

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PPG EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

DAYANNE NETTO DOS SANTOS

**EFEITO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO NA VIABILIDADE CELULAR E NA
CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTES
DECÍDUOS EXTRAÍDOS**

JUIZ DE FORA
2018

DAYANNE NETTO DOS SANTOS

**EFEITO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO NA VIABILIDADE CELULAR E NA
CAPACIDADE DE MINERALIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO DE DENTES
DECÍDUOS EXTRAÍDOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica. Área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo

JUIZ DE FORA

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Foi uma experiência única e indescritível, que me tirou totalmente da zona de conforto, me trazendo insegurança. Momentos prazerosos também presenciei: observar as primeiras células-tronco no microscópio isoladas por mim, e sem contaminação!). Isso me fez crescer frente as dificuldades, e o melhor de tudo: conheci pessoas incríveis. Finalizo esse momento grandioso com a sensação de dever cumprido.

E só tenho a agradecer:

Agradeço primeiramente a minha família, **Anivalda, Osvaldo e Daniella**, por apoiarem em todos os meus sonhos, e por entenderem minha ausência em alguns momentos. Pesquisar é assim mesmo! Hoje finalizo mais um ciclo. Amo vocês.

Agradeço ao **Leonardo**, pelo apoio incondicional nesta jornada e por acreditar em mim, incentivando-me sempre. Sem você seria mais difícil essa caminhada!

A minha querida amiga **Juliana Nascentes**, pela torcida e por me salvar sempre. Obrigada!

Agradeço ao meu orientador e amigo **Prof. Antônio Márcio** pela oportunidade de fazer parte do grupo Biobanco Polpa Dental e por poder retribuir todo o ensinamento e acolhimento com esta pesquisa. Obrigada pela confiança, paciência, incentivo, amizade, orientação e pelos diálogos frutíferos e incentivadores.

Agradeço ao **Prof. Carlos Maranduba**, que acompanhou este projeto desde o início, pelas orientações durante a pesquisa, pelo incentivo durante o Mestrado, pela educação e boa vontade com que sempre me recebeu em sua sala/laboratório. Obrigada por me auxiliar, em todos e em qualquer momento, durante a execução do trabalho, e por disponibilizar o Genetec quando mais precisei.

Agradeço ao **Prof. Cláudio Galupo**, que nos recebeu gentilmente em sua sala e nos incentivou a realizar a pesquisa com o hipoclorito de sódio.

Aos colegas que fiz durante o mestrado, **Jairo, Érika, Patrícia, Melissa e Otávio** por dividirem os momentos de vitória e recomeço das pesquisas. Muito obrigada.

Ao **Gustavo Torres**, que muito me ajudou nos bastidores da reta final. Obrigada pelas dicas!

Obrigada **Fernanda Rezende, Pós-Doc Fernanda Gonçalves e Prof. Leandro Resende** por toda a ajuda e ensinamento. Vocês foram essenciais nessa trajetória.

Agradeço as minhas queridas **Letícia Gonçalves e Wanessa Alonso** e ao **Cláudio Leite** da secretaria de Pós Graduação em Clínica Odontológica pela boa vontade em sanar as dúvidas e ajudar-me nas questões burocráticas nestes anos de pesquisa. Vocês são essenciais!

Aos professores **Elton Góis e Sérgio Jr** que gentilmente aceitaram compor a banca examinadora.

Sobre todos, agradeço a **Deus**, por inspirar minha força interior.

E a todos, que direta e indiretamente contribuíram nessa caminhada: Muito obrigada!

EPIGRAFE

“Ninguém disse que seria fácil, como também foi dito que a cada dia o grau de dificuldade só aumentaria. Reveja o progresso dos teus passos, verás que é um vencedor. Desistir nesta etapa por mera preguiça ou pelas atitudes de terceiros não condiz com a promessa do verdadeiro e genuíno aprendiz. ”

PAULO URSAIA

RESUMO

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigadora mais comumente utilizada durante a terapia endodôntica. A atividade antimicrobiana e a capacidade de dissolver a matéria orgânica são características bem conhecidas desta solução. No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos do NaOCl nas células-tronco mesenquimais humanas. As células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) foram cultivadas e expostas a 0,04% de NaOCl durante 30, 60 e 300 segundos. A proliferação e viabilidade celular foram investigadas pelos ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) e Trypan blue, respectivamente. O potencial de diferenciação foi investigado através da diferenciação osteogênica. A expressão dos marcadores de células-tronco foi avaliada por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). Todos os ensaios foram realizados no 1º dia após o tratamento. Todos os testes mostraram uma redução no número de células viáveis com aumento do tempo de exposição ao NaOCl. Entretanto, não houve diferença entre os grupos em relação a mineralização. Quanto à RT-PCR, a expressão dos genes testados, β -actina, Nestin e CD105 foi significativamente menor. Os resultados mostraram que o longo período de exposição ao NaOCl tem efeitos prejudiciais na sobrevivência de SHEDs.

Palavras-chave: Células-tronco, Hipoclorito de Sódio, Citotoxicidade, Sobrevivência celular, Dente decíduo

ABSTRACT

Sodium Hypochlorite (NaOCl) is the most common irrigation solution and widely used during root canal procedures. The antimicrobial activity and capacity to dissolve organic matter are well known features of this solution. However, there is little knowledge about the effects of NaOCl on human mesenchymal stem cells. Briefly, stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) were cultured and exposed to 0.04% NaOCl for 30, 60 and 300 seconds. We investigated cell proliferation and viability by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and trypan blue dye, respectively. Differentiation potential was investigated through osteogenic differentiation. Stem cells markers expression was evaluated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). All the assays were performed at 1 day following treatment. All tests showed a reduction in the number of viable cells with increased exposure time to NaOCl. Interestingly, there was no difference between the groups in relation to mineralization. As for RT-PCR, the expression of the genes tested, β -actin, Nestin and CD105 was significantly lower. The data showed that long exposure period to NaOCl has detrimental effects on the survival of SHEDs.

KeyWords: Stem cells, Sodium Hypochlorite, Cytotoxicity, Cell survival, Tooth Deciduous

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1	Obtenção e processamento das amostras	17
Esquema 2	Cultivo celular	19
Esquema 3	Ensaio de viabilidade celular por MTT	22
Esquema 4	Ensaio de viabilidade celular por Trypan blue	23
Esquema 5	Eletroforese horizontal de DNA em gel de agarose	26
Figure 1	Effect of 0.04% NaOCl on SHED in the assays	34
Figure 2	RT-PCR performed in the control group and 30 seconds	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEP/HU-CAS	Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPSC	<i>Dental pulp stem cells</i>
Dr.	Doutor
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GI	Grupo 1
GII	Grupo 2
GIII	Grupo 3
GENETEC	Laboratório de Genética Humana e Terapia Celular
hTERT-MSC	Immortalized human bone marrow mesenchymal stem cells
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
LTDA	Limitada
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NEAS	Aminoácidos não essenciais (<i>Non-Essential Amino Acids</i>)
n.s	Not statistically significant
NT	<i>Non treated</i>
OD	Densidade óptica (do inglês: <i>Optical density</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDL	Periodontal ligament stem cells
PFA	Paraformaldeído
Prof.	Professor
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SCAP	<i>Stem cells of apical papilla</i>
SEM	<i>Scanning electron microscope</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SHED	<i>Stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
USA	Estados Unidos da América (<i>United States of America</i>)
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfofenyl)-2H-Tetrazolium- 5-Carboxanilide)

LISTA DE SÍMBOLOS

cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de Carbono
g	GAUSS
HClO	Ácido hipocloroso
M	Molar
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
min	Minuto
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
nm	Nanômetro
sec	<i>Seconds</i> (Segundos)
U/mL	Unidade por mililitro
v/v	Volume por volume
β	Beta
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
x	Multiplicação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. PROPOSIÇÃO.....	14
2.1 PROPOSIÇÃO GERAL	14
2.2 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 MATERIAL.....	15
3.2 METODOS.....	15
3.2.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	15
3.2.2 CULTIVO CELULAR.....	17
3.2.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,04%..	19
3.2.4 EXPOSIÇÃO DA SHED AO HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,04% ...	20
3.2.5 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – MTT.....	20
3.2.6 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – TRYPAN BLUE.....	22
3.2.7 PLASTICIDADE CELULAR – DIFERENCIAÇÃO	
OSTEOGÊNICA.....	23
3.2.7.1 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA – COLORAÇÃO COM	
VERMELHO DE ALIZARINA.....	24
3.2.8 EXPRESSÃO GÊNICA (RT-PCR).....	24
3.2.8.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	24
3.2.8.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA.....	25
3.2.8.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	27
4. ARTIGO.....	28
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO A.....	42
ANEXO B.....	43
APÊNDICE A.....	46
APÊNDICE B.....	48

1 INTRODUÇÃO

O hipoclorito de sódio (NaOCl) foi introduzido na Odontologia por Barret em 1917, para irrigação dos canais radiculares com a solução de Dakin (0,5% de cloro ativo), e mais tarde, Walker (1936) indicou a utilização do NaOCl a 5% para o preparo de dentes com polpa necrosada (MOHAMMADI, 2008). Sabe-se que é a solução irrigadora mais utilizada na terapia endodôntica, devido às suas consolidadas propriedades antimicrobianas de amplo espectro e solvente de tecido orgânico (SIQUEIRA JR, *et al.*, 2000a; ESTRELA, *et al.*, 2002; MOHAMMADI, 2008). A concentração empregada na prática clínica dessa solução é muito variada, compreendendo de 0,5% a 5,25%, não havendo uma unanimidade na escolha das mesmas (SIQUEIRA JR, *et al.*, 2000a; NAVARRO-ESCOBAR; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ; FERRER-LUQUE, 2010; ALKAHTANI; ALKAHTANY; ANIL, 2014).

Embora seus efeitos antibacterianos sejam reconhecidos, o mecanismo de ação ainda não foi devidamente elucidado. Sugere-se que o cloro ativo presente no ácido hipocloroso (HClO), resultante da dissociação iônica, atua de maneira irreversível nas enzimas essenciais aos microrganismos, desativando assim, as funções metabólicas celulares. Além disso, o NaOCl pode apresentar um efeito deletério ao DNA bacteriano e induzir o rompimento da membrana bacteriana. Quanto a sua propriedade de dissolução de tecido orgânico, tal mecanismo se deve à ação do HClO e dos íons hipoclorito nos ácidos graxos e lipídios, levando à degradação dos aminoácidos e à hidrólise (SIQUEIRA JR, *et al.*, 2000a; ESTRELA *et al.*, 2002; MOHAMMADI, 2008).

