainda podem ser posteriormente injetadas *in vivo* diretamente no local da lesão a ser reparada (CHEN; JIN, 2010).

A literatura mostra que as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos podem ser utilizadas na regeneração das estruturas periodontais ou até mesmo em grandes reconstruções de deformidades crânio-maxilo-faciais (HUANG, 2008; CHEN; JIN, 2010), o que enfatiza a importância da criopreservação dessas células para uso clínico posterior, visando promover a aceleração do processo de reparo tecidual em técnicas terapêuticas aplicadas aos pacientes acometidos por doenças periodontais (OH et al, 2005; SEO et al, 2005; TEMMERMAN et al, 2006; ZANG et al, 2006).

Vários estudos (TEMMERMAN et al, 2008; WOODS et al, 2009; DING et al, 2010) têm demonstrado que células mesenquimais indiferenciadas isoladas do ligamento periodontal, polpa dental ou papila apical, podem ser criopreservadas com sucesso, garantindo viabilidade após o processo de descongelamento. Os mesmos resultados foram encontrados no nosso trabalho, sugerindo que pode ser viável a formação de um banco de células mesenquimais derivadas de tecidos dentais, conforme preconizam Oh et al, 2005; Perry et al, 2008; Woods et al, 2009 e Lee et al, 2010.

É de extrema importância saber os princípios que norteiam o processo de criopreservação para a obtenção do sucesso nesse procedimento. Apesar de várias investigações realizadas no passado sobre a criopreservação dos dentes (BARTLETT; READ, 1972; PRICE; CSEREPFALVI, 1972; SCHWARTZ; ANDREASEN, 1983; SCHWARTZ et al, 1985; SCHWARTZ; RANK, 1986; SCHWARTZ, 1986; POLITIS et al, 1995; LAUREYS et al, 2001; KAWASAKI et al, 2004), algumas perguntas sobre as possíveis reações dos

tecidos dentários após o processo de criopreservação permanecem sem resposta. Essa é provavelmente uma das razões pelas quais os transplantes de dentes criopreservados ainda não são amplamente aceitos. Os autores anteriormente citados concluíram que seria mais oportuno desenvolver uma forma mais simples e precisa de teste *in vitro*, o que permitiria uma análise mais detalhada do método de congelamento e resfriamento, avaliando os efeitos dos agentes crioprotetores sobre as células envolvidas. Diante desse fato, o presente estudo objetivou analisar o efeito de um processo de criopreservação padronizado sobre a capacidade de adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos.

A sobrevivência e a manutenção da função das células periodontais parecem ser essenciais para o processo de reparo e um bom prognóstico de um dente enxertado. De acordo com a literatura e com os resultados deste estudo, sugere-se que a criopreservação não exerce influência negativa na adesão e proliferação *in vitro* de células do ligamento periodontal, quando combinado com uma temperatura de congelamento controlado. O uso do agente crioprotetor dimetil-sulfóxido (DMSO) garante com segurança a manutenção da sobrevivência das células mesenquimais indiferenciadas periodontais. Portanto, o prognóstico de dentes criopreservados e transplantados parece ser semelhante aos dentes transplantados imediatamente (TEMMERMAN et al, 2006).

Segundo Basdra; Komposch (1997), Temmerman et al. (2008), os fibroblastos extraídos do ligamento periodontal de dentes humanos apresentaram uma intensa coloração para enzima fosfatase alcalina (ALP), indicando que essas células são capazes de se diferenciarem em osteoblastos e cementoblastos. Essa característica ressalta o potencial dessas células para utilização nos processos de reparo das estruturas periodontais. Na maioria das investigações *in vitro* de fibroblastos extraídos do ligamento periodontal de dentes humanos, as referidas células expressam atividade da fosfatase alcalina em um nível muito mais elevado quando comparado com fibroblastos gengivais (SOMERMAN et al, 1988; ARCEO et al, 1991; OGATA et al, 1995; GIANNOPOULOU; CIMASONI, 1996; GAO et al, 1999; KAWASAKI et al, 2004).

Temmerman et al. (2008), utilizando fibroblastos do ligamento periodontal, analisou a influência da criopreservação em relação a integridade da membrana (viabilidade celular), capacidade de crescimento e expressão da fosfatase alcalina (ALP) por um período de 24 horas. Os resultados mostraram que os parâmetros observados não foram influenciados pela criopreservação. O teste de integridade da membrana das células revela o seu estado de apresentação em um determinado momento do tempo. Ele não oferece uma compreensão

linear (longitudinal) das propriedades (comportamento) dessas células (STEVENSON et al, 2004). Para estudar os efeitos da criopreservação das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal a longo prazo, é mais adequado avaliar a capacidade de crescimento dessas células, conforme foi realizado em nosso estudo, em intervalos de 24, 48 e 72 horas.

