

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

MELISSA MARIANA GÓMEZ VACA

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE OBTENÇÃO,  
PROLIFERAÇÃO, SENESCÊNCIA E PLASTICIDADE DAS  
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES  
PERMANENTES HUMANOS EM DIFERENTES FAIXAS  
ETÁRIAS**

Juiz de Fora

2017

MELISSA MARIANA GÓMEZ VACA

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE OBTENÇÃO,  
PROLIFERAÇÃO, SENESCÊNCIA E PLASTICIDADE DAS  
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES  
PERMANENTES HUMANOS EM DIFERENTES FAIXAS  
ETÁRIAS**

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

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo**

**Co-orientadora: Dra. Fernanda da Silva Gonçalves**

Juiz de Fora

2017

MELISSA MARIANA GÓMEZ VACA

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE OBTENÇÃO,  
PROLIFERAÇÃO, SENESCÊNCIA E PLASTICIDADE DAS  
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES  
PERMANENTES HUMANOS EM DIFERENTES FAIXAS  
ETÁRIAS**

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 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

---

Dra. Fernanda da Silva Gonçalves  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

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

*Bruno,*

*“Todo cambió cuando te ví  
De blanco y negro al color me convertí  
...Fue entregarte mí amor con una mirada  
El universo escribió que fueras para mí  
Y fue tan fácil quererte tanto...”*

José Luis Ortega - Mario Domm

*A tí dedico.*

## Agradecimentos

*Gratidão é quando a alma diz obrigada. Por isso, venho agradecer:*

A Deus por estar sempre ao meu lado, iluminado meu caminho e guiando meus passos;

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e à Universidade Federal Juiz de Fora pela oportunidade e confiança que me foi dada;

Ao meu orientador o Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo pela confiança, apoio e por sempre ter acreditado em mim e no potencial deste trabalho;

À Dra. Fernanda da Silva Gonçalves, minha co-orientadora, pela ajuda brindada, as correções e suporte no desenvolvimento deste trabalho;

Aos Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba e Prof. Dr. Leandro Marques de Resende, pela colaboração e ensinamentos outorgados;

A minha amiga Érika Mageste de Almeida Candido, pela parceria, carinho, ajuda e excelente tempo de trabalho juntas, muito obrigada!

A todos meus colegas do mestrado, em especial para Dayanne, Jairo, Patrícia e Otávio pelo apoio e amizade;

Aos professores, funcionários e alunos da Faculdade de Odontologia da UFJF, que direta ou indiretamente ajudaram-me na realização deste trabalho;

A minha família, que mesmo estando longe, sempre me fizeram chegar suas manifestações de apoio e carinho;

A meu filho amado Bruno pela companhia e compreensão em todo este tempo.

## RESUMO

O tecido da polpa do dente é uma fonte promissora para a obtenção de células tronco, as *Dental Pulp Stem Cells* (DPSCs) e seu posterior uso em terapias regenerativas, por isso torna-se importante saber a melhor idade do doador para seu armazenamento. Desta forma, o presente estudo buscou avaliar a eficiência na obtenção, proliferação, senescência e plasticidade das DPSCs em diferentes faixas etárias. Foram obtidas polpas dentárias de dentes molares extraídos, que compuseram três grupos: GI (18 – 33 anos), GII (34 – 49 anos) e GIII (50 – 67 anos). O isolamento celular foi avaliado através da observação microscópica diária do tecido pulpar e das células provenientes da polpa, por 15 dias. A proliferação celular foi analisada pelo ensaio de MTT nos dias 3, 5 e 7. A senescência das DPSCs foi feita em triplicata com contagem celular a cada 2 dias. A plasticidade celular foi realizada através da indução a diferenciação osteogênica, odontogênica e adipogênica. Os resultados apontaram que a eficiência da obtenção das DPSCs foi maior no GI, com decréscimo progressivo para GII e GIII. Não houve diferença estatística entre os grupos testados na avaliação da proliferação celular e na senescência. Amostras dos 3 grupos avaliados demonstraram ter capacidade de diferenciação celular. Pode-se concluir que a idade foi capaz de influenciar a obtenção de DPSCs, apontando a faixa etária de 18 a 33 anos de idade (GI), como o grupo mais eficiente, já que o 100% das polpas dentárias deram células. Entretanto, ao avaliar a proliferação, senescência e plasticidade celular, todos os grupos se comportaram dentro de um mesmo padrão, sem a interferência da idade do doador.

**Palavras-chave:** Células-tronco da polpa dental, faixa etária, proliferação celular, senescência, diferenciação.

**Abstract**

The pulp tissue of the tooth is a promising source for obtaining stem cells, the Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) and their subsequent use in regenerative therapies, so it becomes important to know the best age of the donor for its storage. In this way, the present study sought to evaluate the efficiency in obtaining, proliferating, senescence and plasticity of DPSCs in different age groups. Dental pulps of extracted molar teeth were obtained, which comprised three groups: GI (18 - 33 years), GII (34 - 49 years) and GIII (50 - 67 years). Cellular isolation was evaluated by daily microscopic observation of pulp tissue and pulp cells for 15 days. Cell proliferation was analyzed by the MTT assay on days 3, 5 and 7. Senescence of the DPSCs was done in triplicate with cell counts every 2 days. Cellular plasticity was achieved through the induction of osteogenic, odontogenic and adipogenic differentiation. The results showed that the efficiency of obtaining DPSCs was higher in the GI, with progressive decrease for GII and GIII. There was no statistical difference between the groups tested in the evaluation of cell proliferation and senescence. Samples of the 3 groups evaluated showed to be cell differentiation capacity. It can be concluded that age was able to influence the achievement of DPSCs, pointing to the age group of 18 to 33 years of age (GI), as the most efficient group, since 100% of the pulps gave cells. However, when evaluating cell proliferation, senescence and plasticity, all groups behaved within the same pattern, without interference from donor age.

**Keywords:** Dental pulp stem cells, age groups, cell proliferation, senescence, differentiation.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
µL/mL	Microlitro por mililitro
µM	Micromolar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa Humana
CHX	Digluconato de clorexidina
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CT	Célula – tronco
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPSCs	<i>Dental Pulp Stem Cells</i>
FO	Faculdade de Odontologia
FO-UFJF	Faculdade de Odontologia - Universidade Federal Juiz de Fora
G	Gravidade
g/L	Gramas por litro
GI	Grupo 1
GII	Grupo 2
GIII	Grupo 3
H	Hora
LTDA	Limitada
MG	Minas Gerais
mg/mL	Miligramas por mililitros
Min	Minutos
mL	Mililitros

MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
n	Numero amostral
NEAS	<i>Non essential amino acid solution</i>
P	Passagem
PBS	<i>Phosphate-Buffered-Salin</i>
PVC	Policloreto de vinila
S	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U/mL	Unidade por mililitro
UFJF	Universidade Federal Juiz de Fora
$\alpha$ -MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle Alfa Modification</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	- Limpeza externa do dente.....	19
<b>Figura 2</b>	- Local e materiais necessários para secção dentária.....	20
<b>Figura 3</b>	- Obtenção e acondicionamento pulpar.....	21
<b>Figura 4</b>	- Teste de viabilidade celular com espectrofotômetro.....	23
<b>Figura 5</b>	- DPSCs dos três grupos testados submetidas a diferenciação celular (Artigo – Figura 1) .....	31

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	-Efeito da idade do doador na proliferação das CT da polpa dentária humana por ensaio de MTT (Artigo – Gráfico 1) ....	30
<b>Gráfico 2</b>	- Efeito da idade do doador na senescência das DPSCs (Artigo – Gráfico 2) .....	32

## LISTA DE QUADRO

<b>Quadro 1</b>	- Delineamento experimental.....	17
-----------------	----------------------------------	----

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b>	- Perfil dos doadores dos grupos avaliados e informações sobre a obtenção de células da polpa dentaria de dentes permanentes (Artigo – Tabela 1) .....	30
-----------------	--	----



## 1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

As células-tronco, tema atual e de interesse científico em todo o mundo, podem ser definidas como células que são capazes de auto renovação e de se diferenciarem em várias linhagens, ou seja, são capazes de se proliferar, mantendo seu estado indiferenciado e de originar diferentes tipos de células especializadas, quando estimuladas. Possuem como funções principais: proporcionar o desenvolvimento tecidual, a homeostasia e reparo em caso de danos aos tecidos (LA NOCE *et al.*, 2014).