No aspecto antimicrobiano, o efeito do NaOCl já está estabelecido. No entanto, pouco se sabe da sua atuação nos diversos tipos celulares. Alguns estudos mostram o efeito de diferentes concentrações do NaOCl nas células (HIDALGO e DOMINGUEZ, 2000; ALKAHTANI; ALKAHTANY; ANIL, 2014; MARTIN, *et al.*, 2014, MOLLASHAHI; SABERI; KARKEHABADI, 2016; NAVARRO-ESCOBAR; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ; FERRER-LUQUE, 2010; CHANG *et al.*, 2001; ESSNER; JAVED; ELEAZER, 2011), mas a falta de consenso da concentração dificulta estabelecer àquela que não altera a viabilidade celular (SIQUEIRA JR, *et al.*, 2000a; ALKAHTANI, ALKAHTANY e ANIL, 2014). Estudos *in vitro* demonstraram que altas concentrações de NaOCl podem ser citotóxicas para vários tipos celulares, como fibroblastos (HIDALGO e DOMINGUEZ, 2000; NAVARRO-ESCOBAR; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ; FERRER-

LUQUE, 2010), células tronco de dentes permanentes (DPSC) (ESSNER; JAVED; ELEAZER, 2011), células tronco do ligamento periodontal (PDL) (CHANG *et al.*, 2001), células tronco da papila apical (SCAP) (MARTIN, *et al.*, 2014; MOLLASHAHI; SABERI; KARKEHABADI, 2016). E, além da concentração, a viabilidade celular também está relacionada ao tempo de exposição ao NaOCl (CHANG *et al.*, 2001; ALKAHTANI; ALKAHTANY; ANIL, 2014; MARTIN, *et al.*, 2014; MOLLASHAHI; SABERI; KARKEHABADI, 2016).

Em relação a DPSC, não foi demonstrado alterações morfológicas nas concentrações de 0,04%, 0,08%, 0,16% de NaOCl em função do tempo de exposição (5, 10 e 15 minutos) (ESSNER; JAVED; ELEAZER, 2011). Entretanto, não foram abordadas questões a respeito de marcadores de células-tronco mesenquimais da polpa dentária, o que poderia resultar no comprometimento da viabilidade e na diferenciação dessas células.

Assim sendo, investigou-se alterações morfológicas, plasticidade celular quanto a diferenciação osteogênica e marcadores de multipotência das células tronco de dentes decíduos (SHED) expostas a 0,04% NaOCl.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 PROPOSIÇÃO GERAL

Analisar os efeitos do hipoclorito de sódio nas células-tronco de dentes decíduos.

2.2 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

- 2.2.1 Avaliar a viabilidade celular das células tronco de dentes decíduos após exposição ao hipoclorito de sódio;
- 2.2.2 Caracterizar as células-tronco das polpas dentárias quanto à sua plasticidade: diferenciação osteogênica;
- 2.2.3 Avaliar a expressão gênica das linhagens estabelecidas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEP/HU-CAS) e aprovado em setembro de 2015 sob o CAAE: 43968315.1.0000.5133 (ANEXO A), juntamente com os termos: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (APÊNDICE A) e o Termo de Assentimento para o menor de idade (APÊNDICE B). Todos os voluntários da pesquisa receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e um Termo de Assentimento, explicando a realização do estudo, os objetivos, os riscos e os benefícios aos quais estariam expostos.

3.1 MATERIAL

Foi incluída, nesta pesquisa, uma amostra de dente decíduo humano extraído em processo de rizólise parcial, com vitalidade pulpar de uma voluntária do sexo feminino com 7 anos de idade.

A amostragem foi composta por 01 (uma) polpa dentária de incisivo superior decíduo com vitalidade pulpar, indicado previamente para exodontia e que seria descartado após o procedimento cirúrgico.

Como critérios de exclusão, pode-se destacar: pacientes sindrômicos e dentes extraídos com mais de 48 horas armazenados em meio de transporte.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

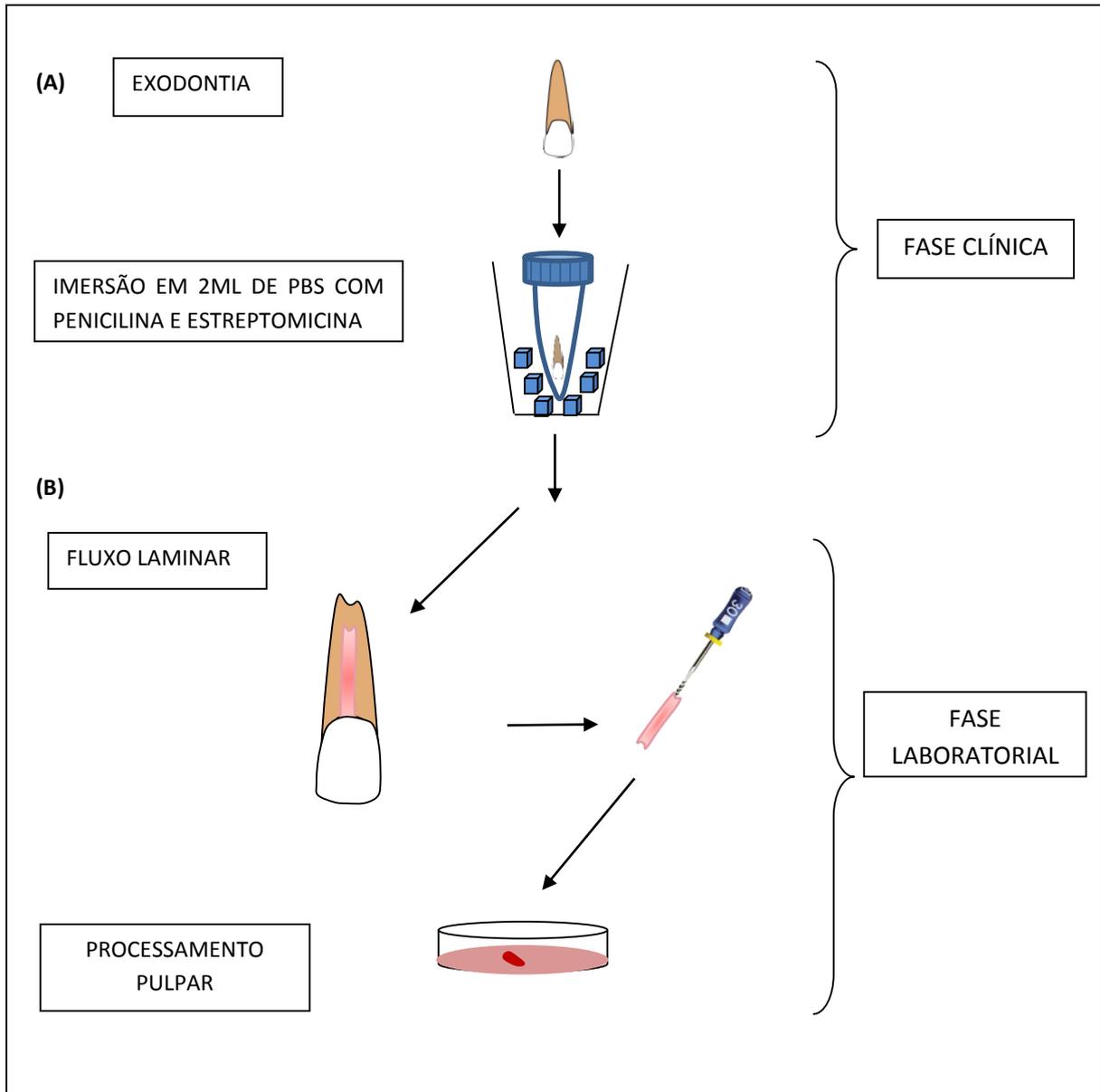
A paciente foi atendida pelos alunos de graduação nas disciplinas clínicas de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFJF, na cidade de Juiz de Fora, sob supervisão do pesquisador responsável. A partir do diagnóstico e da correta indicação do tratamento cirúrgico de extração, o responsável legal junto com paciente menor de idade concordou com o plano de tratamento, e foi convidado a participar deste estudo. O estudo iniciou-se apenas após autorização, do responsável legal e paciente, por assinatura do TCLE e do Termo de Assentimento, respectivamente.

A cirurgia para a obtenção do dente e seu processamento inicial (acondicionamento dos dentes em um tampão fosfato-salino (PBS) estéril (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brazil) contendo 2% (v/v) de Penicilina (100 U/mL) e Estreptomicina (100 U/mL) (LGC biotechnology, Cotia, Brazil) após a exodontia) foram realizados nas clínicas das disciplinas de Odontopediatria do Departamento de Odontologia Social e Infantil da Faculdade de Odontologia da UFJF. Os atendimentos e o procedimento de exodontia foi padronizado, segundo os protocolos de atendimento e de biossegurança da Instituição. Faz-se importante citar que as intervenções cirúrgicas obedeceram às rigorosas técnicas assépticas (limpeza da porção coronária, uso de luvas cirúrgicas estéreis, campo cirúrgico e instrumental estéril).

Imediatamente após a exodontia, o dente foi acondicionado em um tubo tipo Falcon de 15mL (KASVI, Curitiba, Brasil), contendo 2mL de meio de transporte (PBS contendo 2% (v/v) de Penicilina e Estreptomicina). Os tubos foram mantidos em condição hipotérmica, em isopor com material congelante reutilizável (Polar Técnica Comercial e Industrial LTDA., São Bernardo do Campo, Brasil), até a exposição e remoção da polpa (Esquema 1A).

O isopor foi conduzido ao Laboratório GENETEC (Laboratório de Genética Humana e Terapia Celular – ICB/UFJF), com colaboração do Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba, onde o processamento *in vitro* das células mesenquimais indiferenciadas da polpa foi realizado.

No fluxo laminar, a polpa foi removida com auxílio de limas endodônticas manuais estéreis (Dentsply, Catanduva, Brasil) e colocadas em cultivo (Esquema 1B).



