

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ODONTOPEDIATRIA

***EFEITO DA REMOÇÃO SELETIVA DE TECIDO CARIADO NAS  
CARACTERÍSTICAS IMUNOFENOTÍPICAS APRESENTADAS POR CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS***

Paola Arosi Bottezini

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ODONTOPEDIATRIA

Linha de Pesquisa:  
Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

***EFEITO DA REMOÇÃO SELETIVA DE TECIDO CARIADO NAS  
CARACTERÍSTICAS IMUNOFENOTÍPICAS APRESENTADAS POR CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia, como parte dos  
requisitos obrigatórios para obtenção do Título  
de Mestre em Clínica Odontológica –  
Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Luciano Casagrande

Porto Alegre

2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Bottezini, Paola Arosi  
EFEITO DA REMOÇÃO SELETIVA DE TECIDO CARIADO NAS  
CARACTERÍSTICAS IMUNOFENOTÍPICAS APRESENTADAS POR  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA POLPA DE DENTES  
DECÍDUOS HUMANOS / Paola Arosi Bottezini. -- 2019.  
53 f.  
Orientador: Luciano Casagrande.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa  
de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2019.

1. Células-tronco. 2. Remoção seletiva de tecido  
cariado. 3. Dentes decíduos. 4. Polpa dentária. I.  
Casagrande, Luciano, orient. II. Título.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
a presença distante das estrelas!”*

*Mário Quintana*

*À Adriana, Celso, Luiza e Ricardo, amores da minha vida e fonte de carinho e  
motivação diários.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente à Deus, pela vida e pela proteção.

À toda minha família, em especial aos meus pais e minha irmã, pelo amor e pelo incentivo a ir em busca dos meus sonhos. Palavras nunca vão ser suficientes para agradecer toda compreensão e carinho.

Ao meu amor, meu maior incentivador, obrigada pela paciência, cumplicidade e carinho incondicionais. Nada disso teria sido possível sem o teu apoio!

À família Scheid, por ter me recebido há oito anos como uma filha e por vibrarem comigo a cada conquista alcançada!

Aos amigos e amigas que, de perto ou longe, se fizeram presentes nos momentos de alegria e de dificuldade, que compreenderam as ausências e que sempre me incentivaram a seguir em frente.

Às minhas amadas Professoras da UNISC, Suziane Raupp, Magda Reis e em especial à minha “mãe científica”, Professora Renita Baldo Moraes, agradeço imensamente por terem acreditado em meu potencial e por me incentivarem a ir em busca desse sonho. Obrigada por tantos conselhos e tanto carinho!

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO-UFRGS), em especial aos professores, funcionários e pacientes que foram essenciais para esta conquista.

*Aos Professores da Odontopediatria da UFRGS...*

Ao Professor Fernando Borba de Araújo, agradeço pelas inúmeras oportunidades de aprendizado. És uma grande exemplo para mim!

À professora Adriela Mariath, agradeço a oportunidade de poder aprender com uma Odontopediatra tão sensível e tão inspiradora!

Ao Professor Jonas de Almeida Rodrigues, agradeço o carinho e os ensinamentos ao longo desse período.

À Professora Tathiane Lenzi, agradeço do fundo do coração por todos os conselhos e ensinamentos... Obrigada por ser além de uma grande professora, uma grande amiga!

Ao Professor Luciano Casagrande, agradeço imensamente por teres me recebido de braços abertos na FO-UFRGS. Serei eternamente grata pelas oportunidades, pela confiança e pelo carinho. Obrigada por ser um exemplo diário de comprometimento e seriedade. Tenho muito orgulho de ser tua orientada!

Aos queridos amigos e colegas da Odontopediatria –Andressa, Débora, Laura, Amanda, Mônica, Fernanda, Gabriel, Luciana, Bruna, Giórgio, Nicole, Sabrina, Natália, Gabriela, Júlia, Caroline e Cláudia- com quem compartilhei a rotina e muitas alegrias ao longo destes dois anos.

Aos colegas das turmas de especialização 2015-2017 e 2017-2019 pela parceria, amizade e apoio!

À querida Stefanie Werle, pela sua disponibilidade e atenção no esclarecimento de dúvidas.

Ao LAMOC, em especial à equipe do *Journal* com quem tive o prazer de dividir as quintas-feiras. À querida Bibiana Matte, pelos conselhos e disponibilidade para esclarecimento de dúvidas (e desabafos). À Professora Lisiane Bernardi, pelos ricos ensinamentos no curso de Cultivo Celular e nas aulas da Graduação e Pós-Graduação que tive o prazer de acompanhar!

*Ao Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT)...*

À Professora Patrícia Pranke, agradeço por teres me recebido de portas abertas em seu laboratório e por ser um exemplo de mulher e pesquisadora!

A todos os integrantes do “Pranke’s Lab”, obrigada pelos ensinamentos e pelos inúmeros momentos de descontração. Foi, e tenho certeza de que continuará sendo, um grande prazer trabalhar com vocês!

Em especial, agradeço imensamente à Natasha Maurmann, pela sua generosidade e paciência ao me ensinar tudo que sei hoje sobre cultivo celular e práticas laboratoriais. Tua ajuda foi fundamental para a realização desse trabalho!

À querida Fabiane Spagnol, obrigada por me receber de forma tão carinhosa na Unidade de Diagnóstico Especializado do HCPA e pela tua paciência e dedicação em me ensinar noções básicas sobre análise imunofenotípica. Tua ajuda foi essencial!

Ao CNPq pelo financiamento concedido a esta pesquisa.

À CAPES pela bolsa de estudos.

E a todos que de alguma forma participaram desta conquista, muito obrigada!

## Resumo

A Remoção Seletiva de Tecido Cariado (RSTC) consiste na manutenção de uma dentina contaminada sob o material restaurador, com o objetivo de evitar a exposição da polpa e manter a sua vitalidade. A interação dos metabólitos bacterianos com os resíduos inflamatórios, provenientes do processo carioso e do procedimento restaurador, sinaliza e modula o processo de formação de dentina terciária. Células mesenquimais indiferenciadas presentes na polpa participam desse reparo, migrando, proliferando e diferenciando-se em células tipo-odontoblasto que passam a secretar matriz dentinária. Entretanto, permanece incerto como essas interações podem afetar a manutenção de células-tronco mesenquimais (CTMs) presentes na polpa de dentes decíduos (SHEDs). O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da RSTC nas características imunofenotípicas, no potencial de diferenciação e proliferação celular apresentadas por SHEDs. Células da polpa de dentes decíduos hígidos (n=9) e com RSTC (n=3) foram isoladas e cultivadas. Para caracterização imunofenotípica, células incubadas com os anticorpos CD14, CD29, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD184, HLA-DR e STRO-1 foram avaliadas por citometria de fluxo. A capacidade de diferenciação celular foi avaliada através da indução das células em linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. Para mensuração da viabilidade e proliferação celular, foi realizado o ensaio de MTT nos dias 1, 3 e 7. A taxa de sucesso no isolamento foi de 66,6% e 100% para as culturas de dentes hígidos e com RSTC, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na média de fluorescência para os marcadores de superfície testados ( $p>0.05$ ). Células de ambos os grupos foram positivas para CD29, CD73, CD90 e negativas para CD14, CD34, CD45, CD73, CD184, HLA-DR e STRO-1/PE. Culturas de ambos os grupos foram capazes de se diferenciar nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica e apresentaram taxa de proliferação semelhantes ( $p>0.05$ ). Desta forma, pode-se concluir que CTMs da polpa de dentes decíduos submetidos à RSTC exibiram características semelhantes às células obtidas de dentes decíduos hígidos, sugerindo que a presença de um tecido desmineralizado infectado na base de uma restauração adesiva não altera as características apresentadas por SHEDs.

**Palavras-chave:** células-tronco, remoção seletiva de tecido cariado, dente decíduo, polpa dental.



## Abstract

Selective caries removal (SCR) is the maintenance of a contaminated dentin under the restorative material, in order to avoid the exposure of the pulp and maintain its vitality. The interaction of bacterial metabolites with inflammatory residues from the carious process and the restorative procedure, signals and modulates the process of tertiary dentin formation. Undifferentiated mesenchymal cells present in the pulp participate in this repair, migrating, proliferating and differentiating into odontoblast-like cells that starts to secrete dentin matrix. However, it remains unclear how these interactions may affect the maintenance of mesenchymal stem cells (MSCs) present in the pulp of deciduous teeth (SHEDs). The present study aimed to evaluate the effect of SCR on immunophenotypic characteristics, on the potential for cell differentiation and viability presented by SHEDs. Dental pulp cells from sound (n = 9) and SCR teeth (n = 3) were isolated and cultured. For immunophenotypic characterization, cells incubated with the antibodies CD14, CD29, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD18, HLA-DR and STRO-1 were evaluated by flow cytometry. Cell differentiation capacity was evaluated through the induction of the cells in adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages. To measure cell viability, the MTT assay was performed on days 1, 3 and 7. The success rate in isolation was 66.7% and 100% for healthy and RSTC cultures, respectively. There was no statistically significant difference between the groups in the mean fluorescence for the surface markers tested ( $p > 0.05$ ). Cells from both groups were positive for CD29, CD73, CD90 and negative for CD14, CD34, CD45, CD73, CD184, HLA-DR and STRO-1. Cultures of both groups were able to differentiate in the adipogenic, chondrogenic and osteogenic lines and presented similar v rates ( $p > 0.05$ ). Thus, it can be concluded that MSCs from deciduous pulp submitted to SCR exhibited similar characteristics to cells obtained from sound deciduous teeth, suggesting that the presence of infected demineralized tissue on the basis of an adhesive restoration does not alter the characteristics presented by SHEDs.