Desde a descoberta das células-tronco mesenquimais na medula óssea, novos nichos de células-tronco foram identificados em vários tecidos incluindo cordão umbilical, tecido adiposo e músculo esquelético (ERICES *et al.*, 2000; GRONTHOS *et al.*, 2000; ZUK *et al.*, 2001). Outros estudos feitos por diferentes pesquisadores determinaram nichos de células-tronco de interesse específico na odontologia. Podemos destacar que Gronthos *et al.* (2000) identificaram células-tronco maduras na polpa de dentes humanos, Miura *et al.* (2003) na polpa de dentes decíduos esfoliados, Handa *et al.* (2002) na papila apical, Hasegawa *et al.* (2005) no ligamento periodontal e Huang *et al.* (2008) no folículo dental.

As possibilidades de tratamento regenerativo celular são limitadas para aqueles pacientes mais velhos, já que, o acesso as células-tronco da papila apical, do folículo dental e de dentes decíduos não estão mais disponíveis. Desta forma,

as células-tronco da polpa dental e do ligamento periodontal são umas das poucas fontes viáveis destas células para uso em terapias regenerativas nos pacientes mais velhos. (CHU, 2013).

O envelhecimento é um processo complexo, caracterizado por uma variedade de distúrbios, associados ao declínio generalizado do organismo e a incapacidade de manter a homeostase tecidual. As funções das células-tronco tornam-se diminuídas com a idade (MÁSLOV *et al.*, 2004), por conseguinte, os tecidos envelhecidos demonstram diminuição da capacidade de reparação e aumento da preponderância para distúrbios degenerativos (CAMPISI, 2005). Mudanças relacionadas à idade, que podem ocorrer nas células-tronco da polpa dental humana e seu impacto em tratamentos regenerativos, ainda são desconhecidos (CHU, 2013).

É sabido que com a idade torna-se mais difícil a remoção do tecido pulpar, uma vez que seu volume passa por um processo progressivo de redução, que está diretamente relacionado à diminuição da celularidade tecidual e ao depósito contínuo de dentina secundária. Além disso, com o passar dos anos, a probabilidade de perda do dente por exodontia ou de perda parcial de seus tecidos por tratamento endodôntico, periodontal e restauradores, é cada vez maior. Poucas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de analisar o potencial celular da polpa de dentes de pessoas com idade avançada. Porém, o conhecimento acerca das células-tronco da polpa dental é essencial na odontologia e na área médica na busca de alternativas para tratamentos regenerativos em pacientes idosos (EKLUND, 2010).

A obtenção e a caracterização de células-tronco é um tema atual na comunidade científica e de muita importância para a Medicina e Odontologia, tornando-se uma poderosa ferramenta para compreensão e investigações moleculares e celulares. Já que inúmeros pacientes poderiam se beneficiar do armazenamento de suas próprias DPSCs (KELLNER, 2014).

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a obtenção e caracterização de células-tronco mesenquimais da polpa de dentes permanentes humanos em diferentes faixas etárias, e assim, saber se existe uma idade ótima

para a doação das polpas dentárias e posterior armazenamento das DPSCs. E deste modo tentar garantir o estudo em pesquisas e aplicação em terapias celulares futuras.

## **2. PROPOSIÇÃO**

### **2.1. PROPOSIÇÃO GERAL:**

Avaliar a influência das diferentes faixas etárias de pacientes, na eficiência de obtenção, proliferação e plasticidade das células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes humanos.

### **2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

2.2.1. Avaliar a eficiência na obtenção de células da polpa dentária humana

dos diferentes grupos testados.

2.2.2. Analisar a proliferação celular dos diferentes grupos testados.

2.2.3. Avaliar o padrão de senescência celular dos diferentes grupos testados.

2.2.4. Avaliar a plasticidade celular quanto a diferenciação osteogênica, odontogênica e adipogênica, nos diferentes grupos testados.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEP/UFJF) sob o CAAE: 56694716.1.0000.5147 (ANEXO A) juntamente com o TCLE (APÊNDICE A). Todos os voluntários da pesquisa receberam um TCLE explicando a forma de realização do estudo, os objetivos, os riscos e os benefícios aos quais foram expostos, e somente foram integrados ao estudo, após concordância e assinatura do termo.

#### **3.1 MATERIAL**

Foram incluídas nesta pesquisa amostras de dentes molares permanentes humanos, extraídos com vitalidade pulpar de voluntários com idade de 18 a 67 anos de idade.

A amostragem foi composta por 34 (trinta e quatro) dentes permanentes com vitalidade pulpar, indicados previamente para exodontia e que seriam descartados após o procedimento cirúrgico. As amostras foram divididas em três grupos, conforme o quadro 1.

Quadro 1 - Delineamento experimental.

	<b>GRUPO 1 (GI)</b>	<b>GRUPO 2 (GII)</b>	<b>GRUPO 3 (GIII)</b>
<b>Faixa etária</b>	18 a 33 anos	34 a 49 anos	50 a 67 anos
<b>“n” da amostra</b>	15	6	13

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

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Obtenção e processamento da amostra

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 Faculdade de Odontologia da UFJF, na cidade de Juiz de Fora - MG, pelos alunos de graduação e sob supervisão do pesquisador responsável. As cirurgias para a obtenção dos dentes e seu processamento inicial (acondicionamento dos dentes em meio de transporte apropriado após a exodontia) foram realizadas nas clínicas das disciplinas de Cirurgia II e de Cirurgia III do Departamento de Clínicas Odontológicas da Faculdade de Odontologia da UFJF. Os atendimentos e os procedimentos de exodontia foram padronizados, seguindo os protocolos de atendimento e de biossegurança da Instituição e obedeceram a mesma sequência operatória. Faz-se importante citar que as intervenções cirúrgicas obedeceram às rigorosas técnicas assépticas (uso de campo cirúrgico estéril, antisepsia extra-oral com solução de CHX 0,12% (Manipulado em Farmácia de Manipulação Cavaliere, Juiz de Fora, Brasil), antisepsia 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 individualmente em um tubo tipo Falcon de 50mL (KASVI, Curitiba, Brasil), contendo 10mL de meio de transporte, composto por 3% de Penicilina 10000U/mL /Estreptomicina 10000µg/mL (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil) 2% de Anfotericina B 25µL/mL (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), e 95% de PBS (1x) (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil). 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.

O processamento das polpas dentárias para cultivo *in vitro* das células-tronco mesenquimais indiferenciadas derivadas destas polpas foi realizado no Laboratório Biobanco Polpa Dental da FO-UFJF. Cada dente foi retirado do tubo tipo Falcon e sua superfície externa foi raspada com curetas periodontais (Golgran, São Caetano do Sul, Brasil) estéreis (Figura.1A). 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 que se evite o contato da solução antisséptica com a porção apical da raiz (Figura 1A e B).

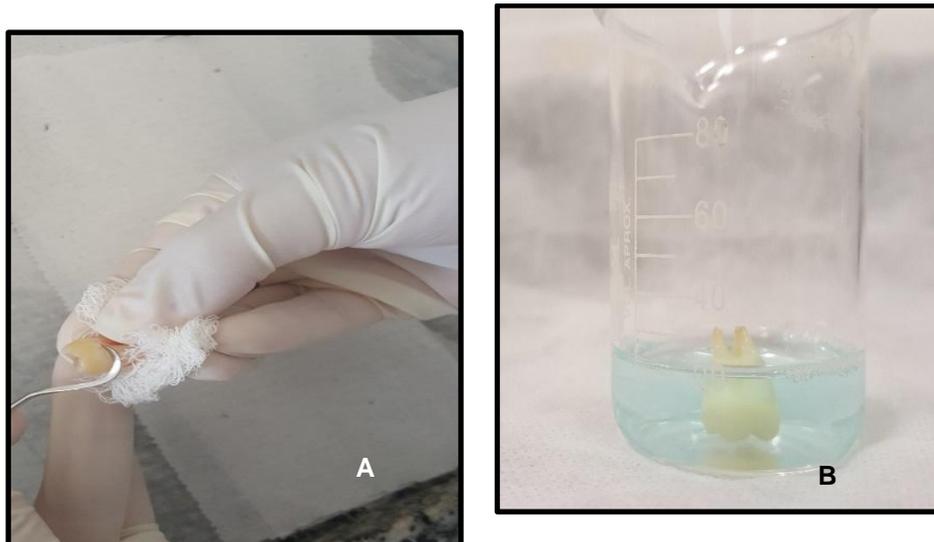


Figura 1 – Limpeza externa do dente. (A): Raspagem com curetas periodontais. (B): Imersão parcial do dente em CHX a 0,12% por 1 minuto. Fonte: Arquivo pessoal.

