

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

ÉRIKA MAGESTE DE ALMEIDA CANDIDO

**EFEITOS DO CAMPO MAGNÉTICO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS DA
POLPA DENTÁRIA E DO TECIDO PULPAR DE DENTES TERCEIROS MOLARES
HÍGIDOS HUMANOS**

JUIZ DE FORA

2017

ÉRIKA MAGESTE DE ALMEIDA CANDIDO

**EFEITOS DO CAMPO MAGNÉTICO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS DA
POLPA DENTÁRIA E DO TECIDO PULPAR DE DENTES TERCEIROS MOLARES
HÍGIDOS HUMANOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo

JUIZ DE FORA

2017

ÉRIKA MAGESTE DE ALMEIDA CANDIDO

**EFEITOS DO CAMPO MAGNÉTICO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS DA
POLPA DENTÁRIA E DO TECIDO PULPAR DE DENTES TERCEIROS MOLARES
HÍGIDOS HUMANOS**

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

Aprovada em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Leandro Marques de Resende
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Rodrigo Guerra de Oliveira
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - SUPREMA

Aos meus amores José Maria, Leiliane e Diogo

Dedico

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um sentimento nobre.

É reconhecer a ação do outro na sua vida.

É compreender nos gestos, nas palavras, grandes lições.

É manifestar ao outro que ele foi importante para você.

Por isso, agradeço...

A *Deus*, pela sua presença em minha vida, por sempre me mostrar um caminho nos momentos difíceis e por me mostrar toda a força, a fé e o potencial existentes em mim;

Aos meus pais *José Maria e Leiliane*, pela dedicação e incentivo à educação de seus filhos, por serem meu porto seguro;

Aos meus irmãos *Daniel e Lucas*, que sempre se fizeram presentes e dispostos a ajudar;

Ao meu esposo *Diogo*, pelo companheirismo e respeito com os meus ideais de vida, por acreditar sempre nas minhas possibilidades;

Aos meus avós *Rogério (in memorian), Leny, Onofre e Elza*, por serem exemplos de perseverança, fé e doação, em especial à *vó Leny* pela acolhida, convívio e ensinamentos diários;

Ao meu orientador *Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo*, por todas as orientações recebidas, por acreditar e apostar no meu trabalho desde o início;

Ao *Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba*, por apresentar o universo das células-tronco e ampliar meus horizontes;

Ao *Prof. Dr. José Paulo Rodrigues Furtado de Mendonça*, por apostar e colaborar com o desenvolvimento de toda parte magnética do trabalho;

Ao *Prof. Dr. Leandro Marques de Resende*, pela colaboração e disponibilidade em ajudar;

À Dra. Fernanda, pelos ensinamentos, apoio e suporte para o desenvolvimento dos experimentos;

À amiga Melissa Mariana Gómez Vaca, pela vivência diária que nos mostrou a certeza de que sozinhos somos fracos e juntos somos fortes na causa que abraçamos;

Aos integrantes do grupo de pesquisa e colegas Dayanne, Fernanda, Jairo, Otávio, Patrícia, por toda contribuição na realização deste trabalho;

À Camila, que me recebeu de forma tão gentil no laboratório Genetec, compartilhando não apenas seu conhecimento, como também seu empenho e dedicação à pesquisa;

Aos professores Dr. Eduardo Machado Vilela e Prof. Dr. Neuza Maria Souza Picorelli Assis, pela acolhida na clínica de cirurgia e ajuda na obtenção das amostras;

Aos integrantes do IMUNOCET, Patrícia, Paula e Thiago, pela prontidão e colaboração sem medida durante os ciclos de congelamento celular;

Aos secretários do programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, por sanar minhas dúvidas e estarem sempre dispostas a ajudar;

Aos meus amigos de profissão da Faculdade de Odontologia da UFJF, por me incentivarem na busca deste sonho, pelo acompanhamento e torcida durante todo o mestrado;

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma, mesmo que de longe, para a elaboração deste trabalho.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

RESUMO

O armazenamento celular e tecidual para uso em terapia regenerativa e desenvolvimento de pesquisas, torna-se uma questão importante à medida que a expectativa de vida aumenta. Este trabalho se propôs avaliar os efeitos de campos magnéticos estáticos unidirecionais durante o processo de criopreservação inicial de células e de tecido pulpar de dentes terceiros molares humanos hígidos. Foram obtidas polpas dentárias (n=39) de terceiros molares extraídos, que foram divididas para avaliação celular (n=3) de viabilidade e avaliação tecidual (n=36) para obtenção de células do tecido pulpar. Para avaliação celular, células isoladas e expandidas, compuseram os grupos: Grupo I: controle, células submetidas à criopreservação inicial por método convencional; Grupo II: controle, células submetidas à criopreservação inicial lenta; Grupo III: células submetidas à criopreservação inicial lenta, associado a 150mT; Grupo IV: células submetidas à criopreservação inicial lenta, associado a 290mT; Grupo V: células submetidas à criopreservação inicial lenta, associado a 360mT. Durante a criopreservação as células foram suspensas em meios de congelamento contendo 0, 3 e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido): GI-II-III-IV-V 0%, GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10%. Para avaliação tecidual as amostras criopreservadas inicialmente em método convencional, formaram os grupos: Grupo I: polpas submetidas à criopreservação inicial sem campo magnético (GI); Grupo II: polpas submetidas à criopreservação inicial associada a 150mT (GII); Grupo III: polpas submetidas à criopreservação inicial associada a 290mT (GIII); Grupo IV: polpas submetidas à criopreservação inicial associada a 360mT (GIV). Amostras das avaliações celular e tecidual, após criopreservação inicial, foram armazenadas em nitrogênio líquido por 7 dias. Após o processo de descongelamento a viabilidade celular foi mensurada por trypan blue e a eficiência de obtenção de células a partir da polpa criopreservada, por observação óptica diária. Os resultados foram semelhantes para as taxas de viabilidade imediatamente após descongelamento celular para GI-II-III-IV-V 0%, GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10% ($p>0.05$). Enquanto a viabilidade após 96h de subcultivo celular, os valores de GI-II-III-IV-V 0% foram inferiores aos de GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10% ($p<0.05$). As células de polpa dentária expostas ao campo magnético durante a criopreservação tiveram um efeito positivo nas taxas de viabilidade após 96h de subcultivo, quando o meio de congelamento foi de 0% DMSO ($p<0.05$). Foi possível

obter células da polpa dos quatro grupos da avaliação tecidual, sendo que o GIV apresentou maior taxa de eficiência. Pode-se concluir que a intensidade do campo magnético e a concentração de DMSO testados não influenciaram na taxa de viabilidade mensurada por trypan blue, imediatamente após o descongelamento. Entretanto, promoveu diferença estatística nos valores de GI-II-III-IV-V 0% após 96h de subcultivo celular. A intensidade do campo magnético foi diretamente proporcional à eficiência de obtenção de células a partir de polpa criopreservada.

Palavras-chave: criopreservação, campo magnético, polpa dentária.

ABSTRACT

Cell and tissue banking for use in regenerative therapy and research development becomes an important issue as life expectancy increases. This work aimed to evaluate the effects of unidirectional static magnetic fields during the initial cryopreservation process of cells and pulp tissue of healthy human third molar teeth. Dental pulps (n = 39) were obtained from third molars extracted, which were divided for cellular evaluation (n = 3) of viability and tissue evaluation (n = 36) to isolate dental pulp cells. For cell evaluation, isolated and expanded cells comprised the following groups: Group I: control, cells submitted to initial cryopreservation by conventional method; Group II: control, cells submitted to initial slow freezing; Group III: cells submitted to initial slow freezing with 150mT; Group IV: cells submitted to initial slow freezing with 290mT; Group V: cells submitted to initial slow freezing with 360mT. During cryopreservation the cells were suspended in freezing medium containing 0, 3 and 10% DMSO (dimethylsulfoxide): GI-II-III-IV-V 0%, GI-II-III-IV-V 3% and GI- II-III-IV-V 10%. For tissue evaluation, samples initially freezing in a conventional method comprised the following groups: Group I: pulps submitted to initial freezing without magnetic field (GI); Group II: pulps submitted to the initial freezing with 150mT (GII); Group III: pulps submitted to initial freezing with 290mT (GIII); Group IV: pulps submitted to the initial freezing with 360mT (GIV). Samples from cellular and tissue evaluations, after initial cryopreservation were stored in liquid nitrogen for 7 days. After the thawing process the cellular viability was measured by trypan blue and the efficiency of obtaining cells from the cryopreserved pulp by daily microscopic observation. The results showed that cell survival rates were similar between control groups and experimental groups at concentrations of 0%, 3% and 10% DMSO ($p>0.05$). After 96h of culture, the proliferation rate was higher for the groups exposed to the freezing medium with 3% and 10% DMSO, than DMSO free groups ($p<0.05$). Dental pulp cells exposed to magnetic field during freezing had a positive effect on the proliferating rate when the freezing medium was DMSO free ($p<0.05$). It was possible to obtain cells from all groups of the tissue analysis, and the GIV exhibited the highest efficiency rate. In conclusion, the magnetic field strength and the DMSO concentration tested, did not influence the viability rate measured by trypan blue immediately after thawing. But that promoted difference in the values of GI-II-III-IV-V 0% after 96h of cellular culture. The increase

of magnetic field was directly proportional to the efficiency rate of dental pulp cell isolation from cryopreserved tissue.

Keywords: cryopreservation, magnetic fields, dental pulp.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
°C/min	Grau Celsius por minuto
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitros
µL/mL	Microlitro por mililitro
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP/UFJF	Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora
CHX	Digluconato de clorexidina
cm ²	Centímetro quadrado
Co	<i>Corporation</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPSCs	<i>Dental Pulp Stem Cells</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	Feminino
FO-UFJF	Faculdade de Odontologia - Universidade Federal Juiz de Fora
g	Força g - unidade de aceleração
GI	Grupo controle para avaliação tecidual
GI 0%	Grupo controle com 0%DMSO, em método convencional na criopreservação inicial para avaliação celular
GI 10%	Grupo controle com 10%DMSO, em método convencional na criopreservação inicial para avaliação celular

- GI 3% Grupo controle com 3%DMSO, em método convencional na criopreservação inicial para avaliação celular
- GII Grupo experimental associado a intensidade de 150mT para avaliação tecidual.
- GII 0% Grupo controle com 0%DMSO, em congelamento lento inicial para avaliação celular
- GII 10% Grupo controle com 10%DMSO, em congelamento lento inicial para avaliação celular
- GII 3% Grupo controle com 3%DMSO, em congelamento lento inicial para avaliação celular
- GIII Grupo experimental associado a intensidade de 290mT para avaliação tecidual.
- GIII 0% Grupo experimental com 0%DMSO, em congelamento lento inicial, associado a intensidade de 150mT para avaliação celular
- GIII 10% Grupo experimental com 10%DMSO, em congelamento lento inicial, associado a intensidade de 150mT para avaliação celular
- GIII 3% Grupo experimental com 3%DMSO, em congelamento lento, associado a intensidade de 150mT para avaliação celular
- GIV Grupo experimental associado a intensidade de 360mT para avaliação tecidual.
- GIV 0% Grupo experimental com 0%DMSO, em congelamento lento inicial, associado a intensidade de 290mT para avaliação celular
- GIV 10% Grupo experimental com 10%DMSO, em congelamento lento inicial, associado a intensidade de 290mT para avaliação celular
- GIV 3% Grupo experimental com 3%DMSO, em congelamento lento inicial,

	associado a intensidade de 290mT para avaliação celular
GV 0%	Grupo experimental com 0%DMSO, em congelamento lento inicial, associado a intensidade de 360mT para avaliação celular
GV 10%	Grupo experimental com 10%DMSO, em congelamento lento inicial, associado a intensidade de 360mT para avaliação celular
GV 3%	Grupo experimental com 3%DMSO, em congelamento lento inicial, associado a intensidade de 360mT para avaliação celular
h	Hora
IMUNOCET	Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada
Inc.	<i>Incorporated</i>
LLC	<i>Limited Liability Company</i>
LTDA	Limitada
M	Masculino
MG	Minas Gerais
mg/mL	Miligrama por microlitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mT	MiliTesla
n	Numero amostral
NEAS	<i>Non essential amino acid solution</i>
NL ₂	Nitrogênio Líquido
PBS	<i>Phosphate Buffered Salin</i>
PVC	Policloreto de vinila
s	Segundos

S/A	Sociedade Anônima
SFB	Soro Fetal Bovino
T	Tesla
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFJF	Universidade Federal Juiz de Fora
UI/mL	Unidade Internacional por mililitro
α -MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle Alfa Modification</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental da avaliação tecidual.....	23
Figura 2 - Delineamento experimental da avaliação celular.....	24
Figura 3 - Processamento inicial das amostras.....	25
Figura 4 - Obtenção do tecido pulpar.....	26
Figura 5 - Criopreservação inicial para avaliação celular.....	28
Figura 6 - Processamento do tecido pulpar.....	28
Figura 7 - Criopreservação inicial para avaliação tecidual.....	29
Figura 8 - Criopreservação inicial (Artigo - Figura 1).....	37
Figura 9 - Taxa de viabilidade imediatamente após descongelamento pela intensidade do campo magnético (Artigo - Figura 2).....	39
Figura 10 - Taxa de viabilidade após 96h de subcultivo pela intensidade do campo magnético (Artigo - Figura 3).....	40

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Perfil dos doadores dos grupos para a avaliação tecidual e taxa de obtenção de células a partir de polpa dentária criopreservada (Artigo - Tabela 1).....	41
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. PROPOSIÇÃO.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 MATERIAL.....	22
3.1.1 Delineamento experimental.....	22
3.2 METODOS.....	24
3.2.1 Obtenção do tecido pulpar.....	24
3.2.2 Criopreservação.....	27
3.2.3 Cultivo celular.....	30
3.2.4 Avaliação da viabilidade celular	31
3.2.5 Análise Estatística.....	32
4. ARTIGO.....	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	53
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO...	54
APÊNDICE B – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	56
APÊNDICE C- TCLE PARA O RESPONSÁVEL DO MENOR.....	59

1 INTRODUÇÃO

O armazenamento tecidual e celular ganhou maior visibilidade com o surgimento dos biobancos, que ampliaram as possibilidades de desenvolvimento de pesquisas regionais e multicêntricas, a partir de um grande número de amostras criopreservadas.