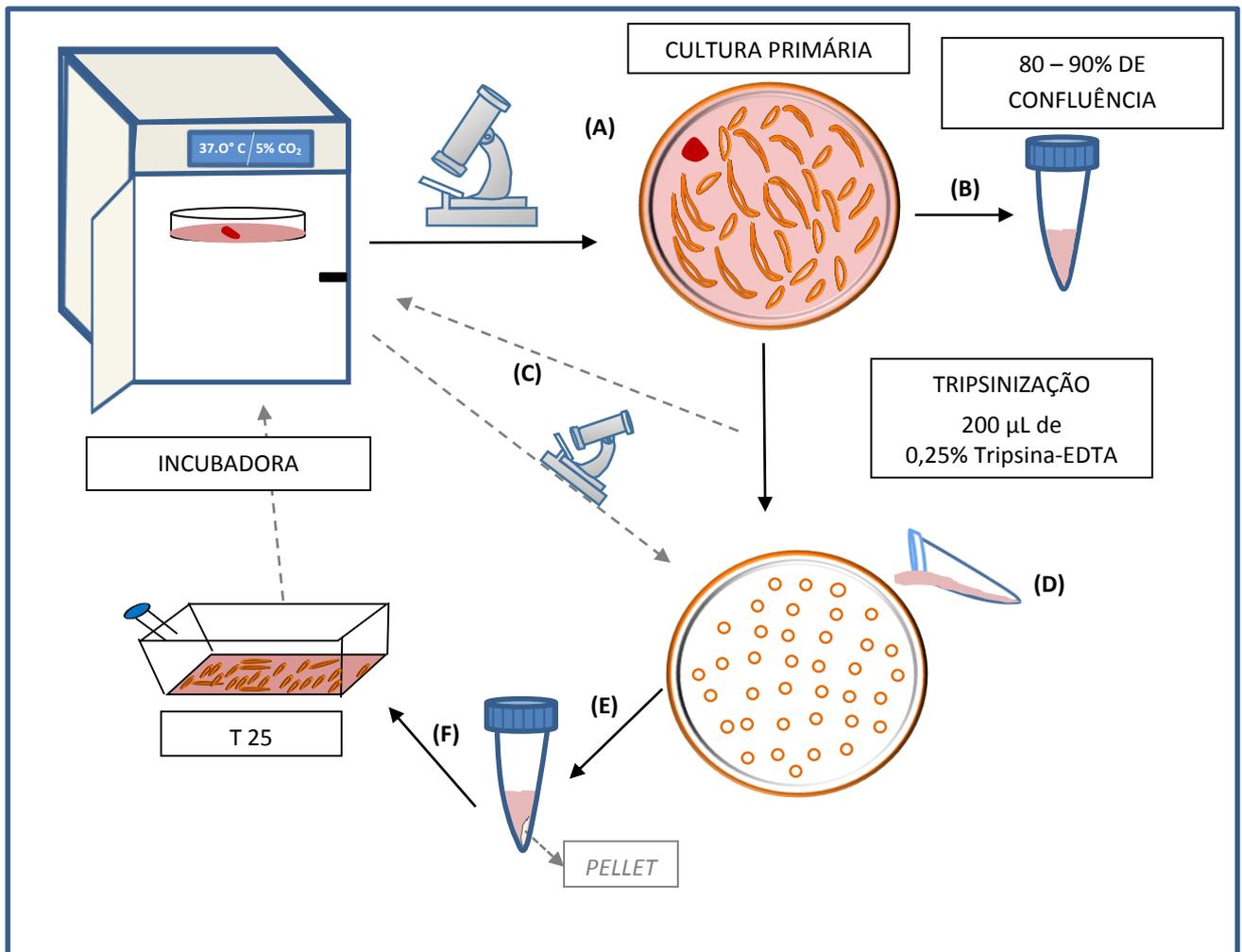
Esquema 1 – Obtenção e processamento das amostras. (A) - Fase clínica. (B) - Fase laboratorial
 Fonte: do autor, 2018.

3.2.2 CULTIVO CELULAR

A polpa foi colocada em cultivo (cultura primária) em placa de cultivo individual (KASVI, China), contendo meio de cultivo α -MEM (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de SFB, 1% (v/v) de Penicilina (100U/mL) e Estreptomicina (100U/mL), 1% (v/v) de L-Glutamina (200mM) (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) e 1% (v/v) Aminoácidos não essenciais (NEAS) (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), mantida a 37°C em incubadora (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) de 5% de CO₂ umidificada. O meio de cultivo foi

trocado a cada três dias. A placa de cultivo foi observada em microscópio invertido (Nikon Instruments Inc., Melville, Estados Unidos) diariamente, até atingir 80-90% de confluência. (Esquema 2A)

Para o subcultivo (expansão das células), o meio de cultivo α -MEM suplementado foi removido e colocado em um tubo tipo Falcon de 15mL e reservado (ESQUEMA 2B). Para os cultivos subsequentes foram utilizadas garrafas de cultivo celular de 25cm² (KASVI, China). As células foram lavadas com 5mL de PBS 1x, por duas vezes, seguido por descarte do mesmo. Foi acrescentado nas garrafas de cultivo celular 200 μ L de 0,25% Tripsina-EDTA (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), deixando agir por 5min em incubadora de 5% de CO₂ umidificada. Após este período, a garrafa foi levada ao microscópio invertido com o objetivo de observar a desagregação celular (Esquema 2C). No fluxo laminar, foi adicionado à garrafa o meio de cultivo reservado no tubo tipo Falcon, a fim de que o SFB presente no meio de cultivo neutralize a Tripsina-EDTA (Esquema 2D). Em um novo tubo tipo Falcon de 15mL, foi colocado todo o conteúdo da garrafa de cultivo e centrifugado a 210 \times g por 5min. Foi observado ao final do processo de centrifugação a formação de *pellet* de células no fundo do tubo (Esquema 2E). O tubo tipo Falcon foi levado para o fluxo laminar e descartado todo o sobrenadante, permanecendo apenas o *pellet* de células. As células serão ressuspensas em 1mL de meio de cultivo α -MEM suplementado e plaqueadas em novas garrafas de cultivo (Esquema 2F). As células passaram por subcultivo toda vez que atingiram confluência de 80-90%.



Esquema 2 – Cultivo celular. (A) – Confluência celular. (B) – Armazenamento do meio α -MEM. (C)- Desagregação celular. (D) – Neutralização da Tripsina-EDTA. (E) – *Pellet*. (F) Plaqueamento Celular.

Fonte: do autor, 2018.

3.2.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,04%

Para realizar os ensaios de proliferação e viabilidade celular, diferenciação osteogênica e expressão de marcadores embrionários e mesenquimais, foi preparado uma solução na concentração de 0,04% (v/v) de hipoclorito de sódio (NaOCl). Para preparar essa diluição, foi utilizado a fórmula descrita por Essner, Javed, Eleazer (2011):

$$\frac{\text{Concentração desejado}}{\text{Concentração NaOCl}} \times \text{Volume necessário.}$$

Para obter 1000 μ L de solução, 10 μ L de NaOCl foi adicionado a 990 μ L de meio de cultivo. No fluxo laminar, a quantidade de solução necessária para realizar cada

ensaio foi preparada em tubo Falcon de 15mL estéril, momentos antes da realização dos mesmos.

3.2.4 EXPOSIÇÃO DA SHED AO HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,04%

Para cada ensaio realizado, as SHED foram divididas em 4 (quatro) grupos conforme o tempo de exposição ao 0,04% (v/v) NaOCl:

- GI: SHED expostas ao 0,04% (v/v) NaOCl por 30 segundos
- GII: SHED expostas ao 0,04% (v/v) NaOCl por 1 minuto
- GIII: SHED expostas ao 0,04% (v/v) NaOCl por 5 minutos
- Grupo controle – SHED não foram expostas ao 0,04% (v/v) NaOCl.

Após a exposição, a solução de 0,04% (v/v) NaOCl foi removida e colocado um novo meio de cultura, e as células foram incubadas à 37°C por 24 horas.

3.2.5 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR - MTT

Este teste baseia-se na metabolização do MTT pela mitocôndria de células viáveis, que irá liberar cristais de Formazan (de cor azul escuro), e através da espectrofotometria, os mesmos serão lidos, e assim, avaliado a viabilidade celular por densidade óptica.

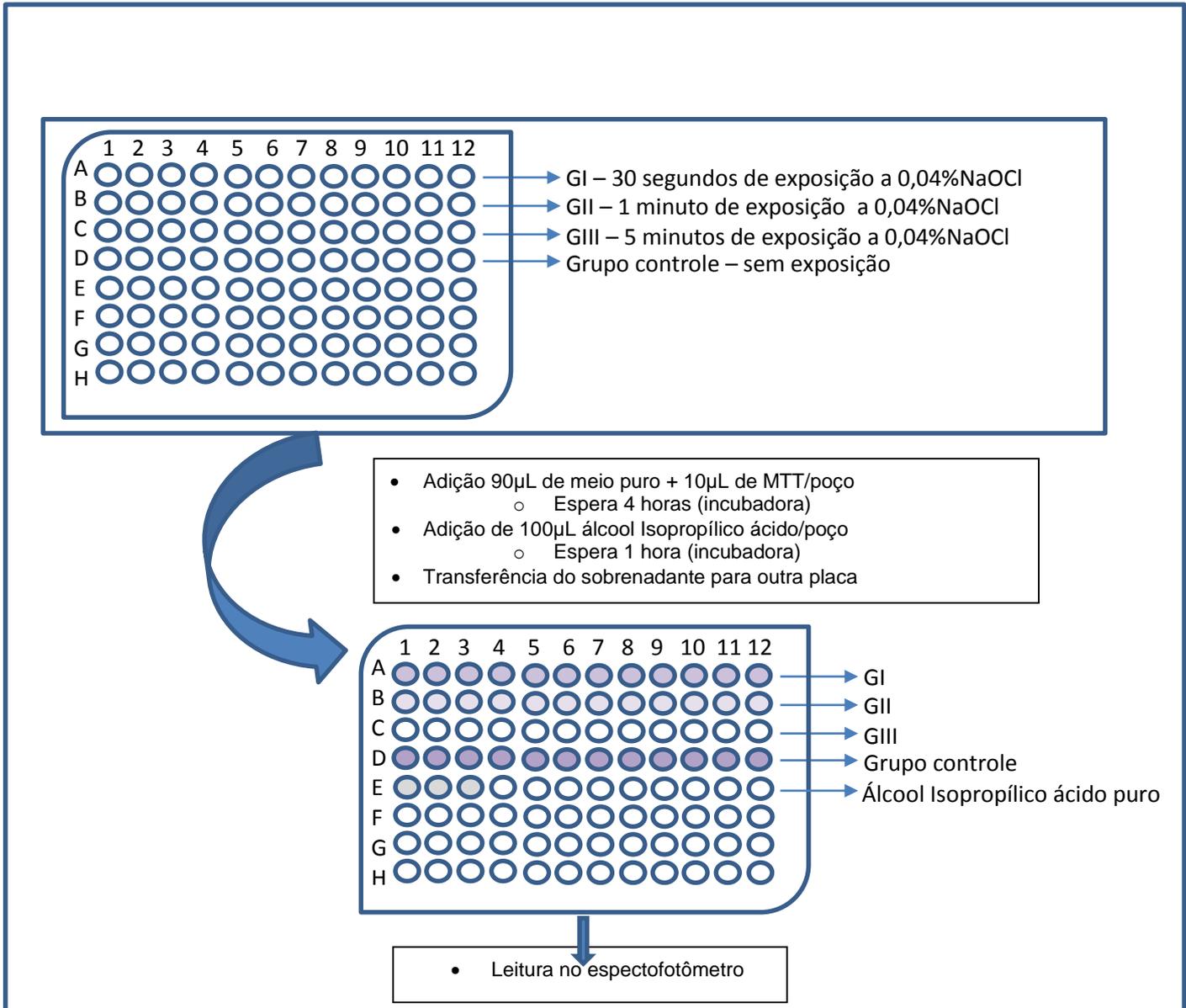
A viabilidade das células isoladas da polpa dentária dos 4 (quatro) grupos testados, foi mensurada por ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos).