Com o uso de motor de suspensão (Beltec Industria 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. Industria 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). Este procedimento foi desenvolvido no interior de uma estrutura de aço inoxidável estéril, envolto por filme transparente PVC (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 2A e 2B).

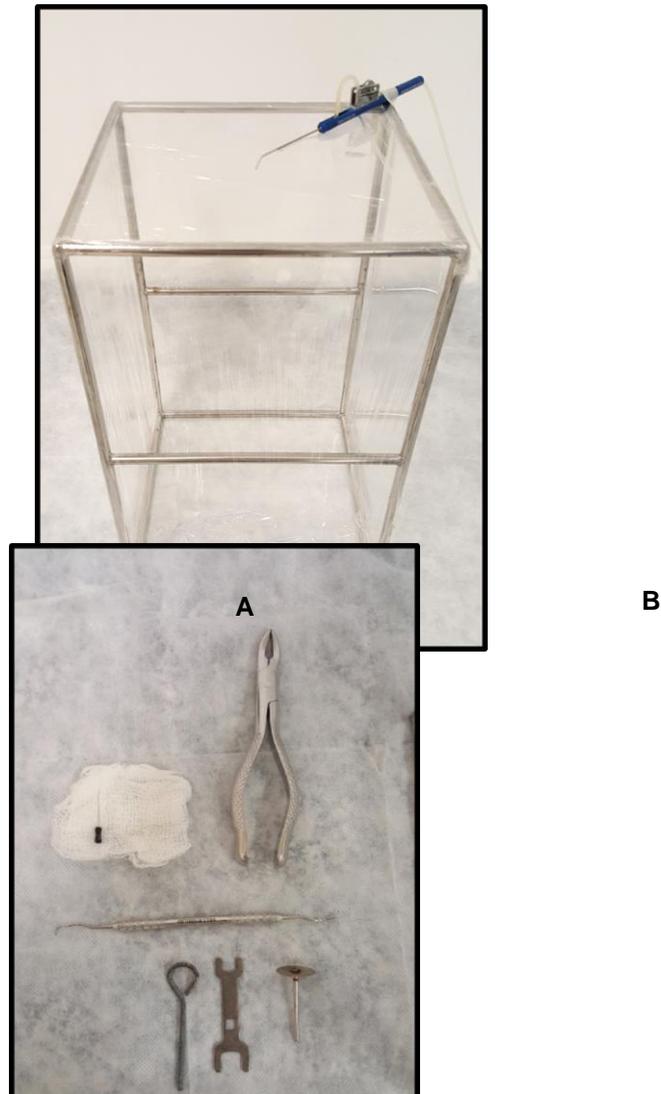


Figura 2 – Local e materiais necessários para secção dentária (A): Local para a confecção do sulco e secção dentária. Estrutura inoxidável envolto por filme PVC e irrigação externa. (B) Materiais necessários para o processamento. Fonte: Arquivo pessoal.

Desta forma, a polpa foi exposta e removida com auxílio de limas endodônticas manuais (Dentsply, Catanduva, Brasil) (Figura 3A) e ou escavadores de dentina (Golgran, São Caetano do Sul, Brasil) estéreis e colocadas em um tubo tipo Falcon de 15mL (Jet Biofil, Guangzhou, China) contendo 2mL de solução de manutenção pulpar (3% de penicilina e estreptomicina e de PBS (1x)) (Figura 3B) 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 pulpar, sendo que a cada lavagem as soluções foram renovadas, objetivando eliminar possíveis contaminações. E uma última lavagem em solução tamponada de PBS (1x).

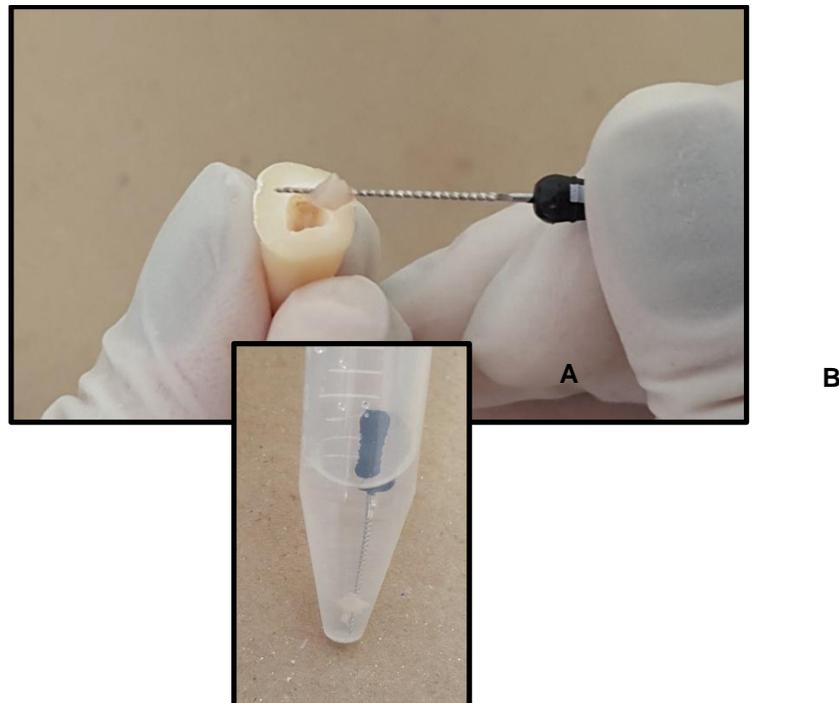


Figura 3 – Obtenção e acondicionamento pulpar. (A): Remoção da polpa dental com auxílio de limas endodônticas manuais. (B) Polpa em um tubo tipo Falcon de 15mL contendo 2mL de solução de manutenção. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.2.2 Cultivo celular

A partir desse momento, as polpas centrifugadas, 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 de cultivo  $\alpha$ -MEM (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 15% SFB (Soro Fetal Bovino) (LCG biotecnologia, Cotia,

Brasil), Penicilina 10000U/mL /Estreptomicina 10000µg/mL (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil), 1% de L-Glutamina 200mM (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) e 1% NEAS aminoácidos não-essenciais (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 CO<sub>2</sub> 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 dias. As amostras que não apresentaram células após 15 dias em cultura primária ou que contaminaram foram descartadas. É importante salientar que as amostras 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 25cm<sup>2</sup> (KASVI, China) ou 75cm<sup>2</sup> (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, seguido por descarte do mesmo. Foi acrescentado nas garrafas de cultivo celular tratadas de 500µL a 800 µL de 0,25% Tripsina-EDTA (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), deixando agir por 5min em incubadora de 5% de CO<sub>2</sub> umidificada. Após este período, a garrafa foi levada ao microscópio de rotina invertido com o objetivo de observar a desagregação celular. 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, é colocado todo o conteúdo da garrafa de cultivo e centrifugado a 210G por 5min. Foi observado 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 permaneceu no tubo. As células foram ressuspensas em 1mL de meio de cultivo α-MEM suplementado e plaqueadas em novas garrafas de cultivo. Desta forma, as

células foram expandidas até conseguir a quantidade ( $1 \times 10^6$  células/T75) necessária para o desenvolvimento dos experimentos propostos neste trabalho.

### **3.2.3 Avaliação da proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT**

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

A avaliação da proliferação celular foi realizada por ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos). Após incubação das células (500 células/poço) por 3 (três) dias, 5 (cinco) dias e 7 (sete) dias em placas de 96 poços (NEST Biotechnology Co., Wuxi, China). O meio de cultivo foi removido e foram adicionados 90µL de meio puro acrescido de 10µL de MTT. A placa envolta em papel alumínio foi incubada por um período de 4 horas, em incubadora de 5% de CO<sub>2</sub> umidificada. Após esta incubação, a solução de meio de cultivo puro com MTT foi removida e foi acrescido 100µL de álcool isopropílico ácido por poço. A placa foi levada à incubadora por 1h, envolta em papel alumínio. Desta forma, a solução de álcool isopropílico ácido dissolverá os cristais de Formazan, resultantes da redução do MTT pelas células. O sobrenadante de cada poço foi transferido para uma nova placa. Como controle 100µL de álcool isopropílico ácido foram adicionados em três poços vazios. A proliferação foi avaliada em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) à absorvância de 570nm, 650nm e 690nm.