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 ultra baixa, geralmente por volta de -196°C (DE SANTIS; PRATA, 2009; Ji *et al.*, 2014).

O processo de criopreservação envolve fenômenos físico-químicos complexos. Diversos estudos criobiológicos como Ragoonanan *et al.* (2010), Giovantú *et al.* (2012), Ji *et al.* (2014), Davies *et al.* (2014), Lin *et al.* (2015) centraram-se em descobrir o que ocorre exatamente no resfriamento de células viáveis e como os danos causados podem ser revertidos.

Como a água é o principal componente dos organismos e precisa estar disponível para que haja vida, todo o metabolismo celular paralisa quando a água que forma seu sistema se converte em gelo. As células normalmente resistem à redução de temperatura, todavia não suportam a formação de cristais de gelo intracelular, que podem ocasionar lesão mecânica, e/ou determinar a retirada de água do sistema, levando ao desequilíbrio osmótico com consequente desidratação celular, este ocorre, geralmente, quando células em suspensão são criopreservadas em baixa velocidade e esse quando o método de congelamento ocorre em alta velocidade (WOLFE; BRYANT, 2001).

O congelamento lento é um método de criopreservação caracterizado pelo decaimento programado e gradual da temperatura, pré-determinada por um gráfico de congelamento. O procedimento requer o investimento em um congelador de decaimento progressivo de temperatura e dependendo do gráfico de criopreservação, o ciclo pode ser longo. Por outro lado, o congelamento convencional em freezer mecânico -80°C , é um método de congelamento de velocidade mais rápida, que requer técnica mais simples, o uso de equipamento menos dispendioso, entretanto, não há precisão da taxa de decaimento de temperatura se comparado ao congelamento lento.

Para minimizar os efeitos danosos causados às células durante o congelamento faz-se necessário à utilização de uma substância, que controle a

formação de cristais de gelo e o problema osmótico, chamada agente criopreservante (JANZ, 2010). O agente crioprotetor pode ser adicionado ao meio, para conferir proteção às células durante o processo de congelamento e descongelamento celular e tecidual, sendo imprescindível a sua presença sobre todo o tecido vital, para viabilizar sua ação.

O DMSO (dimetilsulfóxido) é o agente crioprotetor mais utilizado na criopreservação celular, normalmente em concentrações de 5% a 10%. É um composto higroscópico, polar, incolor, inodoro, de baixo peso molecular. Aparentemente, a função desse agente é essencialmente "coligativa", ou seja, de "captura" das moléculas de água livre, o que leva a redução da quantidade de gelo formada, diminuição da temperatura do ponto de congelamento e aumento do ponto de vitrificação. Esta substância penetra em tecidos e células rapidamente, o que constitui uma vantagem apreciável. No entanto, em temperatura ambiente, o DMSO é tóxico (SANTIS; PRATA, 2009).

Associar outra estratégia ao processo de criopreservação com a finalidade de proporcionar maiores taxas de viabilidade após o descongelamento celular e tecidual e que, concomitantemente, possibilitasse a redução da concentração do DMSO no meio de congelamento, é uma questão relevante neste processo.

Com o intuito de otimizar a qualidade de produtos alimentícios congelados, Hirasawa *et al.* (2000) foram pioneiros em associar ondas eletromagnéticas durante o processo de criopreservação. Na indústria alimentícia, outros pesquisadores investigaram a ação de outras modalidades do campo magnético: Owada & Kurita (2001), Owada (2007); Owada & Saito (2010) analisaram o uso de campo magnético estático e oscilatório somado ao campo elétrico; enquanto Ino *et al.* (2005), Sato & Fujita (2008), Mihara *et al.* (2012) avaliaram o campo magnético oscilatório, isoladamente.

Não só a indústria alimentícia como outras áreas tiveram interesse em adotar o campo magnético como estratégia para criopreservação de células, tecidos e órgãos. Na odontologia, associou campo magnético na criopreservação celular de DPSCs (*Dental Pulp Stem Cell*), 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; KAKU *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010). O isolamento celular a partir de tecido criopreservado passou a ganhar a atenção, uma vez que o uso das células e da polpa dentária, nem sempre se faz obrigatório logo

após a exodontia. Além da estocagem permitir redução de custos com o processamento tecidual imediato, assim como a otimização de todo o processo laboratorial.

No ano de 2010, Owada & Saito tornaram público o primeiro estudo no qual se avaliou o efeito do campo magnético em células vivas, durante o processo de criopreservação. A partir desse mesmo ano trabalhos de 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 resultados desses experimentos foram observados uma taxa de proliferação e de viabilidade celular maior do grupo teste quando comparado aos respectivos grupos controle.

O uso do campo magnético como estratégia no processo de criopreservação representou um avanço significativo para a área de tecnologia de congelamento. Por outro lado, ainda não se conhece um modelo que possa explicar como o campo magnético pode afetar o sistema biológico (MENDONÇA *et al.*, 2010).

A maior parte das pesquisas que avaliam a criopreservação associada ao campo magnético com tecido dental adota como amostra DPSCs e utilizam campo magnético de intensidade baixa (0.01mT). Já estudo de Lin *et al.* (2014) apontou aumento na viabilidade celular após descongelamento de DPSCs, quando o processo de congelamento foi associado a intensidades de campo magnético mais elevadas (0.1T,0.4T,0.6T,0.8T).

Fundamentada nas publicações anteriormente citadas e diante de resultados promissores que empregam o campo magnético durante a criopreservação tecidual e celular, este trabalho buscou avaliar o efeito do campo magnético de diferentes intensidades das publicadas durante a criopreservação celular e tecidual.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de campos magnéticos estáticos unidirecionais de diferentes intensidades durante o processo de criopreservação de células da polpa dentária e do tecido pulpar de dentes terceiros molares humanos hígidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliação celular de viabilidade

2.2.1.1 Avaliar se o campo magnético aplicado durante a criopreservação inicial, influencia na taxa de viabilidade celular imediatamente após o descongelamento e após 96h de subcultivo celular;

2.2.1.2 Avaliar se a concentração do agente crioprotetor influencia na viabilidade celular imediatamente pós-descongelamento e após 96h de subcultivo celular;

2.2.1.3. Avaliar se o método de criopreservação inicial (convencional e lento), influencia na viabilidade celular nos grupos sem aplicação de campo magnético estático.

2.2.2 Avaliação tecidual para obtenção de células

2.2.2.1 Avaliar a eficiência de obtenção de células da polpa dentária humana, após criopreservação tecidual associada a campo magnético.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O presente estudo foi submetido e aprovado do CEP/UFJF (Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora) e aprovado em janeiro de 2016 sob o CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 51518015.9.0000.5147 (ANEXO A), juntamente com os seguintes termos: TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) (APÊNDICE A), termo de assentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B) e o TCLE para responsável do menor (APÊNDICE C). Todos os voluntários da pesquisa receberam um TCLE específico conforme sua idade e somente foram integrados ao estudo, após concordância e assinatura do termo.

Foram incluídas nesta pesquisa amostras de dentes terceiros molares humanos hígidos, extraídos com vitalidade pulpar de voluntários com idade até 30 anos. Como critérios de exclusão, pode-se destacar: pacientes sindrômicos; dentes extraídos e armazenados por mais de 48 horas em meio de transporte e dentes seccionados no trans-cirúrgico. Os pacientes foram avaliados em um setor especializado da Faculdade de Odontologia, denominado Triagem e encaminhados para as clínicas de especialidades, onde foram atendidos nas disciplinas clínicas de Cirurgia da FO-UFJF (Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora), na cidade de Juiz de Fora, pelos alunos de graduação e sob supervisão do pesquisador responsável. O paciente com dente vital que concordou com o tratamento de exodontia, foi convidado a participar deste estudo. O estudo se iniciou apenas após autorização, por cada paciente, por assinatura do TCLE específico para cada idade.

3.1.1 Delineamento experimental

A amostragem total foi composta por 39 (trinta e nove) dentes terceiros molares hígidos de pacientes de até 30 (trinta) anos de idade, com vitalidade pulpar e indicação prévia de exodontia, que seriam desprezados após o procedimento cirúrgico. Destes 3 (três) dentes foram direcionados para avaliação celular, e os 36 (trinta e seis) dentes restantes para avaliação tecidual.

As amostras para avaliação celular (n=3) tiveram o tecido pulpar removido da estrutura rígida do dente e posto em cultivo. Após expansão celular, e imediatamente antes do processo de criopreservação foi composto os seguintes grupos: Grupo I: controle/ sem campo magnético, células submetidas à criopreservação inicial em freezer -80°C; Grupo II: controle/ sem campo magnético, células submetidas à criopreservação inicial em congelador de decaimento progressivo de temperatura; Grupo III: células submetidas à criopreservação inicial em congelador de decaimento progressivo de temperatura, associado a campo magnético de 150mT; Grupo IV: células submetidas à criopreservação inicial em congelador de decaimento progressivo de temperatura, associado a campo magnético de 290mT; Grupo V: células submetidas à criopreservação inicial em congelador de decaimento progressivo de temperatura, associado a campo magnético de 360mT. Foram criopreservados três criotubos de cada amostra, por grupo, sendo que cada um com uma concentração diferente do agente criopreservante. A composição dos dois meios de congelamento foi: 0% DMSO (dimetilsulfóxido), 100% SFB (Soro Fetal Bovino); 3% DMSO com 97% SFB e 10% DMSO com 90% SFB. Os grupos foram diferenciados segundo o meio de congelamento, da seguinte forma: GI-II-III-IV-V 0%, GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10% (Figura 1).

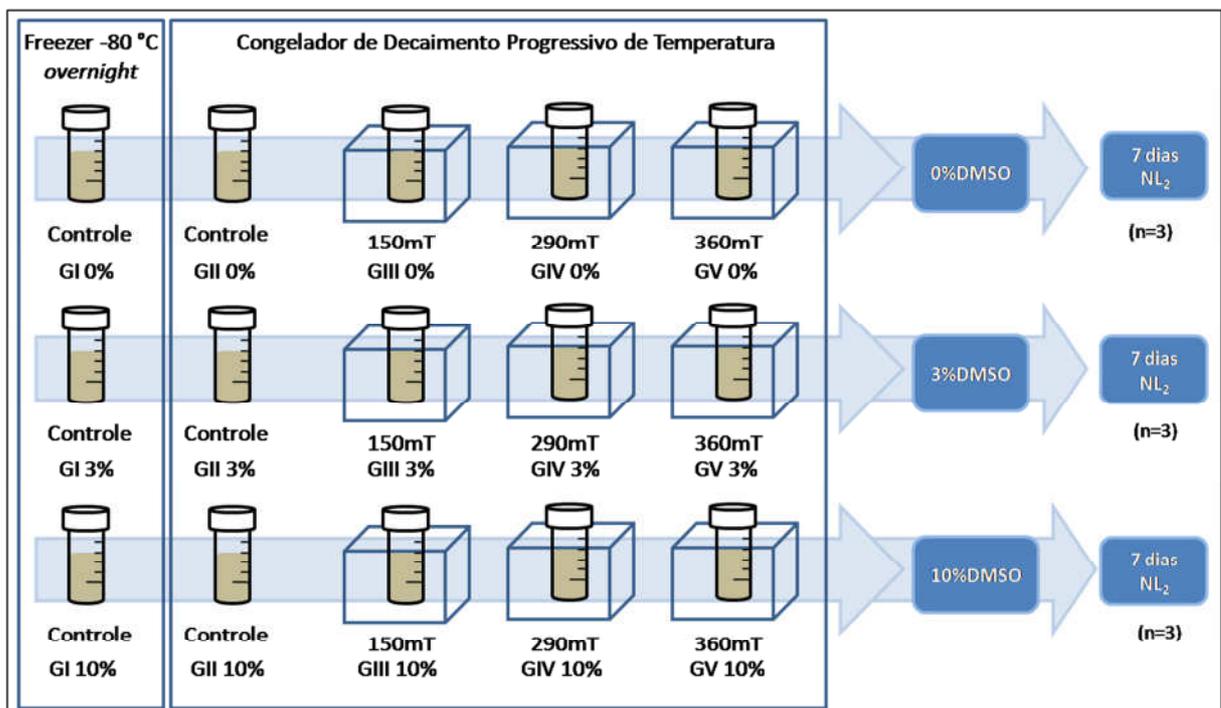


Figura 1- Delineamento experimental da avaliação celular. Fonte: arquivo pessoal.