**Keywords:** stem cells, selective carious removal, deciduous tooth, dental pulp.

## Lista de Abreviaturas

%	Por cento
µg/mL	Micrograma por mililitro
µg/ µmol	Micrograma por micromole
µL	Microlitro
µM	Micromolar
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
CTM	Célula-tronco Mesenquimal
DPSC	<i>Dental Pulp Stem Cell</i>
CDPSC	<i>Cariious Dental Pulp Stem Cell</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
RSTC	Remoção Seletiva de Tecido Cariado
SCR	<i>Selective Caries Removal</i>
SHED	<i>Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
HEPES	n-2 hidroxietil piperazine- n'2 ácido sulfônico etano
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
CD	<i>Clusters of Differentiation</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
PE	Ficoeritrina
HLA-DR	<i>Human Leucocyte Antigen major histocompatibility complex class II cell surface receptor</i>
STRO-1	<i>Stromal cell marker 1</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMSO	Dimethylsulfoxide – solução crioprotetora
7AAD	7- amino Actinomicina D
TGFβ1	Fator de crescimento transformador beta 1
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – tampão fosfato-salino
n	número de amostra
mL	Mililitro
mg/mL	miligrama por mililitro
U/mL	unidade por mililitro
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
ng/mL	nanograma por mililitro
±	mais ou menos

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	17
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	18
Introduction.....	21
Materials and methods .....	22
Results.....	25
Discussion.....	27
References.....	37
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	40
REFERÊNCIAS .....	41
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética.....	45
Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....	47
Anexo 3 – Termo de Assentimento .....	49
Anexo 4 – Termo de Doação de Material Biológico.....	51

## 1. INTRODUÇÃO

Terapias celulares, a partir do emprego de células-tronco mesenquimais (CTMs), passaram a representar alternativas de tratamento em diversas áreas da medicina. Nas últimas décadas, a descoberta de células-tronco provenientes da polpa de dentes humanos, associada à possibilidade de utilização terapêutica, vem estimulando as especulações para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a regeneração de tecidos injuriados (FITZSIMMONS et al., 2018).

A sua utilização em pesquisas que buscam estabelecer novos protocolos de tratamento para doenças que impactam significativamente na população, como desordens neurodegenerativas, doenças cardíacas crônicas, doenças periodontais, perdas ósseas e até mesmo dentárias, motiva os pesquisadores a seguirem na busca por evidências que possam contribuir ainda mais para o avanço dos estudos clínicos (SEO et. al., 2008; FITZSIMMONS et al., 2018).

O isolamento e a identificação de células-tronco mesenquimais na polpa de dentes permanentes foram primeiramente registrados por Gronthos e colaboradores (2000). Essas células foram consideradas capazes de se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos durante o processo de formação da dentina reparadora (GRONTHOS et. al., 2000; BALIC et al., 2010).

Posteriormente, populações de células-tronco foram isoladas e identificadas na polpa de dentes decíduos hígidos em processo de esfoliação (MIURA et al, 2003; BERNARDI, et al., 2011). Essas células, denominadas SHED (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) apresentam um potencial de diferenciação em diversos tipos celulares, especialmente em osteoblastos e odontoblastos.

Em comparação às células-tronco mesenquimais provenientes da polpa de dentes permanentes, estudos têm mostrado que as SHEDs apresentam alta velocidade de proliferação, de formação de colônias e capacidade osteoindutiva *in vivo* (PETROVIC; STEFANOVIC, 2009). Ainda, apresentam como grande vantagem a facilidade de obtenção, tendo em vista que o dente decíduo apresenta um processo fisiológico de reabsorção, permitindo sua obtenção através de procedimentos menos invasivos (ARORA; ARORA; MUNSHI, 2009).

Apesar das semelhanças em relação à estrutura histológica básica, os dentes decíduos diferem dos permanentes especialmente por apresentarem um processo natural de reabsorção que permite a transição entre as dentições. Este fenômeno, denominado rizólise, está geneticamente programado para acontecer e inicia-se a partir da apoptose dos cementoblastos, ação dos osteoclastos, resultando em alterações graduais da polpa, principalmente nos estágios mais avançados (TOLEDO, 2012; NANCI, 2008).

No decorrer da rizólise, ocorrem modificações significativas na estrutura do dente decíduo, tanto em tecidos mineralizados quanto no tecido pulpar. Quando a raiz apresenta-se totalmente reabsorvida, o tecido pulpar apresenta modificações na sua estrutura e composição, sendo possível observar histologicamente alterações a nível celular e vascular, com aumento significativo de células inflamatórias e células clásticas (ARAÚJO, 1982; SAHARA et. al., 1993; ANGELOVA et. al., 2004; MONTEIRO et. al., 2009).

Segundo o estudo realizado por Bernardi e colaboradores (2011), sugere-se que além das alterações vasculares e inflamatórias, o processo de rizólise também parece influenciar na disponibilidade das células-tronco, exacerbando seu processo de ativação durante a reabsorção das estruturas dentárias. Possivelmente esse fenômeno, peculiar aos dentes decíduos, justifique o fato dessas células apresentarem maior proliferação em comparação às oriundas da polpa de dentes permanentes (MIURA et al., 2003, BERNARDI et. al., 2011).

Todas as reações vinculadas à fisiologia da polpa dentária são diretamente influenciadas pela sua localização anatômica, justamente por estar circundada por dentina mineralizada. As paredes dentinárias lhe garantem limitada capacidade de expansão e, considerando que seu substrato nutricional provém da vascularização, que percorre pequenos forames e foraminas, a polpa encontra-se em um ambiente de baixa tolerância (ESTRELA et al., 2007). Frente às diversas agressões oriundas do meio externo, como por exemplo as causadas pela lesão cariada, a polpa ativa mecanismos de defesa para evitar injúrias e consequentes danos permanentes.

Quando o dente é acometido por lesão de cárie, há um processo de resposta pulpar a essa agressão, e são os odontoblastos os primeiros responsáveis pela secreção de matriz dentinária e pela modulação do processo inflamatório (HORST et al., 2011). Esse processo é dependente da manutenção de células viáveis próximas ao local lesado,

resultando em deposição de matriz mineral e aumento da distância entre lesão cariosa e a polpa. Esse aumento pode ser verificado no acompanhamento radiográfico em dentes com lesão cariosa profunda que foram restaurados após remoção seletiva de tecido cariado.

Essa barreira promove proteção pulpar com preservação da estrutura tubular característica da dentina, uma vez que houve a manutenção de odontoblastos “originais” próximos à zona desmineralizada. Da mesma forma, fornece uma estrutura remanescente adequada para procedimentos restauradores (MJOR, 1985).

Aumentando a gravidade da lesão, os odontoblastos da camada subjacente à dentina cariada perecem e, prevalecendo condições favoráveis à vitalidade pulpar, uma nova geração de células indiferenciadas passa a atuar no processo de reparo. Células-tronco mesenquimais da polpa dental, após o estímulo bacteriano, migram e proliferam, iniciando uma cascata de diferenciação em células semelhantes a odontoblastos que começam a secretar a matriz dentinária (GOLDENBERG et al., 2008).

A matriz mineralizada formada a partir de uma nova população de células implica na descontinuidade da estrutura tubular dentinária primitiva/original, reduzindo assim a permeabilidade. Esse processo de ativação das células-tronco é realizado pelo próprio desafio cariogênico, ou seja, as células endoteliais lesadas liberam fatores quimiotáticos e moléculas sinalizadoras para iniciar o processo inflamatório, além de moléculas de adesão, necessárias para o recrutamento de células progenitoras e inflamatórias (HORST et al., 2011).

Já há evidências na literatura que comprovam a existência de células-tronco mesenquimais viáveis na polpa de dentes permanentes e decíduos acometidos por lesão de cárie (MA et al., 2012; WERLE et al., 2015). Ma e colaboradores (2014) realizaram uma análise proteômica das células da polpa de dentes permanentes hígidos (Dental Pulp Stem Cells - DPSC) e cariados (Cariou Dental Pulp Stem Cells - CDPSC). Observou-se que em células provenientes da polpa de dentes acometidos por lesão de cárie em dentina profunda, houve uma maior expressão de proteínas relacionadas à regulação da proliferação e diferenciação celular. Ainda, os autores sugerem que as CDPSC apresentam uma maior expressão de proteínas antioxidativas que podem estar diretamente envolvidas na proteção dessas células contra o estresse oxidativo.

Werle e colaboradores (2016) avaliaram as características imunofenotípicas de células-tronco da polpa de dentes decíduos hígidos e cariados. Os autores concluíram que

células de ambos os grupos apresentaram propriedades semelhantes, sugerindo que a polpa de dentes decíduos cariados pode ser utilizada como fonte viável de células-tronco mesenquimais.

Como primeira alternativa de tratamento para lesões de cárie em dentina profunda, a remoção seletiva de tecido cariado (RSTC) tem como objetivo primordial manter a saúde pulpar dos dentes, preservando a dentina residual e prevenindo possíveis exposições pulpares. Essa técnica, que vem ao encontro de uma filosofia de mínima intervenção, sustenta que apenas a dentina macia deve ser removida, mantendo parte da dentina firme em regiões mais profundas da cavidade, prevenindo a exposição pulpar e a manipulação direta desse tecido (SCHWENDICKE et al., 2016). Já foi reportada a capacidade desse tecido contaminado mantido ser remineralizado após o procedimento restaurador (DAPLIAN et al., 2012), independente da propriedade bioindutora do material utilizado sobre a dentina remanescente (PINTO et al., 2006; FRANZON et al., 2007).

De acordo com revisões sistemáticas, um dos maiores benefícios em manter o tecido cariado na parede pulpar é reduzir o risco de exposição pulpar (RICKETTS et al., 2013; SCHWENDICKE; DORFER; PARIS, 2013), o que simplifica o tratamento, já que não há necessidade de terapia endodôntica. Além disso, o sucesso clínico e radiográfico da RSTC foi demonstrado tanto em dentes decíduos (FRANZON et al., 2014; DALPIAN et al., 2014) quanto em permanentes (MALTZ; ALVES, 2013).