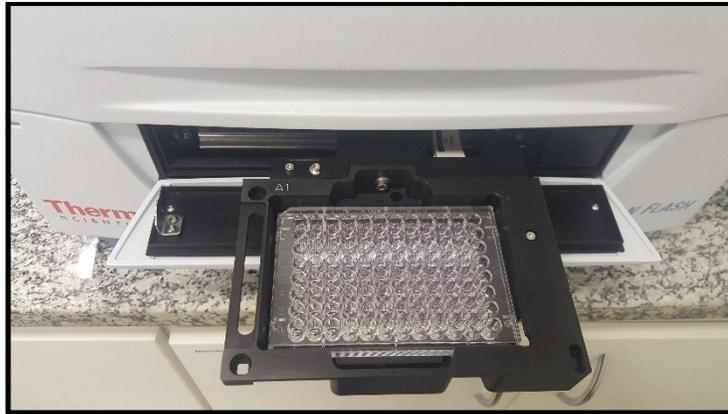


Figura 4 – Teste de viabilidade celular com espectrofotômetro. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.2.4 Avaliação do padrão de senescência celular

Para estudar o padrão de senescência ou a capacidade proliferativa após um determinado número de passagens das células  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas em placas de 6 poços (KASVI, China), e a cada dois dias, o meio de cultivo padrão foi removido e as células aderidas foram lavadas em PBS (1x) (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil). A seguir, as células foram tratadas com 0,25% de tripsina-EDTA (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 5min. A tripsina foi neutralizada com meio de cultivo padrão e o sobrenadante foi centrifugado a 210G por 5min. O *pellet* formado foi ressuspensionado em 1mL de meio de cultivo padrão e o número de células foi estimado com auxílio da Câmara de Neubauer. As células foram re-plaqueadas em placas de 6 poços e os experimentos foram repetidos sucessivamente até a passagem 9 (P9). Inicialmente, as células estavam na passagem 6 (P6). Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.2.5 Avaliação da plasticidade celular

Para a avaliação da plasticidade celular, as amostras foram induzidas à diferenciação osteogênica, odontogênica e adipogênica.

Para diferenciação osteogênica, foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células em placa de seis poços (KASVI, China), em meio de cultivo padrão por 48 horas. Posteriormente, as células foram induzidas, por até três semanas, com meio DMEM LOW GLUCOSE contendo 10% SFB (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil),  $0,1 \mu\text{M}$  dexametasona (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos),  $50 \mu\text{M}$  L-ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), 1% Penicilina 10000U/mL /Estreptomicina  $10000 \mu\text{g/mL}$  (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil) e 10mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) (ZUK et al., 2002). Foi mantido um grupo controle cultivado em meio de cultivo padrão. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias. A evolução da diferenciação foi acompanhada diariamente através do microscópio invertido. A deposição de cálcio e as alterações no citoesqueleto celular foi observada através da coloração com Von Kossa (MELOAN; PUCHTLER, 1985).

Para diferenciação odontogênica, foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células em placa de seis poços (KASVI, China), em meio de cultivo padrão por 48 horas. Posteriormente, as células foram induzidas, por até três semanas, com meio DMEM LOW GLUCOSE contendo 10% SFB (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil), 2mM L-Glutamina (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos),  $0,01 \mu\text{M}$  dexametasona (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos),  $100 \mu\text{M}$  L-ácido ascórbico 2- fosfato (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), 1% Penicilina 10000U/mL /Estreptomicina  $10000 \mu\text{g/mL}$  (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil), 1,8mM Fosfato monopotássico (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) e 5mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) (Karamzadeh et al., 2012). Foi mantido um grupo controle cultivado em meio de cultivo padrão. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias. A evolução da diferenciação foi acompanhada diariamente através do microscópio invertido. A

deposição de cálcio e as alterações no citoesqueleto celular foi observada através da coloração com Von Kossa (MELOAN; PUCHTLER, 1985).

### Avaliação da eficiência de obtenção, proliferação, senescência e plasticidade das células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos em diferentes faixas etárias

2mM L-Glutamina (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), 10 $\mu$ M dexametasona (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos), 1% Penicilina 10000U/mL /Estreptomicina 10000 $\mu$ g/mL (LCG biotecnologia, Cotia, Brasil), 200 $\mu$ M indometacina (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) e 10 $\mu$ M/mL de insulina (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, Estados Unidos) (Dias, 2012). Após indução através do meio adipogênico as células foram submetidas a coloração Oil Red para poder observar os vacúolos citoplasmáticos com depósitos de lipídeos.

#### 4. ARTIGO

##### RESUMO

O tecido da polpa do dente é uma fonte promissora para a obtenção de células tronco, as *Dental Pulp Stem Cells* (DPSCs) e seu posterior uso em terapias regenerativas, por isso torna-se

importante saber a melhor idade do doador para seu armazenamento. Desta forma, o presente estudo buscou avaliar a eficiência na obtenção, proliferação, senescência e plasticidade das DPSCs em diferentes faixas etárias. Foram obtidas polpas dentarias de dentes molares extraídos, que compuseram três grupos: GI (18 – 33 anos), GII (34 – 49 anos) e GIII (50 – 67 anos). O isolamento celular foi avaliado através da observação microscópica diária do tecido pulpar e das células provenientes da polpa, por 15 dias. A proliferação celular foi analisada pelo ensaio de MTT nos dias 3, 5 e 7. A senescência das DPSCs foi feita em

triplicata com contagem celular a cada 2 dias. A plasticidade celular foi realizada através da indução a diferenciação osteogênica, odontogênica e adipogênica. Os resultados apontaram que a eficiência da obtenção das DPSCs foi maior no GI, com decréscimo progressivo para GII e GIII. Não houve diferença estatística entre os grupos testados na avaliação da proliferação celular e na senescência. Amostras dos 3 grupos

avaliados demonstraram ter capacidade de diferenciação celular. Pode-se concluir que a idade foi capaz de influenciar a obtenção de DPSCs, apontando a faixa etária de 18 a 33 anos de idade (GI), como o grupo mais eficiente, já que o 100% das polpas dentárias deram células. Entretanto, ao avaliar a proliferação, senescência e plasticidade celular, todos os grupos se comportaram dentro de um mesmo padrão, sem a interferência da idade do doador.

## **INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA**

As células-tronco, tema atual e de interesse científico em todo o mundo, podem ser definidas como células que são capazes de auto renovação e de se diferenciarem em várias linhagens, ou seja, são capazes de se proliferar, mantendo

seu estado indiferenciado e de originar diferentes tipos de células especializadas, quando estimuladas. Possuem como funções principais: proporcionar o desenvolvimento tecidual, a homeostasia e reparo em caso de danos aos tecidos (LA NOCE *et al.*, 2014).

Desde a descoberta das células-tronco mesenquimais na medula óssea, novos nichos de células-tronco foram identificados em vários tecidos incluindo cordão umbilical, tecido adiposo e músculo esquelético (ERICES *et al.*, 2000; GRONTHOS *et al.*, 2000; ZUK *et al.*, 2001). Outros estudos feitos por diferentes pesquisadores determinaram nichos de células-tronco de interesse específico na odontologia. Podemos destacar que Gronthos *et al.* (2000) identificaram células-tronco maduras na polpa de dentes humanos, Miura *et al.* (2003) na polpa de dentes decíduos esfoliados, Handa *et al.* (2002) na papila apical, Hasegawa *et al.* (2005) no ligamento periodontal e Huang *et al.* (2008) no folículo dental.

As possibilidades de tratamento regenerativo celular são limitadas para aqueles pacientes mais velhos, já que, o acesso as células-tronco da papila apical, do folículo dental e de dentes decíduos não estão mais disponíveis. Desta forma, as células-tronco da polpa dental e do ligamento periodontal são umas das poucas fontes viáveis destas células para uso em terapias regenerativas nos pacientes mais velhos. (CHU, 2013).