Uma garrafa de 25cm² foi tripsinizada (conforme descrito anteriormente – Esquema 2) e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 1mL de meio de cultivo, e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Após isso, foi calculado a quantidade de microlitros (µL) do pellet ressuspensionado em meio de cultura necessários para ter 2x10³ células/poço.

Em uma placa de 96 poços (NEST Biotechnology Co., Wuxi, China), foram utilizados 48 poços para realizar o ensaio (ESQUEMA 3). Para saber a viabilidade celular 24, 48 e 72 horas após a exposição das células na solução de 0,04% (v/v) NaOCl, foram utilizadas 1 placa por tempo, totalizando 3 placas de 96 poços. No dia 0, foram plaqueadas 2000 células/poço nas três placas e adicionado 100µL de meio

de cultura por poço e encubadas à 37°C por 24 horas. Após esse período, as células foram expostas à solução 0,04% (v/v) NaOCl, nos respectivos tempos (GI, GII, GIII, Grupo controle), e um novo meio de cultura fresco foi adicionado aos poços e as mesmas incubadas à 37°C por 24 horas (placa 1), 48 horas (placa 2) e 72 horas (placa 3).

Após os respectivos períodos de incubação, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados 90µL de meio puro acrescido de 10µL de MTT a 10%. A placa envolta em papel alumínio foi incubada por um período de 4 horas, em incubadora de 5% de CO₂ umidificada. Após esta incubação, a solução de meio de cultivo puro com MTT foi removida e foi acrescido 100µL de álcool isopropílico ácido (Hexis, Jundiaí, São Paulo) por poço. A placa foi levada à incubadora por 1h, envolta em papel alumínio. Desta forma, a solução de álcool isopropílico ácido dissolverá os cristais de Formazan, resultantes da redução do MTT pelas células. A placa foi levada ao fluxo laminar e o sobrenadante de cada poço foi transferido para uma nova placa. Como grupo controle, 100µL de álcool isopropílico ácido foram adicionados em três poços vazios. A proliferação foi avaliada em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) à absorvância (comprimento de onda) de 570nm (ESQUEMA 3).



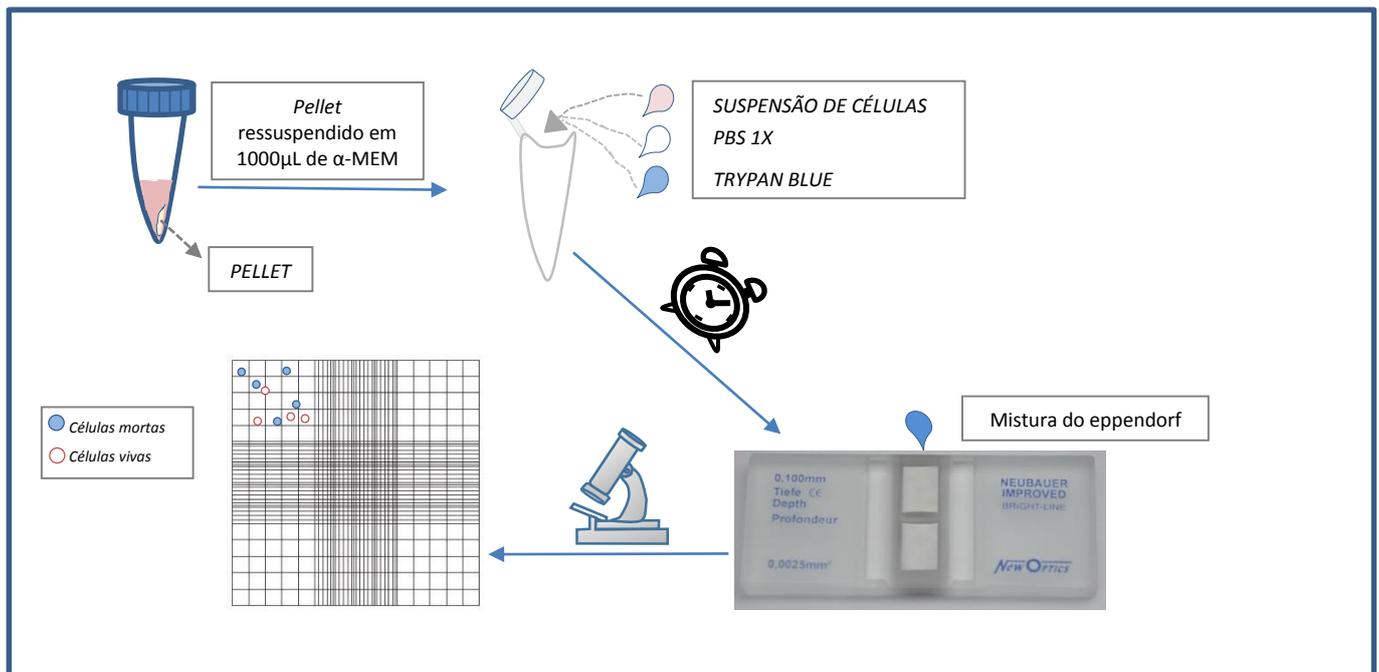
Esquema 3 – Ensaio de viabilidade celular por MTT
 Fonte: do autor, 2018.

3.2.6 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – TRYPAN BLUE

Uma garrafa de 25cm² foi tripsinizada (conforme descrito anteriormente – Esquema 2) e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 1mL de meio de cultivo, e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Após isso, foi calculado a quantidade de microlitros (µL) do *pellet* ressuspensionado em meio de cultura necessários para ter 100.000 células por placa.

Em 4 (quatro) placas individuais de cultivo de 60mm foram plaqueadas 1x 10⁵ células/placa e adicionados 1.000µL de meio de cultivo e incubadas à 37°C por 24

horas. Após esse período, as células foram expostas a solução 0,04% (v/v) NaOCl, nos respectivos tempos (GI, GII, GIII, Grupo controle). Ao final do tempo de exposição, a solução foi removida e as placas foram tripsinizadas (conforme descrito anteriormente) e o *pellet* formado de cada placa foi ressuspendido em 1.000 µL de α -MEM puro. O preparo do *trypan blue* (SIGMA) foi conforme as recomendações do fabricante: em um tubo de Eppendorf foi colocado 20µL da suspensão de células, 30µL PBS 1x e 50µL *Trypan Blue*. Foi esperado 5 minutos e removido 10µL do tubo de eppendorf e dispensado na Câmara de Neubauer e contado. Cada placa foi contada 5 vezes (ESQUEMA 4).



Esquema 4 – Ensaio de viabilidade celular por Trypan blue
Fonte: do autor, 2018.

3.2.7 PLASTICIDADE CELULAR – DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Para diferenciação osteogênica, foram plaqueadas 5×10^4 células/poço em placa de cultivo de 24 poços e mantidas na incubadora à 37°C por 24h. Após esse período, as células foram expostas à solução de 0,04% (v/v) NaOCl, nos respectivos tempos de 30s, 1min., 5min., sendo que cada grupo ocupou 3 poços da placa. Posteriormente, as células foram induzidas, por 14 dias, com meio Eagle modificado

por Dulbecco (DMEM) com baixa concentração de glicose (Invitrogen, CA, USA) contendo 10% (v/v) SFB, 10^{-8} M dexametasona (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), 0,2mM L-ácido ascórbico 2- fosfato (Sigma Aldrich), 10mM de β -glicerofosfato (Sigma Aldrich) e 100U/mL penicilina e 100 μ g/mL estreptomicina e mantidas na incubadora à 37°C. Em todos experimentos foi mantido um grupo controle cultivado em meio α - MEM suplementado com 10% de SFB. O meio das culturas foi trocado a cada três dias. A evolução da diferenciação foi acompanhada diariamente através do microscópio invertido. A deposição de cálcio foi avaliada através da coloração com Alizarin Red S (Sigma Aldrich).

3.2.7.1 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA – COLORAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA

Após finalizar a indução da diferenciação osteogênica, o meio indutor osteogênico foi removido e as culturas de células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4%(v/v) por 24 horas. A solução de vermelho de alizarina foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante: 1% (v/v) de vermelho de alizarina e 1% de hidróxido de amônio na proporção de 10:1, respectivamente, seguido de agitação à temperatura ambiente por 15 minutos (Forma Orbital Shaker, Thermo, USA). Posteriormente, os poços foram lavados com água destilada, o sobrenadante removido e foi aplicado 500 μ L/poço de solução de vermelho de alizarina por 5 minutos. O excesso da solução foi descartado e a placa foi mantida aberta até a secagem e as imagens foram obtidas através do microscópio invertido (Nikon TS100F, Japan).