Corroborando a informação supracitada, Bartlett e Reade (1972); Kristerson et al. (1976) e Oh et al. (2005) também observaram que algumas funções celulares podem ficar transitoriamente ativas em células danificadas e, conseqüentemente, a presença de células viáveis não assegura que as células não estejam danificadas. O método de exclusão do azul trypan utilizado no procedimento das contagens realizadas no presente estudo é uma medida de avaliar a integridade da membrana. Uma membrana intacta é compatível, mas não garante a viabilidade da célula. Por outro lado, uma lesão da membrana e, portanto, a ausência de integridade da membrana não é compatível com as funções normais da célula, exceto em rara situação de recuperação da integridade de membrana. Assim, a exclusão do azul de trypan tem sido frequentemente associada à viabilidade celular. O teste de exclusão de azul trypan é um procedimento simples e que permite a detecção das células viáveis para subcultivo daí a importância do seu uso no nosso estudo.

A análise comparativa da adesão e proliferação celular não mostrou diferenças entre os grupos estudados (células cultivadas imediatamente após a sua obtenção e células criopreservadas). Estes resultados são alicerçados e concordantes com as citações de Oh et al. (2005), Seo et al. (2005), Perry et al. (2008), Temmerman et al. (2008), Woods et al. (2009), Temmerman et al. (2010) e Ding et al. (2010), indicando que o processo de congelamento e descongelamento não exerce influência negativa sobre a capacidade de crescimento das células mesenquimais indiferenciadas de origem dentária.

A criopreservação de dentes inteiros ainda não é consenso na literatura. Woods et al. (2009) relatam em seus experimentos que a criopreservação do dente inteiro com o objetivo de isolar as células mesenquimais dentárias para serem expandidas e utilizadas clinicamente não fornecem resultados repetitivos e confiáveis. Assim, no estudo ora realizado, optou-se em utilizar o protocolo de criopreservação celular, ao invés de se congelar toda a estrutura dental. Em consonância com a literatura foi empregado o agente crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e as células foram submetidas ao seguinte processo de criopreservação: 2 horas a 4° C, 18 horas a -20° C, e então mantidas a -85° C por um período de 30 dias, consoante ao utilizado nos estudos de Woods et al. (2009), Temmerman et al. (2010) e Ding et al. (2010). Atualmente o DMSO é o agente crioprotetor mais utilizado nas pesquisas devido ao seu baixo peso molecular. Ele penetra nos tecidos e células com uma grande velocidade à

temperatura ambiente, constituindo dessa forma uma vantagem apreciável (SANTIS; PRATA, 2009) além de produzir resultados favoráveis referentes à viabilidade e a capacidade de proliferação celular após o processo de criopreservação celular durante um período de 30 dias (WOODS et al, 2009); resultados esses também congruentes aos observados em nosso estudo nos três intervalos de tempo analisados.

Outro motivo a ser apresentado em relação à utilização do DMSO está pautado nas informações de Ding et al. (2010) que constataram que não houve diferença estatística em relação às propriedades biológicas (viabilidade celular, eficiência nas unidades formadoras de colônias e na proliferação celular) das células mesenquimais indiferenciadas extraídas da papila apical de terceiros molares humanos submetidas ao processo de criopreservação, por um período de seis meses, utilizando três agentes crioprotetores: 10% de DMSO associado a 90% de FBS; 10% de glicerol associado a 90% FBS e 10% de etileno glicol com 90% de FBS. Face aos resultados, utilizamos 10% de DMSO associado a 90% de FBS como agente crioprotetor, que também foi utilizado para a criopreservação de tecidos dentários ou células-tronco dentárias (SEO et al, 2005; PAPACCIO et al, 2006).

Entretanto, Woods et al. (2009) verificaram em seus estudos que o agente crioprotetor Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações: 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M produziram melhores resultados em relação a viabilidade celular do que os crioprotetores Propilenoglicol (PG) e Etileno Glicol (EG), nas mesmas concentrações indicadas.

