

CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE ORIGEM DENTÁRIA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

*Cryopreservation of stem cells of dental origin:
a literature review*

Geovanna Caroline Brito da Silva¹
Marcelo Gadelha Vasconcelos²
Rodrigo Gadelha Vasconcelos²

¹ Acadêmica do curso de graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Araruna-PB, Brasil.

² Professor Doutor efetivo da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Araruna-PB, Brasil.

SILVA, Geovanna Caroline Brito da, VASCONCELOS, Marcelo Gadelha e VASCONCELOS, Rodrigo Gadelha. Criopreservação de células-tronco de origem dentária: uma revisão de literatura. *SALUS-VITA*, Bauru, v. 39, n. 4, p. 1061-1092, 2020.

RESUMO

Introdução: Os tecidos dentários são uma fonte acessível de células-tronco mesenquimais que podem ser úteis para o tratamento de variadas doenças clínicas. Logo, o interesse e a necessidade de garantir uma forma eficaz de conservar as células-tronco de origem dentária para aplicações futuras levou ao desenvolvimento de métodos de criopreservação, técnica pela qual são aplicadas baixas tempe-

Autor correspondente:

Rodrigo Gadelha Vasconcelos
rodrigogadelhavasconcelos@yahoo.com.br

Recebido em: 07/12/2020

Aceito em: 16/12/2020

raturas para cessar de maneira reversível e controlada as funções biológicas de células e tecidos vivos. **Objetivo:** Realizar uma revisão de literatura acerca da criopreservação de células-tronco de origem dentária, enfatizando características, princípios, protocolos existentes e efeitos desse método às propriedades biológicas dessas células. **Metodologia:** Este estudo constituiu numa revisão de literatura com base nas informações de 54 artigos científicos publicados no período entre 2005 e 2019 e consultados em bases de dados on-line (PubMed, SciELO e Google Acadêmico), com a utilização dos seguintes descritores: Criopreservação (*Cryopreservation*), Células-tronco dentárias (*Dental stem cells*) e Criopreservação dental (*Dental cryopreservation*). **Resultados:** Verificou-se que as células-tronco de origem dentária parecem manter suas características biológicas, como a taxa de viabilidade, proliferação celular e ampla capacidade de diferenciação mesmo após a criopreservação. Além disso, a criopreservação magnética apresenta-se como um protocolo promissor para a conservação de células-tronco dentárias. **Conclusão:** A criopreservação é uma técnica eficaz para o armazenamento a longo prazo de células-tronco derivadas de tecidos dentários. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados em busca do desenvolvimento de protocolos de criopreservação mais padronizados e seguros que não afetem as propriedades biológicas das células-tronco dentárias.

Palavras-chaves: Criopreservação. Células-tronco dentárias. Células-tronco mesenquimais. Células criopreservadas.

ABSTRACT

Introduction: Dental tissues are an accessible source of mesenchymal stem cells that can be useful for the treatment of various clinical diseases. Thus, the interest and the need to ensure an efficient way to preserve stem cells of dental origin for future applications led to the development of cryopreservation methods, a technique by which low temperatures are applied to reverse, in a reversible and controlled manner, biological functions of living cells and tissues. **Objective:** To perform a literature review about the cryopreservation of stem cells of dental origin, emphasizing characteristics, principles, existing protocols, and effects of this method on the biological properties of these cells. **Methodology:** This study consisted of a literature review based on information from 54 scientific articles published between 2005 and 2019 and consulted in online databases (PubMed, SciELO, and Google Scholar), using

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

the following descriptors: Cryopreservation, Dental stem cells, and Dental cryopreservation. Results: Stem cells of dental origin seem to maintain their biological characteristics, such as viability rate, cell proliferation, and ample capacity for differentiation even after cryopreservation. Also, magnetic cryopreservation presents itself as a promising protocol for the conservation of dental stem cells. Conclusion: Cryopreservation is an effective technique for the long-term storage of stem cells derived from dental tissues. However, additional studies should be carried out to develop more standardized and safer cryopreservation protocols that do not affect the biological properties of dental stem cells.

Keywords: *Cryopreservation. Dental stem cells. Mesenchymal stem cells. Cryopreserved cells.*

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os tecidos dentários se tornaram uma atraente fonte de células-tronco mesenquimais (HILKENS *et al.*, 2016). Tais células são caracterizadas por propriedades de autorrenovação (VASCONCELOS *et al.*, 2011) e imunomodulação, além de possuírem a capacidade de se diferenciarem em variados tipos celulares e de poderem ser isoladas facilmente de múltiplos tecidos, incluindo medula óssea, sangue do cordão umbilical, tecido adiposo, tecido dentário, tecido neural, intestino, dentre outros (KUMAR *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2019).

Sendo assim, a cavidade bucal se apresenta, depois da medula óssea e do tecido adiposo, como um potencial reservatório de células-tronco mesenquimais que estão presentes em diferentes tecidos, como o ligamento periodontal, o folículo dentário, a papila apical e, principalmente, a polpa dentária (XIAO e NASU, 2014). Nesse contexto, as células-tronco dentárias são caracterizadas sobretudo pela facilidade de disponibilidade, visto que são extraídas de dentes decíduos em erupção ou extraídos (MORTADA *et al.*, 2017). Tal fato torna seu isolamento mais acessível e com caráter menos invasivo do que a aspiração de células-tronco mesenquimais da medula óssea, por exemplo. Ademais, sua obtenção não envolve questões éticas, em contraste com as fontes convencionais, como no caso das células-tronco embrionárias (RODAS-JUNCO e VILLICAÑA, 2017).

No entanto, a cultura a longo prazo dessas células pode estar associada a efeitos deletérios, como instabilidade fenotípica, morte celular, senescência ou contaminação (KUMAR *et al.*, 2015). Logo,

procedimentos adequados de armazenamento a longo prazo que não apenas mantenham as células viáveis, mas também resguardem a estabilidade fenotípica e a capacidade de diferenciação são extremamente necessários, uma vez que tais fatores contribuem diretamente para o sucesso da aplicação terapêutica *in vivo* dessas células (KIM *et al.*, 2019).

Nesse cenário, a necessidade de manter as células vivas por um longo período sem a perda de suas funções levou ao desenvolvimento de métodos de criopreservação, que têm como objetivo cessar reversivelmente, de forma controlada, todas as funções biológicas dos tecidos vivos em uma temperatura ultrabaixa, geralmente por volta de -196°C (JI *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2011). Portanto, a disponibilidade e a criopreservação de células-tronco têm sido material de pesquisa intensiva há várias décadas, tornando-se uma questão importante para a engenharia tecidual (DEMIRCI *et al.*, 2014; MUNÉVAR *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2010).

Apesar das células-tronco dentais possuírem acessibilidade facilitada por exodontias em indivíduos mais jovens ou quando um dente decíduo é esfoliado, tais remoções dentárias ou esfoliações espontâneas ocorrem em um período da vida em que normalmente não existe a necessidade de terapia com células-tronco (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018). Dessa forma, levando em consideração que os procedimentos de processamento de células da polpa dentária, por exemplo, dificilmente aconteçam imediatamente após a exodontia em ambiente clínico, a pesquisa em armazenamento de tecido dentário necessita de maiores abordagens. Tem sido demonstrado que as células-tronco normalmente mantêm sua sobrevivência em baixas temperaturas, desde que estejam dispersas em crioprotetores (LINDEMANN *et al.*, 2014).

Ante o exposto, o objetivo do presente estudo é discorrer, por meio de uma revisão da literatura, sobre a criopreservação de células-tronco especificamente de origem dentária, abordando, de maneira preliminar, a heterogeneidade dessas células e, posteriormente, com maior enfoque nas características e princípios da criopreservação, bem como nos protocolos existentes e efeitos, relatados na literatura, desse método às propriedades biológicas das células-tronco derivadas de tecidos dentários. Além disso, o trabalho buscou, em segundo plano, despertar o interesse dos cirurgiões-dentistas acerca da possibilidade de obtenção de células-tronco, durante tratamentos odontológicos usuais, que podem ser posteriormente criopreservadas para aplicação futura em terapias celulares.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

METODOLOGIA

O presente estudo constitui uma revisão de literatura realizada por meio de um levantamento bibliográfico de artigos científicos originais publicados entre 2005 e 2019. Para isso, foram utilizadas as seguintes bases de dados eletrônicas: PubMed– U.S. National Library of Medicine, SciELO (Scientific Electronic Library) e o Google Acadêmico.

Para a filtragem e seleção das publicações, os seguintes descritores em português/inglês foram utilizados: Criopreservação (*Cryopreservation*), Células-tronco dentárias (*Dental stem cells*) e Criopreservação dental (*Dental cryopreservation*). Adicionalmente, a busca manual nas listas de referências dos artigos selecionados foi um recurso utilizado. De maneira preliminar, foi feita a leitura prévia do título e do resumo dos artigos resultantes da busca com a finalidade de obter um entendimento prévio acerca do assunto principal abordado.