As amostras para avaliação tecidual (n=36) compuseram os seguintes grupos: Grupo I: polpas submetidas à criopreservação inicial sem campo magnético; Grupo II: polpas submetidas à criopreservação inicial associada a campo magnético de intensidade de 150mT; Grupo III: polpas submetidas à criopreservação inicial associada a campo magnético de intensidade de 290mT; Grupo IV: polpas submetidas à criopreservação inicial associada a campo magnético de intensidade de 360mT. As amostras de todos os grupos foram criopreservadas em aproximadamente 1mL de meio de congelamento composto por 10% DMSO e 90% SFB. A criopreservação inicial foi conduzida em freezer -80°C *overnight*, para todos os grupos testados (Figura 2).

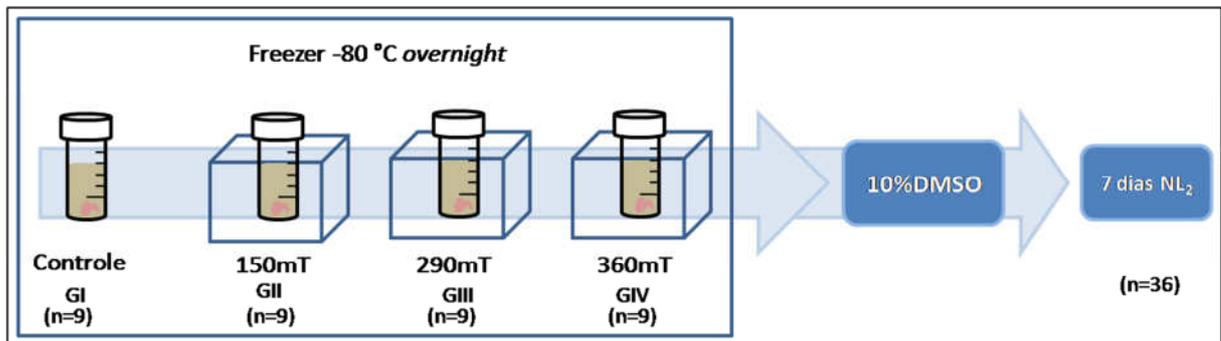


Figura 2 - Delineamento experimental da avaliação celular. Fonte: arquivo pessoal.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do tecido pulpar

As cirurgias para a obtenção dos dentes e seu processamento inicial (acondicionamento dos dentes em meio de transporte apropriado após a exodontia) foram realizadas na clínica da disciplina Cirurgia III do Departamento de Clínicas Odontológicas da FO-UFJF. Os atendimentos e os procedimentos de exodontia foram padronizados, segundo os protocolos de atendimento e de biossegurança da Instituição e obedeceram a mesma seqüência operatória. Faz-se importante citar que as intervenções cirúrgicas obedeceram as rigorosas técnicas assépticas (uso de campo cirúrgico estéril, anti-sepsia extra-oral com solução de CHX (digluconato de clorexidina) 0,12% (Manipulado em Farmácia de Manipulação Cavaliere, Juiz de Fora, Brasil), anti-sepsia intra-oral com bochecho de solução de CHX 0,12% por um minuto, uso de luvas cirúrgicas estéreis, instrumental estéril).

Imediatamente após a exodontia, cada dente foi condicionado em um tubo tipo Falcon de 50mL (KASVI, Curitiba, Brasil), individualmente, contendo 5mL de meio de transporte, composto por 3% de Penicilina 10000UI/mL/Estreptomicina 10000µg/mL (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil) 2% de Anfotericina B 100x (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), 10mg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) e 95% de PBS (Phosphate-Buffered-Salin) (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) (Figura 3A). 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.

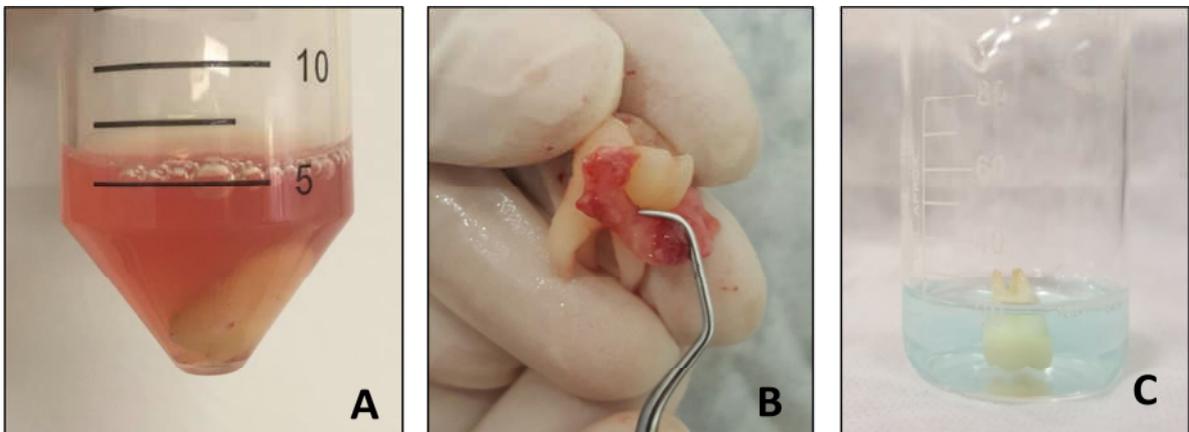


Figura 3 - Processamento inicial das amostras. (A) condicionamento do dente em tubo Falcon em meio de transporte. (B) limpeza da superfície externa das amostras com curetas periodontais. (C) anti-sepsia das amostras através submersão parcial em digluconato de clorexidina 0,12%. Fonte: arquivo pessoal.

O isopor foi conduzido ao Laboratório Biobanco Polpa Dental situado na FO-UFJF, onde foi realizado o processamento *in vitro* das células mesenquimais indiferenciadas da polpa. Cada dente foi retirado do tubo tipo Falcon e teve sua superfície externa raspada com curetas periodontais (Golgran, São Caetano do Sul, Brasil) estéreis (Figura 3B). Os dentes que apresentaram processo de rizogênese incompleta tiveram a papila apical removida por curetas periodontais estéreis. Em seguida, os dentes foram submetidos a imersão parcial (porções coronária e $\frac{2}{3}$ radiculares) em solução de CHX 0,12% por um minuto de modo a evitar o contato da solução anti-séptica com a porção apical da raiz (Figura 3C). Com o uso de motor de suspensão (Beltec Indústria e Comércio de Equipamentos Odontológicos, Araraquara, Brasil) e disco de carborundum (Dentorium Products Co. Inc., Nova York, Estados Unidos), foi realizado um sulco de aproximadamente 1,5mm de

profundidade em toda extensão da junção amelo-cementária (colo do dente) sob irrigação de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril (I. P. Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, Brasil) acoplado ao infusor pressurizado (Smiths Medical do Brasil Produtos Hospitalares, São Paulo, Brasil) e sistema de irrigação externa (Dentoflex, São Paulo, Brasil) (Figura 4A). Este procedimento foi desenvolvido no interior de uma estrutura de aço inoxidável estéril, envolto por plástico filme transparente (Térmica Embalagens Plásticas, Juiz de Fora, Brasil). A fratura completa do dente foi realizada através de aplicação de força com auxílio de fórceps odontológico (Instrumentos Cirúrgicos Esmeralda, Cajamar, Brasil) estéril (Figura 4B).

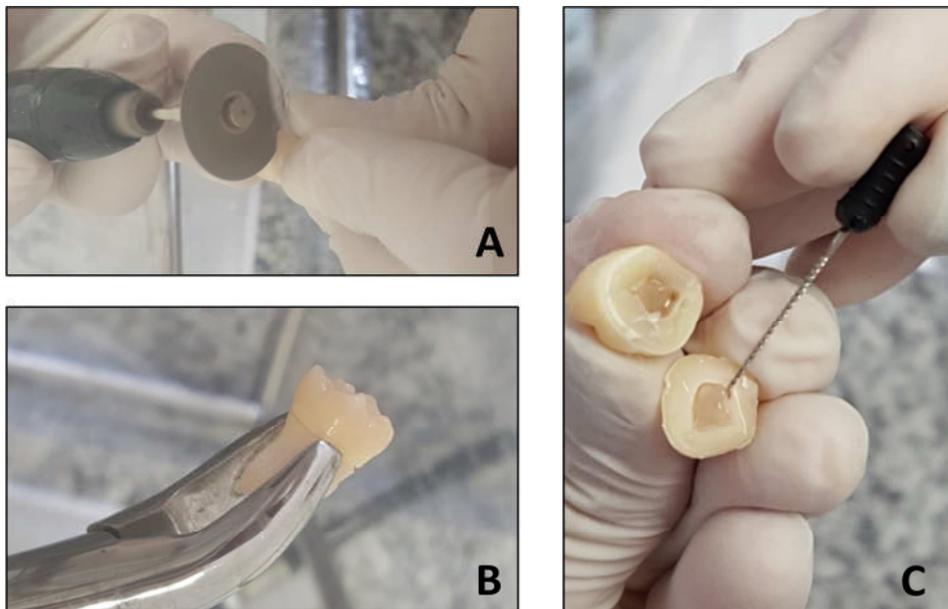


Figura 4 - Obtenção do tecido pulpar. (A) Confecção de sulco com disco de corte sob irrigação. (B) Fratura do dente com auxílio de fórceps odontológico estéril. (C) Remoção do tecido pulpar com lima endodôntica. Fonte: arquivo pessoal.

Desta forma, a polpa foi exposta e removida com auxílio de limas endodônticas manuais (Dentsply, Catanduva, Brasil) e ou escavadores de dentina (Golgran, São Caetano do Sul, Brasil) estéreis (Figura 4C) e colocadas em um tubo tipo Falcon de 15mL (JetBiofil, Guangzhou, China) contendo 2mL de solução de manutenção (3% de penicilina e estreptomicina e 97% de PBS (1x)) e levado ao fluxo laminar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos). As polpas dentárias foram submetidas a três processos de lavagem em centrífuga (DJB Labcare LTD., Buckinghamshire, Inglaterra), a 210G por 2min. As duas primeiras lavagens foram realizadas em solução de manutenção, sendo que a cada lavagem

as soluções foram renovadas, objetivando eliminar possíveis contaminações. E uma última lavagem em solução tamponada de 100% de PBS.

3.2.2 Criopreservação

A criopreservação inicial para a avaliação celular, foi realizada com as três linhagens expandidas, na 4^o passagem. Foram criopreservadas 5×10^5 células/criotubo. O processo de criopreservação inicial para os grupos GII-III-IV-V 0%, GII-III-IV-V 3% e GII-III-IV-V 10% foi executado em congelador de decaimento progressivo de temperatura (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos), segundo a seqüência: iniciou na temperatura de 10°C e decaiu até 0°C (1°C/min), e foi mantida a 0°C por 10 minutos. Logo após, a temperatura decaiu de 0°C até -30°C (1°C/min), seguido de novo decaimento até -60°C (3°C/min) (Figura 5A). O uso desse congelador foi possível através da colaboração do IMUNOCET (Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada). Durante este processo inicial de criopreservação, os grupos que apresentam em sua descrição associação de campo magnético, tiveram os criotubos inseridos em estruturas de ímãs de neodímio com as intensidades de campo magnéticos determinados por cada grupo (Figura 5B). Enquanto que os grupos GI 0%, GI 3% e GI 10%, os criotubos foram colocados no freezer -80°C *overnight*, para a criopreservação inicial. Após a conclusão desta fase inicial de criopreservação, amostras de todos os grupos foram submetidas aos mesmos passos. Os criotubos de todos os grupos, foram então, transferidos e mantidos em botijão de nitrogênio líquido (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) por 7 (sete) dias, localizados no Laboratório Biobanco Polpa Dental da FO-UFJF. O descongelamento foi realizado através de contato imediato dos criotubos em banho-maria (Solab Científica, Piracicaba, Brasil) a 37°C por 1min e postos em subcultivo por 96h.

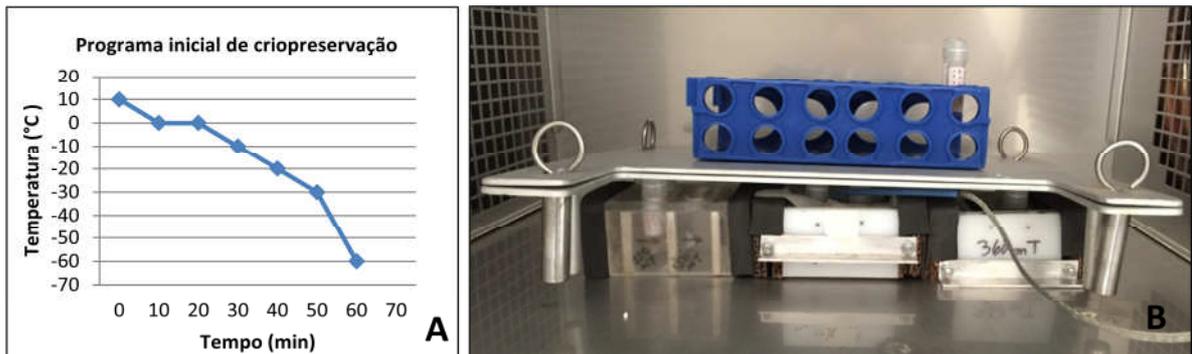


Figura 5 - Criopreservação inicial para avaliação celular. (A) Gráfico do programa de decaimento de temperatura controlada realizado na criopreservação inicial para avaliação celular. (B) Distribuição das amostras no congelador durante o ciclo de criopreservação inicial. Fonte: arquivo pessoal.

Enquanto que a criopreservação para avaliação tecidual, as polpas dentárias dos quatro grupos, em meio de transporte pulpar (Figura 6A), foram levadas ao fluxo laminar e dispensadas, individualmente, em criotubos de capacidade de 2mL (KASVI, Canadá), contendo aproximadamente 1mL de meio de congelamento (Figura 6B).

