

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

***CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS DERIVADAS DE POLPA DE
DENTE PERMANENTE DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS***

Aluno: Ana Helena Selenko

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman

Coorientadora: Prof^a. Dra. Letícia Fracaro

Curitiba, Novembro/2024

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

***CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS DERIVADAS DE POLPA DE
DENTE PERMANENTE DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS***

Dissertação de mestrado acadêmico
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud
Brofman

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Fracaro

Curitiba, Novembro/ 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo o apoio e compreensão. Agradeço principalmente a minha mãe por sempre ser toda ouvidos, sempre dar os melhores conselhos e acreditar no meu potencial. E é claro, agradeço ao meu irmão por sempre me ajudar a resolver os problemas quando meu computador resolvia dar uma parada.

Agradeço aos meus amigos de laboratório: Gabriel Moraes, Milena Lima pelas risadas e pelos momentos de “O que vocês querem assistir hoje?”, fazendo da nossa rotina não ser apenas sobre assuntos relacionados a pesquisa. E sim, agradeço a Nathália Forti que será minha eterna B2.

Agradeço ao meu amigo Mateus Eduardo pelos momentos de “Vamos tomar um café” e por sempre trazer um chocolate ou paçoca para alegrar meu dia.

Agradeço a minha amiga Emeline Huk pelo suporte e por me mostrar o mundo da corrida, da qual hoje não vivo sem.

Agradeço ao Dr. Paulo Roberto Slud Brofman pela oportunidade de realizar o projeto no laboratório.

Agradeço imensamente a Clarice por passar todos os dias no laboratório retirando o lixo e deixar aquele cheirinho de limpeza e agradeço a Dona Lurdes por sempre ajudar a manter a ordem quando a Clarice não estava por perto. Agradeço a essas duas mulheres por sempre disponibilizar um cantinho do sofá após o horário do almoço para colocarmos a fofoca em dia.

Agradeço também a minha querida Adriane por passar não somente uma, mas duas, três vezes no laboratório e nos ajudar com a limpeza dos materiais. E é claro pelos cafés da manhã no nosso eterno TECPUC.

Agradeço imensamente a Amanda da clínica de odontologia M&M, por sempre nos ajudar com as coletas das amostras.

Agradeço a CAPES pelo fomento que recebi durante esses dois anos.

Agradeço a Paula e Vanessa, secretárias do Programa de Pós-Graduação da PUCPR, por sanar todas as dúvidas relacionadas ao mestrado.

Agradeço ao Professor Dr. Luiz Guilherme Achcar Capriglione por me aceitar como aluna de iniciação científica, porque sem essa oportunidade eu não estaria onde estou hoje.

Agradeço a equipe LECC, e a todos que algum dia passaram por lá e contribuíram na “formação” da Ana Selenko de hoje.

E gostaria de agradecer imensamente a minha coorientadora Letícia Fracaro por todos os anos de ensinamento e confiar a mim um mestrado.

IDENTIFICAÇÃO DA BANCA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina e Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 12 dias do mês de novembro de 2024 às 14:30, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação "CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS DERIVADAS DE POLPA DE DENTE PERMANENTE DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS" apresentado por Ana Helena Selenko para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman - Presidente	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza - PUCPR	
Prof. Dr. Alejandro Correa Dominguez - Fiocruz/PR	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza
Prof. Dr. Alejandro Correa Dominguez