Dentre os critérios de inclusão empregados, foram considerados: artigos cujo conteúdo se enquadrava no enfoque e no objetivo do trabalho, bem como os mais pertinentes no que se refere à abrangência das informações desejadas. Além disso, foram analisados aspectos de disponibilidade integral do texto do estudo e clareza no detalhamento metodológico utilizado. Por outro lado, foram excluídos da amostra trabalhos que não exibiram relevância sobre o tema abordado e que não se enquadraram nos critérios de inclusão.

Os artigos obtidos através das estratégias de busca que tiveram como temática principal “criopreservação de células-tronco dentárias” foram avaliados e classificados em elegíveis (estudos que apresentaram relevância clínica e tinham possibilidade de serem incluídos na revisão) e não elegíveis (estudos sem relevância, sem possibilidade de inclusão na revisão). Dessa forma, após uma filtragem cautelosa, foram selecionados 54 artigos para inclusão na revisão.

REVISÃO DE LITERATURA

A HETEROGENEIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO DE ORIGEM DENTÁRIA: CONSIDERAÇÕES GERAIS E NECESSIDADE DE PRESERVAÇÃO

O dente é constituído por vários tecidos, incluindo a camada externa de esmalte mineralizada, a camada adjacente de dentina mi-

neralizada, a polpa dentária contendo vasos sanguíneos, nervos e tecido mesenquimal e estruturas radiculares compostas de dentina, cemento e ligamento periodontal, que fixam os dentes ao osso alveolar subjacente. A dentina, por sua vez, possui túbulos característicos e distintos, produzidos por células-tronco mesenquimais dentais derivadas da crista neural chamadas odontoblastos, que persistem em dentes maduros e exibem capacidades regenerativas limitadas para formar uma dentina reparadora em resposta a lesões ou doenças (CHALISSERRY *et al.*, 2017).

De outro modo, a polpa dentária é composta de células mesenquimais dentais, nervos e vasos sanguíneos que passam pelo canal radicular. Nesse sentido, os dentes se desenvolvem através de interações contínuas e recíprocas entre as células-tronco mesenquimais derivadas da crista neural craniana e células-tronco epiteliais orais durante a embriogênese inicial (CHALISSERRY *et al.*, 2017).

De acordo com os estágios de desenvolvimento, as células-tronco podem ser divididas em embrionárias ou adultas (EGUSA *et al.*, 2012; PENG *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2011). A principal vantagem das células-tronco embrionárias é sua habilidade de proliferação e diferenciação em diferentes tipos celulares (plasticidade). Todavia, existem limitações no que se refere à instabilidade genética, necessidade de transplante dessas células para hospedeiros imunocomprometidos, risco de formação de teratomas, além de questões éticas. Já as células-tronco adultas são autogênicas, não envolvem questões éticas e respondem aos fatores de crescimento do hospedeiro, porém essas células também possuem limitações como o fato de não serem pluripotentes, dificuldade de isolamento e cultivo *in vitro*, bem como a sua menor capacidade de diferenciação tecidual (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

A diferenciação e proliferação de células-tronco embrionárias constituem a base do desenvolvimento animal. Por outro lado, a diferenciação adicional de células-tronco adultas é o pré-requisito para a reparação e regeneração de tecidos e órgãos. Com as características de alta capacidade proliferativa e plasticidade, as células-tronco são consideradas uma nova fonte de células-progenitoras na engenharia tecidual com uma ampla possibilidade de aplicações (PENG *et al.*, 2009).

No entanto, em virtude da natureza proliferativa e de outros critérios éticos com o processo de recuperação e uso de células-tronco, elas estão sendo utilizadas de maneira muito restrita (HAR e PARK, 2015). Nessa perspectiva, foi observado que as células-tronco são encontradas em muitos reservatórios de tecido, incluindo o sistema estomatognático. A cavidade oral, assim, parece ser uma fonte parti-

SILVA, Geovanna Caroline Brito da, VASCONCELOS, Marcelo Gadelha e VASCONCELOS, Rodrigo Gadelha. Criopreservação de células-tronco de origem dentária: uma revisão de literatura. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 4, p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

cularmente atraente, já que essas células estão amplamente presentes e acessíveis nos tecidos dentais e periodontais, podendo ser usadas para fins terapêuticos. Adicionalmente, a sua aplicação não envolve questões éticas, sendo uma vantagem significativa em relação às fontes convencionais, como as células-tronco embrionárias (BROZEK *et al.*, 2018; RODAS-JUNCO e VILLICAÑA, 2017).

Por conseguinte, desde a descoberta da existência de células-tronco adultas da polpa dentária no ano de 2000, vários outros tipos de células-tronco dentárias foram sucessivamente isoladas dos dentes decíduos e permanentes (ESTRELA *et al.*, 2011), sendo evidenciadas, assim, sua presença e a possibilidade de isolamento de variados tecidos orais, como o osso craniofacial, a polpa dentária, o ligamento periodontal, o germe dentário, a papila apical, a mucosa oral, a gengiva e o periósteo (CHALISSERRY *et al.*, 2017).

Dessa forma, as células-tronco dentárias se definem como um conjunto de células-tronco pós-natais providas de propriedades similares às das células-tronco mesenquimais à exemplo, a capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação em várias linhagens. Essas células são derivadas da crista neural e, assim, têm uma origem diferente das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, que são provenientes do mesoderma embrionário (KOMADA *et al.*, 2012).

No que se refere à classificação das células-tronco dentais (*Dental Stem Cells – DSCs*), dois grupos principais podem ser destacados: células-tronco relacionadas à polpa dentária e células-tronco relacionadas ao periodonto (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018). Variadas estruturas que dão origem às diferentes populações de células-tronco dentais serão ilustradas adiante na figura 1.

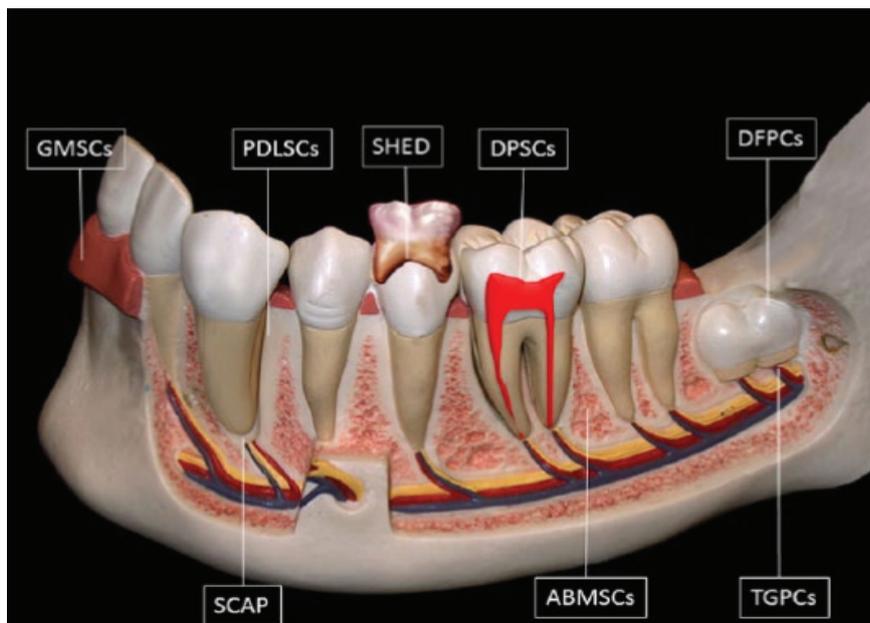


Figura 1 - Representação esquemática que ilustra as diferentes fontes de células-tronco dentárias. **GMSCs** (*Gingival Mesenchymal Stem Cells*) – células-tronco mesenquimais gengivais; **PDLSCs** (*Periodontal Ligament Stem Cells*) – células-tronco do ligamento periodontal; **SHED** (*Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*) – células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos; **DPSCs** (*Dental Pulp Stem Cells*) – células-tronco da polpa dentária; **DFPCs** (*Dental Follicle Progenitor Cells*) – células progenitoras do folículo dentário; **TGPCs** (*Tooth Germ Progenitor Cells*) – células progenitoras do germe do dente; **ABMSCs** (*Alveolar Bone-derived Mesenchymal Stem Cells*) – células-tronco mesenquimais derivadas do osso alveolar; **SCAP** (*Stem Cells from Apical Papilla*) – células-tronco da papila apical.

Fonte: Chalisserry *et al.* (2017).

Diante do contexto apresentado, os dentes têm uma grande vantagem de ser a fonte mais natural e não-invasiva de células-tronco (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019). Logo, os cirurgiões-dentistas devem reconhecer a promessa do campo emergente da odontologia regenerativa e a possibilidade de obter células-tronco durante tratamentos dentários convencionais que podem ser armazenadas para uso terapêutico futuramente (EGUSA *et al.*, 2012).

No entanto, um significativo desafio é a identificação e o adequado isolamento dessas células dos tecidos de um paciente (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019). Nesse âmbito, a criopreservação de células para uso clínico é um recurso muito importante a ser considerado (MORTADA *et al.*, 2017), visto que as células-tronco dentárias têm potencial aplicabilidade para o tratamento de doenças, como infarto do miocárdio, doenças neurodegenerativas e diabetes (HILKENS *et al.*, 2016). Portanto, o conceito de desenvolvimento de bancos de

SILVA, Geovanna Caroline Brito da, VASCONCELOS, Marcelo Gadelha e VASCONCELOS, Rodrigo Gadelha. Criopreservação de células-tronco de origem dentária: uma revisão de literatura. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 4, p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

dentes e preservação de células-tronco dentárias é bastante promissor (CHALISSERRY *et al.*, 2017).

O PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO: CONCEITO E CARACTERÍSTICAS

O desenvolvimento de métodos que promovam o armazenamento de células-tronco com comprometimento mínimo de viabilidade celular, capacidade de diferenciação e função é substancialmente necessário para a aplicabilidade clínica (MUNÉVAR *et al.*, 2015). Nesse contexto, a criopreservação consiste no emprego de baixas temperaturas para preservar a integridade estrutural e funcional das células e tecidos (HUNT, 2017) e apresenta-se como um método chave para manutenção das propriedades biológicas das células-tronco mesenquimais nas fases iniciais. O processo facilita o transporte e fornece um adequado armazenamento de um grande número de células por longos períodos (CONDE *et al.*, 2016). Conforme a utilização das células criopreservadas aumenta, as demandas colocadas na indústria de biobancos estão crescendo e evoluindo em um ritmo acelerado (BAUST *et al.*, 2015).

A criopreservação é dependente de um complexo equilíbrio estabelecido por uma taxa de resfriamento bem controlada e a concentração do agente crioprotetor. Dessa forma, um adequado agente deve permitir que a água deixe a célula lentamente para evitar danos nas membranas das células, mas rápido o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo em seu interior. Nesse contexto, um solvente polar aprótico, o dimetilsulfóxido, é extensamente aplicado como agente crioprotetor. Em virtude da sua natureza hidrofílica, esse composto tem a capacidade de induzir a saída de água numa velocidade ideal, reduzindo o estresse térmico durante a transição do estado líquido para o sólido (CONDE *et al.*, 2016).

Todavia, o dimetilsulfóxido demonstrou ser citotóxico, visto que pode diminuir a capacidade de proliferação e diferenciação das células-tronco mesenquimais depois do descongelamento (LINDEMANN *et al.*, 2014). Posto isso, pesquisadores têm testado substâncias alternativas, como glicerol e etilenoglicol, e açúcares, como sacarose e trealose, devido à sua citotoxicidade reduzida como agentes crioprotetores (PARK *et al.*, 2014).

Atualmente, os agentes crioprotetores são subdivididos em dois grupos principais. O primeiro inclui as substâncias de baixo peso molecular, como o glicerol, etileno (propileno) glicol, dimetilsulfóxido, que podem penetrar na membrana citoplasmática das células,

prevenir a formação de núcleos de cristal de gelo e desacelerar o crescimento do cristal de gelo intracelular (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018). Já o segundo grupo inclui substâncias com alto peso molecular, por exemplo, dextrano, hidroxietilamido, polivinilpirrolidona e álcool polivinílico (STOLZING *et al.*, 2012).

O glicerol e etilenoglicol são agentes crioprotetores amplamente usados em técnicas de congelamento rápido - técnica de criopreservação. Depois disso, a solução é convertida em um sólido amorfo, que deve ser desprovido de cristais de gelo. Além disso, equipamentos especializados, como *freezers* de campo magnético (LEE *et al.*, 2010, 2012, 2012; LIN *et al.*, 2014) e *freezers* programados (PARK *et al.*, 2014), têm sido utilizados para melhorar as propriedades biológicas das células e minimizar os efeitos tóxicos do agente crioprotetor (CONDE *et al.*, 2016).

PRINCÍPIOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

As atuais técnicas empregadas para o armazenamento de células incluem métodos convencionais de criopreservação que empregam a adição de crioprotetor, congelamento lento programado e congelamento rápido (vitrificação) (RAIK *et al.*, 2019). Para o entendimento dos riscos, benefícios e das consequências das diferentes técnicas de criopreservação, faz-se necessário entender também os princípios básicos do congelamento e descongelamento de células (HUNT, 2017).

As células-tronco dentais podem estar suscetíveis a um dano irreversível durante o processo de congelamento ou descongelamento, denominado de lesão por congelamento (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018). Nas últimas décadas, várias hipóteses foram formuladas para tentar explicá-la (BAUST *et al.*, 2015).

Sendo assim, um mecanismo exato é pouco entendido, porém, de forma geral, as alterações irreversíveis das células são ocasionadas pela formação extra e intracelular de cristais de gelo. Essa hipótese permanece como a mais aceita (BAUST *et al.*, 2015). Isso ocorre através de dois mecanismos principais: o primeiro deles acontece quando as células-tronco dentais são resfriadas lentamente e a formação do cristal de gelo extracelular provoca um efluxo osmótico de água das células. Tal mecanismo eleva a concentração de solutos intracelulares, o que pode provocar um dano osmótico devido à toxicidade do soluto. Em contraste, o segundo ocorre quando as células-tronco dentais são resfriadas rapidamente. Por esse motivo, não há tempo suficiente para a saída de água das células, assim,

SILVA, Geovanna Caroline Brito da, VASCONCELOS, Marcelo Gadelha e VASCONCELOS, Rodrigo Gadelha. Criopreservação de células-tronco de origem dentária: uma revisão de literatura. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 4, p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

observa-se a formação intracelular de cristais de gelo ocasionando danos mecânicos e estruturais às células (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018).

Por outro lado, a criação de espécies reativas de oxigênio apresenta-se também como um estresse associado ao congelamento, o que pode ser um estímulo para a apoptose (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018). Para evitar isso, existe um agente crioprotetor incorporado ao meio de congelamento para proteção das células-tronco dentais durante o processo de congelamento e descongelamento. Logo, os principais efeitos dos agentes crioprotetores são a otimização da taxa de resfriamento e o bloqueio da formação de cristais de gelo, ligando-se aos núcleos e diminuindo o crescimento dos cristais de gelo (STOLZING *et al.*, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2011).

De forma geral, as principais etapas para a criopreservação da maioria dos tipos de células são: (1) isolamento de células, (2) adição de criopreservante, (3) indução de cristais de gelo na suspensão de células após uma certa taxa de resfriamento, (4) armazenamento de longo prazo em temperaturas criogênicas, geralmente em nitrogênio líquido, (5) descongelamento rápido a 37°C, (6) remoção do crioprotetor por centrifugação e (7) semeadura de células para permitir seu crescimento em cultura (MUNÉVAR *et al.*, 2015).

CRIOPRESERVAÇÃO DOS DENTES

Apesar da principal área de interesse dos estudos envolvendo criopreservação trabalhar com o congelamento das próprias células-tronco dentais, ou seja, a criopreservação de linhagens dessas células após o seu isolamento e expansão bem-sucedidos dos tecidos derivados dos dentes, muitos esforços têm sido direcionados para tentar criopreservar os dentes (decíduos e permanentes). Em um ambiente laboratorial, o isolamento e a expansão das células-tronco dentárias são de alto custo, demorados e arriscados devido à contaminação e diferenciação espontânea (LINDEMANN *et al.*, 2014).

Nesse contexto, o armazenamento de dentes hígidos é justamente adiar esses procedimentos para um momento posterior, quando as células-tronco dentais seriam realmente necessárias. Todavia, esse método ainda possui muitas limitações, o que torna seu uso clínico praticamente impossível. Um dos problemas apresentados é a baixa porcentagem de células-tronco dentais viáveis obtidas de dentes decíduos ou permanentes criopreservados após o processo de descongelamento (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018).

Em um estudo, Lindemann *et al.* (2014) demonstraram uma taxa de cultura de apenas 30% das células-tronco da polpa dentária que foram obtidas de dentes decíduos criopreservados, enquanto em dentes não criopreservados essa taxa sobe para 61%. Ademais, após o descongelamento, as células-tronco criopreservadas da polpa mostraram uma baixa taxa de proliferação, bem como citoplasma de formato arredondado, em contraste com o citoplasma fusiforme do grupo não criopreservado.

Já em outra pesquisa, Woods *et al.* (2009) utilizaram dentes permanentes imaturos com raízes não totalmente desenvolvidas, e foi observado, após o descongelamento, uma taxa de isolamento de apenas 20%. Para eles, três em cada dez dentes criopreservados eram ausentes de células-tronco com características morfológicas de células-tronco da polpa dentária ou não exibiam qualquer crescimento celular.

A baixa taxa de isolamento pode estar associada à baixa penetração e difusão do agente crioprotetor no centro da polpa dentária e, assim, à proteção insuficiente da formação de cristais de gelo. Em função disso, dentes decíduos sem reabsorção radicular visível ou dentes permanentes com raízes totalmente desenvolvidas não podem ser usados. Em contrapartida, a reabsorção radicular ou ápices radiculares abertos fornecem uma forma de penetração para o agente crioprotetor. Entretanto, a taxa de proliferação se mantém muito baixa, em particular para atender às demandas clínicas (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018).