De Rosa et al. (2009) criopreservaram células-tronco derivadas do tecido adiposo em diferentes soluções crioprotetoras incluindo 1% de DMSO, 9% de trealose e 90 FBS%; 4% de DMSO, 6% de trealose e 90% de FBS; 8% de DMSO, 2% de trealose e 90% de FBS; 10% DMSO e 90% FBS. Os resultados demonstraram que a solução com 4% DMSO, 6% trealose e 90% FBS se comportou como o melhor agente crioprotetor. A trealose é um dissacarídeo não redutor da glicose, que protege as células e melhora a viabilidade das mesmas quando criopreservadas (EROGLU et al, 2000; GUO et al, 2000). É importante comparar os efeitos da utilização de diferentes crioprotetores como DMSO, trealose em suas diferentes concentrações para otimizar tal processo e/ou resolver os efeitos provocados pela citotoxicidade. Todavia, estudos com esta composição não foram descritos ainda na criopreservação de células mesenquimais indiferenciadas provenientes de estruturas dentárias. A adição de trealose torna o procedimento mais dispendioso e os resultados favoráveis ainda precisam ser confirmados por outros estudos. Por este motivo, optou-se por utilizar um protocolo que apresenta resultados irrefutáveis na literatura.

Como constatado na revisão de literatura deste trabalho, nós optamos por realizar a criopreservação utilizando uma quantidade de 1×10^6 células, por se tratar de uma quantidade razoável de células capaz de resistir ao processo de criopreservação e ainda obtida em menos tempo do que se optássemos trabalhar com uma maior quantidade celular. Sendo assim, o processo de criopreservação foi realizado utilizando 900 μ l de soro fetal bovino associado à 100 μ l de DMSO (10%). Esse protocolo foi preconizado por Woods et al. (2009), que verificaram em seus experimentos que a variação da quantidade celular de $0,5 \times 10^6$ até 2×10^6 não produziam resultados estatisticamente diferentes, pelo menos em um período de 30 dias de criopreservação.

No que concerne à temperatura de congelamento empregada em nossa metodologia (-85°C), destacamos a simplicidade do método por não necessitar do uso de nitrogênio líquido a uma temperatura de 196°C negativos. Esse fato torna o processo tecnicamente mais simples, menos dispendioso e garante resultados semelhantes ao nitrogênio líquido, conforme citam Woods et al. (2009), que congelaram células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária por 6 meses nas duas temperaturas supracitadas e observaram uma capacidade de diferenciação celular idêntica nos dois grupos.

Em relação ao processo de digestão enzimática é unanimidade da literatura o uso de 3 mg/mL de colagenase I e 4mg/mL de dispase, por 1 hora a 37°C . Conforme citam Woods et al. (2009), ao isolar um tecido ocorre um maior grau de penetração do agente crioprotetor quando comparado a um dente intacto. É provável que a água penetre e saia mais facilmente das células durante a formação e o derretimento dos cristais de gelo nos tecidos que não esteja limitado por uma rígida estrutura dentinária. Também é provável o comprometimento em algum grau da estrutura da membrana celular ao digerir o extrato tecidual antes do processo de criopreservação. Como a digestão enzimática, sem dúvida, resulta em algum grau de estresse da membrana, isso potencializa as injúrias do agente crioprotetor. Entretanto, é importante ressaltar que durante a realização dos nossos experimentos a digestão enzimática foi realizada antes do processo de criopreservação (TEMMERMAN et al, 2008), visto que estávamos utilizando extrato tecidual do ligamento periodontal ao invés de extrato do tecido pulpar.

No presente estudo, a análise quantitativa das células em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) revelou, através dos testes estatísticos, um comportamento crescente da adesão e proliferação celular em ambos os grupos estudados (células frescas— não submetidas ao processo de criopreservação e células criopreservadas), corroborando os achados de Oh et al. (2005), Seo et al. (2005) e Temmerman et al. (2006). Destaca-se ainda,

no presente estudo, a diferença estatística significativa dos índices encontrados para os três intervalos de tempo em cada um dos grupos analisados. Essa informação mostra não só a expressiva capacidade que este tipo celular apresenta de se desenvolver e multiplicar quando submetido às técnicas adequadas de cultivo celular (GRONTHOS et al, 2006; MIYAGI, 2008), mas também o seu sugestivo potencial para futuras aplicações clínicas (ZANG et al, 2006; PERRY et al, 2008; HUANG et al, 2010).

No tocante a comparação pareada dos resultados entre os grupos analisados, utilizando o teste de Wilcoxon, foi observado que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) nos três intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas). Diante desses resultados, comprova-se que o processo de criopreservação não alterou o padrão de crescimento celular, ou seja, as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos apresentaram viabilidade *in vitro* nos dois grupos estudados, semelhante aos resultados de Temerman et al, 2008; Temerman et al, 2010 e Ding et al, 2010.

Os resultados do presente experimento também demonstraram a efetividade do crioprotetor empregado, confirmando os achados de De Rosa et al, 2009; Ding et al, 2010. Pode-se inferir ainda que, nos três intervalos de tempo analisados, houve uma menor variabilidade dos resultados no grupo de células criopreservadas, principalmente nos períodos de 24 e 72 horas, sugerindo que o processo de criopreservação selecionou colônias celulares capazes de sobreviverem à criopreservação. Dentro da metodologia abordada neste estudo e fortemente embasada na literatura, portanto, estamos convencidos de que o processo de criopreservação das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos, durante um período de 30 dias, apresentam uma forte capacidade para uso posterior. Os achados do presente experimento reforçam a teoria recente na literatura de uma futura aplicabilidade clínica desse tipo celular (CHEN; JIN, 2010; LEE, et al, 2010; HUANG et al, 2010).