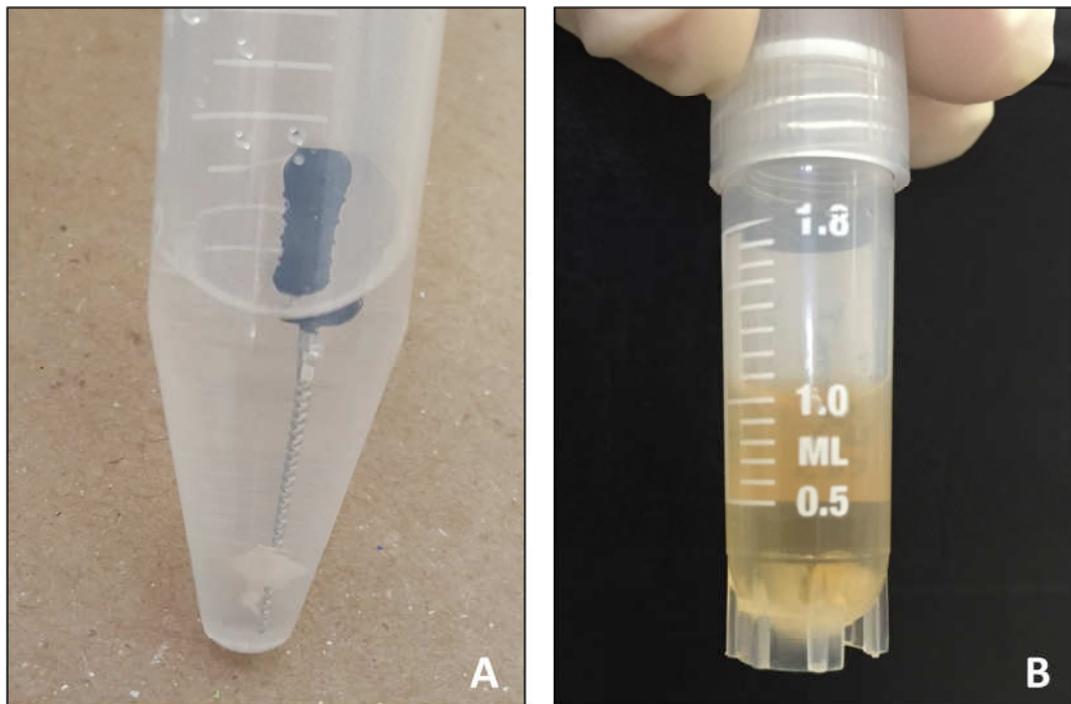


Figura 6 - Processamento do tecido pulpar. (A) Tecido pulpar em meio de transporte pulpar. (B) Tecido pulpar em meio de congelamento acondicionado em criotubo. Fonte: arquivo pessoal.

Foi adotado como meio de congelamento, solução de 10% DMSO (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) e 90% de SFB (LCG biotecnologia,

Cotia, Brasil). O processo de criopreservação inicial foi realizado por um período *overnight* em freezer -80°C foi desenvolvido no laboratório de mestrado em Clínica Odontológica da FO-UFJF. Os criotubos foram inseridos nas estruturas de ímãs de neodímio (Figura 7A), previamente ao início do ciclo de congelamento, conforme o grupo experimental que constituíram. Uma vez os criotubos posicionados nas estruturas de ímã (Figura 7B), o conjunto criotubo/estrutura (Grupos II, III, IV) ou somente criotubo (Grupo I) foram ainda, inseridos em caixas de isopor preenchidas por gaze (Dental Cremer Produtos Odontológicos S/A, Blumenau, Brasil) (Figura 7C), durante este processo. Em um mesmo ciclo de congelamento, amostras pertencentes aos 4 grupos estavam presentes no congelador (Figura 7D).

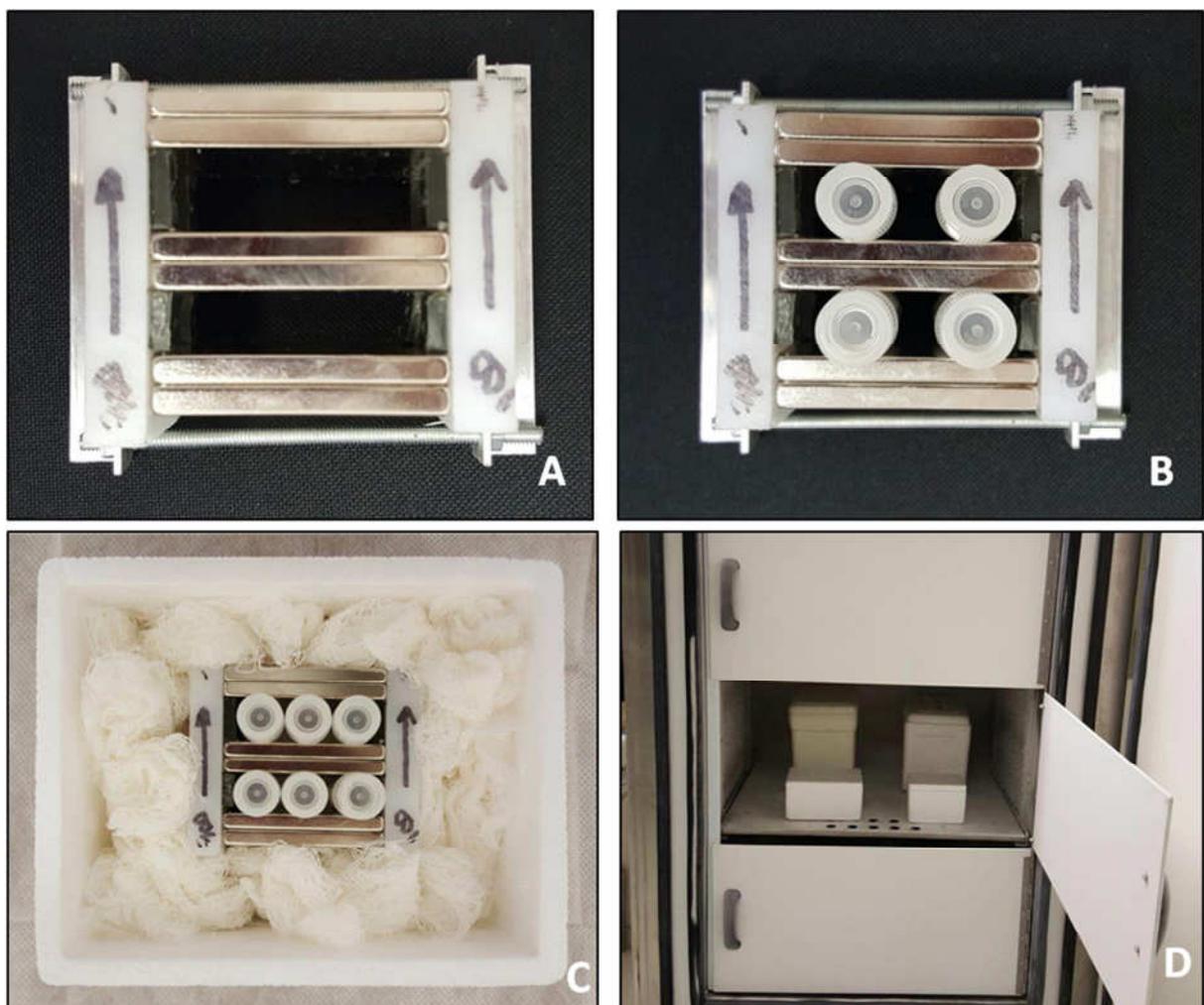


Figura 7 - Criopreservação inicial para avaliação tecidual. (A) Estrutura de ímã de neodímio confeccionada para o desenvolvimento deste estudo. (B) Criotubos inseridos na estrutura de ímã de neodímio. (C) Conjunto estrutura de ímã/criotubos em caixa de isopor e gaze. (D) Distribuição das caixas de isopor, contendo as amostras de cada grupo, no freezer -80°C , durante o ciclo de criopreservação inicial. Fonte: arquivo pessoal.

Após a conclusão da criopreservação inicial, apenas os criotubos, foram transferidos e mantidos em botijão de nitrogênio líquido (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) por 7 (sete) dias, localizados no Laboratório do Banco de Dentes Humanos da FO-UFJF. O cultivo e os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório do Banco de Dentes Humanos da FO-UFJF. Após o período de 7 (sete) dias de criopreservação em nitrogênio, as polpas dentárias foram descongeladas. O descongelamento foi realizado através de contato imediato dos criotubos em banho-maria (Solab Científica, Piracicaba, Brasil) a 37°C por 1min. Os criotubos foram levados ao fluxo laminar. Em seguida, cada polpa dentária foi colocado em tubos tipo Falcon de 15mL, juntamente com 3mL de meio de cultivo, composto por meio α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle Alfa modification) (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado por 15% de SFB, 1% de Penicilina 10000UI/mL /Estreptomicina 10000 μ g/mL (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil), 1% de L-Glutamina 200mM (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) e 1% NEAS (Nonessential amino acid solution) (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), para remoção, por diluição, do agente crioprotetor. Os tubos com as amostras foram centrifugados a 210g por 5min.

3.2.3 Cultivo celular

O isolamento de células da polpa dentária, foi realizado para a avaliação celular, logo após processo de extração do tecido pulpar do dente e para a avaliação tecidual após descongelamento pulpar. As polpas foram submetidas à fragmentação mecânica através de lâminas de bisturi descartáveis (Med Goldman Indústria e comércio LTDA., São José, Brasil), no fluxo laminar.

Após o processo de fragmentação, as polpas foram colocadas em cultivo (cultura primária) em placas de cultivo tratadas de 6 poços (KASVI, China), sendo uma em cada poço, em meio α -MEM (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado por 15% de SFB, 1% de Penicilina 10000UI/mL/Estreptomicina 10000 μ g/mL (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil), 1% de L-Glutamina 200mM (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) e 1% NEAS (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) (meio de cultivo padrão adotado neste trabalho), mantidas 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. E os poços foram

observados em microscópio invertido (Nikon Instruments Inc., Melville, Estados Unidos) diariamente, por 15 (quinze) dias. As amostras que não apresentaram células ou que esse número não tenha sido em quantidade suficiente para estabelecer linhagem ou que contaminaram foram descartadas. É importante salientar que as amostras que foram descartadas, nas condições anteriormente citadas, não deixaram de fazer parte do “n” amostral pré-estabelecido.

Para o subcultivo, o meio de cultivo padrão, foi removido e colocado em um tubo tipo Falcon de 15mL e reservado. Para os cultivos subsequentes foram utilizadas garrafas de cultivo celular tratadas de 25cm² (KASVI, China) ou 75cm² (KASVI, China), conforme o aumento do número de célula por área de cultivo. As células foram lavadas de 5 a 10mL de PBS (1x), conforme a garrafa de cultivo utilizada, por duas vezes, seguido por descarte do mesmo. Foi acrescentado nas garrafas de cultivo celular tratadas de 500µL a 800µL 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 (Nikon, Melville, USA). No fluxo laminar foi adicionado às garrafas o meio de cultivo reservado no tubo tipo Falcon, a fim de que o SFB presente no meio neutralize a Tripsina-EDTA. Em um novo tubo tipo Falcon de 15mL, foi colocado todo o conteúdo da garrafa de cultivo e centrifugado a 210g por 5min. Foi observada ao final do processo de centrifugação, a formação de *pellet* de células no fundo do tubo. O tubo foi levado para o fluxo laminar e descartado todo o sobrenadante, apenas o *pellet* de células foi mantido no tubo. As células foram ressuspensas em 1mL de meio de cultivo padrão e plaqueadas em novas garrafas de cultivo. Para a avaliação celular, as células foram expandidas até atingirem quantidade (1.5x10⁶células/T75) suficiente para o experimento de criopreservação e após o descongelamento postas em subcultivo por 96h. Enquanto que para a avaliação tecidual, as células foram isoladas e expandidas até o estabelecido da linhagem, e em seguida, armazenadas em nitrogênio líquido.

3.2.4 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade foi determinada pelo teste do corante azul de trypan e Câmara de Neubauer (Grid Optik, Curitiba, Brasil). O ensaio foi conduzido, apenas para a avaliação celular, antes do processo de criopreservação, imediatamente após o

descongelamento celular e com 96h de subcultivo, após processo de descongelamento.

As células foram coradas por 0,4% trypan blue (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canadá). Após período de 5min, conforme instruções do fabricante, e o número de células viáveis e inviáveis foram contadas em Câmara de Neubauer (Grid Optik). As taxas de viabilidade celular foram calculadas, em duplicata, para cada período citado anteriormente.

3.2.5 Análise Estatística

A viabilidade celular foi analisada usando one-way ANOVA com o teste Duncan post hoc para testar as diferenças entre os grupos controle e experimentais. Para todas as comparações, foram utilizados para indicar significância estatística $p < 0,05$.

4 ARTIGO

EFEITOS DO CAMPO MAGNÉTICO DURANTE CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS DA POLPA DENTÁRIA E DO TECIDO PULPAR.