Portanto, a criopreservação de linhagens isoladas de células-tronco dentais continua sendo o método com os resultados mais satisfatórios de crio-recuperação. Esse fato é muito importante e serve como resposta para o questionamento se os bancos de células devem armazenar dentes inteiros hígidos ou as populações de células-tronco isoladas. Por outro lado, pode-se supor que uma manipulação mínima dos tecidos pulparens antes do congelamento possivelmente produza melhores resultados de viabilidade pós-descongelamento das células-tronco da polpa dentária (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018). No entanto, Woods *et al.* (2009) refutaram essa ideia, visto que as células-tronco obtidas do tecido pulpar pós-descongelamento não proliferaram na mesma taxa observada em células não congeladas, demorando aproximadamente o dobro de tempo.

Em contrapartida, um estudo realizado por Gioventù *et al.* (2012) objetivou o desenvolvimento de um novo método para o armazenamento de dentes inteiros sem a necessidade de fratura dental e processamento celular antes da criopreservação. Para isso, 10 dentes decíduos não esfoliados foram coletados e, pouco tempo depois da

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

extração, 4 deles foram perfurados com *laser* Nd: YAG (perfuração a *laser*) a fim de fazer microcanais através de camadas de esmalte e dentina para alcançar a câmara pulpar sem danificar a polpa, permitindo a penetração do criopreservativo e a conservação das células a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um *freezer* mecânico por 10 dias. Paralelamente, 2 dentes sem perfuração a *laser* foram submetidos à criopreservação e os 4 dentes restantes não foram criopreservados para obtenção de células-tronco frescas. Após o descongelamento e fratura mecânica, isto é, quebra dos dentes tanto frescos como criopreservados para obtenção da polpa, isolamento, expansão e caracterização das células obtidas, os resultados demonstraram que as células-tronco da polpa de dentes criopreservados perfurados a *laser* apresentaram morfologia de células-tronco mesenquimais, imunofenótipo, viabilidade e taxa de proliferação semelhantes às de células isoladas de dentes frescos não criopreservados, enquanto houve perda significativa de viabilidade celular e taxa de proliferação das células isoladas de dentes criopreservados sem perfuração a *laser*. Esses dados apoiam o uso desse método para bancos de dentes inteiros, visto que o uso do *laser* Nd: YAG reduz custos de procedimento de fratura dental antes da criopreservação e simultaneamente evita o superaquecimento provocado por brocas odontológicas tradicionais, mantendo a temperatura durante a perfuração em nível compatível com a preservação da integridade celular.

COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA HUMANA

A coleta da polpa dentária diz respeito principalmente aos dentes hígidos com indicação de extração, que podem ser dentes decíduos (desde que não haja rizálises muito avançadas) ou dentes permanentes, impactados ou parcialmente erupcionados. A fase pré-operatória envolve a programação da cirurgia com a avaliação da viabilidade de manter o dente intacto durante o processo de avulsão, bem como a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, do contrato de criopreservação e realização de testes sorológicos para detecção de doenças infecciosas transmissíveis. A cirurgia pode ser realizada sob anestesia local ou geral. O dente deve ser mantido intacto quando possível (figura 2). Ao ser extraído, o dente é imediatamente colocado em um tubo de coleta em um kit de transporte (DUTILLEUL *et al.*, 2012).

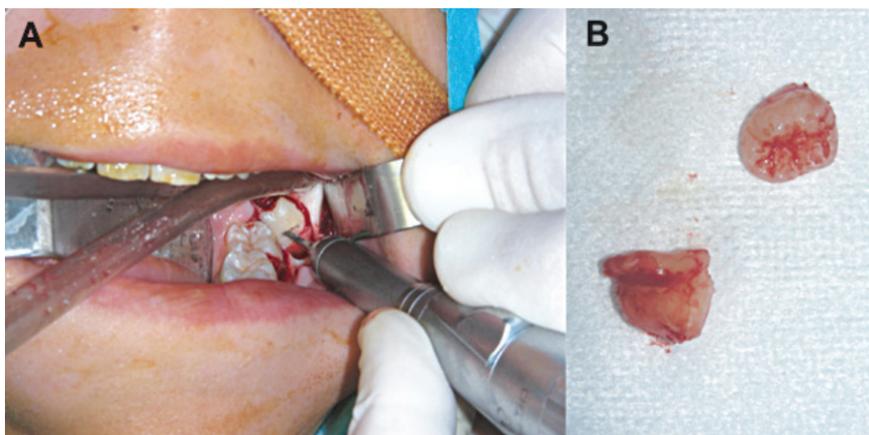


Figura 2 - Avulsão de um dente submucoso 38. (A) Odontossecção durante a avulsão. (B) Como o dente foi cortado e não se manteve intacto durante o processo, torna-se inutilizável para a coleta da polpa dentária e, portanto, das células-tronco.

Fonte: Dutilleul *et al.* (2012).

A fase pós-operatória, por sua vez, se refere ao transporte do dente até o laboratório, extração da polpa e posterior isolamento das células-tronco. Novos testes sorológicos serão realizados seis meses após a operação. Um dos possíveis riscos para a criopreservação de tecidos ou células humanas é sua degradação entre o momento da coleta e o momento da criopreservação (DUTILLEUL *et al.*, 2012). Nesse contexto, em um trabalho realizado com um grande número de dentes, Perry *et al.* (2008) apontaram que a obtenção de células-tronco da polpa dentária viáveis foi possível até 120 horas após a extração do dente.

Papaccio *et al.* (2006) e Waddington *et al.* (2008) demonstraram por meio de estudos que o armazenamento de células-tronco da polpa dental ou toda a polpa em nitrogênio líquido não afeta a funcionalidade das células no que concerne ao potencial de multiplicação e de diferenciação após o congelamento. Além disso, eles também evidenciaram que a viabilidade das células-tronco pulpares após a criopreservação não era limitada pela concentração celular, utilizando métodos que atendem às boas práticas de laboratório, solicitadas pelas autoridades sanitárias para a conservação de células e tecidos.

Assim, a polpa dentária é, sob muitos aspectos, um dos tecidos adultos mais interessantes para conservação de células-tronco a longo prazo. Logo, são notáveis as propriedades das células-tronco da polpa dentária devido à sua pluripotência, assim como sua capacidade de crescimento após a criopreservação. Portanto, a assistência de médicos, odontólogos, estomatologistas ou cirurgiões maxilo-faciais

SILVA, Geovanna Caroline Brito da, VASCONCELOS, Marcelo Gadelha e VASCONCELOS, Rodrigo Gadelha. Criopreservação de células-tronco de origem dentária: uma revisão de literatura. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 4, p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

é de suma importância para estabelecer a relevância da criopreservação (qualidade do dente e da polpa) (DUTILLEUL *et al.*, 2012).

PROTOSCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DIRECIONADOS PARA CÉLULAS-TRONCO DENTÁRIAS

Variados protocolos foram testados para a criopreservação de células-tronco dentárias, cada um com seus critérios específicos para avaliar o potencial efeito sobre o comportamento intrínseco dessas células-tronco (HILKENS *et al.*, 2016). Na tabela 1, são mostrados alguns protocolos relatados em estudos da literatura.

Tabela 1 - Visão geral de diferentes protocolos de criopreservação para células-tronco dentárias.

Autor	Células-tronco	Método	Tempo de duração	Crítérios testados	Resultados pós-descongelamento
Davies et al. (2014)	Células-tronco da polpa dentária	90% FBS + 10% DMSO 4°C por 1h, depois a -20°C por 2h, - 80°C durante a noite e -136°C em N ₂ Armazenamento por congelamento lento	Dois semanas	Viabilidade Expressão dos marcadores CD73, CD44, CD90, CD29, CD105 Marcadores de pluripotência de células-tronco: KLF-4, Nanog, Lin28	Ligeiramente reduzida Aumento na expressão Aumento na expressão
Pappacio et al. (2006)	Células-tronco da polpa dentária	10% DMSO + 90% FBS Armazenamento a -196°C em N ₂	Dois anos	Diferenciação osteogênica Formação óssea in vivo	Não afetada após criopreservação Não afetada após criopreservação
Malekfar et al. (2016)	Células-tronco da polpa dentária criopreservada	90% FBS + 10% DMSO Resfriamento a 4°C, depois -80°C durante a noite e depois armazenamento em N ₂ com taxa de resfriamento controlada de 1°C/min	3 meses	Expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais Diferenciação osteogênica e adipogênica	Não afetada após criopreservação Não afetada após criopreservação
Woods et al. (2009)	Células-tronco da polpa dentária criopreservada	(0,5 M- 1 M - 1,5 M) de etilenoglicol, propilenoglicol e dimetilsulfóxido, respectivamente Resfriamento com taxa de -1°C/min em suspensão de isopropanol em freezer mecânico a -85°C por 24h e depois armazenamento em N ₂ a -196°C	Seis meses	Diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica	Não afetada após criopreservação
Ji et al. (2014)	Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos	90% FBS + 10% DMSO 1h a 4 °C, depois congelamento lento de 4°C até -80°C a uma taxa de 1 °C/min e por fim, armazenamento em N ₂ a -196°C	Dois períodos: Um grupo experimental por três meses e outro entre três a nove meses	Viabilidade Capacidade de crescimento celular	Diminuiu à medida que o período de criopreservação aumentou Não diferiu expressivamente entre células frescas e células do grupo criopreservado por 3 meses, mas foi significativamente reduzida no grupo criopreservado entre 3 a 9 meses
Lindemann et al. (2014)	Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos	90% FCS + 10% DMSO 1h a 4 °C, depois congelamento controlado com taxa de resfriamento de -1°C/min em um freezer a -80°C por 24h e por fim, armazenamento em N ₂ a -196°C	Sete dias	Expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais Diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica Proliferação celular Morfologia celular	Não afetada após criopreservação Não afetada após criopreservação Não afetada após criopreservação Alterada após criopreservação