É patente ressaltar que diversas culturas dos nossos experimentos foram excluídas da amostra em virtude da contaminação, por se tratar de cultura primária, fato este que também pode ser observado nos estudos de Temmerman et al. (2008), Perry et al. (2008), Woods et al. (2009) e Temmerman et al. (2010).

Em resumo, observamos que as culturas de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos são capazes de serem estabelecidas quando processadas dentro das primeiras 24 horas após a sua extração, exibindo potencial de adesão e proliferação quando submetidos a corretos protocolos de cultivo e criopreservação celular e que são corroborados também pelo estudo de Perry et al. (2008). Esses achados

confirmam a viabilidade do banco de células mesenquimais indiferenciadas de dentes humanos para aplicações na medicina regenerativa (CHEN; JIN, 2010; LEE, et al, 2010; HUANG et al, 2010). Esforços de pesquisas atuais, como as citadas neste estudo, são direcionadas à melhoria do processo de criopreservação dentário, otimizando esse processo para futuras aplicações clínicas (WOODS et al, 2009; HUANG et al, 2010).

Diante do que foi exposto, acreditamos no inquestionável potencial de aplicabilidade clínica das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos para acelerar os processos de reparo tecidual. Os resultados encontrados neste trabalho sustentam não só esta hipótese, como também reforçam a necessidade de mais pesquisas para comprovar se outros tipos celulares são influenciados ou não pelo processo de criopreservação. Infere-se ainda a importância de estudos futuros que avaliem a capacidade de integração dessas células criopreservadas sobre superfícies de biomateriais, como o titânio e carreadores de hidroxiapatita, o que trará novas perspectivas na regeneração periodontal e na bioengenharia em periodontia e implantodontia.

7. CONCLUSÕES

O processo de criopreservação em condições controladas, após um período de 30 dias, não exerceu influência na capacidade de adesão e proliferação das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de terceiros molares humanos, as quais apresentaram capacidade de crescimento *in vitro* semelhante às células não criopreservadas (frescas).

REFERÊNCIAS¹

AHRENS, N. et al. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. **Transplantation**, v. 78, n. 6, p. 925-929, Sep, 2004.

AJEN, S. A. Análise por tomografia computadorizada do enxerto autógeno na cirurgia de “sinus lift”. **Radiol Bras**, v. 38, n. 1, p. 25-31, 2005.

ARANA, V.; KATCHBURIAN, E. **Histologia e embriologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2^a. ed., 2004.

ARCEO, N. et al. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. **J Periodontol**, v. 62, p. 499–503, 1991.

ASAHARA, T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. **Circulation Research**, Baltimore, v. 85, p. 221-228, Aug, 1999.

AKIZUKI, T. et al. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. **J Periodontal Res**, v. 40, n. 3, p. 245-251, Jun, 2005.

BARRY, F. P. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Birth Defects. Res C Embryo Today**, v. 69, n. 3, p. 250-256, Aug, 2003.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 4, p. 568-584, Apr, 2004.

BARTLETT, P. F.; READE, P. C. Cryopreservation of developing teeth. **Cryobiology**, v. 9, p. 205–211, 1972.

BARTOLD, P. M. et al. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. **Periodontolog**, v. 24, p. 253–269, 2000.

¹ Segundo a normalização realizada pela Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT-NBR 6023/2002)

BARTOLD, P. M.; SHI, S.; GRONTHOS, S. Stem cells and periodontal regeneration. **Periodontolog**, v. 40, p. 164-172, 2006.

BASDRA, E. K.; KOMPOSCH, G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. **Eur J Orthod**, v. 19, p. 615–621, 1997.

BATH-BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. J. **Anatomia, histologia das estruturas orofacias**, São Paulo: Manole, 2^a. ed., 2008.

BENSON, K. C. M. et al. An Improved Cryopreservation Method for a Mouse Embryonic Stem Cell Line. **Cryobiology**, v. 56, n. 2, p. 120–130, April, 2008.

BERKOVITZ, B. K. B.; HOLLAND, G. R.; MOXHAM, B. J. **Anatomia, embriologia e histologia bucal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BORDJI, K. et al. J. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblast and osteoblast. **Biomaterials**, v. 17, n. 9, p. 929-940, May, 1996.