Resumo

O armazenamento celular e tecidual para uso em terapia regenerativa e desenvolvimento de pesquisas, torna-se uma questão importante à medida que a expectativa de vida aumenta. Este trabalho se propôs avaliar os efeitos de campos magnéticos estáticos unidirecionais durante o processo de criopreservação inicial de células e de tecido pulpar de dentes terceiros molares humanos hígidos. Foram obtidas polpas dentárias (n=39) de terceiros molares extraídos, que foram divididas para avaliação celular (n=3) de viabilidade e avaliação tecidual (n=36) para obtenção de células do tecido pulpar. Para avaliação celular, células isoladas e expandidas, compuseram os grupos: Grupo I: controle, células submetidas à criopreservação inicial por método convencional; Grupo II: controle, células submetidas à criopreservação inicial lenta; Grupo III: células submetidas à criopreservação inicial lenta, associado a 150mT; Grupo IV: células submetidas à criopreservação inicial lenta, associado a 290mT; Grupo V: células submetidas à criopreservação inicial lenta, associado a 360mT. Durante a criopreservação as células foram suspensas em meios de congelamento contendo 0, 3 e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido): GI-II-III-IV-V 0%, GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10%. Para avaliação tecidual as amostras criopreservadas inicialmente em método convencional, formaram os grupos: Grupo I: polpas submetidas à criopreservação inicial sem campo magnético (GI); Grupo II: polpas submetidas à criopreservação inicial associada a 150mT (GII); Grupo III: polpas submetidas à criopreservação inicial associada a 290mT (GIII); Grupo IV: polpas submetidas à criopreservação inicial associada a 360mT (GIV). Amostras das avaliações celular e tecidual, após criopreservação inicial, foram armazenadas em nitrogênio líquido por 7 dias. Após o processo de descongelamento a viabilidade celular foi mensurada por trypan blue e a eficiência de obtenção de células a partir da polpa criopreservada, por observação microscópica diária. Os resultados foram semelhantes para as taxas de viabilidade imediatamente após descongelamento celular para GI-II-III-IV-V 0%, GI-II-III-IV-V 3%

e GI-II-III-IV-V 10% ($p>0.05$). Enquanto a viabilidade após 96h de subcultivo celular, os valores de GI-II-III-IV-V 0% foram inferiores aos de GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10% ($p<0.05$). As células de polpa dentária expostas ao campo magnético durante a criopreservação tiveram um efeito positivo nas taxas de viabilidade após 96h de subcultivo, quando o meio de congelamento foi de 0% DMSO ($p<0.05$). Foi possível obter células da polpa dos quatro grupos da avaliação tecidual, sendo que o GIV apresentou maior taxa de eficiência. Pode-se concluir que a intensidade do campo magnético e a concentração de DMSO testados não influenciaram na taxa de viabilidade mensurada por trypan blue, imediatamente após o descongelamento. Entretanto, promoveu diferença estatística nos valores de GI-II-III-IV-V 0% após 96h de subcultivo celular. A intensidade do campo magnético foi diretamente proporcional à eficiência de obtenção de células a partir de polpa criopreservada.

Palavras-chave: criopreservação, campo magnético, polpa dentária.

Introdução

O armazenamento da polpa dentária para posterior isolamento de celular passou a ganhar a atenção, uma vez que o uso da polpa dentária, nem sempre se faz obrigatório logo após a exodontia. Além disso, a estocagem permite a redução de custos com o processamento tecidual imediato, assim como a otimização de todo o processo. O armazenamento tanto de tecido como de células já isoladas passa a ganhar maior visibilidade com o surgimento dos biobancos, que amplia as possibilidades de desenvolvimento de pesquisas com grande número de amostras, proporcionando avanços na área terapêutica.

Nessa direção, a necessidade de manter as células vivas por um longo período sem a perda de suas funções levou ao desenvolvimento de técnicas de criopreservação, que têm como objetivo cessar reversivelmente, de forma controlada, todas as funções biológicas dos tecidos vivos em uma temperatura ultra baixa, geralmente por volta de -196°C ^{1,2}.

Com o intuito de otimizar a qualidade de produtos alimentícios congelados, iniciou³ a avaliação da associação de ondas eletromagnéticas durante o processo de criopreservação. Não só a indústria alimentícia como outras áreas tiveram interesse

em adotar o campo magnético como estratégia para criopreservação de células, tecidos e órgãos.

Pesquisas^{4,5} que avaliam a criopreservação associada a campo magnético com tecido dental utilizam campo magnético de intensidade baixa (0.01mT), com bons resultados. Da mesma forma, a investigação da associação de campo magnético de intensidades mais elevadas (0.1T,0.4T,0.6T,0.8T)⁶ apontou resultados promissores na viabilidade celular após descongelamento de DPSCs.

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de campos magnéticos estáticos unidirecionais de diferentes intensidades (150mT, 290mT e 360mT) durante o processo de criopreservação celular e tecidual de dentes terceiros molares humanos hígidos.

Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora (Juiz de Fora, Brasil), e o consentimento foi assinado antes do procedimento de exodontia. Terceiros molares hígidos de humanos foram coletados de pacientes jovens com idade até 30 anos, extraídos por alunos do curso de graduação em Odontologia na disciplina de Cirurgia III da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para obtenção do tecido pulpar, a superfície externa do dente passou por desinfecção e desgaste com disco de corte em baixa rotação (Dentorium Products Co. Inc., New York, Estados Unidos) sob refrigeração por sistema externo de irrigação (Dentoflex, São Paulo, Brasil), em caixa inoxidável. O tecido pulpar de 39 dentes foram divididos para avaliação celular (n=3) e para avaliação tecidual (n=36). A avaliação celular se deu após isolamento e expansão de células da polpa, e formaram os seguintes grupos: GI controle/sem campo magnético células criopreservadas inicialmente em freezer -80°C (Cold Lab equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, Brasil) *overnight* (método convencional); GII controle/sem campo magnético, células criopreservadas inicialmente em congelador de decaimento progressivo de temperatura (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) (congelamento lento); GIII células criopreservadas inicialmente por congelamento lento associado à 150mT de campo magnético; GIV células criopreservadas inicialmente por

congelamento lento associado à 290mT de campo magnético; GV células criopreservadas inicialmente por congelamento lento associado à 360mT de campo magnético. Na avaliação celular, foram investigados ainda, 3 concentrações diferentes do agente crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, USA): 0%DMSO com 100% Soro Fetal Bovino (SFB), 3%DMSO com 97% SFB e 10%DMSO com 90%SFB. Os grupos foram diferenciados segundo a concentração de DMSO em: GI-II-III-IV-V 0%, GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10%. Para a avaliação tecidual, as polpas dentárias compuseram os grupos: GI controle/sem campo magnético, criopreservação inicial por método convencional; GII criopreservação inicial pelo método convencional, associada à 150mT; GIII criopreservação inicial método convencional, associada à 290mT e GIV criopreservação inicial método convencional, associada à 360mT.

Isolamento e Cultivo Celular

As polpas destinadas à avaliação celular foram cultivadas imediatamente, enquanto que as polpas destinadas à avaliação tecidual foram cultivadas após descongelamento. Para o isolamento celular, foi realizado método explante, no qual as polpas sofreram fragmentação por lâmina de bisturi (MedGoldman Indústria e Comércio LTDA, São José, Brasil). Em seguida, o tecido pulpar fragmentada foi cultivado em placas de 6 poços (Kasvi, Vancouver, Canadá) com α -MEM (LCG Biotecnologia), 15% SFB (LCG Biotecnologia), 100 UI/ml penicilina e 100 mg/ml estreptomicina (LCG Biotecnologia), 2mM L-glutamina (Sigma Aldrich), 1% non-essential amino acid (NEAS) (Sigma Aldrich) mantidas a 37°C em incubadora (Thermo Fisher Scientific) de 5% de CO₂ umidificada. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias e os poços foram observados em microscópio (Nikon Instruments Inc., Melville, Estados Unidos) diariamente, por 15 dias. Quando a cultura alcançava confluência de 80%, as células eram removidas por 0.25% Trypsin/EDTA (Sigma Aldrich) e subcultivadas para os experimentos posteriores.

Criopreservação

O processo de criopreservação ocorreu imediatamente após obtenção da polpa das amostras direcionadas à avaliação tecidual enquanto que para a avaliação

celular, somente na 4ª passagem. O processo de criopreservação inicial para os grupos GII-III-IV-V 0%, GII-III-IV-V 3% e GII-III-IV-V 10% foi executado em congelador de decaimento progressivo de temperatura (Thermo Fisher Scientific), segundo a seqüência: iniciou na temperatura de 10°C e decaiu até 0°C (1°C/min), e foi mantida a 0°C por 10 minutos. Logo após, a temperatura decaiu de 0°C até -30°C (1°C/min), seguido de novo decaimento até -60°C (3°C/min)⁶Fig. (1). Enquanto que os grupos GI 0%, GI 3% e GI 10%, os criotubos foram colocados no freezer -80°C *overnight* (método convencional) para criopreservação inicial. Para os grupos (GI, GII, GIII e GIV) da avaliação tecidual, a criopreservação inicial foi em método convencional com meio criopreservante composto de 10%DMSO e 90%SFB.

Após esse processo inicial as amostras de todas as avaliações foram mantidas em nitrogênio líquido por 7 dias⁷. Decorrido esse período, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por um minuto.

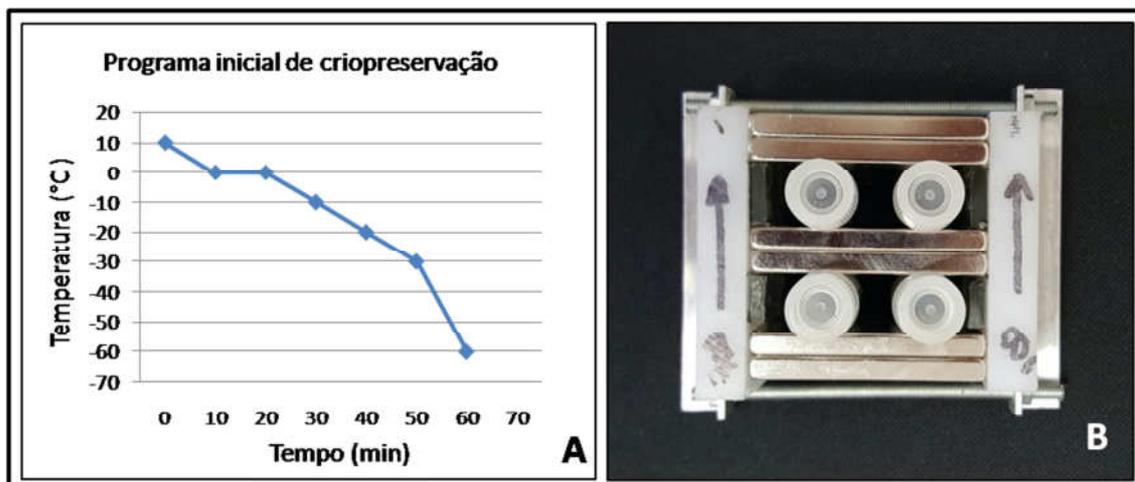


Figura 1. Criopreservação inicial. (A) Programa inicial de criopreservação para avaliação celular. (B) Estrutura de ímã de neodímio com criotubo, desenvolvida para as avaliações celular e tecidual deste estudo.

Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade foi determinada pelo teste do corante azul de trypan. As células foram coradas por 0,4% azul de trypan (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canadá), após período de 5min, conforme instruções do fabricante, e o número de células viáveis e inviáveis foram contadas em Câmara de Neubauer (Grid Optik, Curitiba, Brasil). O ensaio foi conduzido, apenas para a avaliação celular, antes do

processo de criopreservação, imediatamente após o descongelamento celular e com 96h de subcultivo.

Análise Estatística

A viabilidade celular foi analisada usando one-way ANOVA com o teste Duncan post hoc para testar as diferenças entre os grupos controle e experimentais. Para todas as comparações, foram utilizados para indicar significância estatística $p < 0,05$.

Resultados

Avaliação celular

A taxa de viabilidade imediatamente após descongelamento celular foi similar entre os grupos controles e experimentais nas concentrações de 0, 3 e 10% de DMSO ($p > 0,05$) Fig. (2). Considerando a média de todos os grupos, a taxa de viabilidade imediatamente após descongelamento foi de 79,8%.

A comparação entre a taxa de viabilidade imediatamente após descongelamento com a taxa de viabilidade após 96h de subcultivo, nos grupos criopreservados nas concentrações de 3 e 10% de DMSO, sugere um aumento de viabilidade após cultivo celular. Por outro lado, a observação entre as mesmas taxas para os grupos criopreservados sem DMSO, sugerem decréscimo na viabilidade após cultivo celular.

Após 96h de subcultivo, a taxa de viabilidade foi maior para os grupos expostos ao meio de congelamento com 3 e 10% de DMSO, quando contrastados com os grupos com 0% de DMSO ($p < 0,05$) Fig. (3). A média dessa taxa entre os grupos nas concentrações de DMSO de 3%, 10% e 0%, foi de 92,33%, 88,76% e 32,75%, respectivamente. As células da polpa dentária expostas ao campo magnético durante o processo de criopreservação inicial apresentaram viabilidade superior aos grupos controles, após 96h de subcultivo, na ausência de DMSO ($p < 0,05$). A média entre os grupos controle foi de 7,78%, enquanto que para os grupos experimentais de 49,4%.