Vasconcelos et al. (2011)	Células-tronco do ligamento periodontal	90% FBS + 10% DMSO 2h a 4°C; 18h a -20°C e em seguida a -85 °C Armazenamento por congelamento lento	Um mês	Proliferação celular Adesão celular	Não afetada após criopreservação Não afetada após criopreservação
Kang et al. (2015)	Células-tronco do folículo dentário criopreservado	Criotubos contendo os seguintes crioprotetores: glicose 0,05 M, sacarose 0,05 M e etilenoglicol 1,5 M em PBS Protocolo de congelamento lento programado: os criotubos foram equilibrados por 30min a 1°C; resfriados a -2°C/min até -9°C; resfriados de -9°C a -9,1°C por 5min; depois resfriados adicionalmente a -0,3°C/min a -40°C; em seguida -10°C/min a -140°C. Por fim, os criotubos foram armazenados em N ₂ .	Um ano	Expressão de marcadores imunológicos Formação óssea in vivo após transplante	Não afetada após criopreservação Não afetada após criopreservação
Ding et al. (2010)	Células-tronco da papila apical	Três métodos diferentes: 90% FBS + 10% DMSO 90% FBS + 10% glicerol 90% FBS + 10% etilenoglicol 4°C por 1h, depois a -20°C por 2h, - 80°C durante a noite e -196°C em N ₂ Armazenamento por congelamento lento	Seis meses	Expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais Viabilidade e proliferação celular Eficiência de formação de colônias Diferenciação osteogênica e adipogênica CFU-F Potencial imunomodulador in vitro	Todos os critérios avaliados no estudo não foram afetados após a criopreservação

Legenda: FBS – Soro Fetal Bovino; DMSO – Dimetilsulfóxido; N₂ – Nitrogênio líquido; ° C – graus Celsius; ° C/min – graus Celsius por minuto; h – horas; min – minutos; M – Molar; PBS – Solução salina fosfatada.

Fonte: O autor (2020).

POSSÍVEIS EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DAS CÉLULAS-TRONCO DE ORIGEM DENTÁRIA

As células-tronco dentais parecem manter as suas propriedades mesmo após o processo de criopreservação. Esse aspecto é fundamental para sua prolongada conservação e para uso futuro. Entretanto, a grande variedade de protocolos de criopreservação dificulta conclusões definitivas sobre o comportamento dessas células-tronco. Além da técnica de cultivo e armazenamento dessas células somadas a algumas variáveis, como variabilidade entre doadores; condição do dente e tipo de célula - população; mudanças induzidas por cultura de células e o uso de aditivos de meio de cultura derivados de animais (HILKENS *et al.*, 2016).

Diante disso, os pesquisadores, atualmente, priorizam amostras em que não apenas haja alta recuperação celular, mas que o produto recuperado seja fisiológica e bioquimicamente idêntico ao seu estado pré-congelamento nos níveis genômico, proteômico, estrutural, funcional e reprodutivo. À vista disso, os biobancos enfrentam o desafio de aprimorar estratégias e protocolos para atender a essas necessidades no futuro. Estudos evidenciam que o controle e a resposta molecular das células à criopreservação impactam significativamente no resultado final (BAUST *et al.*, 2015). Adiante, serão abordados os efeitos da criopreservação nas populações de células-tronco dentárias que foram evidenciados em alguns estudos.

Células-tronco da polpa dentária

As células-tronco da polpa dentária humana são uma grande promessa como fonte de células-tronco adultas para utilização na medicina regenerativa. Assim, o adequado armazenamento e a recuperação pós-descongelamento dessas células sem a perda de funcionalidade são fatores primordiais para futuras aplicações clínicas (KUMAR *et al.*, 2015).

Grande parte dos métodos de criopreservação emprega uma taxa de congelamento controlada utilizando, geralmente, nitrogênio a -80°C para o armazenamento das células-tronco (KUMAR *et al.*, 2015). Sob essa perspectiva, Zhang *et al.* (2006) estudaram o efeito da criopreservação em nitrogênio líquido em relação à capacidade de diferenciação de células-tronco da polpa dentária humana de terceiros molares após 30 dias. Os autores verificaram que

SILVA, Geovanna Caroline Brito da, VASCONCELOS, Marcelo Gadelha e VASCONCELOS, Rodrigo Gadelha. Criopreservação de células-tronco de origem dentária: uma revisão de literatura. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 4, p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

essas células foram capazes de se diferenciar ao longo de cinco vias de diferenciação para linhagens neurogênicas, osteogênicas/odontogênicas, adipogênicas, miogênicas e condrogênicas, mesmo após a criopreservação.

Outro estudo comparou a capacidade de diferenciação das células-tronco pulpares de ratos por um período mais longo: após dois anos de criopreservação em nitrogênio líquido. Foi evidenciado que as células criopreservadas eram capazes de se diferenciar e produzir tecido ósseo, mesmo após criopreservação por um longo prazo (PACCIO *et al.*, 2006).

Por outro lado, oito métodos de criopreservação a -80°C utilizando dimetilsulfóxido para armazenamento a longo prazo de células-tronco da polpa dentária foram adotados para avaliar diferentes parâmetros biológicos dessas células durante o período de criopreservação de um ano. Após o descongelamento, todas as células armazenadas por diferentes métodos obtiveram capacidade de diferenciação em células similares a osteoblastos, adipócitos e células neurais. Com base nessas informações, esse estudo concluiu que o congelamento não controlado (congelamento rápido) a uma temperatura de -80°C é tão efetivo quanto o congelamento controlado (congelamento lento) usando recipientes de etanol e outros procedimentos de criopreservação. Isso implica que as células-tronco da polpa dental podem ser utilizadas com sucesso para engenharia de tecidos e terapêutica celular, mesmo após criopreservação não controlada (KUMAR *et al.*, 2015).

A criopreservação de tecidos pulpares obtidos de dentes diagnosticados com pulpite irreversível sintomática durante o tratamento endodôntico também foi estudada. Foi utilizado um protocolo composto de 90% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido para criopreservar esses tecidos. Então, as células-tronco frescas foram isoladas de tecidos de pulpares utilizando um método enzimático e foram posteriormente criopreservadas. Como resultado, não foi encontrada nenhuma diferença significativa na expressão do marcador de célula-tronco e no potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica de células-tronco da polpa dentária obtidas de tecido pulpar dentário fresco e criopreservado. Isso mostra que a polpa dentária pode ser criopreservada com sucesso sem perder as características normais e o potencial de diferenciação das suas células-tronco, tornando-as adequadas para bancos odontológicos e futuras finalidades terapêuticas (MALEKFAR *et al.*, 2016).

Com o objetivo de avaliar *in vitro* a viabilidade da polpa humana isolada de terceiros molares imaturos após criopreservação, realizou-se um estudo que foi dividido em três experimentos. No primei-

ro deles, os tecidos pulpare de 19 terceiros molares foram isolados e divididos em segmentos horizontais, e cada segmento foi então cultivado separadamente para avaliar a existência de diferenças na capacidade de crescimento dos fibroblastos derivados da porção coronal, medial e apical do tecido pulpar. No segundo experimento, os tecidos pulpare isolados de 27 terceiros molares foram divididos em duas porções (mesial e distal): uma parte foi criopreservada antes da cultura por 30 dias e a outra parte foi cultivada imediatamente para comparar a capacidade de crescimento desses tecidos. No terceiro experimento, 43 terceiros molares inteiros foram criopreservados por 6 a 11 meses. Após o descongelamento, a dimensão do forame apical foi mensurada e a polpa isolada, segmentada horizontalmente e cultivada para comparação da capacidade de crescimento. Os resultados dos dois primeiros experimentos não mostraram diferença significativa na capacidade de crescimento entre fibroblastos derivados de diferentes segmentos pulpare do mesmo dente (sem criopreservação) ou entre fibroblastos criopreservados e não criopreservados. Assim, a viabilidade do tecido pulpar isolado pode ser mantida durante a criopreservação se o crioprotetor e procedimentos padrão forem usados. O terceiro experimento revelou uma correlação positiva entre a dimensão do forame apical e a viabilidade pulpar após a criopreservação. Uma dimensão mínima de 9,42 mm² permite que o crioprotetor penetre suficientemente e proteja os tecidos pulpare do ápice à coroa, com a observação de viabilidade de 90,9% (TEMERMAN *et al.*, 2009).

Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos

O efeito de um método de criopreservação na proliferação de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos foi avaliado por meio do isolamento de células de três dentes decíduos. Parte das células foi submetida às condições normais de cultivo celular (Grupo Controle), enquanto outra parcela celular foi mantida em dimetil-sulfóxido 10% diluído em soro fetal bovino e submetida ao seguinte protocolo de conservação: duas horas a 4°C, 18 horas a -20°C e depois a -80°C por dois intervalos, sendo o primeiro de 30 dias e o segundo de 180 dias (GINANI *et al.*, 2016).