3.2.8 EXPRESSÃO GÊNICA (RT-PCR)

3.2.8.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Foram utilizadas 2 garrafas de 25cm² confluentes. Em uma garrafa, as células foram expostas por 5 segundos à solução de 0,04% (v/v) NaOCl e a outra foi utilizada como controle, ou seja, as células não foram expostas a solução teste. Ambas permaneceram com meio de cultivo por 24 horas em incubadora à 37°C. Após essa etapa, as duas garrafas foram submetidas aos mesmos procedimentos. No fluxo

laminar, o meio de cultura foi removido e as garrafas de cultivo foram lavadas com PBS 1x. As células foram lisadas com 500µL Brazol (LGC Biotecnologia), e o mix obtido (células lisadas e brazol) foi transferido para tubo de Eppendorfs distintos e mantidos em condições hipotérmicas. Em seguida, foram acrescentados aos tubos de Eppendorfs, 200µL de clorofórmio e homogeneizado vigorosamente por 15 minutos (Forma Orbital Shaker, Thermo, USA) e centrifugados a 14.000xg por 15 minutos a 4°C.

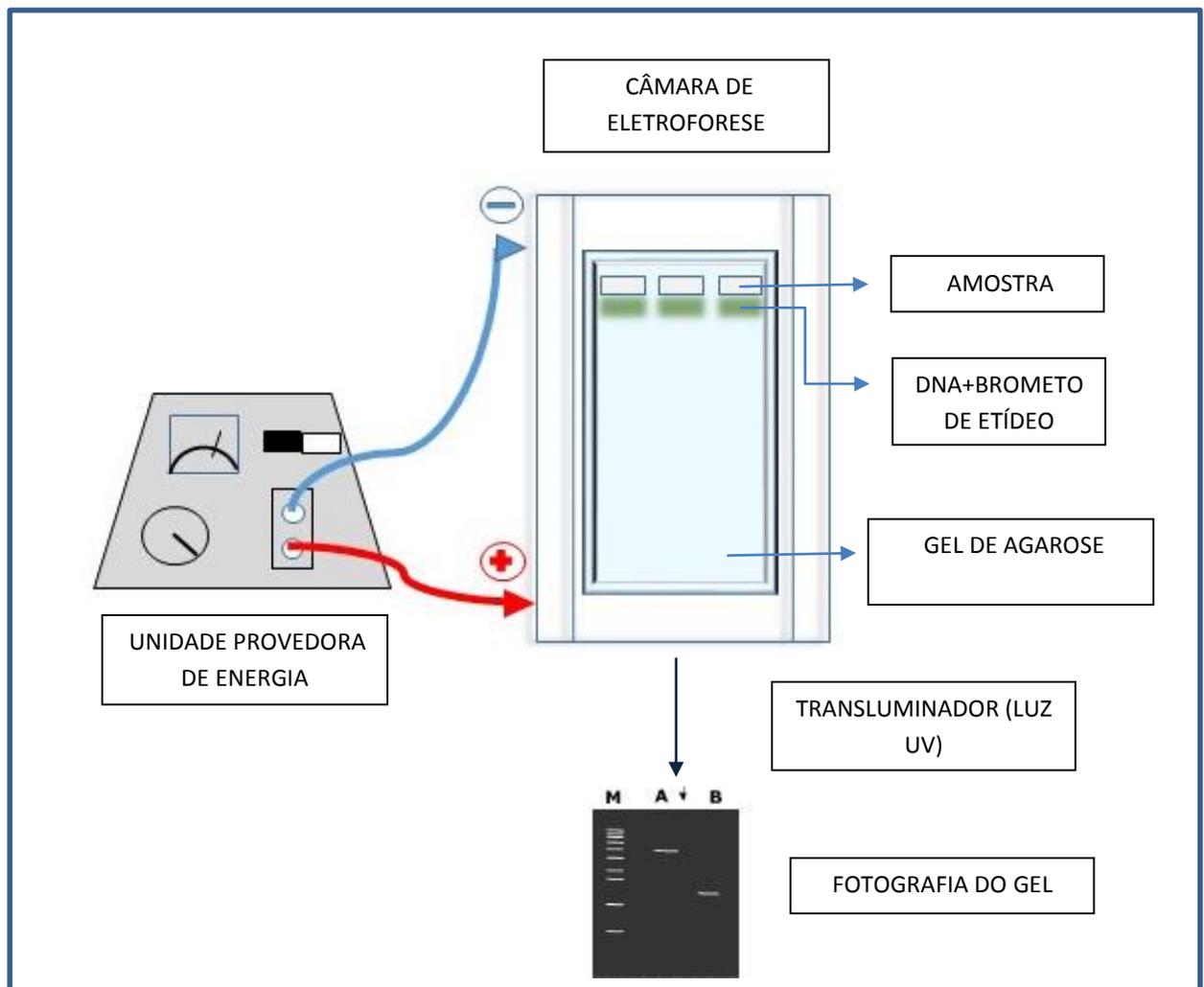
Após a centrifugação do material, a fase aquosa foi transferida para outro eppendorf e o RNA foi precipitado com 700µL de álcool isopropanol ácido, em condições hipotérmicas, por 15 minutos. Em seguida o material foi novamente centrifugado a 14.000xg por 15 minutos à 4° C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA formado foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado a 14.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA foi seco a -20°C por 20 minutos. O RNA total foi dissolvido em água destilada e livre de DNase e RNase (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos), incubado por 10 minutos a 60° C (para inativação de qualquer possível resíduo de RNase) e, então, armazenado à -80°C.

3.2.8.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA

A transcrição reversa é um processo que converte as moléculas de RNA em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). A transcrição reversa do cDNA foi realizada com o kit Superscript One-Step RT-PCR (Invitrogen, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os primers utilizados para amplificação por RT-PCR estão descritos na Tabela 1. Os cDNAs obtidos foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) e seus produtos foram separados por eletroforese em 1,5% de gel de agarose (GelDoc- It Imaging System, CA, USA) e os marcadores de DNA foram usados para confirmar o tamanho dos fragmentos resultantes (ESQUEMA 5).

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação por RT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Annealing temperature (°C)
OCT/4	ACTTCACTGCACTGTACTCCTCAG	AGGTTCTCTTTCCCTAGCTCCTC	60
Nanog	CTACCCCAGCCTTTACTCTTCCTAC	CTCTCCACAGTTATAGAAGGGACTG	60
B-actina	ATTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTC	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG	60
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	60
Nestin	GACCACTCCAGTTTAGAGGCTAAG	GAATCTCCTCTCCAGAGACTTC	60
CD105	TGCCACTGGACACAGGATAA	CCTTCGAGACCTGGCTAGTG	60



Esquema 5 – Eletroforese horizontal de DNA em gel de agarose.
 Fonte: do autor, 2018.

3.2.8.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para quantificar as mudanças na intensidade das bandas, as análises das imagens foram realizadas usando o *software* Photoshop CC e todas as imagens digitais foram adquiridas usando os mesmos parâmetros de exposição e sem modificação. A intensidade de *pixel* de cada uma dessas bandas foi medida e esses dados foram importados para GraphPad Prism7.

4 ARTIGO

EFFECTS OF SODIUM HYPOCHLORITE ON CELL VIABILITY AND MINERALIZATION CAPACITY OF STEM CELLS FROM HUMAN EXFOLIATED DECIDUOUS TEETH

Abstract

Introduction: Sodium Hypochlorite (NaOCl) is the most common irrigation solution and widely used during root canal procedures. The antimicrobial activity and capacity to dissolve organic matter are well known features of this solution. However, there is little knowledge about the effects of NaOCl on human mesenchymal stem cells.

Methods: Briefly, stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) were cultured and exposed to 0.04% NaOCl for 30, 60 and 300 seconds. We investigated cell proliferation and viability by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and trypan blue dye, respectively. Differentiation potential was investigated through osteogenic differentiation. Stem cells markers expression was evaluated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). All the assays were performed at 1 day following treatment.

Results: All tests showed a reduction in the number of viable cells with increased exposure time to NaOCl. Interestingly, there was no difference between the groups in relation to mineralization. As for RT-PCR, the expression of the genes tested, β -actin, Nestin and CD105 was significantly lower.

Conclusions: The data showed that long exposure period to NaOCl has detrimental effects on the survival of SHEDs.

KeyWords

Stem cells, Sodium Hypochlorite, cytotoxicity, survival, viability, SHED.

Introduction

In the endodontics practice, sodium hypochlorite (NaOCl) is the most commonly employed irrigation solution. Its utilization is due to the solution presenting several important features, such as pronounced antimicrobial activity with broad antibacterial spectrum, and capacity to dissolve organic matter and necrotic tissue (1-7).

Many studies have shown the effects of NaOCl on several cell types, (1-3,5-8), nevertheless, there is no consensus as to the existence of an ideal concentration for which no adverse reactions are presented (2,4). *In vitro* studies have shown higher concentrations of NaOCl to be potentially cytotoxic for many type of cells, e.g., fibroblasts (1); dental pulp stem cells (DPSC) (7); periodontal ligament stem

cells (PDL) (6); and stem cells of apical papilla (SCAP) (3). Those results also allowed concluding that cell viability is associated to the concentration of NaOCl and the time of exposure to it. (2,3,6,8)

High concentrations of NaOCl ($\geq 0,01\%$ for fibroblasts (1); $\geq 0,1\%$ for PDL (6); $\geq 0,33\%$ for DPSC (7)) decrease the number of cells, while low concentrations ($\leq 0,005\%$ for fibroblasts (1); $\leq 0,05\%$ for PDL (6); $0,04\%$ for DPSC (7)) combined diminished exposure time exhibited the greatest viability.

In relation to the stem cells isolated from the dental pulp, no morphological alterations was observed upon exposure to low concentration solutions (0.04%, 0.08% and 0.16%) (7). However, no questions was raised regarding the expression of markers of mesenchymal stem cells of the dental pulp, which could result in impairment and differentiation of these cells.

In this scenario, our objectives were to investigate alterations in morphology; cellular plasticity regarding osteogenic differentiation; and multipotency markers of SHED exposed to 0.04% NaOCl.

Materials and Methods

Patient Recruitment and Material Collection

This study was approved by the Human Research Committee of Ethics of the University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais. After verbal and written explanation, the donor or person responsible for minors donating signed the declaration of consent. Normal exfoliated human deciduous incisors were collected from a 7-year-old female child recruited from the pediatric dentistry clinic of the Dentistry Faculty, Federal University of Juiz de Fora. The extracted teeth were immediately immersed in sterile phosphate buffered saline (PBS) (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brazil) supplemented with antibiotics 100 U/mL penicillin (LGC biotechnology, Cotia, Brazil) and 100 U/mL streptomycin (LGC biotechnology) until further processing in the laboratory as described.