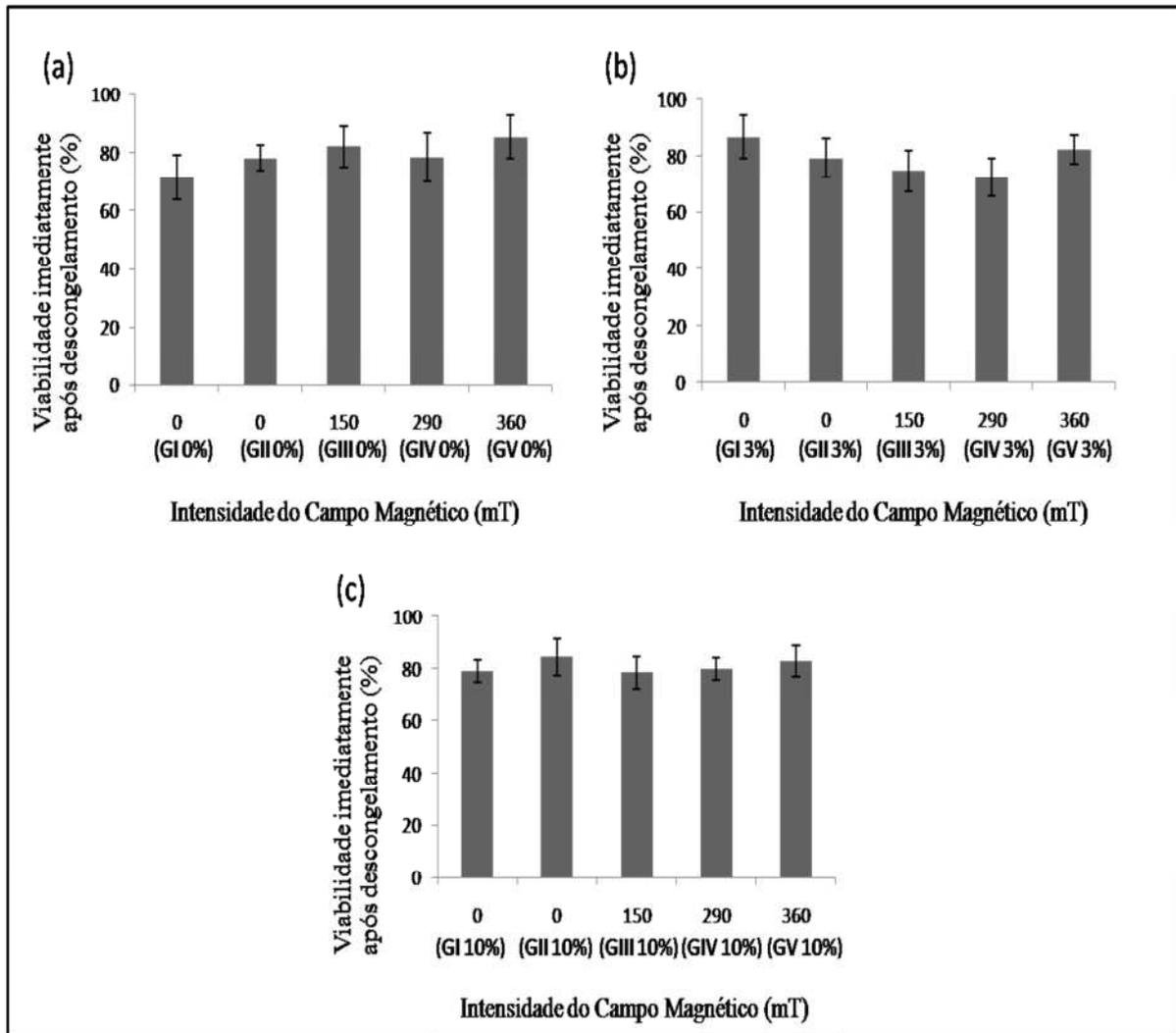


Figura 2. Taxa de viabilidade imediatamente após descongelamento pela intensidade do campo magnético. (a), (b) e (c) são os resultados para os meios de congelamento com 0, 3 e 10% DMSO, respectivamente ($n=3$, $p>0.05$).

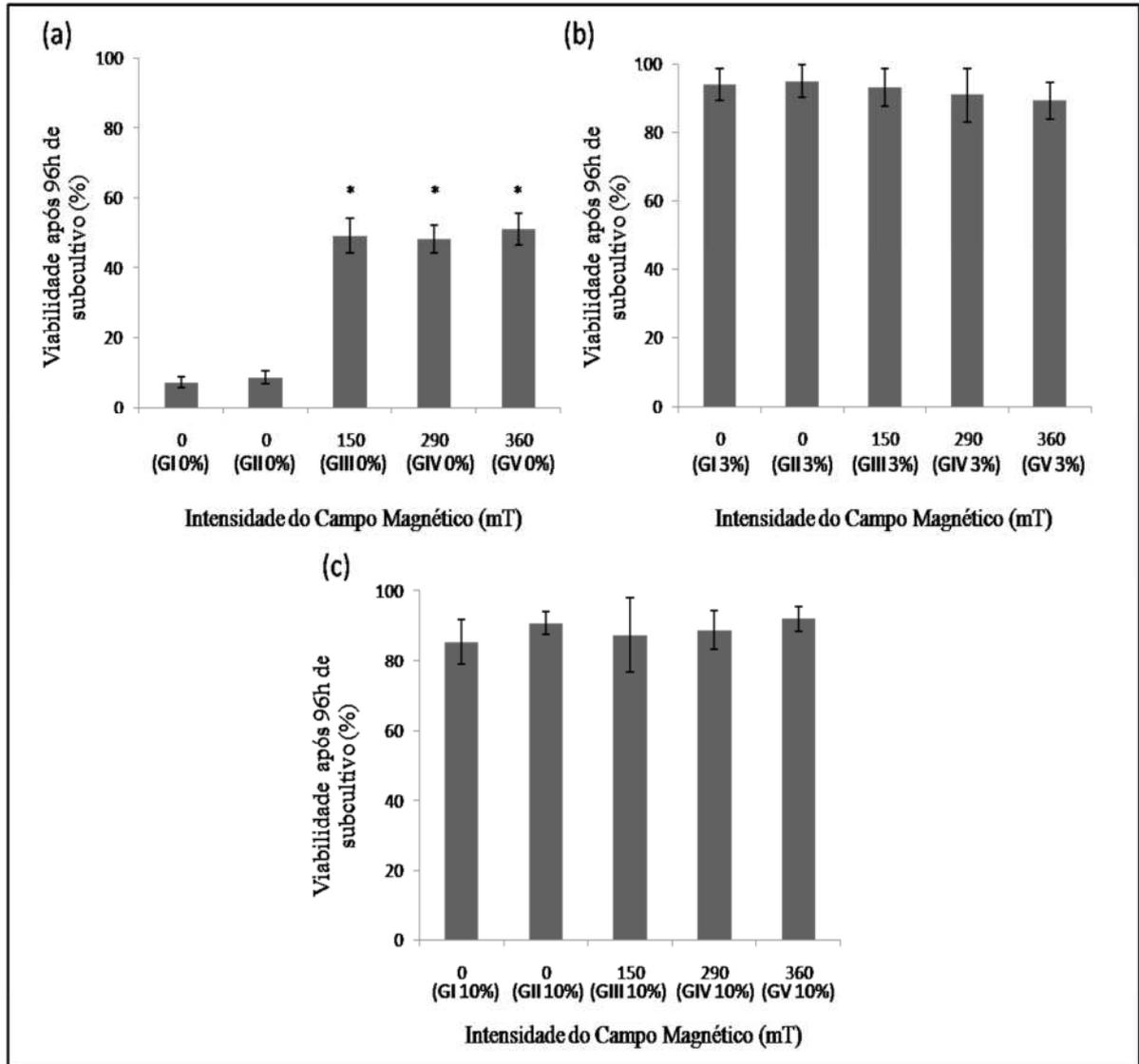


Figura 3. Taxa de viabilidade após 96h de subcultivo pela intensidade do campo magnético. (a), (b) e (c) são os resultados para os meios de congelamento com 0, 3 e 10% DMSO, respectivamente (n=3, * $p < 0.05$).

Avaliação tecidual

Foi possível isolar células da polpa dentária em todos os grupos testados. A taxa de eficiência de obtenção de células da polpa dentária a partir do tecido criopreservado revelou os seguintes percentuais: 77,77% para GI; 55,55% para GII; 77,77% para GIII e 88,88% para GIV Tab. (1).

Grupos	Média de idade	Sexo	Taxa de obtenção de células da polpa
GI (n=9)	20,77 anos	F=67% M=33%	77,77%
GII (n=9)	21,66 anos	F=67% M=33%	55,55%
GIII (n=9)	20,77 anos	F=67% M=33%	77,77%
GIV (n=9)	19,88 anos	F=67% M=33%	88,88%

Tabela 1. Perfil dos doadores dos grupos para a avaliação tecidual e taxa de obtenção de células a partir de polpa dentária criopreservada (F: feminino; M: masculino).

Discussão

O aprimoramento de técnicas e protocolos direcionados à criopreservação celular e tecidual passa a ganhar ainda mais evidência com terapias regenerativas baseada em células-tronco e com o surgimento dos biobancos. Os biobancos ampliaram as possibilidades de desenvolvimento de pesquisas regionais e multicêntricas, a partir de um número de amostras representativo, organizadas e armazenadas criteriosamente, de forma a manter uma alta taxa de viabilidade celular do material biológico humano destinado para esse fim⁸. Nesse sentido, o presente estudo buscou verificar se a associação de campo magnético estático unidirecional no processo de criopreservação celular e tecidual, poderia influenciar, respectivamente, na viabilidade e na obtenção de células da polpa dentária, após o descongelamento.

Owada & Saito, (2010)⁹ foram pioneiros em patentear um sistema de criopreservação com campo magnético oscilatório direcionado para tecido e células vivas, assim como para alimentos e medicamentos, com grande diversidade amostral. Todavia, o delineamento amostral da presente pesquisa teve como propósito estabelecer uma padronização bem limitada com relação ao gênero e idade do paciente, grupo e tipo de dente.

A coleta das amostras para a avaliação tecidual, foi realizada de forma randômica entre os pacientes de forma a manter os mesmos percentuais de gênero

feminino (67%) e masculino (33%) em todos os grupos testados, como nos estudos de Lee *et al.* (2010)⁵ e de Lee *et al.* (2012)¹⁰ afim de evitar interferência hormonal nos resultados, provenientes da desproporção entre os gêneros.

A seleção da faixa etária dos participantes da amostra foi baseada em evidências de estudos de vários autores^{5,6,10-12}. Os achados de Wu *et al.* (2015)¹³, mostraram que o tecido pulpar de dentes de pacientes jovens devem ser os eleitos para este tipo de pesquisa, por apresentarem o metabolismo mais alto, com tecido pulpar extenso, câmara pulpar ampla, pouca formação de dentina secundária e dentina terciária. Estudo de Gómez (2017)¹⁴ corrobora com esses resultados, ao apontar que DPSCs de dentes molares de pacientes na faixa etária de 18 a 33 anos de idade apresentam maior capacidade de proliferação celular em detrimento aos de idade mais avançada, além de destacar a facilidade de obtenção de amostras nesses pacientes. Outras pesquisas avaliaram a influência do campo magnético no processo de criopreservação também adotam amostras nessa faixa de idade^{5,6,10-12}.

Assim, no presente estudo foram eleitas amostras de dentes terceiros molares hígidos de pacientes até 30 anos de idade, com delineamento similar ao estudo de Lee *et al.* (2010)⁵. Essa seleção se justifica também, pelo alto índice de indicação de extração de dentes terceiros molares hígidos por razões ortodônticas como falta de espaço e ou mal posicionamento dos mesmos. Indicações estas, que em sua maioria, não estão associadas à doença ou agressão externa, o que facilita a obtenção de dentes hígidos. Além disto, esses dentes são os últimos a se formarem na cavidade bucal¹⁵ e supostamente dispõem de nichos de células-tronco que foram pouco estimulados.

Pesquisas^{4,5,10,11} relacionadas com nosso propósito, apontam que o uso do campo magnético no processo de criopreservação não foi capaz de alterar a morfologia, expressão de marcadores de superfície, plasticidade das células avaliadas, como também promoveu um acréscimo na taxa de sobrevivência de células criopreservadas. No entanto, os estudos supracitados adotam como grupo controle, células ou tecido *in natura*, que não sofreram o processo de criopreservação sofrido pelos grupos experimentais, fator indicativo de viés de padronização entre os grupos avaliados, uma vez que não foram expostos ao mesmo procedimento. Outro ponto relevante é a intensidade de campo magnético selecionada nesses trabalhos que giram em torno de 0.01mT, um valor muito

aproximado do campo magnético da Terra (0.025 a 0.06mT), que sugere uma intensidade pouco expressiva.

Assim, a maioria das publicações atuais sobre a associação do campo magnético com o processo de criopreservação elegeram intensidades de campo magnético muito baixas. Por outro lado, o estudo de Lin *et al.*, (2014)⁶ utilizou intensidades muito superiores e com grandes intervalos entre elas (0mT, 100mT, 400mT e 800mT), seus resultados sugerem que o aumento da intensidade do campo magnético no processo de criopreservação celular não está diretamente relacionado ao ganho de viabilidade após descongelamento das células criopreservadas com agente criopreservante nas concentrações de 3% e 10%. Aliado ao fato de não ter sido definida uma intensidade ótima do campo magnético nos resultados publicados até o momento sobre o tema, o presente trabalho se propôs a avaliar intensidades compreendidas entre o intervalo de 100mT a 400mT (150mT, 290mT e 360mT).