CAI, J.; WEISS, M. L.; RAO, M. S. In search of "stemness". **Exp. Hematol**, v. 32, n. 7, p. 585-598, Jul, 2004.

CHEN, S. C. et al. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. **J Periodontal Res**, v. 41, n. 6, p. 547-553, Dec, 2006.

CHEN, F-M.; JIN, Y. Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities. **Tissue Engineering: Part B**, v. 16, n. 2, p. 219-255, 2010.

CHOI, B. H. Periodontal ligament formation around titanium implants using cultured periodontal ligament cells: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, n. 2, p. 193-196, Mar-Apr, 2000.

CORDEIRO, M. M. et al. Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. **J Endod**, v. 34, n. 8, p. 962–969, 2008.

COURA G. S. et al. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. **J Periodont Res.**, v. 43, n. 5, p. 531–536, Oct, 2008.

DALEY, G. Q.; GOODELL, M. A.; SNYDER, E. Y. Realistic prospects for stem cell therapeutics. **Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)**, p. 398-418, 2003.

DE ROSA, A. et al. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: An attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. **Tissue Eng Part C**, v. 15, p. 659–667, 2009.

DING, G. et al. Effect of Cryopreservation on Biological and Immunological Properties of Stem Cells From Apical Papilla. **J. Cell. Physiol**, v. 223, p. 415–422, 2010.

EROGLU, A. et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. **Nat Biotechnol**, v. 18, p. 163–167, 2000.

FRANZOLIN, S. O. B. et al. Diferenciação de célula-tronco hematopoética periférica humana em osteoblasto sobre diferentes superfícies de implantes de titânio. **Rev. Dental Press Periodontia Implantol**, Maringá, v. 2, n. 2, p. 68-79, abr/maio/jun, 2008.

FUJII, S. et al. Investigating a Clonal Human Periodontal Ligament Progenitor/ Stem Cell Line In Vitro and In Vivo. **J. Cell. Physiol**, v. 215, n. 13, p. 743–749, Jun, 2008.

GAO, J. et al. Should cementoblasts express alkaline phosphatase activity? Preliminary study of rat cementoblasts in vitro. **J Periodontol**, v. 70, p. 951–959, 1999.

GAY, I. C.; CHEN, S.; MACDOUGALL, M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. **Orthod Craniofac Res**, v. 10, n. 3, p. 149-160, Aug, 2007.

GIANNOPOULOU, C.; CIMASONI, G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. **J Dent Res**, v. 75, p. 895–902, 1996.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, Dec, 2000.

GRONTHOS S. et al. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. **Dent Res**, v. 81, n. 8, p. 531-535, Aug, 2002.

GRONTHOS, S. et al. Ovine Periodontal Ligament Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential. **Calcif Tissue Int**, v. 79, n. 5, p. 310-317, Oct/ Nov, 2006.

GUO, N. et al. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. **Nat Biotechnol**, v. 18, p. 168–171, 2000.

HASEGAWA, M. et al. Human periodontal ligament sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. **Tissue Eng.**, v. 11, n. 4, p. 469-78, Mar-Apr, 2005.

HAU, G. R. et al. A preliminary review on the viability of the utilization of stem-cells derived from deciduous and permanent human teeth for tissue regeneration. **Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v.12, n.1, p. 47-55, Mar, 2006.

HUANG, G. T. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. **J Dentistry**, v. 36, n. 6, p. 379-386, Jun. 2008.

HUANG, Y. H. et al. Dental Stem Cells and Tooth Banking for Regenerative Medicine. **J Exp Clin Med.**, v. 2, n. 3, p. 111–117, Mar, 2010.

IVANOVSKI, S. et al. Stem cells in the periodontal ligament. **Oral Diseases**, v. 12, n. 4, p. 358–363, Jul, 2006.

ISAKA, J. et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. **J Periodontol**, v. 72, p. 314–323, 2001.

JAVAZON, E. H. et al. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passing. **Experimental Hematol**, v. 32, p. 414-425, 2004.

KAWANABE, K.; MURAKAMI, K.; YAMAMOTO, T. T. The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, n. 4, p. 1278–1283, Jun, 2006.

KAWASAKI, N. et al. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. **Arch Oral Biol**, v. 49, p. 59–69, 2004.

KADIYALA, S.; JAILSWAL, N.; BRUDER, S. P. Culture-expanded, bone marrow derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sizes segmental bone defect. **Tissue Engineering**, v. 3, p. 173- 185, 1997.

KIM, J. W. et al. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. **Ann Hematol**, v. 83, n. 12, p. 733-738, Dec, 2004.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery, Philadelphia**, v. 32, p. 232-242, Apr, 2006.