Harvesting of SHED and Cell Culture

Pulp tissue was separated from the tooth with the aid of endodontic hand files and the SHEDs have been isolated and cultured as described previously (9). When the growth of explanted pulp cells reached 80% to 90% confluence, they were submitted to treatment with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and passaging to the subsequent culture plates. The cells were cultured in α -MEM (LGC biotechnology) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (LGC biotechnology), 100 U/mL penicillin (LGC biotechnology) and 100 U/mL streptomycin (LGC biotechnology) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The growth medium was replaced every three days.

SHEDs lineages between the fifth and seventh passages were used in this study.

NaOCl preparation

In order to perform the proliferation and viability assays, osteogenic differentiation and expression of mesenchymal and embryonic markers, we prepared a 0.04%NaOCl (v/v) solution. Briefly, NaOCl 4% (v/v) (CAVALIERI Handling Pharmacy, Br) was diluted using growth medium, prepared as previously described (7). The SHED cells were divided in four groups (GI, GII, GIII and control group-NT) and were exposed to 0.04% NaOCl for different periods (30, 60 and 300 seconds, respectively). After that, a fresh medium was replacement and the cells were incubated at 37°C for 24 hours.

Proliferation Assay

MTT

SHED (2×10^3) were seeded in 48 wells of 96-well plate (n= 12 per group) and 100 μ l growth medium was added. After exposition of the cells to NaOCl, the SHED were cultivated in normal growth medium and the MTT (Sigma) assay was performed at 24, 48 and 72 hours. Tetrazolium salt is broken by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase of viable cells, and purple insoluble crystals of

formazan are produced in this test. After incubation, the supernatant in each well was removed and 100 µl of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well, and incubated for 4 hours. Subsequently, 100 µl acidic isopropanol solution was added to each well to dissolve formazan crystals at room temperature for 1 hour. The optical density (OD) of each well was measured in a Varioskan reader (Thermo Scientific Varioskan Flash, USA) at 570 nm.

Trypan Blue

A total of 1×10^5 SHED were seeded in 60-Mm culture dishes and growth medium was added to each dishes and kept in CO₂ incubator for 24 hours. After treatment of the cells with NaOCl, the supernatant was removed and the cells were then detached by 0.25% trypsin-EDTA treatment and stained by trypan blue (Sigma) as described by the manufacturer, and each dishes were counted five times so that the viability could be calculated.

Osteogenic differentiation

An initial density of 5×10^4 cells was plated onto 24-well plates (Corning, USA). The culture medium employed for the differentiation induction was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (Invitrogen, CA, USA) supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 0.2 mM ascorbic acid (Sigma), 10^{-8} M dexamethasone (Sigma) and 10 mM glycerophosphate. The culture was kept for 14 days. Medium was renewed every 3 days.

Alizarin red S staining

The cultures were fixed with paraformaldehyde 4% (v/v) for 24 h and stained using the alizarin red (Sigma) method to analyze the mineralization. The plates were washed with distilled water after the supernatant was removed. Then, the plates were filled with a solution containing 1% alizarin red and 1% ammonium hydroxide at the proportion of 10:1, respectively, and kept under agitation at room temperature for 15 min (Forma Orbital Shaker, Thermo, USA). The excess stain was removed

and the plates were kept open until dry. Finally, the images were obtained with an inverted microscope (Nikon TS100F, Japan).

RNA Isolation and Reverse-transcription PCR

Total RNA was extracted with Brazol reagent (LCG Biotechnologia) and reverse transcription was performed with the Superscript One-Step RT-PCR kit (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions. The primers used for amplification by RT-PCR are described in Table 1. PCR conditions were: First cycle 50°C for 30 min and 94°C for 2 min; initial denaturation at 94°C for 15 sec followed by 40 cycles at 94°C for 15 sec, annealing for 30 sec and 72°C for 1 min with a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis (GelDoc-It Imaging System, CA, USA). DNA ladder was used to confirm the size of the resulting fragments.

Table 1. Primers used for amplification by RT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Annealing temperature (°C)
OCT/4	ACTTCACTGCACTGTA CTCTCCTCAG	AGGTTCTCTTTCCCTAGCTCCTC	60
Nanog	CTACCCCAGCCTTTACTCTTCCTAC	CTCTCCACAGTTATAGAAGGGACTG	60
B-actin	ATTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTC	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG	60
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	60
Nestin	GACCACTCCAGTTTAGAGGCTAAG	GAATCTCCTCTCCCAGAGACTTC	60
CD105	TGCCACTGGACACAGGATAA	CCTTCGAGACCTGGCTAGTG	60

Gene Expression Quantification

In order to quantify changes in signal intensity, we analyzed the unmodified images using Photoshop CC software and all digital images were acquired using the same exposure parameters. The pixel intensity of all the bands was measured, and these data were imported into GraphPad Prism7.

Data Analysis

The results of cell viability and proliferation were presented by mean and standard deviation. The data were analyzed using Prism software version 7 (GraphPad Software, San Diego, USA) at different times. The MTT and Trypan blue results were analyzed by 2-way ANOVA, individual group comparisons were made using the Turkey test. Osteogenic differentiation was analysed by 1-way ANOVA and individual group comparisons were made using the Dunnett's test. Level of significance was set at $p < .05$.

Results

SHED Proliferation is Affected by the Exposure Time to NaOCl

Cell viability results were assayed by absorbance of MTT. In relation to NT, SHED exposed to NaOCl showed reduced proliferation in a time-dependent manner, being greatly affected after 5 min of exposure (Figure 1A). In the first 24 hours there was no statistical difference ($p > .05$) between NT and GI. In the next periods (48 h and 72 h), the 30-second and 60-second NaOCl exposure times did not differ statistically from each other ($p > .05$). The trypan blue assay also demonstrated that there was no statistically significant difference between the viability of NT and GI cells, nor between GI and GII, thus corroborating to the data generated by the MTT assay ($p > .05$). In addition, it showed a drastic reduction of viable cells as the exposure time to NaOCl increased (FIGURE 1B). Visual evaluation allowed observing morphological changes and loss of plate adhesion as can be seen in Figure 1 D-G.

Osteogenic Differentiation

After 21 days of the osteogenic differentiation induction, we observed that there was no statistically significant difference ($p > .05$) in the quantification of mineralization between samples (Figure 1C AND 1H-K).

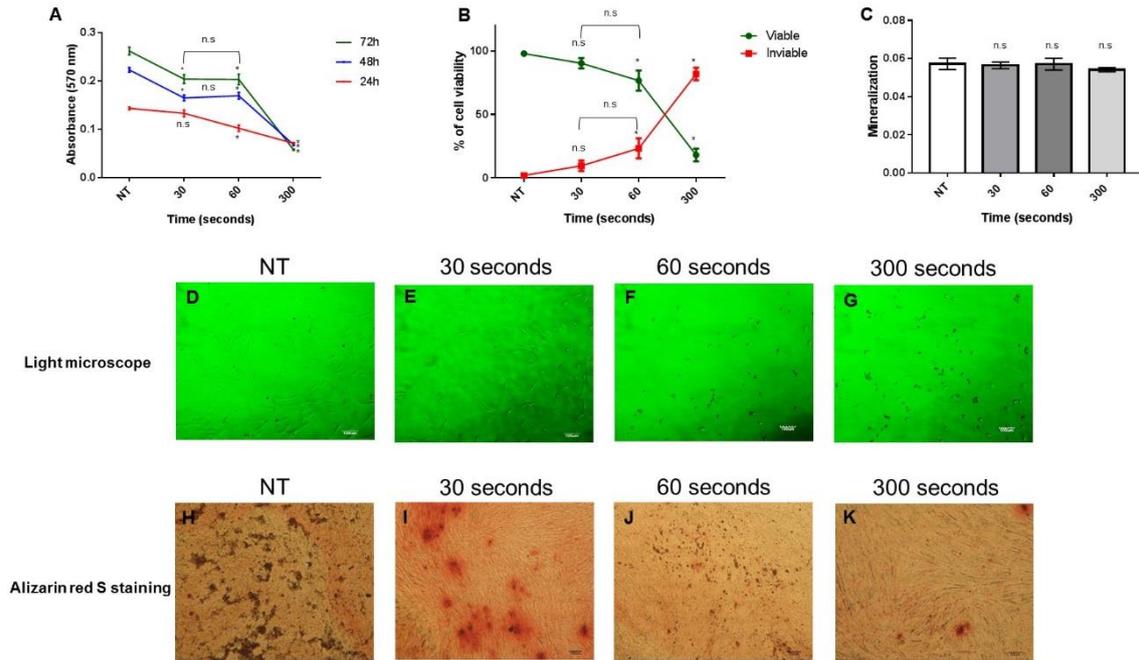


Figure 1. Effect of 0.04% NaOCl on SHED in the assays. (A) MTT assay. Effect of different exposure times on SHED proliferation. Increased time reduces cell proliferation. (B) Trypan Blue assay. Effect of different exposure times on SHED viability. The increase in exposure time is inversely proportional to cell viability. (C) and (H-K) Mineralization. After 21 days of osteogenic induction, there was no statistical difference between the groups ($p > .05$). Experimental group culture at 21 days of the experiment to detect calcium deposits by alizarin red S staining. (4X lens and scale bar: 100 μm .). (D-G) Cell morphology after each exposure period. It is noteworthy that, as the exposure time is increased, changes from fusiform to round morphology occur as well as loss of adherence to the culture plate (4X objective and scale bar: 100 μm). Data are presented as the mean \pm standard error of the mean. NT = non treated; n.s = not statistically significant; * $p < .05$

Molecular Analysis

The molecular characterization was performed after the shortest time of exposure to NaOCl (GI) and compared to the NT group. We chose this period due to the promising results found in the previously performed trials. The expression of pluripotent transcription factors (OCT/4 and Nanog) were found positive in the NT and GI groups. Both groups were positive for mesenchymal markers (Nestin, CD105) and internal control (β -actin), nevertheless, GI displayed a slight decrease in their expression (Figure 2A-B).