Quanto ao processo de criopreservação inicial, o emprego do congelador de decaimento progressivo de temperatura (congelamento lento) se faz frequente na literatura^{4,6,10-12}. No entanto, a revisão sistemática de Otero *et al.* (2016)¹⁶ ressalta a necessidade de avaliar a associação do campo magnético a um método convencional de criopreservação, pela maior viabilidade técnica e econômica destes métodos. Desta forma, o estudo além de avaliar um grupo controle no processo de congelamento lento durante a criopreservação inicial, foi acrescido da análise celular de um grupo controle em método convencional, no qual a amostra foi mantida por período de *overnight* em freezer a -80°C.

A taxa de viabilidade imediatamente após o descongelamento celular foi similar entre os grupos experimentais e os grupos controles nas concentrações de 0%, 3% e 10% de DMSO. Estes resultados corroboram com o estudo de Lin *et al.* (2014)⁶, que não encontrou diferença entre as taxas de sobrevivência do grupo controle e dos grupos submetidos a criopreservação associada a campo magnético nas intensidades de 0mT, 100mT, 400mT e 800mT, de 3 linhagens de DPSCs testadas nas concentrações de 3% e 10% de DMSO.

Achados de Kaku *et al.* (2010)⁴, revelaram, por trypan blue, taxa elevada de sobrevivência imediatamente após o descongelamento de células do ligamento periodontal, submetidas a campo magnético nas intensidades de 0.005mT, 0.01mT e 0.15mT: superior a 90%. De maneira semelhante, os resultados da presente

pesquisa, com o mesmo método, apontaram uma média entre as taxas de sobrevivência celular imediatamente após descongelamento de 79,8%. Por outro lado, Lin *et al.* (2014)⁶, revelaram uma taxa de viabilidade média de 50%, por citometria de fluxo. Carvalho *et al.* (2008)¹⁷, corroboram com estas observações, quando afirmam que a estimativa de células viáveis pela coloração de trypan blue, pode ser superestimada.

O comportamento semelhante entre os grupos testados neste estudo, nas concentrações de 3% e 10% de DMSO, imediatamente após descongelamento, reforçam os achados do estudo de Woods *et al.* (2009)⁷, que demonstrou a eficácia do uso de meio criopreservante composto de DMSO e SFB com concentrações inferiores a 10% de DMSO, para criopreservação de DPSCs, tanto para armazenamento a -80°C quanto em nitrogênio a -196°C, sem associação de campo magnético.

Outro ponto a destacar é que o trabalho de Kumar *et al.* (2015)¹⁸ corrobora com os resultados encontrados neste estudo, na avaliação celular, uma vez que, após avaliar 8 protocolos diferentes de criopreservação baseado no DMSO como agente crioprotetor, afirma que a criopreservação em processo rápido a -80°C é tão eficiente como em processo lento com decaimento de temperatura controlado, independente da concentração de DMSO.

Desse modo, o comportamento semelhante das taxas de viabilidade celular imediatamente após o descongelamento, entre os dois grupos controle estudados, sugere o método convencional como uma alternativa viável para a criopreservação celular, reforçando as considerações da revisão sistemática de Otero *et al.* (2016)¹⁶.

Somado a isto, a observação na prática laboratorial permite apontar outras vantagens da adoção do método convencional de criopreservação em detrimento ao congelamento lento: a alta disponibilidade de freezers -80°C na maioria dos laboratórios de cultivo celular, a maior facilidade de manipulação destes equipamentos, a sua grande capacidade interna, a possibilidade de uso tanto para o processo de criopreservação inicial quanto para o armazenamento prolongado de amostras; além do custo econômico que é bem menor.

A diferença entre os resultados das taxas de viabilidade celular encontradas respectivamente nos grupos GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10%, quando mensuradas imediatamente após o descongelamento e 96h após de cultivo celular, sugere ganho de viabilidade após cultivo celular, como no estudo de Kaku *et al.*

(2010)⁴, quando confronta a sobrevivência celular imediata com a taxa de viabilidade após 48h de subcultivo celular.

Ao confrontar a taxa de viabilidade imediatamente após descongelamento celular dos grupos GI-II-III-IV-V 0%, com as taxas de viabilidade após 96h de subcultivo dos respectivos grupos, os valores sugerem decréscimo percentual, após cultivo celular, de modo contrário ao inferido pelas observações de GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10%.

O cálculo da viabilidade com 96h de subcultivo, foi estabelecido após observação microscópica de número reduzido de células aderidas na garrafa de cultivo após 4 (quatro) dias de subcultivo, contradizendo a alta média entre as taxas de viabilidade, mensuradas imediatamente após descongelamento celular, 79,8%, de GI-II-III-IV-V 0%, GI-II-III-IV-V 3% e GI-II-III-IV-V 10%. Esta observação sugere a presença de células com morte celular programada sem ruptura de membrana, imediatamente após descongelamento celular.

A taxa de viabilidade após 96h de subcultivo celular para as concentrações de 3% e 10% de DMSO, mostrou-se superior em relação às taxas referentes à concentração de 0% de DMSO, dados que reforçam a ação crioprotetora desse agente. Enquanto que os valores dessa mesma taxa revelaram-se maiores nos grupos submetidos ao campo magnético em relação aos grupos controle, fato que sugere ação crioprotetora das intensidades avaliadas, na ausência de DMSO.

A revisão sistemática de Conde *et al.* (2016)¹⁹, sobre o impacto da criopreservação nas propriedades biológicas de células-tronco de tecidos dentários, considera o armazenamento tecidual prévio ao isolamento celular como uma alternativa promissora que necessita de mais investigações. Assim, os resultados da eficiência de obtenção de células do tecido pulpar após descongelamento tecidual de amostras submetidas ao método convencional de criopreservação com 10% de DMSO, revelaram taxa de eficiência de 77,77% (n=7) para o GI; de 55,55% (n=5) para o GII; de 77,77% (n=7) para o GIII e de 88,88% (n=8) para o GIV. A observação desses resultados aponta o sucesso de isolamento celular após armazenamento de polpa dentária. Além disso, os resultados revelam uma relação diretamente proporcional entre a taxa de isolamento de células da polpa e a intensidade do campo magnético, na criopreservação tecidual através de método convencional.

De acordo com trabalho de Gómez (2017)¹⁴, 100% (n=15) de polpas *in natura* de dentes molares de pacientes com média de idade de 23,6 anos, foram capazes

de obter células. A semelhança do delineamento amostral e da metodologia de isolamento celular entre esse estudo e o atual, permite compará-los e essa comparação revela um decréscimo na taxa de eficiência de isolamento de células a partir de tecidos criopreservados em relação ao isolamento celular de tecido *in natura*.

Conclusão

Este estudo demonstrou: que as intensidades de campo magnético e as concentrações de DMSO avaliadas, não influenciaram na taxa de viabilidade celular imediatamente após descongelamento; que as concentrações de DMSO 3% e 10% promoveram aumento nas taxas de viabilidade após 96h de subcultivo; que o campo magnético influenciou positivamente na viabilidade após 96h de subcultivo, na ausência de DMSO e que a intensidade do campo magnético interferiu de modo positivo na eficiência de isolamento de células da polpa a partir de tecido pulpar criopreservado.

Referências

1. De Santis G C, Prata K L. Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. *Medicina* 2009 42: 36-47.
2. Ji E H, Song J S, Kim S-O, *et al.* Viability of pulp stromal cells in cryopreserved deciduous teeth. *Cell Tissue Bank* 2014 15: 67-74.
3. Hirasawa K, Shu R, Goto H, Okamoto M, inventors. 2000. Refrigeration and refrigerator utilizing nuclear magnetic resonance. JP Patent 2000-325062.
4. Kaku M, Kamada H, Kawata T, *et al.* Cryopreservation of periodontal ligament cells with magnetic field for tooth banking. *Cryobiology* 2010 61: 73-78.
5. Lee S Y, Chiang P C, Tsai Y H, *et al.* Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod* 2010 36: 1336-1340.
6. Lin S L, Chang W J, Lin C Y, *et al.* Static magnetic field increases survival rate of dental pulp stem cells during DMSO-free cryopreservation. *Electromagn Biol Med* 2014 34: 302-308.
7. Woods E J, Perry B C, Hockema J J, *et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology* 2009 59: 150-157.

8. Ministério da Saúde; Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 441/2011 - Normas regulamentadoras de utilização de material biológico humano em pesquisa. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde; 2011.
9. Owada N, Saito S, inventors. 2010. Quick freezing apparatus and quick freezing method. US Patent 7810340B2.
10. Lee S Y S, Sun C H B, Kuo T F, *et al.* Determination of cryoprotectant for magnetic cryopreservation of dental pulp tissue. *Tissue Eng Part C* 2012 18: 397-407.
11. Abedini S, Kaku M, Kawata T, *et al.* Effects of cryopreservation with a newly-developed magnetic field programmed freezer on periodontal ligament cells and pulp tissues. *Cryobiology* 2011 62: 181–187.
12. Kamada H, Kaku M, Kawata T, *et al.* In vitro and in vivo study of periodontal ligament cryopreserved with a magnetic field. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011 140: 799-805.
13. Wu W, Zhou J, Xu C T, *et al.* Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. *Molecular Medicine Reports* 2015 12: 5127-5134.
14. Gómez M M V. Avaliação da eficiência de obtenção, proliferação, senescência e plasticidade das células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos em diferentes faixas etárias. "MS (Master of Odontological Clinic) thesis", *Federal University of Juiz de Fora* 2017.
15. Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. 3rd ed, pp 298 .Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2012.
16. Otero L, Rodríguez A C, Pérez-Mateos M, *et al.* Effects of Magnetic Fields on Freezing: Application to Biological Products. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2016 15: 646-667.
17. Carvalho K A, Cury C C, Oliveira L, *et al.* Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency. *Transplant Proc* 2008 40: 839–841.
18. Kumar A, Bhattacharyya S, Rattan V. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Banking* 2015 16: 513-522.
19. Conde M C M, Chisini L A, Grazioli G, *et al.* Does cryopreservation affect the biological properties of stem cells from dental tissues? A systematic review. *Braz Dent J* 2016 27: 633-640.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

- O campo magnético influenciou do mesmo modo, nas taxas de viabilidade imediatamente após o descongelamento celular, em todos os grupos testados. Todavia, todas as intensidades de campo magnético avaliadas influenciaram de forma superior nas taxas de viabilidade após 96h de subcultivo, nos grupos criopreservados na ausência de DMSO;
- A concentração do agente crioprotetor influenciou semelhantemente, nas taxas de viabilidade imediatamente após descongelamento celular. Entretanto, promoveu aumento das taxa de viabilidade celular após 96h de subcultivo celular, para as concentrações de 3% e 10% de DMSO. Indicando a concentração de 3% de DMSO tão eficiente para viabilidade celular como a concentração de 10% para a criopreservação de células da polpa de dentes permanentes;
- Os dois métodos de criopreservação avaliados (convencional e lento), influenciaram da mesma forma a viabilidade celular, nos grupos sem aplicação de campo magnético estático, tanto nas taxas de viabilidade imediatamente após descongelamento como nas taxas de viabilidade após 96h de subcultivo;
- A intensidade do campo magnético interferiu de modo positivo na eficiência de isolamento de células da polpa a partir de tecido pulpar criopreservado, apontando o campo magnético de intensidade de 360mT (GIV) como o mais eficiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBEDINI, S. *et al.* Effects of cryopreservation with a newly developed magnetic field programmed freezer on periodontal ligament cells and pulp tissues. **Cryobiology**, v. 62, p. 181-187, 2011.
- BAROFFIO, A. *et al.* Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. **Differentiation**, v. 60, n. 1, p. 47–57, 1996.
- BARTLETT, P. F.; READE, P. C. Cryopreservation of developing teeth. **Cryobiology**, v. 9, p. 205-211, 1972.
- BECKER, A. J. *et al.* Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. **Nature**, v. 197, p. 452-464, 1963.
- CARVALHO, K. A. *et al.* Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency. **Transplant Proc**, v. 40, p. 839–841, 2008.
- CONDE, M. C. M. *et al.* Does cryopreservation affect the biological properties of stem cells from dental tissues? A systematic review. **Braz Dent J**, v. 27, n. 6, p. 633-640, 2016.
- DAVIES, G. O. *et al.* The effects of cryopreservation on cells from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. **Cryobiology**, v. 69, p.342-347, 2014.
- DE SANTIS, G. C.; PRATA, K. L. Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. **Medicina**, v. 42, n.1, p. 36-47, 2009.
- ERICES, A. *et al.* Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Hematology**, v. 109, p. 235-242, 2000.
- FERRO, F. *et al.* Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum. **Plos one**, v.7, n. 11, p. 1-9, 2012.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells** : a manual of basic technique and specialized applications. 6. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010, 732p.
- GIOVANTÚ, S. *et al.* A novel method for banking dental pulp stem cells. **Transfusion and Apheresis Science**, v.47, p. 199-206, 2012.
- GÓMEZ, M. M. V. **Avaliação da eficiência de obtenção, proliferação, senescência e plasticidade das células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos em diferentes faixas etárias.** 2017. 44f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.
- GRONTHOS, S. *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 97, n.25, p. 13625-13630, 2000.
- HANDA, K. *et al.* Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. **Connect Tissue Research**, v. 43, p. 406-408, 2002.

HASEGAWA, K. *et al.* Human periodontal ligament cells can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 469-478, 2005.

HILKENS, P. *et al.* Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. **Cell Tissue Research**, v. 353, p. 65-78, 2013.

HIRASAWA KOSUKE, SHU RAKU, GOTO HIROSHI, OKAMOTO MAMORU. **Refrigeration and refrigerator utilizing nuclear magnetic resonance**. Int CI A23L3/36; F25D11/00. JP2000325062A. 28 nov. 2000, 21 maio 1999.