KRISTERSON, L.; SODER, P. O.; OTTESKOG, P. Transport and storage of human teeth in vitro for autotransplantation and replantation. **J Oral Surg**, v. 34, p. 13–18, 1976.

LANGER, R. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, p. 920, 1993.

LAINO, G. et al. Dental pulp stem cells can be detected in aged humans: An useful source for living autologous fibrous bone tissue (LAB). **J Bone Mineral Res** , v. 20, n. 1394–1402, 2005.

LAUREYS, W. et al. Revascularization after cryopreservation and autotransplantation of immature and mature apicoectomized teeth. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 119, p. 346–352, 2001.

LEE, S. Y. et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. **J Endod**, v. 36, n. 8, p. 1336–1340, Aug, 2010.

LEON, E. R. et al. Osteogenic effect of interleukin-11 and synergism with ascorbic acid in human periodontal ligament cells. **J Periodont Res**, v. 42, n. 6, p. 527–535, Dec, 2007.

LIN, N. H. et al. Putative stem cells in regenerating human periodontium. **J Periodont Res**, v. 43, n. 5, p. 514–523, Oct, 2008.

MAEDA, M, et al. In vitro mineralization by mesenchymal stem cells cultured on titanium scaffolds. **J Biochem**, v. 141, n. 5, p. 729-736, May, 2007.

MARTINEZ, S. A.; WALKER, T. Bone grafts. **Vet Clin North. Am Small Anim Pract**, v. 29, n. 5, p. 1207-1219, 1999.

MERYMAN, H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. **Cryobiology**, v. 8, p. 489-500, 1971.

MIYAGI, S. P. H. **Análise in vitro da expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) e de metaloproteinases da matriz (MMPs) em células tronco de polpa dentária humana.** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

MIURA, M, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **PNAS**, v. 100, n. 10, p. 5807–5812, May, 2003.

NAGATOMO, K. et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. **J Periodont Res**, v. 41, n. 4, p. 303-310, Aug, 2006.

NAKASHIMA, M.; REDDI, A. H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 1025-1032, Sept, 2003.

NEEDLEMAN, I. G. et al. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 19, n. 2, p. CD001724, Apr, 2006.

OGATA, Y. et al. Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. **J Periodontol**, v. 66, p. 1025–1031, 1995.

OH, Y. H. et al. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank-A preliminary study. **Cryobiology**, v. 51, n. 3, p.322–329, 2005.

OHTA, S. et al. The behavior of stem cells and progenitor cells in the periodontal ligament during wound healing as observed using immunohistochemical methods. **J Periodont Res**, v. 43, n. 6, p. 1-9, Dec, 2008.

OLIVEIRA, G. K. **Células-Tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão. 2008.** 50 folhas. (Tese Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, RS.

PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Isolation and use of platelet rich plasma and undifferentiated mesenchymal cells in bone grafts, **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1202-1205, jul/ago, 2007.

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**, v. 208, n. 2, p. 319-325, Aug, 2006.

PERRY, B. C. et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. **Tissue Engineering Part C Methods**, v. 14, n. 2, p. 149-156, Jun, 2008.

PITTENGER, M. F. et al. Multipotential potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284 (5411), p. 143-147, Apr, 1999.

POLIMENI, G.; XIROPAIDIS, A. V.; WIKESJO, U. M. E. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. **Periodontology**, v. 41, p. 30–47, 2006.

POLITIS, C. et al. Cryopreservation of teeth. Organizational aspects of a tissue bank for tooth tissues. **Acta Stomatol Belg**, v. 92, p. 149–154, 1995.

PRATA, K. L. **Efeito da quimioterapia em altas doses sobre as células-tronco mesenquimais humanas. 2006.** 202 folhas. Tese (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP da Universidade de São Paulo, SP.

PRICE, P. J.; CSEREPFALVI, M. Pulp viability and the homotransplantation of frozen teeth. **J Dent Res**, v. 51, p. 39–43, 1972.

REMEDIOS, A. Bone and bone healing. **Vetrinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 29, n. 5, Sept, 1999.

ROSADA, C. et al. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. **Calcif Tissue Int**, v. 72, n. 2, p. 135-142, Feb 2003.

SABATINI, F. et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Lab. Invest**, v. 85, n. 8, p. 962-971, Aug, 2005.

SANTIS, G. C.; PRATA, K. L. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells. **Revista de Medicina, Ribeirão Preto**, v. 42, n. 1, p. 36-47, 2009.

SCHWARTZ, O. Cryopreservation as long-term storage of teeth for transplantation or replantation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 15, p. 30–32, 1986.

SCHWARTZ, O.; ANDREASEN, J. O. Cryopreservation of mature teeth before replantation in monkeys (I). Effect of different cryoprotective agents and freezing devices. **Int J Oral Surg**, v. 12, p. 425–436, 1983.