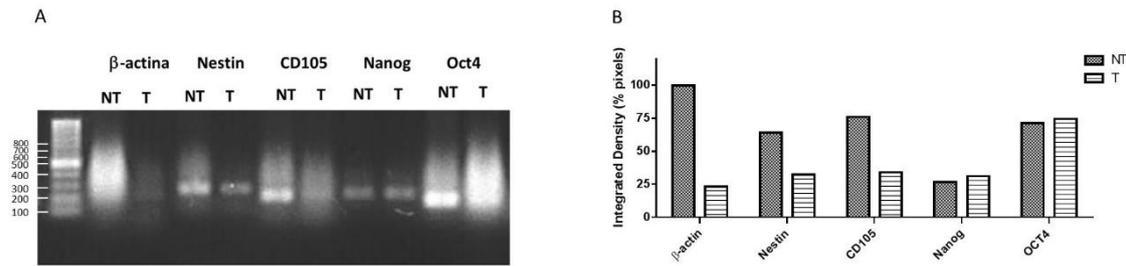


Figure 2. RT-PCR performed in the control group (NT) and 30 seconds (GI). (A) Gel electrophoresis of RT-PCR product on 1.5% agarose gel. Both groups expressed markers for the embryonic, mesenchymal and internal markers. (B) Pixel quantification of the intensity of each band of markers. A slight decrease in the expression of β -actin, Nestin and CD105 may be noted.

Discussion

Sodium hypochlorite is commonly used in endodontic treatment on account of its well-known properties of broad antimicrobial spectrum and organic tissue solvent (4,10). In addition to those features, it presents acceptable biological compatibility when used in less concentrated solutions (10). Many studies in the literature discuss the effects of NaOCl exposure on several cell types.

Studies on dermal fibroblasts in 2000 (1), and 3T3-L1 fibroblasts in 2010 (5) showed disagreement between their results. Hidalgo et al. (1) through the XTT assay demonstrated that concentrations greater than 0.01% NaOCl for 4 hours resulted in loss of cell adhesion and mitochondrial dysfunction in a concentration-dependent mode. Concentrations ranging from 0.005% to 0.00025% had no inhibitory effect on cell proliferation. On the other hand, in the concentration of 0.1% NaOCl, Navarro and Escobar (5) obtained a high rate of cell viability after 1 hour of exposure (97.78%), which diminished as the exposure time increased to 6 hours and 24 hours. Cell viability was also observed in the concentration of 0.5% as being inversely proportional to the time of exposure. Such discrepancies in the results may be due to different cellular origin; to the experimental protocol of each laboratory; or to be related to the experimental conditions used to evaluate cytotoxicity.

Another cell type used to study the effect of NaOCl was the immortalized mesenchymal stem cell (hTERT-MSCs) (2). The authors tested the concentrations of 0.5, 0.1, 0.025, 0.0125, and 0.005 mg/mL for 2, 4 and 24h and found that cell viability decreased with the augmentation in concentration and time of exposure and

both were inversely proportional to cell viability. Morphological changes were observed by SEM (scanning electron microscope) at concentrations of 0.025mg/mL after 4h exposure and 0.05 mg/mL after 2h and 4h. The cells acquired a round shape, presented loss of adhesion, and rupture of the cell membrane with nucleus extrusion.

With respect to DPSC, Essner, Javed, Eleazer (7) evaluated the effects of NaOCl on stem cells exposed to different concentrations (0.33%, 0.16%, 0.08%, and 0.04%) for the periods of 5, 10, and 15 minutes to simulate possible *in vivo* contact time. According to the authors, lower concentrations of NaOCl did not affect cell viability in a significant manner. The use of 0.04% NaOCl produced results similar to the control, thus indicating nearly complete preservation of cell viability at all time intervals tested. Our data do not corroborate with the aforementioned work, considering we exposed SHED to the same concentration and time employed in the work cited and cell viability assessed by us did not correspond to its data. We conducted our experiments with the best concentration suggested by the authors, however, altering the exposure time, i.e., 30, 60 and 300 seconds. Differently from the previously published data, proliferation was affected in a time-dependent manner and the viability of SHED in 30 seconds did not present statistical difference ($p > 0.05$) in relation to the control, similar results did not appear in the other times tested.

Alterations in cellular morphology were only observed by the authors (7) by utilizing 0.16% NaOCl solution. The morphological changes found in our study were subtle in the first 30 seconds, becoming more evident after 60 seconds. We conducted the experiments using the same observation method.

The study by Chang et al(6) tested concentrations of 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4% NaOCl in the cells of the periodontal ligament (PDL) for the periods of 3 and 24 h. It was observed that viability decreased at the periods tested, being drastic for concentrations above 0.2%. At the concentration of 0.05%, cell viability was close to 80% following exposure for 3h. Similarly, our results were similar regarding concentration but not the time, since over 5 minutes the SHED became 100% unviable.

Although a reduction in the number of viable cells in periods greater than 60 seconds was found in our study, the same was not observed for osteogenic differentiation. The lack of statistically significant difference between the groups,

might be justified by the period differentiation induction. Exposure of SHED to NaOCl decreases confluence over exposure time, however, as they were differentiated for 21 days, we may suggest that a SHED recovered along the time and proliferated thus yielding no long-term difference in mineralization .

Regarding the molecular characterization performed, we observed that the exposure of SHED to NaOCl in 30 seconds did not affect the multipotency markers. This data was corroborated by the preservation of plasticity in the osteogenic differentiation.

Thus, there is still no consensus when correlating cell parameters to time of exposure to NaOCl, as well as to concentrations. Our results, in addition to the previous ones produced in literature, suggest that each cell line presents a different behavior to sodium hypochlorite exposure. Further studies should be conducted for each cell type.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel), FAPEMIG (Research Support Foundation of Minas Gerais), UFJF (Federal University of Juiz de Fora), and the Dentistry Faculty furthering our research. We would also like to express our gratitude towards Claudio Galupo, Carlos Maranduba and the Laboratory for Human Genetics and Cell Therapy for greatly supporting this work both financially and technically.

Conflict of interest

The authors deny any conflicts of interest related to this study

References

1. Hidalgo E, Dominguez C. Growth-altering effects of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts. *Life Sciences*. 2000; 67: 1331-44
2. Alkahtani A, Alkahtany SM, Anil S. An *in vitro* Evaluation of the Cytotoxicity of Varying Concentrations of Sodium Hypochlorite on Human Mesenchymal Stem Cells. *J Contemp Dent Pract* 2014;15(4):473-481.
3. Martin DE, De Almeida JFA, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, et al. Concentration-dependent Effect of Sodium Hypochlorite on Stem Cells of Apical Papilla Survival and Differentiation. *J Endod*. 2014;40 (1):51-55.

4. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2000;26:331-4.
5. Navarro-Escobar E, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Jan 1;15(1):e90-4.
6. Chang YC, Huang FM, Tai KW, et al. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:446–50
7. Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112(5):662-666.
8. Farhad Mollashahi N, Saberi E, Karkehabadi H. Evaluation of cytotoxic effects of various endodontic irrigation solutions on the survival of stem cell of human apical papilla. *Iranian Endod J.* 2016;11(4): 293-7
9. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey P G, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100 (10): 5807–12.
10. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-117.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises dos resultados deste trabalho, pode-se concluir que:

- A viabilidade celular é inversamente proporcional ao tempo de exposição, ou seja, quanto maior for o tempo de exposição das SHED a 0,04%NaOCl menor o número de células-tronco viáveis. Sendo assim, o melhor tempo para essa concentração é de 30 segundos.
- A plasticidade celular (diferenciação osteogênica) não foi alterada entre os grupos. Isso pode ser explicado que, a longo prazo, as células-tronco dos grupos de 60 e 300 segundos conseguiram se recuperar e proliferar, não alterando a mineralização.
- A caracterização molecular entre o grupo controle e o de 30 segundos de exposição a 0,04%NaOCl não foi afetada (expressão dos marcadores de multipotência), sendo comprovado pela manutenção da plasticidade na diferenciação osteogênica.
- Tais resultados são promissores quando se pensa em regeneração endodôntica. Vários estudos já foram realizados envolvendo medicação intracanal entre sessões e células-tronco. Uma vez descontaminado o canal radicular, os resultados encontrados sugerem a irrigação final com NaOCl a 0,04% por 30 segundos, mantendo a viabilidade celular e sem apresentar grandes efeitos citotóxicos caso haja extravasamento pelo forame.

REFERENCIAS

ALKAHTANI, A.; ALKAHTANY, S.M.; ANIL, S. An *in vitro* Evaluation of the Cytotoxicity of Varying Concentrations of Sodium Hypochlorite on Human Mesenchymal Stem Cells. **J Contemp Dent Pract.**, v.15, n.4, p. 473-481, 2014.

CHANG, Y.C. *et al.* The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 92, p. 446–50, 2001.

ESSNER, M.D.; JAVED, A.; ELEAZER, P.D. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v,112, n.5, p. 662-666, 2011.

ESTRELA C. *et al.* Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz Dent J.**, v. 13, n. 2, p. 113-117,2002

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ, C. Growth-altering effects of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblastos. **Life Sciences**, v. 67, p. 1331-44, 2000.

MARTIN, D.E. *et al.* Concentration-dependent Effect of Sodium Hypochlorite on Stem Cells of Apical Papilla Survival and Differentiation. **J Endod.**, v. 40, n. 1, p. 51-55, 2014.

MIURA, M. *et al.* SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, 2003.

MOHAMMADI, Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. **Int Dent J**, v. 58, n. 6, p. 329-341. 2008.

MOLLASHAHI, N.F.; SABERI, E.; KARKEHABADI, H. Evaluation of cytotoxic effects of various endodontic irrigation solutions on the survival of stem cell of human apical papilla. **Iranian Endod J.**, v.1, n. 4, p. 293-7, 2016.

NAVARRO-ESCOBAR, E.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.P.; FERRER-LUQUE, C.M. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, v. 15, n. 1, p.90-4, 2010.

SIQUEIRA JR, J.F.et al. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. **J Endod.**, v.26, p. 331-4, 2000.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA-MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise comparativa de meios de transporte de dentes decíduos humanos extraídos - estudo de viabilidade celular.