O envelhecimento é um processo complexo, caracterizado por uma variedade de distúrbios, associados ao declínio generalizado do organismo e a incapacidade de

manter a homeostase tecidual. As funções das células-tronco tornam-se diminuídas com a idade (MÁSLOV *et al.*, 2004), por conseguinte, os tecidos envelhecidos demonstram diminuição da capacidade de reparação e aumento da preponderância para distúrbios degenerativos (CAMPISI, 2005). Mudanças relacionadas à idade, que podem ocorrer nas células-tronco da polpa dental humana e seu impacto em tratamentos regenerativos, ainda são desconhecidos (CHU, 2013).

É sabido que com a idade torna-se mais difícil a remoção do tecido pulpar, uma vez que seu volume passa por um processo progressivo de redução, que está diretamente relacionado à diminuição da celularidade tecidual e ao depósito contínuo de dentina secundária. Além disso, com o passar dos anos, a probabilidade de perda do dente por exodontia ou de perda parcial de seus tecidos por tratamento endodôntico, periodontal e restauradores, é cada vez maior. Poucas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de analisar o potencial celular da polpa de dentes de pessoas com idade avançada. Porém, o conhecimento acerca das células-tronco da polpa dental é essencial na odontologia e na área médica na busca de alternativas para tratamentos regenerativos em pacientes idosos (EKLUND, 2010).

A obtenção e a caracterização de células-tronco são um tema atual na comunidade científica e de muita importância para a Medicina e Odontologia, tornando-se uma poderosa ferramenta para compreensão e investigações

moleculares e celulares. Já que inúmeros pacientes poderiam se beneficiar do armazenamento de suas próprias DPSCs (KELLNER, 2014).

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a obtenção e caracterização de células-tronco mesenquimais da polpa de dentes permanentes humanos em diferentes faixas etárias e assim, saber se existe uma idade ótima para a doação das polpas dentárias e posterior armazenamento das DPSCs. E deste modo tentar garantir o estudo em pesquisas e aplicação em terapias celulares futuras.

## **MATERIAL E METODOS**

Isolamento e cultura celular de DPSCs.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora (Juiz de Fora, Brasil). Dentes molares permanentes humanos foram coletados e classificados em três grupos etários: (Grupo I) com idade entre 18 a 33 anos (n = 15 dentes); (Grupo II) com idade entre 34 a 49 anos (n = 6 dentes) (Grupo III) com idade entre 50 a 67 anos (n = 13 dentes) pelo Departamento de Clínicas Odontológicas da Faculdade de Odontologia da UFJF De Juiz de Fora). Para o isolamento da polpa, as superfícies dos dentes foram desinfetadas com clorexidina ao 12% e abertas por brocas de corte (Dentorium Products Co. Inc., Nova

York, EUA) sob refrigeração por sistema de irrigação externa (Dentoflex, São Paulo, Brasil), numa caixa isolada de aço inoxidável. Para a cultura das células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente humana foi realizada a técnica de explante.

Cada polpa foi cultivada em placas de 6 poços (KASVI, China) com  $\alpha$ -MEM (LCG Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB, LCG Biotecnologia), 100 U / ml de penicilina e 100 mg / ml de estreptomicina (LCG Biotecnologia), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich Co LLC, St. Louis, EUA), solução de aminoácidos não essenciais 100x (Sigma Aldrich Co LLC) em incubadora (Thermo Fisher Scientific) humidificada a 37 ° C a 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. As culturas de células foram sistematicamente acompanhadas e fotografadas durante 15 dias, com um microscópio invertido (Nikon, Melville, EUA) e registrado o surgimento das primeiras células.

Quando as culturas atingiram 80% de confluência, estas foram removidas utilizando tripsina / EDTA a 0,05% (Sigma) e subcultivadas para experiências posteriores. Foram usadas células a partir da terceira passagem para os experimentos.

#### Ensaio de proliferação celular

Neste experimento foram utilizadas células de três doadores do Grupo I, células de três doadores do Grupo II, que foram selecionadas de modo randômico e células de um doador do Grupo III. Com a finalidade

de determinar a taxa de proliferação de DPSCs em cultura, realizou-se um ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Foram plaqueadas 500 células/poço em doze poços por linhagem, numa placa de 96 poços (KASVI) em meio de cultura DPSC padrão. Todas as condições foram realizadas em triplicata. As leituras foram feitas nos dias 3, 5 e 7 de cultura, o meio de cultura foi substituído com 10% de MTT em 90% de meio de cultura DPSC. Após 4 h de incubação, a solução de MTT foi removida e foram adicionados 100  $\mu$ l/poço de álcool isopropílico ácido para dissolver a formação de cristais. A absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 570, 650 e 690nm com um leitor espectrofotométrico de microplacas (Thermo Fisher Scientific).

#### Senescência

Com a finalidade de avaliar se há diferença no potencial de divisão celular das DPSC de pacientes em diferentes faixas etárias, foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  cels/poço em placas de 6 poços (KASVI) e a cada dois dias, estas foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas novamente com a mesma quantidade de células. O número de células foi contado em cada passagem com auxílio de câmara de Neubauer. Para esta análise foi avaliado uma linhagem de cada grupo, em triplicata, selecionada de forma randômica para os GI e GII.

#### Avaliação da plasticidade in vitro

Para avaliar a capacidade das células de se diferenciarem em outras linhagens, foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de 6 poços (KASVI). Três dias mais tarde, o meio de crescimento foi substituído por um meio de indução específico e as células foram mantidas nestes meios de diferenciação específicos entre 14 e 21 dias.

Para a diferenciação osteogênica, o meio utilizado foi DMEM- low Glucose (1 g/L) (GIBCO Corporation, Grand Island, Nova Iorque) suplementado com 10% de soro fetal bovino (LCG Biotecnologia);  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma), 10 mM final; Ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), 50  $\mu$ M final; Dexametasona (Sigma), 0,1 uM final; E 1% de 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomina (LCG Biotecnologia) (ZUK et al., 2002).

Para diferenciação odontogênica, o meio foi constituído por DMEM - low Glucose (1g/L) (GIBCO Corporation, Grand Island, Nova Iorque) suplementado com 10% de soro fetal bovino (LCG Biotecnologia); Ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), 100  $\mu$ M final; L-glutamina (Sigma), 2 mM final; 1% 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomina (LCG Biotecnologia); Dexametasona (Sigma), 0,01  $\mu$ M final;  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma), 5 mM final; e fosfato monopotássico (Sigma), 1,8 mM final (Karamzadeh et al., 2012).

Para a diferenciação adipogênica, foi adotado o meio DMEM-low Glucose (1 g / L) (GIBCO Corporation, Grand Island, Nova Iorque) suplementado com 10% de

soro bovino fetal (LCG Biotecnologia); Insulina (Sigma), 10 uM/mL final; Dexametasona (Sigma), 1 uM final; Indometacina (Sigma), 200 uM final; L-glutamina (Sigma), 2 mM final; E 1% de 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomina (LCG Biotecnologia) (Dias, 2012).

Após o período de diferenciação, o meio foi removido das culturas e as células fixadas em álcool durante 3-24 horas. As células que sofreram diferenciação osteogênica e odontogênica foram coradas com Von Kossa e as submetidas a diferenciação adipogênica, coradas com Oil Red O.

Para esta análise foram utilizadas as mesmas linhagens já selecionadas para o ensaio de senescência.

#### Análise Estatística

A análise estatística utilizada foi Anova, teste Two Way e teste Tukey, com o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Isolamento

Foram coletadas 34 amostras e distribuídas conforme a tabela 1. Foi possível obter o tecido pulpar e células da polpa dental de todos os grupos.

Tabela I. Perfil dos doadores dos grupos avaliados e informações sobre a obtenção de células da polpa dental de dentes permanentes.

Grupos	Média de idade	Média para a obtenção de células com formato fibroblastóide	Eficiência da obtenção células da polpa
GI (n=15)	23,6 anos	5,93 dias	100%
GII (n=6)	40,33 anos	7 dias	66,66%
GIII (n=13)	61,38 anos	8 dias	38,46%

#### Ensaio de proliferação celular – MTT

A proliferação das DPSCs em cada grupo foi avaliada nos dias 3, 5 e 7 no comprimento de onda de 570nm. O ensaio de MTT foi realizado em 7 amostras: GI (P128, P153 e P168), GII (P145, P186 e P250) e GIII (P253). A análise estatística foi realizada para os grupos GI e GII, na qual foi adotada uma média dos três resultados de cada grupo.