SCHWARTZ, O.; ANDREASEN, J. O.; GREVE, T. Cryopreservation before replantation of mature teeth in monkeys. (II). Effect of preincubation, different freezing and equilibration rates and endodontic treatment upon periodontal healing. **Int J Oral Surg**, v. 14, p. 350–361, 1985.

SCHWARTZ, O.; RANK, C. P. Autotransplantation of cryopreserved tooth in connection with orthodontic treatment. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 90, p. 67–72, 1986.

SCHWINDT, T. T. et al. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 13-19, Dez, 2005.

SEO, B. M. et al. Recovery of Stem Cells from Cryopreserved Periodontal Ligament. **J Dent Res**, v. 84, n. 10, p. 907-912, Oct, 2005.

SEO, B. M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 149-155, Jul, 2004.

SHANTI, R. M. et al. Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, p. 1640-1647, 2007.

SHI, S.; ROBEY, P. G.; GRONTHOS, S. Comparison of Human Dental Pulp and Bone Marrow Stromal Stem Cells by cDNA Microarray Analysis. **Bone**, v. 29, n. 6, p. 532-539, December, 2001.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 18, n. 4, p. 696-704, Apr, 2003.

SHORT, B. et al. Mesenchymal stem cells. **Arch Med Res**, v. 34, n. 6, p. 565-571, Nov/Dec, 2003.

SILVÉRIO, K. G. et al. Stem Cells: Potential Therapeutics for Periodontal Regeneration. **Stem Cell Rev.**, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2008.

SLACK, J. M. W. Stem cells in epithelial tissues. **Science**, v. 287, p. 1431-1433, Feb, 2000.

SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral Diseases**, v. 13, n. 2, p. 151-157, Mar, 2007.

SOARES, A. P. et al. Células-tronco em odontologia. **Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial**, Maringá, v. 12, n. 1, jan./fev, 2007.

SOMERMAN, M. J. et al. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. **J Dent Res**, v. 67, p. 66–70, 1988.

SONG, L. et al. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. **Cytotherapy**, v. 6, n. 6, p. 596-601, 2004.

SOUZA, V. F. et al. Células-tronco: uma breve revisão. **R. Ci. méd. Boil. Salvador**, v. 2, n. 2, p. 251-256, jul/dez, 2003.

STEVENSON, D. J. et al. Cryopreservation of viable hepatocyte monolayers in cryoprotectant media with high serum content: metabolism of testosterone and kaempherol post-cryopreservation. **Cryobiology**, v. 49, n. 97–113, 2004.

STOCUM, D. L. Stem cells in regenerative biology and medicine. **Wound Repos Regen**, v. 9, p. 429-442, 2001.

TECHAWATTANAWISAL, W. et al. Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 15, n. 4, p. 917-923, Jun, 2007.

TEMMERMAN, L. et al. Tooth transplantation and cryopreservation: State of the art. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 129, n. 691-695, 2006.

TEMMERMAN, L. et al. Influence of cryopreservation on human periodontal ligament cells in vitro. **Cell Tissue Banking**, v. 9, n. 1, p. 11–18, 2008.

TEMMERMAN, L. et al. Influence of cryopreservation on the pulpal tissue of immature third molars in vitro. **Cell Tissue Banking**, v. 11, n. 3, p.281-289, Aug, 2010.

TRUBIANI, O. et al. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: A morphological report. **J Biomed Mater Res A**, v. 87, n. 4, p. 986-993, Dec, 2008.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol.**, v. 12, n. 11, p. 502-508, Nov, 2002.

VERFAILLIE, C. M.; PERA, M. F.; LANSDORP, P. M. Stem cells: hype and reality. **Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)**, p. 369-391, 2002.

WOBUS, A. M.; BOHELER, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiol Rev**, v. 85, n. 2, p. 635-678, Apr, 2005.

WOODS, E. J. et al. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. **J. Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 150-157, Oct, 2009.

YOUNG, H. E.; BLACK, A. C., Jr. Adult stem cells. **Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.**, v. 276, n. 1, p. 75-102, Jan, 2004.

ZANG, W. et al. Multineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 10, p. 2813-2823, Oct, 2006.

ZHOU, Y. et al. Osteogenic and Adipogenic Induction Potential of Human Periodontal Cells. **J Periodontol**, v. 79, n. 3, p. 525-534, March, 2008.