Pesquisador: ANTÔNIO MÁRCIO RESENDE DO CARMO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43968315.1.0000.5133

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.211.923

Situação do Parecer:

Aprovado

ANEXO B – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO *JOURNAL OF ENDODONTICS*

Organization of Original Research Manuscripts

Please Note: *All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc., and should not exceed more than 250 words in length.*

1. **Title Page:** The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at icmje.org). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and order reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.
2. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings, and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.
3. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing the extensive review of the literature, and discuss the results of the study in this section.
4. **Materials and Methods:** The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components of this section are the detailed description of the materials used and their components, the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader

- should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (e.g., antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published method. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a **commercial product**, the manuscript must state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an **in vitro** model to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the **model**, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on **humans** must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies involving **animals** must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.
5. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (*i.e.*, neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts, and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings. The author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published online. Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (*e.g.*, microarray data).
 6. **Figures:** There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photos, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (*i.e.*, about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (*e.g.*, “A,” “B,” etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (J Endod 2012;38:884–888); Olivieri et al., (J Endod 2012;38:1007–1011); Tsai et al (J Endod 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the value of the illustration. Please note that a multi-panel, composite figure only counts as one figure when

considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for the maximum number of allowable figures). The second type of figures is graphs (*i.e.*, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y-axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

7. **Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary: Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).
8. **Discussion:** This section should be used to interpret and explain the results. Both the strengths and weaknesses of the observations should be discussed. How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical leadership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions
9. **Acknowledgments:** All authors must affirm that they have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest should be disclosed. Any author for whom this statement is not true must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Likewise, the sources and correct attributions of all other grants, contracts or donations that funded the study must be disclosed
10. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be easily learned from reading past issues of the JOE. The JOE uses the Vancouver reference style, which can be found in most citation management software products. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits to the number of references for review articles.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Biorrepositório)

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Análise comparativa de meios de transporte de dentes decíduos humanos extraídos: estudo de viabilidade celular.”**. Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano **“DENTE DECÍDUO E POLPA DENTÁRIA,”** cuja utilização está expressamente vinculada somente e esse projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos: (1) obter de células-tronco adultas da polpa dentária humana, (2) caracterizar as células-tronco quanto tipo, capacidade de se multiplicar e envelhecimento celular; e (3) diferenciá-las, visando testar a capacidade de se transformarem em tecidos diferentes. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: O **“dente decíduo”** será obtido de crianças de 4-12 anos com indicação clínica para exodontia. Todas as amostras obtidas serão armazenadas em nitrogênio (-196°C), visando desenvolvimento de pesquisa. A princípio todo material coletado será usado em pesquisa específica até que termine, porém caso seja necessário descartá-lo por razões de estocagem ou espaço os mesmos poderão ocorrer. Entretanto, conforme preconizado na Resolução CNS 441/2011 item 8, os participantes serão notificados sobre perda ou destruição de suas amostras, bem como sobre o encerramento da pesquisa. O descarte do material biológico humano armazenado em BIORREPOSITÓRIO pode ocorrer: a) pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa; b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade; c) por iniciativa da instituição; e d) pela dissolução do BIORREPOSITÓRIO.

Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em **“RISCOS MÍNIMOS”**, uma vez que os materiais biológicos mencionados são descartados no lixo hospitalar após sua indicação clínica. O benefício que esta pesquisa trará é que permitirá entender melhor os mecanismos moleculares e celulares de certas doenças humanas, usando as células-tronco como modelo, visando melhorar futuros tratamentos.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a

qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do

material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer

penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a

sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado

sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em **DUAS VIAS ORIGINAIS**, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **“LABORATÓRIO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA”**, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão

a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas normas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade

_____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa “**Análise comparativa de meios de transporte de dentes decíduos humanos extraídos: estudo de viabilidade**”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

MATERIAL DOADO: DENTE DECÍDUO E POLPA DENTÁRIA

Em caso de óbito ou condição incapacitante, expresso a minha vontade de cessão dos direitos sobre.

o material armazenado para:

Sucessores: _____, contato _____ .

Investigador Principal do referido estudo. _____ .

Outros: _____, contato _____

Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e

esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20____ .

Nome	Assinatura participante	Data
Nome	Assinatura pesquisador	Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF

Hospital universitário Unidade Santa Catarina

Prédio da Administração Sala 27

CEP 36036-110 Telefone: 40095205

E-mail: cep.hu@ufjf.edu.br

Nome do Pesquisador Responsável: Antônio Márcio Resende do Carmo

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Faculdade de odontologia –Departamento de Clínica Odontológica

Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário

Bairro São Pedro - CEP 36036-900

Juiz de Fora/MG - Brasil

Tel (32) 2102-6300 Ramal 25

Email: antoniomarcio.resende@ufjf.edu.br

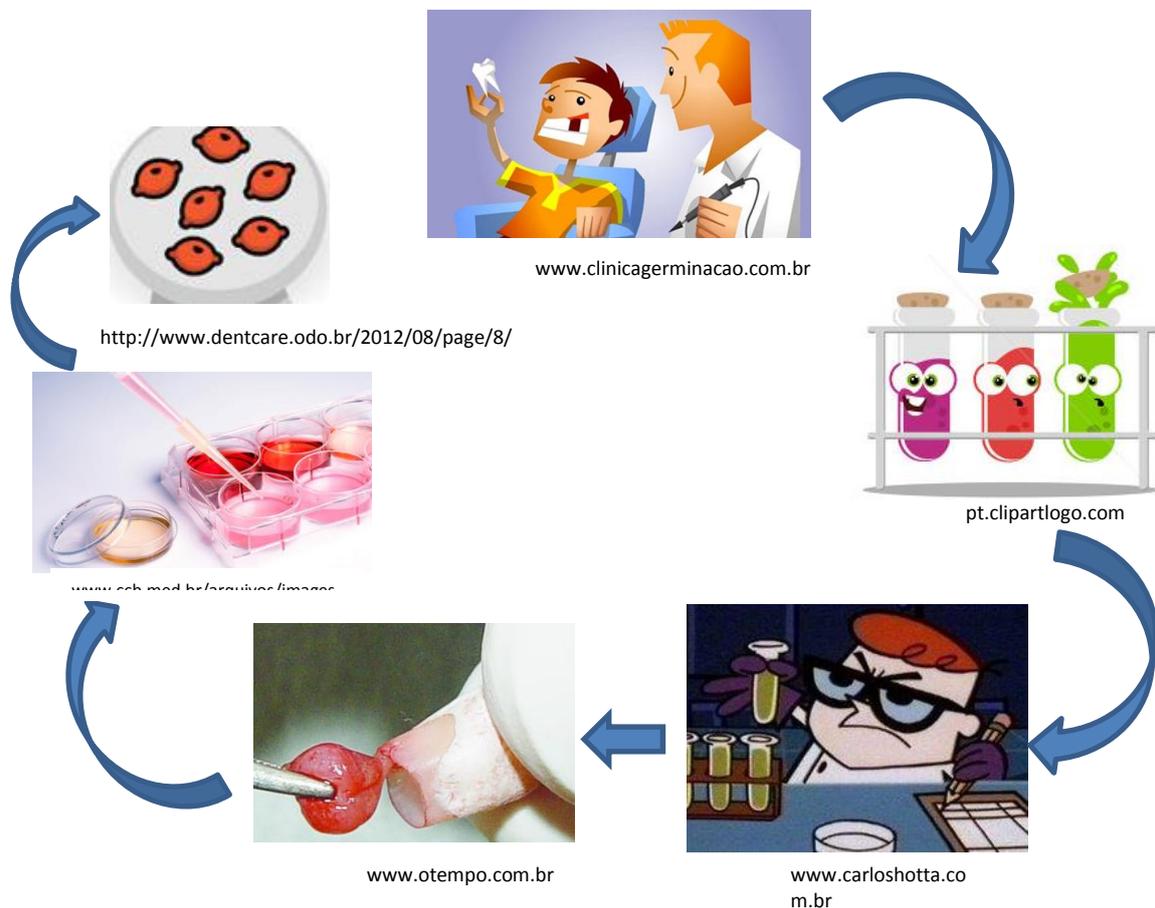
APÊNDICE B – TERMO DE ASSENTIMENTO



TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este formulário de assentimento informado é para crianças maiores de 4 anos e menores de 12 anos que comparecerão à clínica de odontopediatria e que estamos convidando a participar na pesquisa “**Análise comparativa de meios de transporte de dentes decíduos humanos extraídos: estudo de viabilidade celular.**”. Nesta pesquisa pretendemos fazer um protocolo para transportar o dente de leite extraído em duas substâncias diferentes para avaliar a sobrevivência da célula. Nós queremos diminuir a infecção do dente de leite e obter células vivas.

Para esta pesquisa adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s):



Seu dente de leite será removido da boca com cuidado e sem dor, adequadamente armazenados em frascos e levados para o laboratório.

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. É você quem decide. Se decidir **não participar** da pesquisa, é seu direito e nada mudará no seu tratamento de saúde. Até mesmo se disser "sim" agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema. Não falaremos para outras pessoas que

você está nesta pesquisa e também não compartilharemos informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa.

Os procedimentos a serem realizados são seguros e os **riscos** são **mínimos**, já que o material para a pesquisa será descartado após a pesquisa. Esta pesquisa poderá nos ajudar a achar o material mais indicado para transportar o dente de leite.

Quando terminarmos a pesquisa, eu sentarei com você e seus pais e falaremos sobre o que aprendemos com ela. Eu também darei um papel com os resultados por escrito. Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar agora ou depois. Eu escrevi um número de telefone e endereço onde você pode me localizar ou, se você estiver por perto, você poderá vir e me ver. Se você quiser falar com outra pessoa tal como o seu professor ou médico ou algum parente, não tem problema.

Este termo de assentimento encontra-se impresso em **DUAS VIAS ORIGINAIS**, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no "**LABORATÓRIO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA**", e a outra será dada a você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos.

Eu entendi para que serve a pesquisa, e que terei que doar meu dente de leite. Tive a oportunidade de tirar as minhas dúvidas.

() **ACEITO** participar da pesquisa

() **NÃO ACEITO** participar da pesquisa

Juiz de Fora, ____ de _____ de 20__.

Assinatura da criança: _____

Assinatura dos pais/responsáveis: _____

Ass. Pesquisador: _____

CEP HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF

Hospital Universitário Unidade Santa Catarina

Prédio da Administração, Sala 27

CEP 36036-110

E-mail: cep.hu@ufjf.edu.br

Nome do Pesquisador Responsável: Antônio Márcio Resende do Carmo

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Faculdade de odontologia – Departamento de Clínica Odontológica

Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário

Bairro São Pedro - CEP 36036-900

Juiz de Fora/MG - Brasil

Tel (32) 2102-6300 Ramal 25

Email: antoniomarcio.resende@ufjf.edu.br

Contatos da Equipe da Pesquisa:

Dayanne Netto dos Santos

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Faculdade de Odontologia – Departamento de Clínica Odontológica (CLO)

Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário.

Bairro São Pedro - CEP 36036-900

Juiz de Fora/MG - Brasil

Tel (32) 9133-3499

Email: day_nsantos@yahoo.com.br