O teste estatístico Anova (Two-Way) mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos GI e GII ( $p > 0.05$ ). Quando as

amostras do mesmo grupo foram comparadas entre os dias, os dados estatísticos apontaram que não existe diferença significativa entre os dias 3 e 5 ( $p > 0.05$ ), todavia houve diferença significativa entre os dias 3 e 7, e entre os dias 5 e 7, para ambos grupos (GI, GII) ( $p < 0.05$ ), revelado pelo teste estático Anova (Tukey).

No GIII foi observado diferença entre os dias 3 e 5, 5 e 7 e entre os dias 3 e 7. (Gráfico 1)

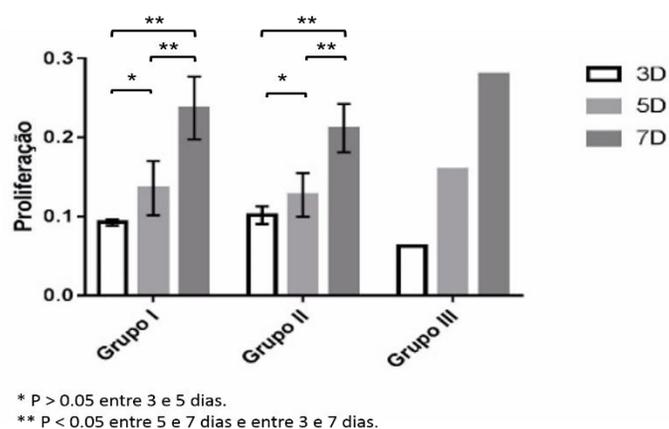


Gráfico 1: Efeito da idade do doador na proliferação das células da polpa dentária analisado por ensaio de MTT.

### Avaliação do padrão de senescência celular

Para complementar os dados relativos a cinética de crescimento das DPSCs fez-se necessário compreender como se deu o envelhecimento das células ao longo das passagens estudadas, para tanto, foi realizada a avaliação da senescência para as DPSCs das diferentes faixas etárias dos grupos (GI, GII e GIII) entre as passagens (P6 e P9), (Gráfico2).

Foi utilizado o teste estatístico Anova (Tukey) para a análise de senescência das amostras avaliadas. Desta forma não foi observada diferença significativa entre os grupos (GI, GII e GIII) ( $p > 0.05$ ). Porém, no grupo GII verificou-se diferença significativa ( $p < 0.05$ ) na viabilidade celular entre as passagens P6 e P7, P6 e P9.

Contudo, observou-se que as células começaram a apresentar um declínio no parâmetro de crescimento, viabilidade e envelhecimento populacional na passagem P8 nos 3 grupos testados (Gráfico 2).

### Avaliação da plasticidade celular

As células das três amostras testadas (P.128, P.250 e P.253), foram capazes de se diferenciar, quando induzidas, em linhagens; osteogênica, odontogênica e adipogênica.

Na avaliação das DPSCs na sua plasticidade, foi possível visualizar que o citoesqueleto das células encontrasse alterado, semelhante aos osteoblastos e com a

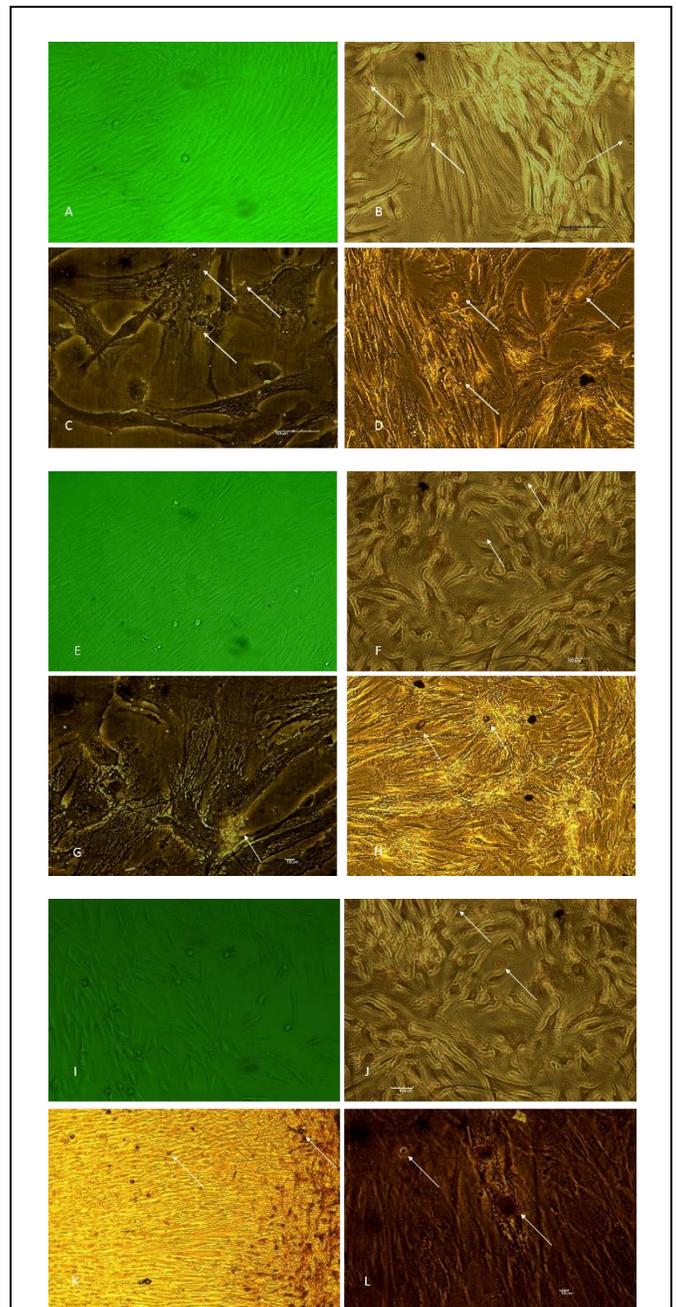


Figura 1: Fotomicrográfica das DPSCs submetidas à diferenciação celular. A (GI) E (GII) I (GIII) Controle. B (GI), F (GII), J (GII) DPSCs induzidas com meio osteogênico durante 21 dias, e submetidas à coloração Von kossa, apresentando citoesqueletos celulares alterados e aparente formação de tecido mineralizado (seta); aumento 100x. C (GI), G (GII), K (GII) DPSCs submetidas a indução com meio odontogênico durante 21 dias mostrando aparente formação de tecido mineralizado e deposição de cálcio, citoesqueletos celulares alterados (seta); aumento 100x. D (GI), H (GII), L (GII) DPSCs após indução através do meio adipogênico durante 14 dias, e submetidas a coloração Oil Red apresentando vacúolos citoplasmáticos com depósitos de lipídeos (seta); aumento 100x.

aparente formação de tecido mineralizado com

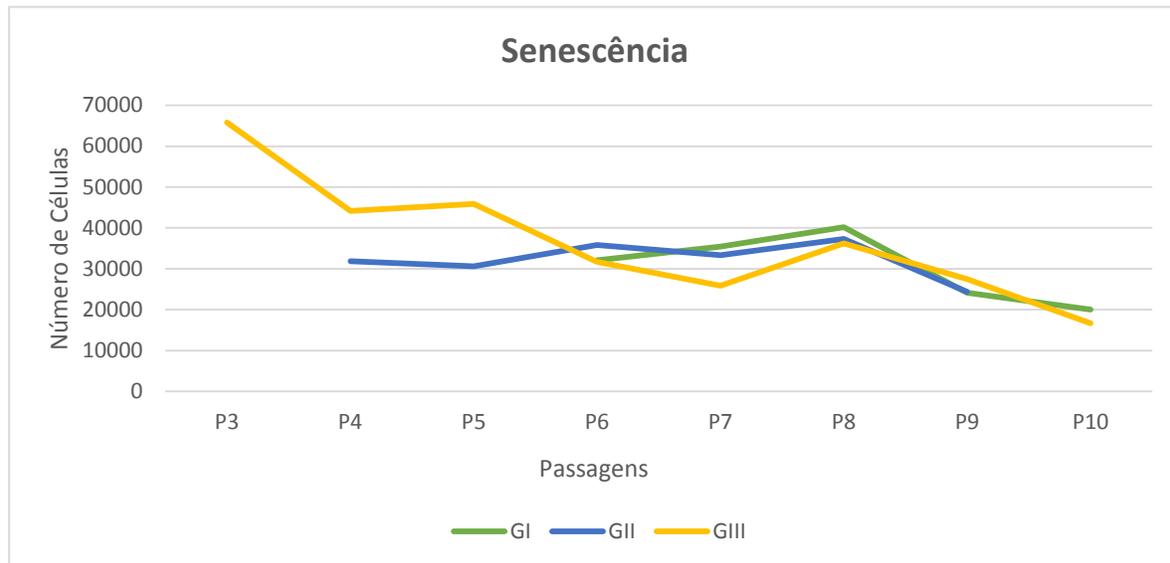


Gráfico 2: Efeito da idade do doador na senescência das DPSCs.

deposição de cálcio. GI, GII e GIII (Figura 1 B, F, J), sendo que o grupo controle mostrou-se inalterado (Figura 1 A, E, I).