As repercussões pulpares, além de serem causadas pela progressão da lesão cariosa, também podem resultar de preparos cavitários e materiais restauradores utilizados para tratamento da seqüela da doença. Quando uma intervenção restauradora para reparar o dano à estrutura do dente é realizada, a viabilidade das células-tronco da polpa pode ser influenciada pelos sistemas adesivos e materiais restauradores utilizados (TRUBIANI et al., 2010; LUTFI et al., 2010; KANJEVAC et al., 2012). Isso porque produtos químicos, como monômeros residuais, influenciam as células-tronco via apoptose, alteração gênica e diminuição da proliferação celular (KRIFKA et al., 2013), especialmente quando esses produtos são aplicados em dentina profunda, onde a permeabilidade dentinária é maior.

Dessa forma, a interação dos metabólitos bacterianos com os resíduos inflamatórios, provenientes tanto do processo carioso quanto do procedimento

restaurador, sinaliza e modula o processo regenerativo. Todavia, ainda permanece incerto como esses produtos afetam as características imunofenotípicas, bem como a capacidade de proliferação e diferenciação de células-tronco pulpares.

Sendo assim, o presente estudo se propõe a avaliar o efeito da técnica de RSTC nas características imunofenotípicas, capacidade de diferenciação e viabilidade apresentadas por células-tronco isoladas da polpa de dentes decíduos em processo de esfoliação.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do tratamento de remoção seletiva de tecido cariado nas características imunofenotípicas apresentadas por células-tronco isoladas da polpa de dentes decíduos em processo de esfoliação.

### **2.2 Objetivos Específicos**

-Isolar e cultivar células pulpare de dentes decíduos hígidos e com remoção seletiva de tecido cariado.

-Avaliar o potencial de diferenciação e viabilidade/proliferação de células pulpare de dentes decíduos hígidos e com remoção seletiva de tecido cariado.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

A ser submetido ao periódico internacional "*Clinical Oral Investigations*"

Fator de impacto: 2.386

Qualis A1

**The effect of selective caries removal on the immunophenotypic characteristics  
presented by mesenchymal stem cells from human deciduous teeth**

Paola Arosi Bottezini <sup>a1\*</sup>, Natasha Maurmann <sup>b2</sup>, Fabiane Spagnol <sup>c3</sup>, Patricia Pranke <sup>b2</sup>  
and Luciano Casagrande <sup>a1</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>b</sup> Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and Stem Cell Research Institute, Porto Alegre, Brazil.

<sup>c</sup> Specialized Diagnostic Unit of the Hospital of Clinics of Porto Alegre in the field of Flow Cytometry and Molecular Biology

<sup>1</sup>Address: School of Dentistry, Pediatric Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Ramiro Barcelos 2492, Porto Alegre, RS; ZIP: 90035-003, Brazil

Telephone: 0XX (51)33085493/ Fax: 0XX (51)33085010

<sup>2</sup> Address: Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS) Av. Ipiranga, 2752/3, Porto Alegre, RS, Brazil

Telephone: 0XX (51)33085370

<sup>3</sup> Address: Hospital of Clinics of Porto Alegre, Clinical Pathology Service. Rua Ramiro Barcelos 2350 Rio Branco 90035903 - Porto Alegre, RS, Brazil

Telephone: 0XX (51) 33598000

p-bottezini@hotmail.com (P. A. Bottezini),

pesquisa.natasha@gmail.com (N. Maurmann),

fabispagnol@hotmail.com (F. Spagnol),

patriciapranke@ufrgs.br (P. Pranke),

luciano.casagrande@ufrgs.com (L. Casagrande).

\*Corresponding author

## **Abstract**

*Objective:* to evaluate the effect of Selective Caries Removal (SCR) on the immunophenotypic characteristics, potential for differentiation and viability of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the pulp of restored exfoliated deciduous teeth.

*Material and methods:* Dental pulp cells from sound (n=9) and SCR (n=3) deciduous teeth were isolated and cultured. For immunophenotypic characterization, cells incubated with the CD14, CD29, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD184, HLA-DR and STRO-1 were evaluated by flow cytometry. Cell differentiation capacity was evaluated through the induction of the cells in adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages. To measure cell viability the MTT assay was performed in a time course (1, 3 and 7 days).

*Results:* Isolation success rate were 66.7 and 100% from de sound and SCR groups, respectively. There was no statistically significant difference between the groups in the mean fluorescence for the surface markers tested ( $p>0.05$ ). Cells from both groups were positive for CD29, CD73, CD90 negative for CD14, CD34, CD45, CD73, CD184, HLA-DR and STRO-1. Cultures of both groups were able to differentiate in the adipogenic, chondrogenic and osteogenic lines and presented similar viability rates ( $p>0.05$ ).

*Conclusion:* Stem cells from the pulp of deciduous teeth submitted to SCR showed similar characteristics to cells obtained from sound deciduous teeth.

*Clinical relevance:* The presence of infected demineralized tissue on the basis of an adhesive restoration does not alter the characteristics presented by stem cells present in the dental pulp of deciduous teeth. These findings shows that stem cells from teeth submitted to RSTC may represent a new and viable source of mesenchymal stem cells.

## Introduction

When the dentin is affected by caries lesion, there is a pulp response to this aggression and the odontoblasts are the ones responsible for the secretion of the dentin matrix and for the modulation of the inflammatory process [1]. However, with the increase of aggression or lesion severity, the odontoblasts layer collapse and, prevailing favorable conditions for pulp vitality, a new generation of undifferentiated cells starts to act [2], initiating a cascade of signalization that ultimate leads to differentiation in odontoblast-like cells that start to secrete dentin matrix. Recent evidences from literature showed the presence of viable mesenchymal stem cells (MSCs) in the pulp of both permanent and deciduous teeth affected by active caries lesions [3, 4].

Cavity preparations and restorative materials used to treat the caries lesions can also result in pulpal repercussions. When a restorative intervention is performed, the viability of pulp stem cells can be influenced by restorative materials and adhesive systems [5, 6, 7] used. Chemical products, such as residual monomers, influence stem cells via apoptosis, gene alteration and decreased cell proliferation [8], especially when these products are applied in deep dentin, where dentin permeability is higher.

The contemporary approach of managing carious lesions recommends that in deep lesions of vital teeth, preserving pulpal health should be prioritized. The technique involves selective removal to soft dentin over the pulp site to avoid its exposure, while the cavity margins (i.e., peripheral dentin) are left firm (scratchy) dentin [9]. Studies have shown that the remaining carious tissue becomes more hardened, darkened and less contaminated [10, 11], regardless of the use of calcium hydroxide liner [12, 13].

However, it remains unclear how the interaction between residual bacterial metabolites and the inflammatory products, coming from both the carious process and the restorative procedure, affect MSC activities. Therefore, the present study aims to evaluate the effect of Selective Caries Removal (SCR) on the immunophenotypic characteristics, potential for differentiation and cell viability presented by Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHEDs).

## **Materials and methods**

### *Ethics statement*

All the procedures were performed in accordance with the ethical standards of the Resolution of the National Council on Ethics in Research (n° 466/2012) and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included. The protocol of this research was approved by the Ethics Committee (n° 685.656) of Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil.

### *Samples*

Deciduous teeth with at least 1/3 of physiologic root resorption and with previous indication of extraction were selected for the sound (n=9) and the SCR groups (n=3), from 8 donors aged 7 to 12 years. All the procedures were conducted at the Children and Youth Dental Clinic, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. The inclusion criteria for Selective Caries Removal (SCR) group were as follows: teeth that present adequate restoration at the time of the extraction, with no signs of adjacent carious lesion or signs of pain, no history of dental trauma, no signs of ankylosis or radiolucency at the furcation and/or periapical region on the radiographic exam and at least 1/3 of root resorption, taking into account the formation stage of the permanent tooth germ, which should be at least in the 8<sup>th</sup> stage of Nolla [14]. Before the extractions, the teeth were cleaned with 0,12% chlorhexidine solution.

### *Isolation and cell culture*

Immediately after the extraction, the teeth were placed into a Falcon tube containing 2 mL of cool culture medium - Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) - supplemented by 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 1% by Penicillin-Streptomycin (Gibco, Grand Island, NY). In a laminar flow, the dental pulp tissue was separated from the dentinal walls by using endodontic files or dentine spoons, and the cells were retrieved by enzymatic digestion. These procedures were performed up to 24h after tooth extraction. Briefly, the dental pulp

was placed into a 0.2% type I collagenase solution (Gibco, Grand Island, NY) for 60 min in a 37°C bath and centrifuged (4°C, 800×g/10min). The supernatant was discarded and the remaining pellet was resuspended and seeded onto a 48-well plate. The culture medium was changed every 3 or 4 days. Cell suspensions were seeded onto new plates, respecting the proportion of 5.000 cells/cm<sup>2</sup>. When the cells were not present after 30 days, the well was inactivated and the culture registered as a failure. All the tests were carried out with the cells between third (P3) and fifth passage (P5). During this whole period, the cells were incubated in a 37°C and 5% CO<sub>2</sub> environment.

#### *Flow cytometric analysis*

A total of 10<sup>5</sup> cells of each sample (n=9) were incubated with the following types of conjugated antibodies: CD14/FITC, CD29/PE, CD34/PE, CD45/FITC, CD73/PE, CD90/FITC, CD184/PE, HLA-DR/FITC, and STRO-1/PE from BD (Becton Dickinson, USA). Unstained cells and cells labeled with mouse IgG1 isotype control conjugated with PE and FITC were used as controls. Only living cells were analyzed (7AAD positive cells (Invitrogen™). Data was acquired using the FACSCanto™ II flow cytometer (BD Bioscience) and 20,000 events were analyzed.

#### *In vitro multipotent assay*

A total of 10<sup>4</sup> cells from both groups (n=9) were seeded onto 48-well plates and cultivated in a regular medium Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) low glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab, Brazil), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (P/S, Sigma-Aldrich®, USA); until confluence reached 80%. Then, cells were exposure to osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation inducing medium, as previously described [4]. After 30 days cells were fixed in 4% paraformaldehyde and staid with Alizarin red, Alcian blue and Oil-Red-O to verify osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation respectively. The cells cultured in a regular culture medium, during the same period, were used as control. The cultures were observed

microscopically. The experiments were performed in triplicate for each sample to verify reproducibility of results.