Isso posto, a proliferação e o ciclo celular foram avaliados em intervalos de 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento, e os eventos relacionados à apoptose foram analisados em 72 horas. Como resultado, todos os grupos mostraram aumento no número de células, não sendo observadas, portanto, divergências relevantes entre os grupos

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

criopreservado e controle. Além disso, a distribuição das células nas fases do ciclo celular foi consistente com a proliferação celular, e a porcentagem de células viáveis foi superior a 99% em todos os grupos, apontando que a viabilidade celular não foi afetada pelo protocolo de criopreservação aplicado, sendo ele adequado para o armazenamento de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (GINANI *et al.*, 2016).

Em outro estudo, vinte dentes decíduos esfoliados foram divididos aleatoriamente em um grupo criopreservado de células-tronco e outro grupo não criopreservado para uma análise comparativa. Após o descongelamento e separação da polpa, as células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos foram cultivadas e as características de células-tronco mesenquimais foram investigadas. Assim, diferenças significativas não foram achadas entre os dois grupos nas análises de proliferação celular, expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais ou na diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*. Tal resultado confirma que a criopreservação de dentes decíduos esfoliados intactos se configura como um método útil para conservação de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (LEE *et al.*, 2015).

Células-tronco do ligamento periodontal

Um estudo realizado por Vasconcelos *et al.* (2011) teve como objetivo avaliar *in vitro* a influência da criopreservação em células mesenquimais indiferenciadas derivadas do ligamento periodontal de seis terceiros molares humanos. Para isso, as células isoladas de cada dente foram separadas em dois grupos, sendo o primeiro de células frescas, isto é, não criopreservadas que foi cultivado imediatamente, e o segundo que foi submetido à criopreservação por um mês. As taxas de adesão e proliferação celular foram analisadas nos dois grupos pela contagem de células aderidas aos poços, 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Como resultado, o estudo não apontou diferença considerável na capacidade de crescimento *in vitro* de células mesenquimais entre os dois grupos, concluindo que a criopreservação por um mês não afetou as células mesenquimais do ligamento periodontal.

A capacidade de recuperação de células-tronco pós-natais do ligamento periodontal humano criopreservado também foi estudada. Terceiros molares impactados e fragmentos ósseos aderidos de dez adultos (entre 19 e 29 anos de idade) foram coletados imediatamente após a extração. Posteriormente, os ligamentos periodontais foram

cuidadosamente separados da superfície radicular e, em seguida, foram seccionados em pequenos fragmentos para criopreservação do tecido. Após o processo de descongelamento, foi evidenciado que as células-tronco do ligamento periodontal criopreservadas permaneceram com as propriedades normais, incluindo a expressão da molécula de superfície da célula-tronco mesenquimais STRO-1, formação de colônia celular, potencial de diferenciação, cariótipo diplóide normal e regeneração de tecido semelhante ao cimento/ligamento periodontal. Tal resultado demonstra que as células-tronco pós-natais podem ser recuperadas do ligamento periodontal humano criopreservado, proporcionando uma abordagem clínica prática para a utilização de tecidos congelados para o isolamento de células-tronco (SEO *et al.*, 2005).

Sob outra perspectiva, Temmerman *et al.* (2007) avaliaram o efeito de um procedimento de criopreservação padronizado em culturas de células do ligamento periodontal humano, em que fibroblastos dos ligamentos obtidos de terceiros molares imaturos de 11 pacientes foram cultivados e divididos em dois grupos, sendo um grupo controle cultivado sem criopreservação e um grupo experimental criopreservado e cultivado após o descongelamento.

Posteriormente, Temmerman *et al.* (2007) efetuaram uma análise comparativa entre as células dos dois grupos a fim de avaliar possíveis efeitos nas características dos fibroblastos. Os resultados mostraram que a integridade da membrana celular não foi influenciada pela criopreservação e que também não houve diferença estatisticamente significativa na capacidade de crescimento entre as células criopreservadas e as de controle. Por outro lado, as células não criopreservadas apresentaram, ligeiramente, uma expressão positiva mais forte para a fosfatase alcalina, mas sem grandes diferenças estatisticamente. Portanto, os critérios em questão avaliados não sofreram influência da criopreservação.

Células-tronco da papila apical

As células-tronco da papila apical são uma nova população de células-tronco mesenquimais que residem na papila apical de dentes permanentes imaturos (KANG *et al.*, 2019). Um estudo foi realizado por Ding *et al.* (2010) com o intuito de avaliar o efeito da criopreservação nas propriedades biológicas e imunológicas dessas células. Foram coletados terceiros molares impactados de pacientes de 18 e 20 anos de idade, e a papila apical foi delicadamente separada da superfície radicular (figura 3). As células-tronco da papila foram

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

isoladas e cultivadas. Após coleta e contagem, as células-tronco da papila apical foram suspensas em um fluido de preservação contendo agente crioprotetor. Posteriormente, as células foram transferidas para criotubos e armazenadas a 4 °C por uma hora, -20 °C por duas horas, -80 °C durante a noite e, finalmente, em nitrogênio líquido (-196 °C) por seis meses.

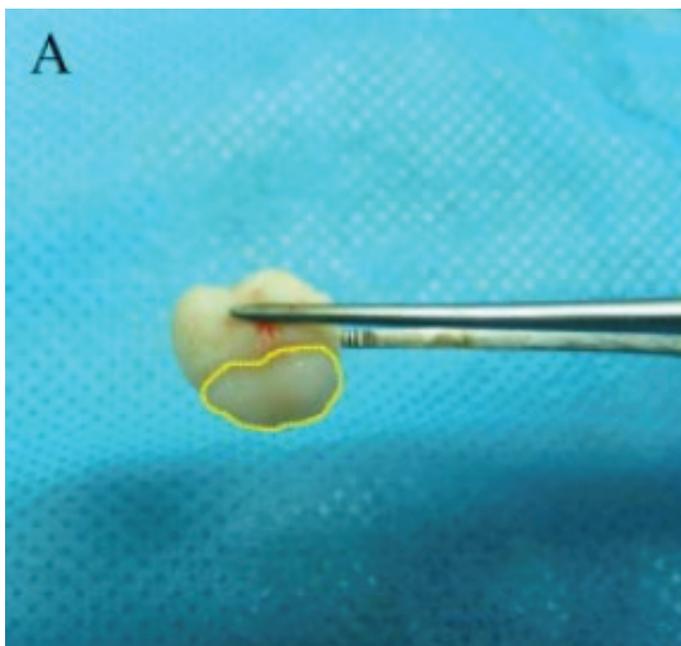


Figura 3 - Terceiro molar humano extraído contendo papila apical (linha amarela demarcada).

Fonte: Ding *et al.* (2010).

Assim sendo, células-tronco da papila apical humana frescas e células-tronco da papila apical submetidas à criopreservação foram comparadas após o descongelamento e, como resultado, as células-tronco da papila apical criopreservadas apresentaram uma proporção de células viáveis, eficiência de formação de colônias, taxa de proliferação celular, potencial de diferenciação em várias linhagens, marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais e taxa apoptótica semelhantes quando comparadas com as células-tronco não criopreservadas. Além disso, não houve diferença significativa entre os dois grupos de células no que se refere às propriedades imunológicas. Portanto, esse estudo indica que a criopreservação não afeta as propriedades biológicas e imunológicas das células-tronco da papila apical, apoiando a viabilidade da criopreservação dessas células em nitrogênio (DING *et al.*, 2010).

Células progenitoras do folículo dentário

O tecido do folículo dentário se apresenta como um recurso promissor de células-tronco mesenquimais para abordagens citoterpêuticas e aplicações na engenharia de tecidos (YANG *et al.*, 2017). Nesse sentido, os efeitos de um protocolo de criopreservação do tecido do folículo dentário humano com uma taxa de congelamento lenta foram avaliados por meio de um estudo que constatou um índice de 70% de sobrevivência celular após três meses de armazenamento. Além disso, as células-tronco dentárias humanas isoladas e cultivadas de folículos dentais criopreservados expressaram marcadores de células-tronco mesenquimais em um nível semelhante ao de células-tronco dentárias de tecido fresco não criopreservado, bem como apresentaram diferenciação com sucesso *in vitro* em linhagem mesenquimal, osteócitos, adipócitos e condrócitos sob induções específicas (PARK *et al.*, 2014).

Em outro estudo, foi avaliada a qualidade pós-descongelamento de células estromais mesenquimais derivadas do tecido dental, incluindo células-tronco do folículo dentário. Nesse âmbito, o protocolo de armazenamento foi a -80°C em dimetilsulfóxido a 10% por um período longo com a finalidade de avaliar a ocorrência de algum efeito adverso na funcionalidade e estabilidade genética. Após um máximo de cinco anos de criopreservação, as amostras celulares foram cultivadas, sendo observado que mesmo após o congelamento não controlado por longo prazo, as células sobreviveram e proliferaram com eficiência, assim como expressaram marcadores de células-tronco e capacidade de diferenciação. Portanto, a criopreservação não provocou efeitos adversos na funcionalidade e estabilidade genética das células criopreservadas, permitindo seu uso para pesquisa, banco de células-tronco, como também aplicações clínicas de sucesso em engenharia tecidual (RAIK *et al.*, 2019).