HUANG, G. T. *et al.* The hidden treasure in the dental papilla: the potential role in pulp/ dentin regeneration and bioroot engineering. **Journal of Endodontics**, v. 11, p. 645-651, 2008.

INO, H., SUZUKI, Y., KATAMURA, T., TSUJI, S., KURIHARA, Y., inventors. 2005. **Food freezer and food thawing apparatus**. JP Patent 2005–291525.

JANZ, L. F. **Características de expansão, diferenciação e criopreservação de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico do segundo trimestre de gestação**. 2010. 161f. Tese (Doutorado em distúrbios do crescimento celular, hemodinâmicos e da hemostasia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

JI, E. H. *et al.* Viability of pulp stromal cells in cryopreserved deciduous teeth. **Cell Tissue Bank**, v.15, p. 67-74, 2014.

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

KAMADA, H. *et al.* In vitro and in vivo study of periodontal ligament cryopreserved with a magnetic field. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 140, p. 799-805, 2011.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2012.

KUMAR, A.; BHATTACHARYYA, S.; RATTAN, V. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. **Cell Tissue Banking**, v.16, n. 4, p. 513-22, 2015.

LA NOCE, M. *et al.* Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translations on research into therapy. **Journal of Dentistry**, v. 42, p. 761-768, 2014.

LEE, H-S. *et al.* Characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) from intact cryopreserved deciduous teeth. **Cryobiology**, v. 71, p. 374-383, 2015.

LEE, S. S. *et al.* Determination of cryoprotectant for magnetic cryopreservation of dental pulp tissue. **Tissue Engineering: Part C**, v. 18, n. 6, p. 397-407, 2012a.

LEE, S. S. *et al.* Effects of cryopreservation of intact teeth on isolated dental pulp stem cells. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 8, p. 1336-1340, 2010.

LIN, S. L. *et al.* Static magnetic field increases survival rate of dental pulp stem cells during DMSO-free cryopreservation. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 34, p. 302-308, 2014.

MENDONÇA, J. P. R. F. *et al.* Efeito do campo magnético com moderada intensidade em sistemas biológicos. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 22, 2010, Tiradentes. **Anais Congresso Brasileiro de engenharia Biomédica**. Tiradentes, 2010. p. 1438-1441.

MIHARA, M., NAKAGAWA, T., NOGUCHI, S., DOHI, T., MASAMUNE, K., NIINO, T., YAMASHITA, H., inventors. 2012. Freezing method. EP Patent 2499924 A1.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 441/2011 - Normas regulamentadoras de utilização de material biológico humano em pesquisa. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde; 2011.

MIURA, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 100, p. 5807-5012, 2003.

OTERO, L. *et al.* Effects of Magnetic Fields on Freezing: Application to Biological Products. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, v. 16, p. 646-667, 2016.

OWADA, N., inventor. 2007. **Highly-efficient freezing apparatus and high-efficient freezing method**. US Patent 7237400 B2.

OWADA, N., KURITA, S., inventors. 2001. **Super-quick freezing method and apparatus therefor**. US Patent 6250087 B1.

OWADA, N., SAITO, S., inventors. 2010. **Quick freezing apparatus and quick freezing method**. US Patent 7810340B2.

PARKER, G. C. *et al.* Stem cells: shibboleths of development. **Stem Cell and Development**, v. 13, p. 579-584, 2004.

PISCIOTTA, A. *et al.* Human serum promotes osteogenic differentiation of Human dental pulp stem cells in vitro and In vivo. **Plos one**, v. 7, n. 11, p. 1-11, 2012.

PRINDULL, G. *et al.* Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 67, n. 4, p. 413-416, 1978.

RAGOONANAN, V. *et al.* Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. **Cryobiology**, v.61, p. 335-344, 2010.

SATO, M., FUJITA, K., inventors. 2008. Freezer, freezing method and frozen objects. US Patent 7418823 B2.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Celular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **Internacional Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

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**, v. 59, p. 150-157, 2009.

WU, W. *et al.* Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. **Molecular Medicine Reports**, v.12, p. 5127-5134, 2015.

ZUK, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

ANEXO**ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise comparativa da curva de viabilidade de células-tronco da polpa dental de dentes permanentes humanos íntegros, descongelados, após criopreservação associada ao campo magnético.

Pesquisador: ANTÔNIO MÁRCIO RESENDE DO CARMO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51518015.9.0000.5147

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.400.932

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUIZ DE FORA, 02 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Francis Ricardo dos Reis Justi
(Coordenador)

APÊNDICES

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF

36036-900 JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Biorrepositório)

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Análise comparativa da curva de viabilidade de células-tronco da polpa dental de dentes permanentes humanos íntegros, descongelados, após criopreservação associada ao campo magnético”**. Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano **“dente permanente”**, cuja utilização está expressamente vinculada somente a esse projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos: (1) obter dentes permanentes vitais por procedimento de extração/remoção, que já possuíam indicação clínica de extração, anterior a este estudo; (2) congelar as amostras associando campo magnético; (3) obter células-tronco adultas da polpa dentária humana, (4) caracterizar as células-tronco quanto tipo, capacidade de se multiplicar e envelhecimento celular. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: o **“dente permanente”**, será obtido através de uma consulta odontológica agendada na Faculdade de Odontologia desta Universidade. O que mudará, será depois da extração do dente, ao invés do dente extraído ser entregue ao paciente, será doado para a pesquisa. O material será coletado em frascos apropriados e esterilizados, sendo todos por ocasião devidamente rotulada para enumeração dos doadores e das amostras. Todas as amostras obtidas serão armazenadas, 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. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em **RISCOS MÍNIMOS**, caracterizado por pequeno desconforto referente ao procedimento. A pesquisa contribuirá para entender melhor os mecanismos moleculares e celulares do congelamento de células, usando as células-tronco como modelo, visando melhorar a técnica de armazenamento celular para uso em futuros tratamentos de doenças.

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 obtidos pela pesquisa, a partir de seu

material biológico, 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, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 05 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas 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 da curva de viabilidade de células-tronco da polpa dental de dentes permanentes humanos íntegros, descongelados, após criopreservação associada ao campo magnético**", 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.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. 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 - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano-UFJF

Campus Universitário da UFJF

Pró-Reitoria de Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@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 (CLO)

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

Contato da equipe de pesquisa: Érika Mageste de Almeida Candido

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) 99954-6736

Email: erika mageste.candido@gmail.com

APÊNDICE B - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



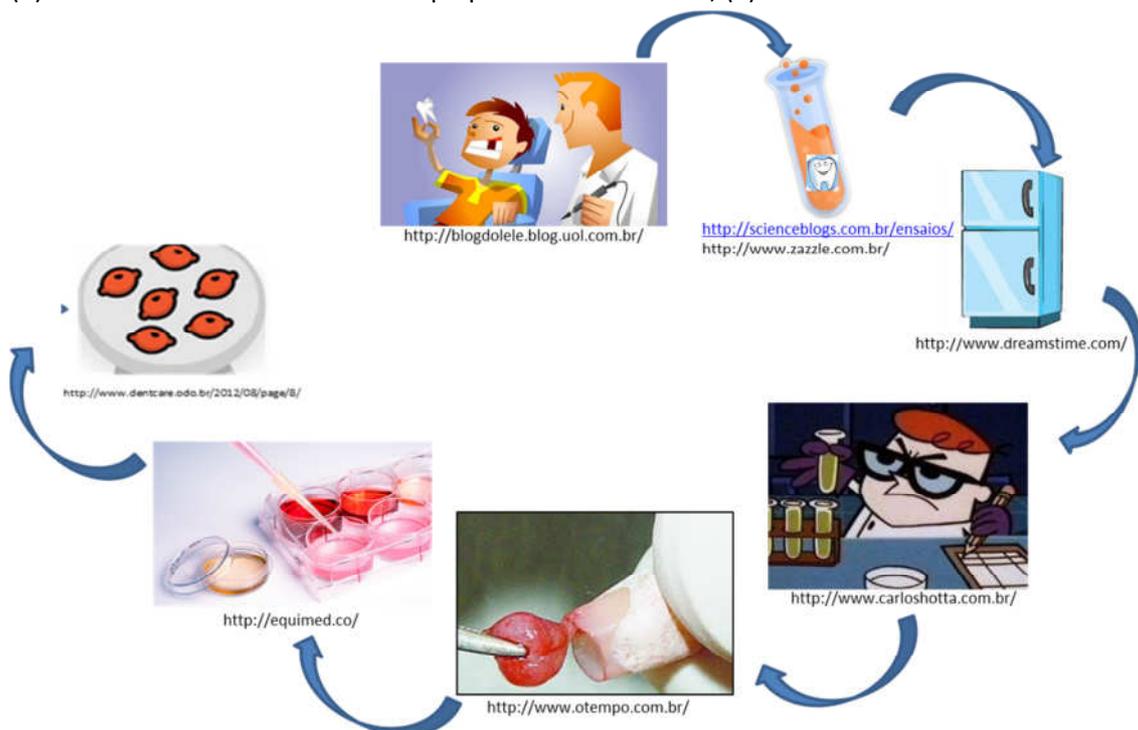
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF
36036-900 JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Anuência do participante da pesquisa, criança, adolescente ou legalmente incapaz).

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Análise comparativa da curva de viabilidade de células-tronco da polpa dental de dentes permanentes humanos íntegros, descongelados, após criopreservação associada ao campo magnético”**. Nesta pesquisa pretendemos: (1) obter dentes permanentes após procedimento de extração; (2) congelar os dentes; (3) obter células-tronco adultas da polpa dentária humana, (4) analisar a sobrevivência das células.



O motivo que nos leva a estudar esse assunto é a falta de um protocolo padrão para (congelamento) de dentes permanentes.

Para esta pesquisa adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): a pessoa que tenha algum dente permanente que precise extrair/indicação clínica anterior, será convidada a participar desta pesquisa. A extração/remoção será realizada através de uma consulta odontológica agendada na Faculdade de Odontologia desta Universidade. O que mudará, será depois da extração do dente, ao invés do dente extraído ser entregue ao paciente, será doado para a pesquisa. A utilização do material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa. O material será coletado em frascos apropriados e esterilizados, sendo todos por ocasião devidamente rotulada para enumeração

dos doadores e das amostras. Todas as amostras obtidas serão armazenadas, 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 participante da pesquisa; b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade; c) por iniciativa da instituição; e d) pela dissolução do BIORREPOSITÓRIO.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. 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 ideia 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 riscos envolvidos na pesquisa consistem em “**RISCOS MÍNIMOS**”, caracterizado por pequeno desconforto referente ao procedimento. A pesquisa contribuirá para entender melhor como podemos congelar as células do dente permanente e deixar elas vivas depois de descongeladas.

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. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 05 (CINCO) anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em **duas vias originais**: sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (**se já tiver documento**), fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas *dúvidas*.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do (a) menor

Assinatura do (a) pesquisador (a)

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

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano-UFJF

Campus Universitário da UFJF

Pró-Reitoria de Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@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

Contato da equipe de pesquisa: Érika Mageste de Almeida Candido

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) 99954-6736

Email: erika.mageste.candido@gmail.com

APÊNDICE C- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO RESPONSÁVEL DO MENOR



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

*COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF
36036-900 JUIZ DE FORA - MG – BRASIL*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (BIORREPOSITÓRIO)

(No caso do responsável pelo menor)

O menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Análise comparativa da curva de viabilidade de células-tronco da polpa dental de dentes permanentes humanos íntegros, descongelados, após criopreservação associada ao campo magnético”**. Nesta pesquisa pretendemos: (1) obter dentes permanentes vitais por procedimento de extração/remoção, que já possuíam indicação clínica de extração, anterior a este estudo; (2) congelar as amostras e (3) analisar a viabilidade celular.

O motivo que nos leva a estudar é a ausência de um protocolo padrão para (congelamento) de dentes permanentes.

Para esta pesquisa adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): o **“dente permanente”** do menor, será obtido através de uma consulta odontológica agendada na Faculdade de Odontologia desta Universidade. O que mudará, será depois da extração do dente, ao invés do dente extraído ser entregue ao paciente, será doado para a pesquisa. A utilização do dente está expressamente vinculada somente a esse projeto de pesquisa. O material será coletado em frascos apropriados, sendo todos por ocasião devidamente rotulada para enumeração dos doadores e das amostras. 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, 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 participante da pesquisa; b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade; c) por iniciativa da instituição; e d) pela dissolução do BIORREPOSITÓRIO.

Para participar desta pesquisa, o menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, ele tem assegurado o direito à indenização. Ele será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. O (A) Sr. (a), como responsável pelo menor, poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação dele a qualquer momento. A participação dele é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pelo pesquisador que irá tratar a identidade do menor com padrões profissionais de sigilo (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares). O menor não será identificado em nenhuma publicação. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em **“RISCOS**

MÍNIMOS", caracterizado por pequeno desconforto referente ao procedimento. A pesquisa contribuirá para entender melhor os mecanismos moleculares e celulares do congelamento de células, usando as células-tronco como modelo, visando melhorar a técnica de armazenamento celular para uso em futuros tratamentos de doenças.

Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. O nome ou o material que indique a participação do menor não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável, por um período de 05(cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. 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).

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, responsável pelo menor _____, fui informado (a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar a decisão do menor sob minha responsabilidade de participar, se assim o desejar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à 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 - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano-UFJF

Campus Universitário da UFJF

Pró-Reitoria de Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@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

Contato da equipe de pesquisa: Érika Mageste de Almeida Candido

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) 99954-6736

Email: erika.mageste.candido@gmail.com