#### *Cell viability assay*

Cell viability was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. A total of  $5 \times 10^3$  cells/well of each sample (n=9) were seeded a 96-well plate and incubated with 200  $\mu$ L of 0.25 mg/mL MTT. Four hours later, the supernatant was carefully removed and dimethyl sulfoxide (DMSO, 200  $\mu$ L) was added to each well to dissolve the formed crystals. Next, 200  $\mu$ L of the colored solution was transferred for absorbance analysis at 570nm and 630nm in the molecular devices SpectraMax® 250 Microplate Spectrophotometer – the results were calculated by the absorbance label subtraction. Tests were performed according to the manufacturer's instructions, in triplicate. The analysis of absorbance was performed on days 1, 3, and 7 after seeding. Three wells filled with MTT without cells were used as background. Proliferation was also evaluated by using the mean time (days) between the cell isolation and the third passage.

#### *Statistical analysis*

Mann Whitney test was used to evaluate the fluorescence means for each surface marker in the flow cytometry analysis, time-course proliferation assay for the comparison between groups and to compare the mean time between isolation and the third passage. The time-course proliferation assay for the comparison within groups was analyzed using Friedman test. The statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2011) at 95% significance level.



## Results

### *Sample and establishment of cultures*

The full description of the sample is presented in Table 1. In this study, a cell culture was considered a successful outcome when adherent isolated or grouped cells were seen at the base of the well, within 30 days after isolation and reached confluence for the passage. Therefore, the isolation of the cells was considered successful in 6 of the 9 cultures (66.7%) of the sound group. Two cultures didn't settle and 1 presented a different morphology and behavior and were excluded. Of the two cultures that did not settle, one tooth was a central upper incisor and the other was a second upper molar, both with 2/3 root resorption. The average time for the first passage was  $11.8 \pm 3.8$  days. For the SCR group, all the cultures (100%) were considered successful and the average time for the first passage was  $9.7 \pm 4.5$  days. Cells from both groups presented the capacity for a plastic attachment as well as with the expected morphology of spindle-shaped cytoplasm

### *Flow cytometry analysis*

For both groups, all the cells were positive for CD29, CD73 and CD90 and negative for hematopoietic markers (CD14, CD34, CD45 and HLA-DR). There was no difference ( $p > 0.05$ ) in fluorescence mean between the sound and SCR group for the tested surface markers. The mean expression of STRO-1 was higher in the sound group, but also did not represent a significant difference ( $p = 0.3$ ). The low expression of 7AAD indicates that only a small percentage of the cells analyzed were not viable (Figure 1 and Table 2).

### *In vitro multipotent assay*

To evaluate the multipotent capacity, both groups were treated with differentiation inducing media. Osteogenic differentiation was indicated by detection of mineralized nodules by Alizarin Red after 3 weeks of culture. Following the induction of adipogenic differentiation, the accumulation of lipid-rich vacuoles was visualized within cells by Oil Red O staining. The induction of chondrogenic differentiation was demonstrated by the extracellular matrix stained by Alcian blue. The negative control, consisting of the cells

of both groups cultured in a regular culture medium, showed no differentiation (Figure 2).

#### *MTT assay*

The increase of cell number resulted in the increase of absorbance values (Figure 3). The cells from both groups presented an exponential growth from day 1 to day 7. For the sound group, absorbance values ranged from 0.09 on the first day to 0.31 on the 7<sup>th</sup> day, and from 0.11 to 0.36 in SCR group. There was no significant difference in all the period evaluated between the groups ( $p>0.05$ ). Sound and SCR groups showed a significantly higher viability in the 7<sup>th</sup> day ( $p=0.02$  and  $p=0.04$ , respectively). The mean time (days) between isolation and the third passage was 27.5 ( $\pm 6.73$ ) for sound and 31 ( $\pm 1.4$ ) for SCR group and there was no difference between groups ( $p=0.71$ ).

## Discussion

In our study, we successfully isolated stem cells from deciduous teeth submitted to SCR. Flow cytometric analysis showed that there was no significant difference in immunophenotypic characteristics between cells from sound and SCR teeth. Regarding the potential for differentiation and viability, both groups presented similar results. Until now, this is the first study in the literature that has been proposed to isolate pulp cells from deciduous teeth submitted to SCR and subsequent restoration.

The contemporary approach of managing carious lesions recommends that in deep lesions of vital teeth, preserving pulpal health should be prioritized. It is well established in the literature that leaving a contaminated dentin under the restoration, as proposed by selective carious removal technique, do not impair the lesion arrestment and the maintenance of pulp vitality [13, 15-18]. There is already evidence in the literature that demonstrates clinical and radiographic success of SCR in both deciduous [20, 21] and permanent teeth [22]. In addition, the findings of the present study suggest that even with the presence of an infected dentin on the basis of a restoration, the mesenchymal stem cell population of the pulp tissue was maintained. This portrays the reactivity potential of the dental pulp, indicating that the pulp of teeth with SCR remains vital after the restorative procedure and has the ability to maintain viable stem cells until the tooth reaches full rhizolysis.

The International Society of Cellular Therapy (ISCT) proposed a set of standards to define human MSCs for both laboratory-based scientific investigations and for pre-clinical studies [23]. First, MSCs must be plastic-adherent when maintained in standard culture conditions using tissue culture flasks. In our study, all the cultures fulfilled this requirement. Second, the MSC population must undergo to a phenotype analysis. There are no specific surface marker characterizing SHEDs, but typical markers of MSCs were established, such as CD29, CD73 and CD90 [7]. Both groups (sound and SCR) were positive for these markers, and there was no difference in the fluorescence mean between groups. For negative control CD14, CD34, CD45, CD184 and HLA-DR were used and both groups presented a low mean of fluorescence for these surface markers, which are in accordance with previous studies [3, 4, 24]. The fluorescence for STRO-1 marker was low for both groups, corroborating the findings from previous studies with stem cells obtained from carious deciduous [4] and permanent teeth [25, 26], [25]. There was a small

percentage of dead cells (7AAD positive) for both groups, indicating an adequate cell viability (with intact membranes) [27].

The biologic property that most uniquely identifies MSCs is their capacity for trilineage mesenchymal differentiation. Cells must be shown to differentiate to osteoblasts, adipocytes and chondroblasts using standard *in vitro* tissue culture-differentiating conditions [23]. Like similar studies [3, 4, 5, 24], cells from both groups were capable to differentiate in these three lineages. This cell capacity was similar in both groups, suggesting that the SCR and subsequent restoration of the teeth did not impair the capacity of the stem cells to differentiate.

As indicated by MTT assay, the viability and proliferation rate were similar between the groups. Werle and colleagues who isolated stem cells from the pulp of carious deciduous teeth found similar results. It was observed that the previous aggression to the dental pulp caused by the inflammatory process triggered by the caries activity did not modify the biology of the cells, allowing the maintenance of its viability. Previous studies [5, 6] evaluating the cytotoxicity of restorative materials suggested that, especially in deep caries lesions where all carious tissue is removed, the material could interfere in cell proliferation but not on its ability to differentiate. According to our results, neither the affected dentin layer nor the restorative material used has influenced cell proliferation or differentiation. It can be thought that the layer of infected dentin left below the restoration may have contributed to the protection against the cytotoxic potential of the adhesive system and restorative material, since its presence limits communication with the dental pulp.

Although, the results of the present study should be viewed in light of its possible methodological limitations. The total success obtained in the isolation of teeth in this group may have been due to the smaller sample number. This was due the difficulty to find teeth with SCR that fit the inclusion criteria. Regarding cell proliferation, Bernardi and colleagues suggest that root resorption may exacerbate the activation process of SHEDs [24]. Thus, when comparing the groups, this can be considered a confounding factor, masking the influence of SCR on the proliferation rate. Also, there are other methodologies that could be used to confirm the influence of SCR on SHEDs, such as gene expression analysis and cellular senescence.

In conclusion, the stem cells from the pulp of teeth submitted to SCR and subsequent restoration exhibit similar properties to those cells obtained from the pulp of sound deciduous teeth. The layer of infected dentin left in the base of adhesive restorations besides allowing the maintenance of the pulp vitality, did not cause interferences in the immunifenytypic characteristics, potential of proliferation and viability of mesenchymal stem cells present in the dental pulp. Thus, dental pulp from SCR deciduous teeth could also be used as a source of stem cells.

### **Compliance with Ethical Standards**

Conflict of Interest: Paola Arosi Bottezini declares that she has no conflict of interest. Natasha Maurmann declares that she has no conflict of interest. Fabiane Spagnol declares that she has no conflict of interest. Patricia Pranke declares that she has no conflict of interest. Luciano Casagrande declares that he has no conflict of interest.

Funding: The work was supported by the Stem Cell Research Institute, Brazil and the National Council for Scientific and Technological Development—CNPq (Universal 14/2014, process n. 444311/2014-9).