Com o propósito de avaliar as propriedades imunomoduladoras de células-tronco de folículos dentais frescos e criopreservados e a osteogênese *in vivo* após transplante dessas células em animais experimentais realizou-se um estudo em que os folículos dentários humanos foram obtidos de terceiros molares extraídos e criopreservados de 24 pacientes, sendo 12 doadores para o grupo de criopreservação do tecido e 12 doadores para o grupo de tecido fresco. Nesse estudo, foi utilizado um protocolo de congelamento lento programado (tabela 1), e o tempo de armazenamento em nitrogênio líquido foi de aproximadamente um ano. Como resultado, ambas as células-tronco frescas e criopreservadas apresentaram expressão semelhante de re-

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

ceptor CD119 e do complexo de histocompatibilidade classe I e II (MHC I e MHC II), com altos níveis de CD119 e MHC I e quase nenhuma expressão de MHC II. Ambos os grupos de células frescas e criopreservadas foram transplantadas *in vivo* com uma estrutura de matriz óssea desmineralizada em defeitos mandibulares em filhotes de porcos e tecidos subcutâneos de camundongos e, após avaliações radiológicas e histológicas de osteogênese *in vivo* dos locais transplantados, foram evidenciadas atividades de formação óssea consideravelmente melhoradas em comparação com aquelas em locais de controle implantados apenas em andaimes. Curiosamente, nos defeitos ósseos mandibulares transplantados com as células-tronco derivadas do folículo, ossos recém-gerados notavelmente crescidos foram observados oito semanas após o transplante quando comparados com o tamanho original dos defeitos de controle, bem como forte expressão de osteocalcina e fator de crescimento endotelial vascular foram identificadas nos tecidos transplantados de ambos os animais. Ademais, a análise imunohistoquímica de CD3, CD4, e CD8 nos locais de formação óssea ectópica de camundongos mostraram expressão de CD4 significativamente reduzida em tecidos implantados com células-tronco do folículo dentário em comparação com aqueles em locais de controle. Esses achados indicam que essas células possuem propriedades imunomoduladoras que envolvem a inibição da resposta imune adaptativa mediada por CD4 e MHC II. Através disso, pode-se evidenciar que os folículos dentais preservados a longo prazo servem como fonte de células-tronco autólogas ou alogênicas para regeneração óssea, tendo, portanto, aplicabilidade na engenharia tecidual, além de serem um valioso agente terapêutico para doenças imunes (KANG *et al.*, 2015).

CRIOPRESERVAÇÃO MAGNÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO DE ORIGEM DENTÁRIA

Outro protocolo de criopreservação é o congelamento magnético que utiliza um campo magnético a fim de garantir uma distribuição de baixa temperatura sem que ocorra congelamento (LIN *et al.*, 2014). Nesse sentido, esse procedimento é considerado uma técnica controlada de congelamento lento (PILBAUEROVÁ e SUCHÁNEK, 2018).

Comprovadamente, o campo magnético reduz a agregação de água durante o congelamento. Tal fato é vantajoso, visto que a formação de cristais de gelo, assim como a geração de corrente elétrica fraca indesejada são reduzidas. Dessa forma, a corrente elétrica não

pode romper as membranas celulares, permitindo, assim, uma melhor proteção das células durante o congelamento (LEE *et al.*, 2012). Portanto, os campos magnéticos podem exercer influência positiva durante a criopreservação de células-tronco mesenquimais, uma vez que evita a formação de cristais de gelo, permitindo que as moléculas de água sejam congeladas instantaneamente (CONDE *et al.*, 2016).

Na odontologia, o campo magnético foi associado na criopreservação celular de células-tronco da polpa dentária, de células do ligamento periodontal de dentes permanentes, assim como o armazenamento tecidual da polpa dentária ou até mesmo do dente inteiro (LIN *et al.*, 2014; ABEDINI *et al.*, 2011; KAMADA *et al.*, 2011; KAKU *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010).

Dessa forma, trabalhos publicados por Lee *et al.* (2010) e Kaku *et al.* (2010) divulgaram resultados sobre a avaliação da taxa de proliferação e a viabilidade celular de dente permanente íntegro e de células do ligamento periodontal quando submetidos ao processo de criopreservação associado ao uso do campo magnético. Como resultado desses experimentos, foram observadas taxa proliferativa e de viabilidade celular maior no grupo teste quando comparado aos respectivos grupos de controle.

No que diz respeito às células-tronco da polpa dentária, constatou-se um aumento de viabilidade das células após seu descongelamento, quando o processo de congelamento foi associado a intensidades de campo magnético mais elevadas (0.1T, 0.4T, 0.6T, 0.8T) (LIN *et al.*, 2014). Adicionalmente, foi evidenciado que, pós-descongelamento, as células-tronco pulpares criopreservadas magnéticas exibiram viabilidade celular, proliferação, expressão de marcadores de superfície e capacidade de diferenciação semelhantes às células-tronco da polpa dentária não criopreservadas, bem como melhores quando comparadas às células criopreservadas por métodos tradicionais. Portanto, esse estudo permitiu a validação da criopreservação magnética como um método confiável e eficaz para o armazenamento de células-tronco da polpa dentária (LEE *et al.*, 2012).

Em nível histológico, a criopreservação magnética manteve a arquitetura do tecido do dente armazenado, mantendo células viáveis da região odontoblástica e da zona rica em células, onde residem as células-tronco mesenquimais da polpa dentária, enquanto a criopreservação tradicional interrompeu a viabilidade celular e danificou o tecido (LIN *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2011).

Em suma, a associação de campos magnéticos ao método de criopreservação, certamente, oferece opções promissoras para conservação de células, tecidos e órgãos. Todavia, a otimização ainda está em andamento e envolve a determinação do campo magnético ideal,

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

programas de congelamento lento e composição da solução de criopreservação (RODAS-JUNCO e VILLICAÑA, 2017).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da literatura apresentada, entende-se que os tecidos dentários se configuram como uma fonte atraente e acessível de células-tronco mesenquimais, visto que podem ser obtidas por meio de tratamentos odontológicos convencionais, como a exodontia. Dessa forma, as células-tronco de origem dentária podem ser viáveis para a odontologia regenerativa, bem como para o tratamento de várias doenças. Em virtude disso, o armazenamento a longo prazo dessas células por meio da criopreservação é um recurso bastante promissor. No entanto, devido a ocorrência de efeitos deletérios como morte celular e contaminação, o processo de preservação celular com aplicação de baixas temperaturas é desafiador. Sendo assim, o desenvolvimento de métodos que minimizem tais efeitos necessita de maiores abordagens.

Nesse sentido, foi possível verificar a existência de uma ampla variedade de protocolos de criopreservação de células-tronco dentárias. Isso pode, eventualmente, dificultar resultados permanentes a respeito do comportamento dessas células-tronco, visto que a aplicação de diferentes protocolos gera diferentes efeitos celulares no que se refere às suas características biológicas. Muitos estudos comprovam que as células-tronco dentais mantêm suas propriedades após a criopreservação, à exemplo, viabilidade, proliferação e capacidade de diferenciação. Esse aspecto é essencial para a recuperação pós-congelamento e aplicabilidade clínico-terapêutica dessas células no futuro.

Adicionalmente, é possível inferir que a associação de campos magnéticos ao processo de criopreservação tem se mostrado um método eficaz para conservação de células-tronco e tecidos dentários, visto que estudos apontaram que a influência magnética induz resultados positivos acerca das taxas de viabilidade e proliferação de células-tronco dentárias quando comparadas às células-tronco dentárias frescas ou criopreservadas por meio de métodos convencionais. Em suma, ainda que avanços significativos tenham sido realizados, ainda há necessidade de explorar e desenvolver melhores métodos e protocolos de criopreservação mais padronizados e otimizados para manter as propriedades das células-tronco de origem dentária a longo prazo, tornando-as disponíveis para futuras pesquisas.

REFERÊNCIAS

- ABEDINI, S. et al. Effects of cryopreservation with a newly-developed magnetic field programmed freezer on periodontal ligament cells and pulp tissues. **Cryobiology**, San Diego, v. 62, n. 3, p. 181-187, jun. 2011.
- BAUST, J. M. et al. Biobanking: the future of cell preservation strategies. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, New York, p. 37-53, 2015.
- BROZEK, R., KURPISZ, M., KOCZOROWSKI, R. Application of stem cells in dentistry for bone regeneration. **Journal Of Physiology And Pharmacology**, Kraków, v. 1, n. 69, p. 23-33, fev. 2018.
- CHALISSERRY, E. P. et al. Therapeutic potential of dental stem cells. **Journal Of Tissue Engineering**, London, v. 8, p. 204173141770253-204173141770254, jan. 2017.
- CONDE, M. C. M. et al. Does Cryopreservation Affect the Biological Properties of Stem Cells from Dental Tissues? A Systematic Review. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 6, p. 633-640, dez. 2016.
- DAVIES, O.G. et al. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. **Cryobiology**, San Diego, v. 69, n. 2, p. 342-347, out. 2014.
- DEMIRCI, S. et al. Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 68, n. 1, p. 139-146, fev. 2014.
- DING, G. et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. **Journal Of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 223, n. 2 p. 415-422, 2010.
- DUTILLEUL, PY. C. et al. Les cellules souches de la pulpe dentaire: caractéristiques, cryopréservation et potentialités thérapeutiques. **L'Orthodontie Française**, Paris, v. 83, n. 3, p. 209-216, set. 2012.
- EGUSA, H. et al. Stem cells in dentistry – Part I: stem cell sources. **Journal Of Prosthodontic Research**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 151-165, jul. 2012.
- ESTRELA, C. et al. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 2, p. 91-98, 2011.
- SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

GINANI, F. et al. Effect of a cryopreservation protocol on the proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Acta Odontologica Scandinavica**, Stockholm, v. 74, n. 8, p. 598-604, ago. 2016.