Conceito: *Aprovado*
Conceito: *Aprovado*
Conceito: *APROBADO*

Parecer Final: *Aprovado*

Observações da Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a normatização Vancouver. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório Experimental de Cultivo Celular, no Núcleo de Tecnologia Celular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente dissertação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes fontes de MSC encontradas no tecido dentário.	20
Figura 2. Desenho esquemático do desenvolvimento do dente.....	21
Figura 3 Desenho de estudo.	35
Figura 4 Cultivo de uma amostra representativa de cada grupo das DPSC	45
Figura 5. Caracterização imunofenotípica das DPSC de quatro faixas etárias.	46
Figura 6 Porcentagem de células positivas para o marcador STRO-1.	47
Figura 7 Viabilidade celular das quatro faixas etárias de DPSC.....	47
Figura 8 Imagem representativa da diferenciação <i>in vitro</i> das DPSC das quatro faixas etárias.	48
Figura 9 Imagem representativa da diferenciação <i>in vitro</i> das DPSC.....	49
Figura 10 Quantificação das DPSC diferenciadas para a linhagem adipogênica após a coloração utilizando Oil Red.	50
Figura 11. Quantificação das DPSC diferenciadas para a linhagem osteogênica utilizando espectrofotometria após a coloração com Alizarina Red.	51
Figura 12 Quantificação das DPSC diferenciadas para linhagem osteogênica.	52
Figura 13 Ensaio de formação de colônia das DPSC.	53
Figura 14 Média do número de colônias e porcentagem de eficiência de formação de colônias dos grupos de DPSC.	54
Figura 15 Análise cariotípica.	55
Figura 16 Proliferação das DPSC de diferentes faixas etárias.	56
Figura 17 Senescência das DPSC de diferentes faixas etárias.	57
Figura 18 Expressão dos marcadores neuronais avaliados por citometria de fluxo nos grupos A, B, C e D de DPSC.....	58
Figura 19 Expressão <i>in vitro</i> das DPSC de todos os grupos marcadas com o anticorpo anti- β tubulinaIII e intensidade de fluorescência da expressão da β tubulinaIII.	59
Figura 20 Quantificação da intensidade de fluorescência do marcador β tubulina III nas DPSC.....	60
Figura 21 Expressão do anticorpo anti-nestina nas DPSC de todos os grupos.	61
Figura 22 Quantificação da intensidade de fluorescência da DPSC de todos os grupos marcadas com anti-Nestina.	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Separação das amostras em grupos conforme faixa etária.	35
Quadro 2 Marcadores utilizados na caracterização das DPSC.	37
Quadro 3 Marcadores neuronais utilizados na imunofenotipagem das DPSC.....	42

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Números de dentes coletados e isolados de cada grupo de DPSC.	44
Tabela 2. Cariótipos dos diferentes grupos e amostras de DPSC.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	aloficocianina (do inglês <i>allophycocyanin</i>)
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	albumina sérica bovina (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
CD	grupos de diferenciação celular (do inglês <i>cluster of differentiation</i>)
CFU-F	unidade formadora de colônias fibroblastóides (do inglês <i>colony forming units-fibroblast</i>)
CFSE	éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (do inglês <i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>)
CE	células estromais
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DFPC cells	células precursoras do folículo dentário (do inglês <i>dental follicle precursor cells</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DO	densidade óptica
DPSC	células estromais derivadas de polpa de dente permanente (do inglês <i>Dental Pulp stromal cells</i>)
EDTA	ácido etilenodiamino tetraacético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EdU	5-etinil-2'-desoxiuridina
FACS	separador de células ativadas por fluorescência (do inglês <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FITC	isotiocianato de fluoresceína (do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
GF	fibroblasto gengival (do inglês <i>gingival fibroblast</i>)
IMDM	meio Iscove modificado Dulbecco (do inglês <i>Iscoves Modified Dulbecco's Medium</i>)
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (do inglês <i>International System Nomenclature Cytogenetic</i>)
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (do inglês <i>International Society for Cell and Gene Therapy</i>)
Ki-67	marcador de proliferação
LECC	Laboratório Experimental de Cultivo Celular
LNGFR	receptor de fator de crescimento do nervo de baixa afinidade (do inglês <i>low-affinity nerve growth factor receptor</i>)