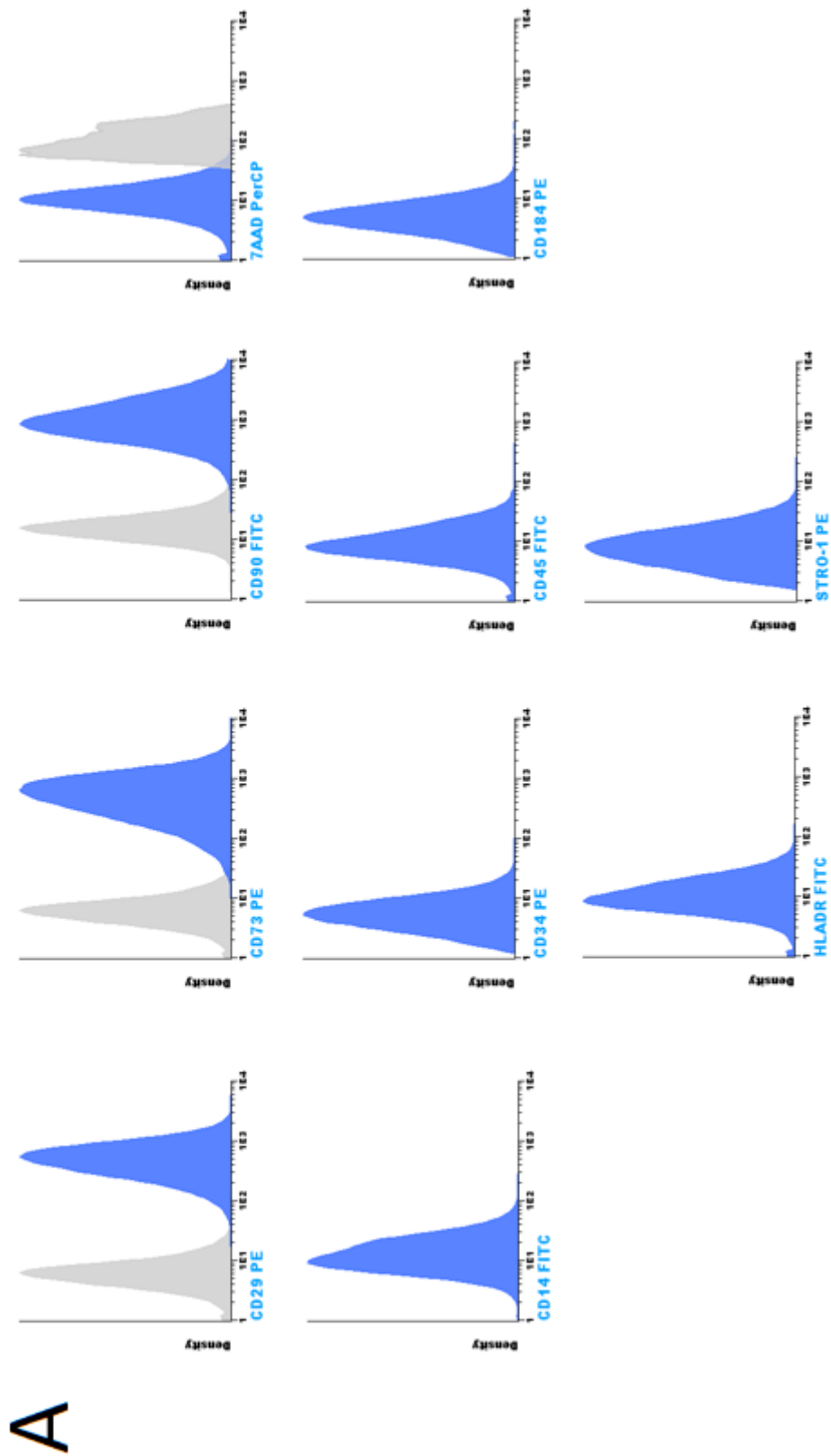
Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

**Table 1.** Sample characteristics.

	<b>Sound group (SD)</b>	<b>SCR group (SD)</b>
<b>Donor age</b>	10,4 (2,06)	10,7 (0,94)
<b>Type of teeth</b>		
Incisor or canine	4/9	-
Molar	5/9	3/3
<b>Mean time (years) between SCR and dental extraction</b>	-	3,08
<b>Root resorption level</b>		
TR	5/9	-
1/3	3/9	3/3
2/3	1/9	-
<b>Isolated/culture success</b>	6/9	3/3
<b>Period (days) until first passage</b>	11,83 (3,76)	9,66 (4,5)

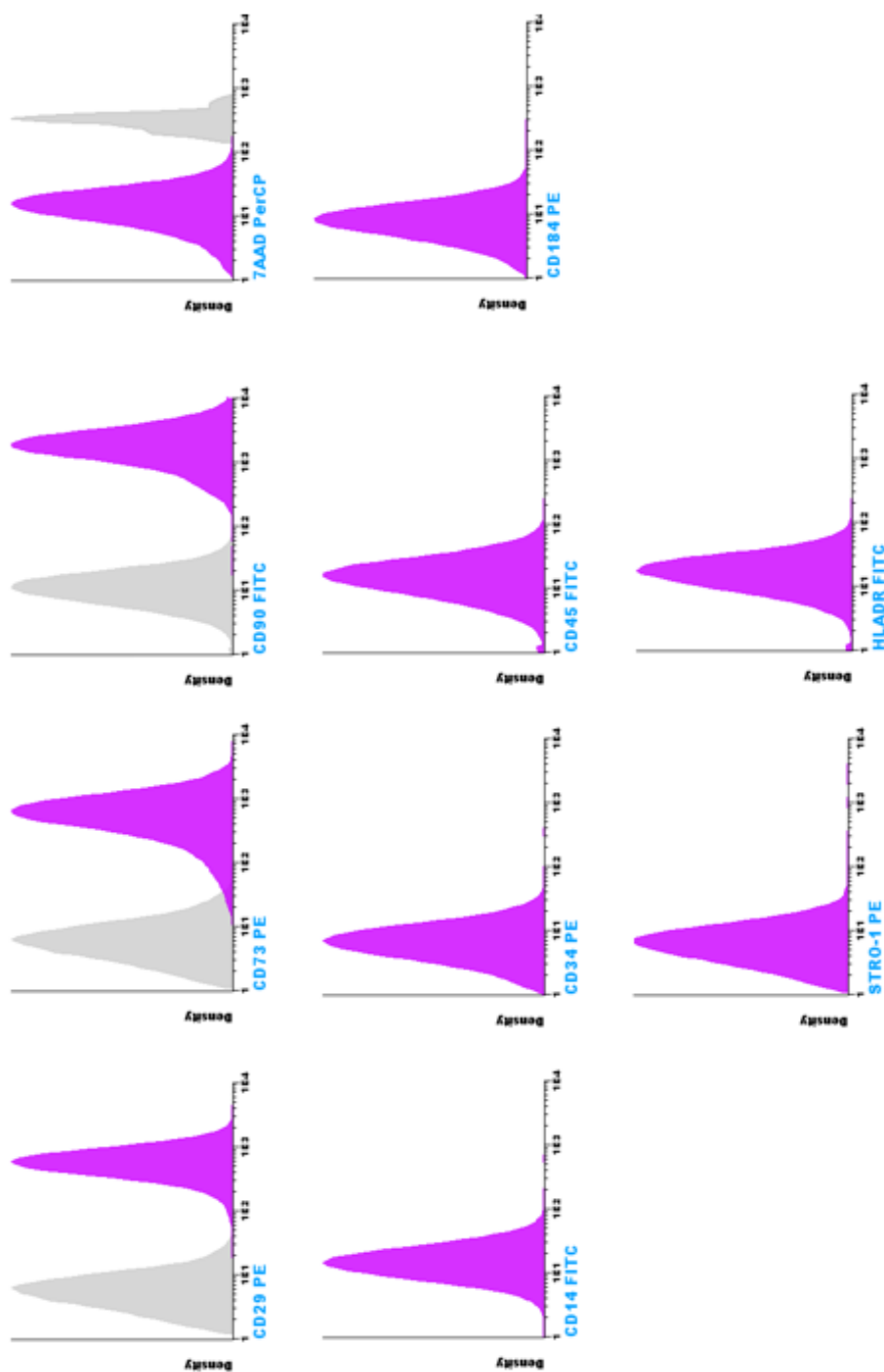
**TR:** root totally resorbed; **1/3:** 1/3 remaining root; **2/3:** 2/3 remaining root