GIOVENTÙ, S. et al. A novel method for banking dental pulp stem cells. **Transfusion And Apheresis Science**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 199-206, out. 2012.

HAR, A. PARK, J. C. Dental Stem Cells and Their Applications. **Chinese Journal Of Dental Research**, New Malden, v. 18, n. 4, p. 207-212, dez. 2015.

HILKENS, P. et al. Cryopreservation and Banking of Dental Stem Cells. **Advances in experimental medicine and biology**, New York, p. 199-235, 2016.

HUANG, MS. et al. Effects of transportation time after extraction on the magnetic cryopreservation of pulp cells of rat dental pulp. **Journal Of Dental Sciences**, Taiwan, v. 6, n. 1, p. 48-52, mar. 2011.

HUNT, C. J. Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling. **Methods In Molecular Biology**, Clifton, p. 41-77, 2017.

JI, E. H. et al. Viability of pulp stromal cells in cryopreserved deciduous teeth. **Cell And Tissue Banking**, Dordrecht, v. 15, n. 1, p. 67-74, mai. 2013.

KAMADA, H. et al. In-vitro and in-vivo study of periodontal ligament cryopreserved with a magnetic field. **American Journal Of Orthodontics And Dentofacial Orthopedics**, St. Louis, v. 140, n. 6, p. 799-805, dez. 2011.

KANG, YH. et al. Immunomodulatory properties and in vivo osteogenesis of human dental stem cells from fresh and cryopreserved dental follicles. **Differentiation**, London, v. 90, n. 1-3, p. 48-58, jul. 2015.

KANG, J. Stem Cells from the Apical Papilla: a promising source for stem cell-based therapy. **Biomed Research International**, New York, p. 1-8, jan. 2019.

KAKU, M. et al. Cryopreservation of periodontal ligament cells with magnetic field for tooth banking. **Cryobiology**, San Diego, v. 61, n. 1, p. 73-78, ago. 2010.

KIM, H.J. et al. Three-Dimensional Spheroid Formation of Cryopreserved Human Dental Follicle-Derived Stem Cells Enhances Pluripotency and Osteogenic Induction Properties. **Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, Seoul, v. 16, n. 5, p. 513-523, set. 2019.

KOMADA, Y. et al. Origins and Properties of Dental, Thymic, and Bone Marrow Mesenchymal Cells and Their Stem Cells. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 11, 21 nov. 2012.

KUMAR, A., BHATTACHARYYA, S., RATTAN, V. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. **Cell And Tissue Banking**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 513-522, fev. 2015.

LEE, HY. et al. Characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) from intact cryopreserved deciduous teeth. **Cryobiology**, San Diego, v. 71, n. 3, p. 374-383, dez. 2015.

LEE, SY. et al. Effects of Cryopreservation of Intact Teeth on the Isolated Dental Pulp Stem Cells. **Journal Of Endodontics**, New York, v. 36, n. 8, p. 1336-1340, ago. 2010.

LEE, SY. S. et al. Determination of Cryoprotectant for Magnetic Cryopreservation of Dental Pulp Tissue. **Tissue Engineering Part C: Methods**, New York, v. 18, n. 6, p. 397-407, jun. 2012.

LEE, SY. et al. Magnetic Cryopreservation for Dental Pulp Stem Cells. **Cells Tissues Organs**, Switzerland, v. 196, n. 1, p. 23-33, 2012.

LIN, SL. et al. Evaluation of mechanical and histological properties of cryopreserved human premolars under short-term preservation: a preliminary study. **Journal Of Dental Sciences**, Taiwan, v. 9, n. 3, p. 244-248, set. 2014.

LIN, SL. et al. Static magnetic field increases survival rate of dental pulp stem cells during DMSO-free cryopreservation. **Electromagnetic Biology And Medicine**, London, v. 34, n. 4, p. 302-308, mai. 2014.

LINDEMANN, D. et al. Effects of cryopreservation on the characteristics of dental pulp stem cells of intact deciduous teeth. **Archives Of Oral Biology**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 970-976, set. 2014.

MALEKFAR, A. et al. Isolation and Characterization of Human Dental Pulp Stem Cells from Cryopreserved Pulp Tissues Obtained from Teeth with Irreversible Pulpitis. **Journal Of Endodontics**, New York, v. 42, n. 1, p. 76-81, jan. 2016.

MORTADA, I., MORTADA, R., BAZZAL, M. A. Dental Pulp Stem Cells and Neurogenesis. **Stem Cells: Biology and Engineering**, New York, p. 63-75, 2017.

MUNÉVAR, J. C. et al. Evaluation of two human dental pulp stem cell cryopreservation methods. **Acta Odontol Latinoam**, Buenos Aires, v. 22, n. 2, p. 114-121, 2015.

PAPACCIO, G. et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.

for tissue repair. **Journal Of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 208, n. 2, p. 319-325, 2006.

PARK, BW. et al. Cryopreservation of human dental follicle tissue for use as a resource of autologous mesenchymal stem cells. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, Chichester, v. 11, n. 2, p. 489-500, jul. 2014.

PENG, L., YE, L., ZHOU XD. Mesenchymal Stem Cells and Tooth Engineering. **International Journal Of Oral Science**, Chengdu, v. 1, n. 1, p. 6-12, mar. 2009.

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**, New York, v. 14, n. 2, p. 149-156, jun. 2008.

PILBAUEROVÁ, Nela; SUCHÁNEK, Jakub. Cryopreservation of Dental Stem Cells. **Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)**, Hradec Králové, v. 61, n. 1, p. 1-7, 2018.

RAIK, S. et al. Assessment of Post-thaw Quality of Dental Mesenchymal Stromal Cells After Long-Term Cryopreservation by Uncontrolled Freezing. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Clifton, v. 191, n. 2, p. 728-743, dez. 2019.

RODAS-JUNCO, B. A., VILLICAÑA, C. Dental Pulp Stem Cells: current advances in isolation, expansion and preservation. **Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, Seoul, v. 14, n. 4, p. 333-347, mar. 2017.

SEO, B-M. et al. Recovery of Stem Cells from Cryopreserved Periodontal Ligament. **Journal Of Dental Research**, Chicago, v. 84, n. 10, p. 907-912, out. 2005.

STOLZING, A. et al. Hydroxyethylstarch in cryopreservation – Mechanisms, benefits and problems. **Transfusion And Apheresis Science**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 137-147, abr. 2012.

TEMMERMAN, L. et al. Influence of cryopreservation on human periodontal ligament cells in vitro. **Cell And Tissue Banking**, Dordrecht, v. 9, n. 1, p. 11-18, mai. 2007.

TEMMERMAN, L. et al. Influence of cryopreservation on the pulpal tissue of immature third molars in vitro. **Cell And Tissue Banking**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 281-289, ago. 2009.

VASCONCELOS, R. G., VASCONCELOS, M. G., BARBOZA, C. A. G. Cryopreservation of dental and periodontal stem cells and their

potential for tissue regeneration. **Int J Dent**, Recife, v. 10, n. 4, p. 287-292, out/dez. 2011.

VASCONCELOS, R. G. et al. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. **Cell And Tissue Banking**, Dordrecht, v. 13, n. 3, p. 461-469, 21 jul. 2011.

WADDINGTON, R. J. et al. Isolation of Distinct Progenitor Stem Cell Populations from Dental Pulp. **Cells Tissues Organs**, Switzerland, v. 189, n. 1-4, p. 268-274, ago. 2008.

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. **Cryobiology**, San Diego, v. 59, n. 2, p. 150-157, out. 2009.

XIAO, L., NASU, M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. **Stem Cells And Cloning: Advances and Applications**, Auckland, p. 89-99, dez. 2014.

YANG, H. et al. Cells isolated from cryopreserved dental follicle display similar characteristics to cryopreserved dental follicle cells. **Cryobiology**, San Diego, v. 78, p. 47-55, out. 2017.

ZAKRZEWSKI, W. et al. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 10, n. 1, p. 68, fev. 2019.

ZHANG, W. et al. Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation. **Tissue Engineering**, New York, v. 12, n. 10, p. 2813-2823, out. 2006.

SILVA, Geovanna
Caroline Brito da,
VASCONCELOS,
Marcelo Gadelha
e VASCONCELOS,
Rodrigo Gadelha.
Criopreservação de
células-tronco de origem
dentária: uma revisão de
literatura. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 39, n. 4,
p. 1061-1092, 2020.