ANEXO A- APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

PARECER N° 080/2010

Prot. nº	018/10 CEP/UFRN
CAAE	0021.0.051.000-10
Projeto de Pesquisa	A influência da criopreservação nas células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos - análise comparativa in vitro
Área de Conhecimento	4 - CIÊNCIAS DA SAÚDE 4.02 - Odontologia
Pesquisador Responsável	Carlos Augusto Galvão Barboza
Instituição Onde Será Realizado	Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Instituição Sediadora	Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Nível de abrangência do Projeto	Dissertação de Mestrado
Período de realização	Cronograma: Início - jan/2010 - Término - jan/2011 Arrolamento: Início - jun/2010 - Término - jul/2010
Revisão ética em	7 de maio de 2010

RELATO

1. RESUMO

O projeto de pesquisa propõe a utilização de dentes (terceiro molar) de pacientes que já precisam realizar esse procedimento. A partir destes dentes serão isoladas células mesenquimais indiferenciadas para analisar a capacidade de divisão depois do congelamento em nitrogênio líquido. O projeto aborda a temática de células-tronco adultas e sua utilização na regeneração de tecidos e órgãos lesados. Na literatura existem alguns trabalhos utilizando a polpa dentária e ligamento periodontal, entretanto não existem estudos do comportamento destas células após armazenamento por longo tempo por criopreservação. O objetivo deste trabalho será avaliar a influência da criopreservação na capacidade de adesão e proliferação celular.

2. ENTENDIMENTOS E PARECER

Considerando que as pendências expostas por este Comitê foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

3. ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR

Em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em pesquisa (Brasília, 2002) e Res. 196/96 – CNS o pesquisador deve:

1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Res. 196/96 CNS – item IV.2d);
2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Res. 196/96 – CNS item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p. 41);

4. apresentar ao CEP/UFRN relatório final após conclusão da pesquisa (Manual Operacional para Comitês de ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.65).

Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN (www.etica.ufrn.br).

Natal, 10 de maio de 2010.


Dulce Almeida

Coordenadora do CEP-UFRN

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você para participar da pesquisa sobre **A INFLUÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO NAS CÉLULAS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE HUMANOS - ANÁLISE COMPARATIVA *IN VITRO*** o que significa estudar o comportamento destas células após o seu congelamento, com a finalidade de entender os princípios para o desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de restaurar, manter ou melhorar a função do ser vivo; diante do papel desempenhado por estas células (mesenquimais do ligamento periodontal de humanos) congeladas nos processos de regeneração.

A sua participação não trará nenhum risco previsível ou desconforto. Você não será submetido a nenhum procedimento (extra) além da cirurgia conforme à indicação cirúrgica, assim os riscos envolvidos nesta pesquisa são mínimos, porém você deve autorizar os pesquisadores a examinarem os seus fragmentos teciduais (dentes removidos), que seriam tirados de sua boca e desprezados após a cirurgia. As informações confidenciais serão guardadas em local seguro e somente usadas com o propósito científico, sem divulgação do seu nome.

Sua participação é voluntária, caso queira, você poderá desistir a qualquer momento, sem que isso lhe traga prejuízo ou penalidade, basta que retire o seu consentimento em participar.

A pesquisa deverá contribuir para o aumento do conhecimento na área de engenharia de tecidos, que abrange um campo interdisciplinar onde princípios de engenharia e ciências biológicas são utilizados para o desenvolvimento de substitutos biológicos (extrato de tecido periodontal congelado) capazes de recuperar a função do ser vivo. A importância desta pesquisa, portanto, está no fato da necessidade do desenvolvimento e aprimoramento, assim como, um melhor entendimento para facilitar na escolha de tratamentos mais eficazes em regeneração tecidual, trazendo assim, benefícios para a sociedade de um modo geral.

Você não terá nenhum gasto financeiro por qualquer procedimento executado por essa pesquisa e terá direito a reembolso (ressarcimento) de qualquer gasto comprovadamente que você tenha feito para a realização desse estudo, bem como será indenizado em caso de dano comprovadamente ocorrido por sua participação na mesma.

Você receberá uma cópia desse termo no seu endereço via correio com aviso de recebimento e qualquer dúvida a respeito da pesquisa poderá perguntar a Carlos Augusto Galvão Barboza, no Campus Universitário S/N no Departamento de Morfologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Lagoa Nova, Natal/RN fone (84) 3215-3431 celular (84-91156660) E-mail: carlosaugusto2000@hotmail.com

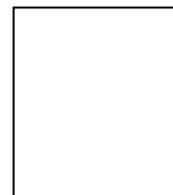
Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa **“A INFLUÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO NAS CÉLULAS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE HUMANOS - ANÁLISE COMPARATIVA *IN VITRO*”**.

Assinatura ou impressão

Digital do voluntário: _____ Data: ___/___/___

Assinatura do pesquisador: _____ Data: ___/___/___



Quanto à ética dessa pesquisa poderá ser questionada ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelo telefone 3215-3135.