**Figure 1A.** Surface marker expression profile of cells from sound group.



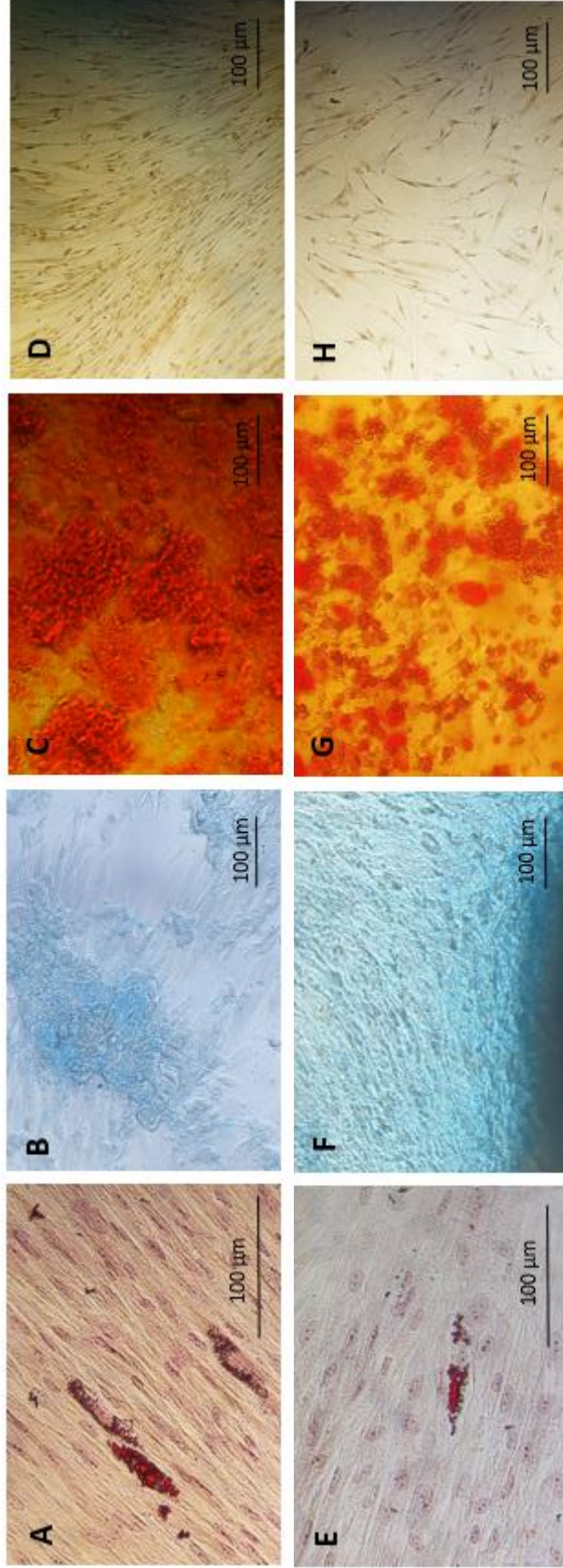
**B**



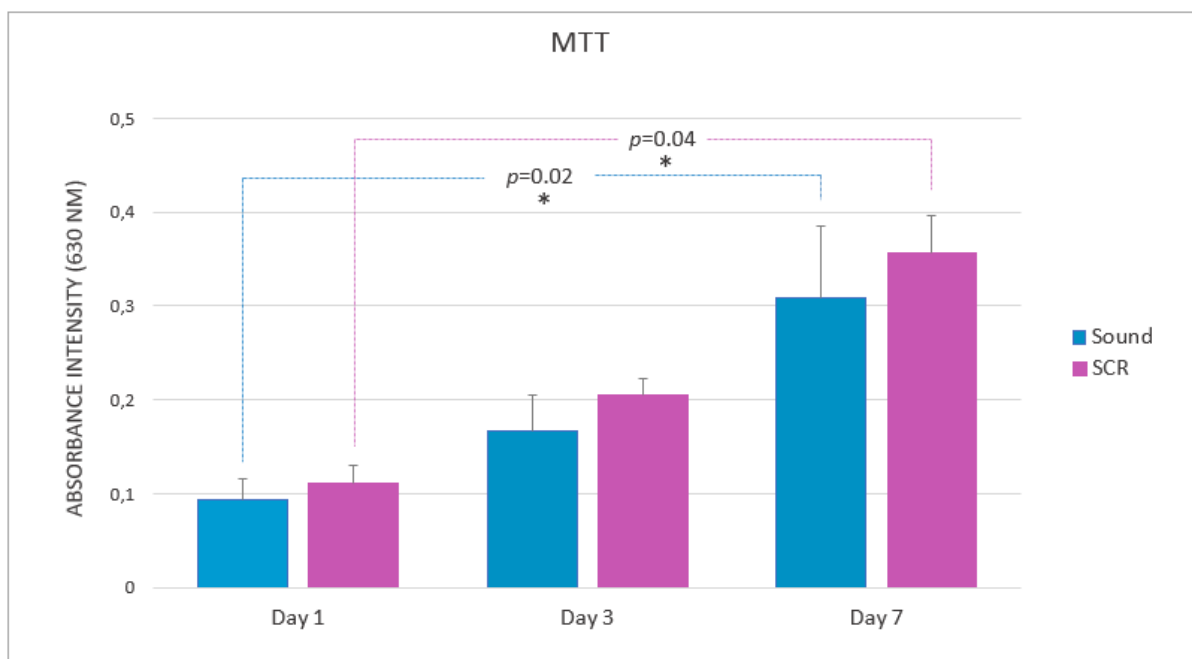
**Figure 1B.** Surface marker expression profile of cells from SCR group.

**Table 2.** Surface markers expressed by means (standard deviation) for both groups. No statistical difference was observed between the groups.

	<b>Sound Mean (SD)</b>	<b>SCR Mean (SD)</b>	<b>P value</b>
<b>CD29</b>	575.44 (334.985)	592.786 (314.712)	<i>p</i> = 0.7
<b>CD73</b>	685.315 (527.053)	711.137 (511.463)	<i>p</i> = 0.9
<b>CD90</b>	1.233,673 (857.697)	1.645,802 (1.187,048)	<i>p</i> = 0.09
<b>CD14</b>	17.290 (9.972)	17.523 (10.371)	<i>p</i> = 1.0
<b>CD34</b>	7.408 (4.810)	7.677 (5.010)	<i>p</i> = 1.0
<b>CD45</b>	14.351 (9.140)	16.764 (10.458)	<i>p</i> = 0.5
<b>CD184</b>	6.770 (4.629)	8.355 (5.371)	<i>p</i> = 0.2
<b>HLA-DR</b>	24.485 (14.452)	19.041 (11.058)	<i>p</i> = 0.9
<b>STRO-1</b>	11.372 (6.780)	9.160 (5.687)	<i>p</i> = 0.3
<b>7AAD</b>	12.597 (8.118)	12.707 (8.638)	<i>p</i> = 0.7



**Figure 2.** *In vitro* multipotent assay. Adipogenic differentiation shown by oil red staining lipid vacuoles in the sound (A) and SCR (E) groups. Chondrogenic differentiation visualized by alcian blue staining of the glycosaminoglycans matrix deposits in the sound (B) and SCR (F) groups. Osteogenic differentiation showing calcium wide sheets stained with alizarin red in the sound (C) and SCR (G) groups. Pulp cell culture without induction medium for negative control for the sound (D) and SCR (H) groups. No visible differences were found between the groups.



**Figure 3.** Cell viability and proliferation assay. The asterisks indicate statistically significant difference within the sound ( $p=0.02$ ) and SCR ( $p=0.04$ ) group during the experiment time-course.

## References

1. Horst OV, Horst JA, Samudrala R, Dale BA. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMC Immunol.* 24, 12:9, 2011.
2. Frozoni M, Zaia A.A., Line S.R.P., Mina M. Analysis of the Contribution of Nonresident Progenitor Cells and Hematopoietic Cells to Reparative Dentinogenesis Using Parabiosis Model in Mice. *J Endod.* 38(9):1214–1219, 2012.
3. Ma D, Gao J, Yue J, Yan W, Fang F, Wu B. Changes in Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells from Deep Caries In Vitro. *Journal of Endodontics.* 38(6):796-802, 2012.
4. Werle SB, Lindemann D, Steffens D, Demarco FF, Araújo FB, Pranke P, Casagrande L. Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clin Oral Invest.* 20:75-81, 2016.
5. Luft AN, Kannan TP, Fazliah MN, Jamaruddin MA, Saidi J. Proliferative activity of cells from remaining dental pulp in response to treatment with dental materials. *Australian Dental Journal.* 55:79-85, 2010.
6. Trubiani O, Caputi S, Di Iorio D, D'Amario M, Paludi M, Giancola R, Di Nardo Di Maio F, De Angelis F, D'Arcangelo C. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 43(8):646-53, 2010.
7. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, Markovic D, Zdravkovic N, Tesic Z, Lukic A. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Med Chem.* 8(1):40-5, 2012.
8. Krifka S1, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials.* 34(19):4555-63, 2013.
9. Schwendicke et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Advances in Dental Research.* 28(2):58-67, 2016.
10. Dalpian DM, Casagrande L, Franzon R, Dutra GM, de Araujo FB. Dentin microhardness of primary teeth undergoing partial carious removal. *J Clin Pediatr Dent.* 36(4):363-7, 2012.
11. Franzon R, Gomes M, Pitoni CM, Bergmann CP, Araujo FB. Dentin rehardening after indirect pulp treatment in primary teeth. *J Dent Chil.* 76:223-8, 2009.
12. Pinto AS, de Araújo FB, Franzon R, Figueiredo MC, Henz S, García-Godoy F, Maltz M. Clinical and microbiological effect of calcium hydroxide protection in indirect pulp capping in primary teeth. *Am J Dent.* 19(6):382-6, 2006.

13. Franzon R, Casagrande L, Pinto AS, García-Godoy F, Maltz M, de Araujo FB. Clinical and radiographic evaluation of indirect pulp treatment in primary molars: 36 months follow-up. *Am J Dent*. 20(3):189-92, 2007.
14. Toledo, Orlando Ayrton de. Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica. 4ed. Rio de Janeiro: Meebok. 432p, 2012.
15. Casagrande L, Bento LW, Dalpian DM, Garcia-Godoy F, de Araujo FB. Indirect pulp treatment in primary teeth: 4-year results. *American Journal of Dentistry*. 23:34-8, 2010.
16. Bjorndal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjaeldgaard M, Nasman P, et al. Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *European Journal of Oral Sciences*. 118:290-7, 2010.
17. Maltz M, Alves LS, Jardim JJ, Moura Mdos S, de Oliveira EF. Incomplete caries removal in deep lesions: a 10-year prospective study. *American Journal of Dentistry*. 24:211-4, 2011.
18. Maltz M, Jardim JJ, Mestrinho HD, Yamaguti PM, Podesta K, Moura MS, et al. Partial removal of carious dentine: a multicenter randomized controlled trial and 18-month follow-up results. *Caries Research*. 47:103-9, 2013.
19. Orhan AI, Oz FT, Orhan K. Pulp exposure occurrence and outcomes after 1-or 2-visit indirect pulp therapy vs complete caries removal in primary and permanent molars. *Pediatric Dentistry*. 32:347-55, 2010.
20. Franzon R, Guimaraes LF, Magalhaes CE, Haas AN, Araujo FB. Outcomes of one-step incomplete and complete excavation in primary teeth: a 24-month randomized controlled trial. *Caries Research*. 48:376-83, 2014.
21. Dalpian DM, Ardenghi TM, Demarco FF, Garcia-Godoy F, Araujo FB, Casagrande L. Clinical and radiographic outcomes of partial caries removal restorations performed in primary teeth. *Am J Dent*. 27(2):68-72, 2014.
22. Maltz, M. Alves LS. Incomplete caries removal significantly reduces the risk of pulp exposure and post-operative pulpal symptoms. *J Evid Based Dent Pract*. 13(3):120-2, 2013.
23. Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy Bymonthly*. 8(4):315-7, 2006.
24. Bernardi L, Luisi SB, Fernandes R, Dalberto TP, Valentim L, Bogo Chies JA, Medeiros Fossati AC, Pranke P. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod*. 37(7):973-9, 2011.
25. Wang Z, Pan J, Wright JT, Bencharit S, Zhang S, Everett ET. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *J Endod*. 36:820-825, 2010.