O potencial odontogênico das DPSCs foi evidenciado através da mudança da forma das células e com a aparente formação de tecido mineralizado com deposição de cálcio nos grupos GI, GII e GIII (Figura 1 C, G, K).

Na avaliação do potencial adipogênico das DPSCs, foi possível observar pequenos vacúolos citoplasmáticos com depósitos de lipídeos (Figura 1 D, H, L).

## DISCUSSÃO

A descoberta das DPSCs abriu novas oportunidades terapêuticas na regeneração biológica dental

(GRONTHOS *et al.*, 2000), desta maneira, o presente estudo buscou

investigar se as diferentes faixas etárias poderiam influenciar na obtenção, senescência e plasticidade das DPSCs.

O tecido pulpar, assim como os outros tecidos do organismo humano, sofre mudanças que dependem da idade, que podem estar relacionadas com a condição de vitalidade da polpa dental (DOMINE; HOLZ, 1991). Wu e colaboradores (2015) avaliaram a obtenção de DPSCs até a idade de 67 anos, com um número de 15 amostras de dentes permanentes. No presente estudo avaliamos também até a idade de 67 anos, em três grupos de diferentes faixas etárias, num total de 34 amostras de polpa dentária de dentes permanentes, permitindo um grupo amostral expressivo. Podemos destacar ainda que no estudo de Yi e

colaboradores (2017) utilizou-se dois grupos distintos com 5 amostras cada grupo, com idades bem diferentes.

Assim, o presente estudo foi inicialmente idealizado com o intuito principal de obter um "n" amostral significativo com 15 amostras por grupo de dentes molares permanentes, que pudesse representar adultos de 18 a 67 anos de idade. No entanto, este objetivo só foi alcançado no GI. Já no grupo GII o "n" amostral obtido foi igual a seis (n= 6), este resultado pode-se justificar pelo reduzido número de indicações de exodontia nesta faixa etária. Enquanto no GIII, foram coletadas 13 amostras, o que pode ter sido ocasionado pela dificuldade de obter dentes com vitalidade pulpar.

Foi possível isolar tecido pulpar e células-tronco mesenquimais nos 3 grupos estabelecidos. Em todas as amostras (100%) do GI (n=15) foi possível obter células, enquanto que no GII das 6 amostras avaliadas, 4 delas, isto é 66,66%, permitiram a obtenção de células e no GIII em 13 amostras avaliadas, 5 delas, isto é, 38,46% permitiram a obtenção de células. Esses dados corroboram com o estudo de Wu e colaboradores (2015), que analisaram a eficiência da obtenção das DPSCs e mostraram que a porcentagem de eficiência foi decrescendo com o aumento da idade.

Neste estudo foram realizados e padronizados todos os procedimentos de obtenção das células-tronco desde a coleta do dente, processamento das polpas dentárias humanas, isolamento das linhagens DPSCs e posterior avaliação da proliferação, senescência e plasticidade celular, nas diferentes faixas etárias dos grupos testados.

Enquanto que estudos (Kellner et al., 2014; Wu et al., 2015; Yi et al., 2017) não descreveram a amostragem em relação ao sexo dos doadores e ao grupo de dentes, este trabalho buscou evidenciar equilíbrio proporcional de gênero na composição dos grupos. Os grupos apresentaram uma mesma proporção entre a quantidade de homens e mulheres. Deste modo também objetivou-se excluir a variabilidade entre os grupos dentários, já que todos os dentes utilizados neste experimento foram molares permanentes.

Pelo ensaio de MTT realizado neste estudo, foi possível observar que as células obtidas derivadas da polpa dentária do GI, GII e GIII mostraram-se saudáveis e mantiveram uma taxa proliferativa dentro do padrão esperado. Estas células mantiveram sua viabilidade ao longo do período analisado, que foi de 7 dias. Entre os dias 3 e 5 de cultivo nenhuma diferença foi observada entre GI e GII, porém entre os dias 3 e 7; 5 e 7 houve um aumento na absorbância, o que demonstrou um aumento da população celular, sendo esse resultado esperado após os 7 dias de cultivo. Huang e colaboradores (2014) encontraram resultados semelhantes a estes.

Sabe-se que muitos fatores induzem a senescência celular. Estes incluem telômeros disfuncionais, danos não teloméricos do DNA, sinais miogênicos excessivos, incluindo os produzidos por oncogênese e desorganização da cromatina. (CAMPISI et al., 2007).

Chu e colaboradores (2013) verificaram a redução progressiva do volume da polpa dentária humana durante o processo de envelhecimento. Estes resultados sugeriram que existem mudanças que relacionam a idade com o potencial de proliferação e diferenciação das DPSCs.

Horibe e colaboradores (2014), avaliaram a taxa de proliferação, e verificaram que esta pode servir como medida para analisar estruturalmente e anatomicamente a polpa dentária, como também verificar quantitativa e qualitativamente o volume celular das DPSC.

No presente estudo foi observado que não houve diferença na taxa de proliferação celular entre os grupos nas diferentes faixas etárias.

Entretanto, neste trabalho foi possível averiguar que os três grupos testados têm uma tendência ao declínio proliferativo celular com o aumento das passagens. Pode-se também constatar que independente da idade do doador, as DPSCs tiveram o mesmo padrão de decaimento na viabilidade celular a partir da passagem 8 (P8).

A diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica é uma das características necessárias para a caracterização de células-tronco mesenquimais. Já as DPSCs podem também caracterizar-se pela diferenciação odontogênica. Neste trabalho, as células derivadas da polpa dentária humana dos Grupos I,

II e III confirmaram a plasticidade, pela indução específica, para cada tipo celular (osteogênica, odontogênica e adipogênica).

As amostras deste estudo não puderam ser submetidas ao processo de diferenciação condrogênica, porém, KARAMZADEH e colaboradores (2012), caracterizaram a plasticidade de células-tronco da polpa dentária humana apenas pela diferenciação odontogênica. No experimento (KARAMZADEH et al., 2012), pode confirmar o potencial de diferenciação em odontoblastos pelo qPCR e assim, verificou a capacidade de mineralização. Estes dados podem contribuir para que a caracterização da plasticidade das DPSCs possa ser avaliada pela diferenciação osteogênica e odontogênica, sem a utilização do processo de capacitação condrogênica.

Vale registrar que, foi verificado uma grande discrepância entre o número de amostras de molares permanentes coletados do GIII, n=13, e a taxa de obtenção 38,46%. Aproximadamente, apenas 1/3 dos tecidos pulparem foram capazes de isolar células, o que nos leva a afirmar que o padrão de celularidade tecidual dessa parcela represente a minoria deste grupo. Tal fato, nos leva a inferir que o perfil metabólico celular dessas amostras esteja exacerbado ao comparar com as outras 8 amostras que compõem o GIII, que nem mesmo foi possível obter células. Assim, os resultados encontrados nos ensaios de proliferação, senescência e plasticidade testados neste estudo, que não apontaram diferença

significativa entre os demais grupos, possam ser justificados.

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a idade foi capaz de influenciar a obtenção de DPSCs, apontando a faixa etária de 18 a 33 anos de idade (G1), como o grupo mais eficiente. Entretanto, ao avaliar a proliferação, senescência e plasticidade celular, todos os grupos se comportaram dentro de um mesmo padrão, sem a interferência da idade do doador.

## REFERENCIAS

1. La Noce M, Paino F, Spina A, et al. State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry* 2014 42: 761 – 768.
2. Erices A, Conget P and Minguell J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* 2000 109: 235 - 242.
3. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 2000 13: 625-13630.
4. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001 72: 211-228.
5. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, et al. Shed: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 2003 5807-5812.
6. Handa K, Saito M, Tsunoda A, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Research* 2002 43: 406-408.
7. Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, et al. Human Periodontal Ligament Cell Sheets Can Regenerate Periodontal Ligament Tissue in an Athymic Rat Model. *Tissue Engineering* 2005, 469-478.
8. Huang G T J, Sonoyama W, Liu Y, et al. The hidden treasure in apical papilla: The potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J. Endodont* 2008 34: 645–651.
9. Chu, R. Age and Sex-Related Differences in Dental Pulp Stem Cells. "MS (Master of Science) thesis", *University of Iowa* 2013.
10. Maslov A Y, Barone T A, Plunkett R J, et al. Neural Stem Cell Detection, Characterization, and Age-Related Changes in the Subventricular Zone of Mice. *The Journal of Neuroscience* 2004, 24: 1726 –1733.
11. Campisi J. Suppressing Cancer: The Importance of Being Senescent. *Science* 2005 309: 886-887.
12. Eklund, S A. Trends in Dental Treatment, 1992 to 2007. *The Journal of the American Dental Association* 2010 141: 391-399.
13. Kellner M, Steindorff M M, Stempel J F, et al. Differences of isolated dental stem cells dependent on donor age and consequences for autologous tooth replacement. *Elsevier* 2014 5 9: 5 5 9 – 5 6 7.
14. Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* 2002 13: 4279–4295.
15. Karamzadeh R, Eslaminejad M B, Aflatoonian R. Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods. *Journal of Visualized Experiments* 2012 10: 3791-437.
16. Domine L, Holz J. The aging of the human pulp-dentin organ. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 1991 101: 725-33.
17. Wu W, Zhou J, Xu C, et al. Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages.

- Molecular Medicine Reports 2015 12: 5127-5134.
18. Yi Q, Liu O, Yan F, et al. Analysis of Senescence-Related Differentiation Potentials and Gene Expression Profiles in Human Dental Pulp Stem Cells. *Cells Tissues Organs* 2017 203:1–11.
  19. Huang C E, Wei Hu F, Yu C H, et al. Concurrent Expression of Oct4 and Nanog Maintains Mesenchymal Stem-Like Property of Human Dental Pulp Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2014 15: 18623-18639.
  20. Campisi J, d'Adda F F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells 2007. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:729–40.
  21. Horibe H, Murakami M, Iohara K, Hayashi Y, Takeuchi N, et al. Isolation of a Stable Subpopulation of Mobilized Dental Pulp Stem Cells (MDPSCs) with High Proliferation, Migration, and Regeneration Potential Is Independent of Age. *PLoS ONE* 2014 95: e98553.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

- Que foi possível obter DPSCs nos três grupos avaliados, sendo que a eficiência da obtenção decresceu com o aumento da idade dos doadores;
- Que a proliferação celular das DPSCs dos grupos testados, através do ensaio de proliferação colorimétrico MTT, apresentaram uma taxa proliferativa dentro dos padrões esperados, sem diferença entre os grupos estudados;
- Que a senescência das DPSCs em todas as faixas etárias analisadas apresentou tendência ao declínio proliferativo celular com o aumento das passagens.
- Que as células isoladas da polpa dentárias dos três grupos avaliados apresentaram plasticidade celular para se diferenciar nas linhagens osteogênica, odontogênica e adipogênica.

## 6. REFÊRENCIAS

CAMPISI J, et al. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8:729–40, 2007.

CAMPISI J. Suppressing Cancer: The Importance of Being Senescent. **Science**. 309: 886-887, 2005.

CHU R. Age and Sex-Related Differences in Dental Pulp Stem Cells."MS (Master of Science) thesis".**University of Iowa** 2013.

DOMINE L, et al. The aging of the human pulp-dentin organ. **Schweiz Monatsschr Zahnmed**. 101: 725-33, 1991.

EKLUND S A.Trends in Dental Treatment, 1992 to 2007. **The Journal of the American Dental Association**. 141: 391-399, 2010.

ERICES, A. *et al.* Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Hematology**. v. 109, p. 235-242, 2000.

GRONTHOS, S., M. MANKANI, J. BRAHIM, P. G. ROBEY and S. SHI: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97(25): 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.

HORIBE H, et al. Isolation of a Stable Subpopulation of Mobilized Dental Pulp Stem Cells (MDPSCs) with High Proliferation, Migration, and Regeneration Potential Is Independent of Age. **PLoS ONE**. 95: e98553, 2014.

HUANG C E, et al. Concurrent Expression of Oct4 and Nanog Maintains Mesenchymal Stem-Like Property of Human Dental Pulp Cells. **Int. J. Mol. Sci**. 15: 18623-18639, 2014.

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.

KARAMZADEH et al. Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods. **Journal of Visualized Experiments**. 10: 3791-437, 2012.

KELLNER M, et al. Differences of isolated dental stem cells dependent on donor age and consequences for autologous tooth replacement. **Elsevier**. 59: 559 – 567, 2014.

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

MASLOV A Y, et al. Neural Stem Cell Detection, Characterization, and Age-Related Changes in the Subventricular Zone of Mice. **The Journal of Neuroscience**. 24: 1726–1733, 2004.

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.

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

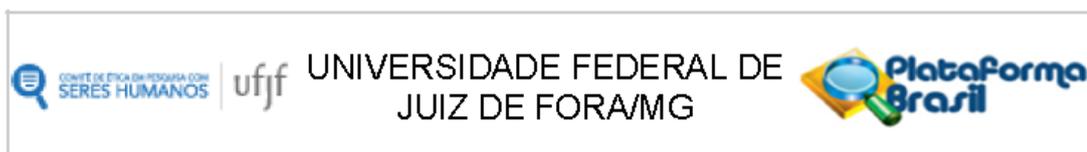
YI Q, et al. Analysis of Senescence-Related Differentiation Potentials and Gene Expression Profiles in Human Dental Pulp Stem Cells. **Cells Tissues Organs**. 203:1–11, 2017.

ZUK P A, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**. 13: 4279–4295, 2002.

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.

## 7. ANEXO E APÊNDICE

### ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação comparativa da obtenção de Células-tronco da polpa dental humana em diferentes idades.

**Pesquisador:** ANTÔNIO MÁRCIO RESENDE DO CARMO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 56694716.1.0000.5147

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.641.745

**Situação do Parecer:**

Aprovado

## 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)**

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Avaliação comparativa da obtenção de células-tronco da polpa humana em diferentes idades**”. Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano tecido mole de dentro do dente (**Polpa Dental**), cuja utilização está expressamente vinculada somente e esse projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos verificar se variações fisiológicas decorrentes da idade na polpa dental afetam a obtenção de células-tronco viáveis.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Iremos (1). Obter o tecido mole de dentro de seu dente permanente vital por procedimento de canal ou extração do dente, previamente indicados; (2) obter células-tronco (células que são capazes de dar origem a outras células) adultas do tecido mole de dentro do seu dente ; (3) avaliar suas variações fisiológicas decorrentes da idade em suas células-tronco (células que são capazes de dar origem a outras células); (4) caracterizar as células-tronco (células que são capazes de dar origem a outras células) quanto tipo, capacidade de se multiplicar e envelhecimento celular; e (5) diferenciá-las, visando testar a capacidade de se transformarem em tecidos diferentes.

Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em “Risco Mínimo”, ou seja, um pequeno desconforto proveniente do procedimento. A pesquisa contribuirá de maneira significativa a entender melhor os mecanismos celulares humanos, usando as células-tronco como modelo, visando melhorar futuros tratamentos, também contribuirá próximos estudos com células-tronco, já que facilitaria o trabalho, tempo e custo destas futuras pesquisas. Os benefícios desta pesquisa serão destinados a construção do conhecimento na área específica, ao serviço de Odontologia e Medicina, a formação de Cirurgião-Dentista, enfim, à sociedade como um todo.

Para participar deste estudo 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 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 você é atendido (a). O pesquisador tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

Você 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, e a outra será fornecida para você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa **“Avaliação comparativa da obtenção de células-tronco da polpa humana em diferentes idades”**, 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. 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](mailto:cep.propesq@ufjf.edu.br)

**Nome do Pesquisador Responsável: Professor Dr. 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](mailto:antoniomarcio.resende@ufjf.edu.br)