26. Pereira LO, Rubini MR, Silva JR, Oliveira DM, Silva IC, Poças-Fonseca MJ. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *Int Endod J*. 45:1080–1090, 2012.
27. Chan LL, McCulley, Kessel SL. Assessment of Cell Viability with Single-, Dual-, and Multi-Staining Methods Using Image Cytometry. *Methods Mol Biol*. 1601:27-41, 2017.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo, pode-se concluir que foi possível isolar e cultivar CTMs a partir de dentes decíduos que foram submetidos à técnica RSTC e subsequente tratamento restaurador. Os resultados parciais obtidos mostraram que CTMs obtidas a partir de dentes decíduos hígidos puderam ser isoladas com uma taxa de sucesso de 66,6%, enquanto que células obtidas de dentes decíduos submetidos a RSTC foram isoladas com 100% de sucesso.

Células de ambos os grupos preencheram os critérios estabelecidos por Dominici e colaboradores (2006) para que pudessem ser classificadas como células-tronco mesenquimais. Em cultura, se mostraram aderentes ao plástico e apresentaram a morfologia de citoplasma fibroblastóide esperada. Todas as culturas foram positivas para os marcadores de superfície celular usualmente utilizados para caracterização de células-tronco mesenquimais (CD29, CD73, CD90) e negativas para os marcadores de células-tronco hematopoiéticas (CD14, CD34, CD45, CD184 e HLA-DR). Culturas de ambos os grupos apresentaram capacidade multipotente, diferenciando-se nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica quando devidamente estimuladas. Em relação à proliferação, o crescimento foi semelhante entre os grupos, havendo diferença apenas na análise intragrupos entre os dias 1 e 7.

Desta forma, pode-se concluir que CTMs da polpa de dentes decíduos submetidos à RSTC e ao tratamento restaurador, exibiram características semelhantes às células obtidas de dentes decíduos hígidos. Sugere-se que dentes submetidos à RSTC podem representar uma fonte viável de obtenção de CTMs.



## REFERÊNCIAS

- Angelova A, Takagi Y, Okiji T, Kaneko T, Yamashita Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Archives of Oral Biology*. 49:29-36, 2004.
- Araújo FB. Estudo morfológico, histométrico e histoquímico da polpa de molares decíduos em diferentes fases de reabsorção radicular. 1982. 126p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.
- Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent*. 33(4):289-94, 2009.
- Balic A, Aguila HL, Caimano MJ, Francone VP, Mina M. Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *National Institutes of Health*. 46(6):1639-51, 2011.
- Bernardi L, Luisi SB, Fernandes R, Dalberto TP, Valentim L, Bogo Chies JA, Medeiros Fossati AC, Pranke P. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod*. 37(7):973-9, 2011.
- Bjorndal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjaeldgaard M, Nasman P, et al. Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *European Journal of Oral Sciences*. 118:290-7, 2010.
- Casagrande L, Bento LW, Dalpian DM, Garcia-Godoy F, de Araujo FB. Indirect pulp treatment in primary teeth: 4-year results. *American Journal of Dentistry*. 23:34-8, 2010.
- Chan LL, McCulley, Kessel SL. Assessment of Cell Viability with Single-, Dual-, and Multi-Staining Methods Using Image Cytometry. *Methods Mol Biol*. 1601:27-41, 2017.
- Dalpian DM, Ardenghi TM, Demarco FF, Garcia-Godoy F, Araujo FB, Casagrande L. Clinical and radiographic outcomes of partial caries removal restorations performed in primary teeth. *Am J Dent*. 27(2) 68-72, 2014.
- Dalpian DM, Casagrande L, Franzon R, Dutra GM, de Araujo FB. Dentin microhardness of primary teeth undergoing partial carious removal. *J Clin Pediatr Dent*. 36(4) 363-7, 2012.
- Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy Bymonthly*. 8(4):315-7, 2006.
- Estrela, C. Ciência Endodôntica. São Paulo: Artes Médicas, 2007. 1010p.
- Fitzmoons REB, Mazurek MS, Soos A. Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells International*. August, 2018.

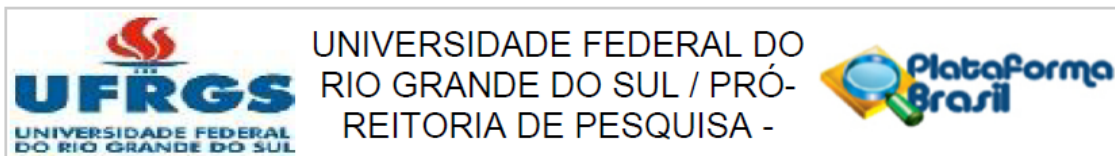
- Franzon R, Casagrande L, Pinto AS, García-Godoy F, Maltz M, de Araujo FB. Clinical and radiographic evaluation of indirect pulp treatment in primary molars: 36 months follow-up. *Am J Dent.* 20(3):189-92, 2007.
- Franzon R, Guimarães LF, Magalhães CE, Haas AN, Araujo FB: Outcomes of one-step incomplete and complete excavation in primary teeth: a 24-month randomized controlled trial. *Caries Res.* 48:376–383, 2014.
- Franzon R, Gomes M, Pitoni CM, Bergmann CP, Araujo FB. Dentin rehardening after indirect pulp treatment in primary teeth. *J Dent Chil.* 76:223-8, 2009.
- Frozoni M, Zaia A.A., Line S.R.P., Mina M. Analysis of the Contribution of Nonresident Progenitor Cells and Hematopoietic Cells to Reparative Dentinogenesis Using Parabiosis Model in Mice. *J Endod.* 38(9):1214–1219, 2012.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 97(25):13625-30, 2000.
- Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res.* 58(2):137-47, 2008.
- Horst OV, Horst JA, Samudrala R, Dale BA. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMC Immunol.* 24, 12:9, 2011.
- Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, Markovic D, Zdravkovic N, Tesic Z, Lukic A. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Med Chem.* 8(1):40-5, 2012.
- Krifka S1, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials.* 34(19):4555-63, 2013.
- Luft AN, Kannan TP, Fazliah MN, Jamaruddin MA, Saidi J. Proliferative activity of cells from remaining dental pulp in response to treatment with dental materials. *Australian Dental Journal.* 55:79-85, 2010.
- Ma D, Cui L, Gao J, Yan W, Xu S, Wu B. Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Normal and Deep Carious Dental Pulp. *PLOS ONE.* 9(5):9726, 2014.
- Ma D, Gao J, Yue J, Yan W, Fang F, Wu B. Changes in Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells from Deep Caries In Vitro. *Journal of Endodontics.* 38(6):796-802, 2012.
- Maltz, M. Alves LS. Incomplete caries removal significantly reduces the risk of pulp exposure and post-operative pulpal symptoms. *J Evid Based Dent Pract.* 13(3):120-2, 2013.
- Maltz M, Alves LS, Jardim JJ, Moura Mdos S, de Oliveira EF. Incomplete caries removal in deep lesions: a 10-year prospective study. *American Journal of Dentistry.* 24:211-4, 2011.

- Maltz M, Jardim JJ, Mestrinho HD, Yamaguti PM, Podesta K, Moura MS, et al. Partial removal of carious dentine: a multicenter randomized controlled trial and 18-month follow-up results. *Caries Research*. 47:103-9, 2013.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad*.100(10):5807-12, 2003.
- Mjor IA. Dentin–predentin complex and its permeability: physiologic overview. *Journal of Dental Research*. 64:621–7, 1985.
- Monteiro J, Day P, Duggal M, Morgan C, Rodd H. *International Journal of Pediatric Dentistry*. 19:16-25, 2009.
- Nanci, Antonio. Ten Cate – Histologia Oral. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- Orhan AI, Oz FT, Orhan K. Pulp exposure occurrence and outcomes after 1-or 2-visit indirect pulp therapy vs complete caries removal in primary and permanent molars. *Pediatric Dentistry*. 32:347-55, 2010.
- Pereira LO, Rubini MR, Silva JR, Oliveira DM, Silva IC, Poças-Fonseca MJ. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *Int Endod J*. 45:1080–1090, 2012.
- Petrovic V, Stefanovic V. Dental Tissue – New source of Stem Cells. *The Scientific World Journal*. 9:1167-77, 2009.
- Pinto AS, de Araújo FB, Franzon R, Figueiredo MC, Henz S, García-Godoy F, Maltz M. Clinical and microbiological effect of calcium hydroxide protection in indirect pulp capping in primary teeth. *Am J Dent*. 19(6): 382-6, 2006.
- Ricketts, DN. et al. Operative caries management in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.*, Oxford. 3(3), 2013.
- Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, Lee JS, Shi S. SHED repair critical-size calvarian defects in mice. *Oral Diseases*. 14:428-434, 2008.
- Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Yagasaki H, Deguchi T, Suzuki K. A Histological Study of the Exfoliation of Human Deciduous Teeth. *Journal of Dental Research*. 72(3):634-640, 1993.
- Schwendicke et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Advances in Dental Research*. 28(2):58-67, 2016.
- Schwendicke, F.; Dorfer, C.E.; Paris, S. Incomplete caries removal: a systematic review and meta-analysis. *J. Dent. Res*. 92(4):306-314, 2013.
- Toledo, Orlando Ayrton de. Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica. 4ed. Rio de Janeiro: Meebok. 432p, 2012.
- Trubiani O, Caputi S, Di Iorio D, D'Amario M, Paludi M, Giancola R, Di Nardo Di Maio F, De Angelis F, D'Arcangelo C. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 43(8):646-53, 2010.

Wang Z, Pan J, Wright JT, Bencharit S, Zhang S, Everett ET. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *J Endod.* 36:820–825, 2010.

Werle SB, Lindemann D, Steffens D, Demarco FF, Araújo FB, Pranke P, Casagrande L. Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clin Oral Invest.* 20:75-81, 2016.

## Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFEITO DA REMOÇÃO PARCIAL DE DENTINA CARIADA NAS CARACTERÍSTICAS IMUNOFENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS APRESENTADAS POR CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS

**Pesquisador:** Luciano Casagrande

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 31022114.0.0000.5347

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 685.656

**Data da Relatoria:** 05/06/2014

#### **Apresentação do Projeto:**

O projeto está apresentado de forma completa e clara. Trata de assunto contemporâneo que, além de utilizar um marcador importante (células-tronco) de reposta terapêutica, é de natureza conservadora e vem ao encontro da tendência de atendimento Odontológico, principalmente no que se refere à proteção do complexo pulpar através da remoção parcial de tecido cariado. O projeto encontra-se bem fundamentado e adequadamente descrito.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o efeito da remoção parcial de dentina cariada nas características apresentadas por células tronco mesenquimais da polpa de dentes decíduos humanos.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Apresentados adequadamente, tanto no texto principal quanto nos documentos TCLE.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa de cunho laboratorial, com análise de procedimentos clínicos realizados anteriormente.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos estão apresentados de forma completa e adequada.

#### **Recomendações:**

Os autores atenderam à solicitação constante no relatório anterior, de identificar o local de realização da análise laboratorial, bem como o termo de concordância do laboratório. Nesta versão, a documentação está apresentada de forma completa.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não existem inadequações ou pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

PORTO ALEGRE, 12 de Junho de 2014

---

**Assinado por:**  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
**(Coordenador)**

<b>Endereço:</b> Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
<b>Bairro:</b> Farroupilha <b>CEP:</b> 90.040-060
<b>UF:</b> RS <b>Município:</b> PORTO ALEGRE
<b>Telefone:</b> (51)3308-3738 <b>Fax:</b> (51)3308-4085 <b>E-mail:</b> <a href="mailto:etica@propesq.ufrgs.br">etica@propesq.ufrgs.br</a>

## **Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre Esclarecido**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOPEDIATRIA

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **Pesquisa**

#### ***“EFEITO DA REMOÇÃO PARCIAL DE DENTINA CARIADA NAS CARACTERÍSTICAS IMUNOFENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS APRESENTADAS POR CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS”***

Elaborado com base na Resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde, publicada no DOU Nº 112, 2013.

O presente termo, elaborado pelo dentista e pesquisador Luciano Casagrande, tem por objetivo convidar a criança a participar deste projeto. Os procedimentos clínicos serão realizados no ambulatório da Clínica Infanto-Juvenil da Faculdade de Odontologia da UFRGS pelos alunos ou dentistas e consistirão na extração do dente. A técnica de extração dentária será a mesma utilizada habitualmente no ambulatório da Clínica Infanto-Juvenil desta faculdade.

Esta autorização deverá ser dada com o conhecimento do Sr. (da Sr<sup>a</sup>) sobre todos os procedimentos a serem executados e seus objetivos, no uso de sua liberdade e sem sofrer qualquer tipo de pressão. Sua participação é voluntária.

Toda e qualquer dúvida será esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa. Fica, ainda, assegurada a sua liberdade em recusar a participação no estudo. Não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum momento da pesquisa.

**OBJETIVO:** Avaliar o efeito da restauração nas células-tronco que existem no dente.

**BENEFÍCIOS PREVISTOS PARA OS PACIENTES ENVOLVIDOS:** Todos os pacientes receberão o tratamento (extração dental) conforme o diagnóstico de necessidade de extração dental realizado por dentistas não vinculados ao projeto. Aqueles que apresentem necessidade de outros tratamentos serão informados e encaminhados segundo possibilidade de atendimento. Os responsáveis receberão informações quanto ao sucesso dos procedimentos realizados. Os resultados desta pesquisa poderão beneficiar a utilização das células-tronco em pacientes.

**RISCOS PREVISTOS PARA OS PACIENTES ENVOLVIDOS:** Poderá haver desconforto durante o exame radiográfico e a extração dental. Para diminuir possível desconforto, todos os procedimentos serão realizados assegurando o correto posicionamento durante a consulta, assim como o uso de materiais esterilizados, equipamentos de radioproteção, tomando os devidos cuidados de biossegurança e sob anestesia local adequada. A qualquer momento você poderá desistir desta pesquisa caso haja alguma situação de desconforto.

Os pesquisadores garantem a manutenção do sigilo e da privacidade de cada participante quando da divulgação dos resultados desta pesquisa.

Eu autorizo o uso do dente da criança por quem sou responsável em outra pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética e pesquisa-UFRGS:    ( ) Sim    ( ) Não

Eu, \_\_\_\_\_ como responsável pelo (a) menor \_\_\_\_\_, declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, autorizo meu (minha) filho (a), ou criança pela qual sou legalmente responsável, a participar do estudo, assim como, doar seu dente de leite depois da extração. Estou ciente de que posso a qualquer momento retirar a presente autorização por minha livre vontade e sem qualquer prejuízo aos menores envolvidos, bastando para isso comunicar o dentista acima citado.

Este documento foi elaborado em duas vias e é assinado pelo participante e pelo pesquisador.

Dente: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

\_\_\_\_\_  
Responsável pelo Participante

RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável: Luciano Casagrande

Telefones de contato: (51) 3308-5027 (51) 9508-7447

Comitê de Ética em Pesquisa – UFRGS Fone: (51) 3308-3738



### **Anexo 3 – Termo de Assentimento**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOPEDIATRIA

#### **Termo de Assentimento**

#### **Pesquisa**

#### ***“EFEITO DA REMOÇÃO PARCIAL DE DENTINA CARIADA NAS CARACTERÍSTICAS IMUNOFENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS APRESENTADAS POR CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS”***

Elaborado com base na Resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde, publicada no DOU Nº 112, 2013.

O presente termo, elaborado pelo dentista e pesquisador Luciano Casagrande, tem por objetivo convidar a criança a participar deste projeto. Os procedimentos clínicos serão realizados no ambulatório da Clínica Infante-Juvenil da Faculdade de Odontologia da UFRGS pelos dentistas ou alunos do curso de Odontologia e consistirão na extração do dente, realizada com a técnica habitualmente utilizada na clínica. Esta autorização deverá ser dada com o SEU conhecimento sobre todos os procedimentos a serem executados e seus objetivos, no uso de sua liberdade e sem sofrer qualquer tipo de pressão. Sua participação é voluntária.

**OBJETIVO:** : Avaliar o efeito da restauração nas células-tronco que existem no dente.

**BENEFÍCIOS PREVISTOS PARA OS PACIENTES ENVOLVIDOS:** Todos os pacientes receberão o tratamento (extração dental) conforme o diagnóstico de necessidade de extração dental realizado por dentistas não vinculados ao projeto. Aqueles que apresentem necessidade de outros tratamentos serão informados e encaminhados segundo possibilidade de atendimento. Os responsáveis receberão informações quanto ao sucesso dos procedimentos realizados. Os resultados desta pesquisa poderão beneficiar a utilização das células-tronco em pacientes.

**RISCOS PREVISTOS PARA OS PACIENTES ENVOLVIDOS:** Poderá haver desconforto durante o exame radiográfico e a extração dental. Para diminuir possível desconforto, todos os procedimentos serão realizados assegurando o correto posicionamento durante a consulta, assim como o uso de materiais esterilizados, equipamentos de radioproteção, tomando os devidos cuidados de biossegurança e sob anestesia local adequada. A qualquer momento você poderá desistir desta pesquisa caso haja alguma situação de desconforto.

Os pesquisadores garantem a manutenção do sigilo e da privacidade de cada participante quando da divulgação dos resultados desta pesquisa.

Estou ciente de que posso a qualquer momento retirar a presente autorização por minha livre vontade e sem qualquer prejuízo, bastando para isso comunicar o dentista acima citado.

Este documento foi elaborado em duas vias e é assinado pelo participante e pelo pesquisador.

Eu \_\_\_\_\_, concordo em ser atendido pelos dentistas participantes desta pesquisa, de acordo com o que foi explicado a mim e a meus responsáveis.

Eu autorizo o uso do meu dente para outra pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética e pesquisa-UFRGS:    ( ) Sim    ( ) Não

DATA: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

ASSINATURA: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

\_\_\_\_\_  
Luciano Casagrande

Telefones de contato: (51) 3308-5027 (51) 9508-7447  
Comitê de Ética em Pesquisa – UFRGS Fone: (51) 3308-3738

## Anexo 4- Termo de Doação de Material Biológico

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOPEDIATRIA

### Termo de Doação de Material Biológico

#### Pesquisa

**“EFEITO DA REMOÇÃO PARCIAL DE DENTINA CARIADA NAS CARACTERÍSTICAS  
IMUNOFENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS APRESENTADAS POR CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS”**

Este estudo está sendo realizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

OBJETIVO: Avaliar o efeito da restauração nas células-tronco que existem no dente.

As pesquisas são fundamentais para a descoberta de novos conhecimentos que beneficiarão muitos pacientes. Portanto, a sua ajuda doando o dente de seu filho para a pesquisa é indispensável para o sucesso deste trabalho. Cabe salientar que não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum momento da pesquisa. Fica assegurada a liberdade dos participantes ou de seus responsáveis de recusar-se a participar do estudo, sem que isso traga consequências aos mesmos em relação ao tratamento que está sendo proposto.

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG: \_\_\_\_\_, como responsável pelo (a) menor \_\_\_\_\_, declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, autorizo meu (minha) filho (a) ou criança pela qual sou responsável a participar do estudo, estando disposto (a) a trazê-lo (a) nas consultas marcadas, assim como, doar seu dente de leite depois da extração.

Eu autorizo o uso do dente da criança por quem sou responsável em outra pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética e pesquisa-UFRGS: ( ) Sim ( ) Não

Dente: \_\_\_\_\_  
Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

---

Responsável pelo Participante

Telefones de contato: (51) 3308-5027 (51) 9508-7447  
Comitê de Ética em Pesquisa – UFRGS

Fone: (51) 3308-3738

Elaborado com base na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, publicada na DOU n 12, 2013.