MCAM	molécula de adesão celular de melanoma (do inglês <i>melanoma cell adhesion molecule</i>)
MO	medula óssea
MSC	células estromais mesenquimais (do inglês <i>mesenchymal stromal cell</i>)
NCAM	molécula de adesão celular neuronal (do inglês <i>neural cell adhesion molecule</i>)
NGF	fator de crescimento do nervo (do inglês <i>nerve growth factor</i>)
NK	células natural killers
NTR	receptor de neurotrofina (do inglês <i>neurotrophin receptor</i>)
PBS	solução salina fosfatada (do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDLSC	células estromais do ligamento periodontal (do inglês <i>periodontal ligament stromal cells</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês <i>phycoerytrin</i>)
PerCP	complexo proteína clorofila peridínina (do inglês <i>peridinin chlorophyll protein complex</i>)
PFA	paraformaldeído
ROS	espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
SA-B-GAL	beta galactosidase associada a senescência
SASP	fenótipo de secreção associado a senescência
SBF	soro bovino fetal (do inglês <i>fetal bovine serum</i>)
SCAP	células estromais da papila apical (do inglês <i>stromal cells from apical papilla</i>)
SHED	células estromais de polpa de dente decíduo esfoliado (do inglês <i>stromal cells from human exfoliated deciduous teeth</i>)
STRO-1	<i>stromal precursor antigen 1</i>
TUJ-1	Beta-tubulina de classe III específica para neurônios
TRITC	tetrametilrodamina (do inglês <i>Tetramethylrhodamine</i>)
TrkA	receptor de tropomiosina quinase A (do inglês <i>tropomyosin receptor kinase A</i>)
BtubulinaIII	beta tubulina de classe III
β-Galactosidase	beta galactosidase

SÍMBOLOS

%	porcentagem
cm ²	centímetro quadrado
CO ²	dióxido de carbono
g/mL	grama/mililitro
M	molar
mg/mL	miligrama/mililitro
nm	nanômetro
®	marca registrada
™	marca comercial (do inglês <i>Trade Mark</i>)
µg/mL	micrograma/mililitro
µL	microlitro

RESUMO

As células estromais mesenquimais são multipotentes, caracterizadas por sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversas linhagens. As MSC podem ser obtidas de vários tecidos do corpo, incluindo tecidos dentários, como as células estromais derivadas da polpa de dentes permanentes (DPSC). As DPSC apresentam uma alta taxa de proliferação e baixa taxa de senescência *in vitro*, além de possuírem vantagem na indução à diferenciação neuronal devido à sua origem ectodérmica comum à linhagem neuronal. Este estudo visa caracterizar e avaliar as propriedades das DPSC quatro faixas etárias. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (4.746.491). Foram coletados dentes permanentes (3º molares) de adultos de quatro faixas etárias separadas em: Grupo A (20-25 anos), Grupo B (30-35 anos), Grupo C (40-45 anos) e Grupo D (50-55 anos). As células foram isoladas com collagenase tipo II e expandidas *in vitro*. As células foram caracterizadas por diferenciação em duas linhagens e por imunofenotipagem. Para analisar a capacidade de formação de colônias *in vitro*, foi realizado o ensaio de unidade formadora de colônia (CFU-F). A estabilidade genética das células foi verificada por citogenética através do bandejamento G. A taxa de proliferação e senescência das células foi avaliada por citometria de fluxo. A expressão de marcadores relacionados à linhagem/diferenciação neuronal foi analisada por citometria de fluxo (CD56, CD146 e CD271) e imunofluorescência (β -Tubulina III e Nestina). Todos os resultados foram analisados no GraphPad Prism 9.0. As células apresentaram características de MSC, corroborando com os critérios da ISCT. Todos os grupos diferenciaram-se em linhagens adipogênica e osteogênica, com uma possível limitação nas duas diferenciações observada através da coloração. A quantificação do potencial de diferenciação adipogênica mostrou diferenças significativas entre os grupos A e C ($p < 0,0001$), A e D ($p < 0,0001$), B e C ($p < 0,0001$) e B e D ($p < 0,0017$), onde os grupos C e D apresentaram maior potencial de diferenciação em comparação aos grupos jovens. Já a quantificação da diferenciação osteogênica mostrou um maior potencial nos grupos B e D. O potencial de formação de colônias *in vitro* diminuiu com o avanço da idade ($p < 0,0001$). As amostras com índice mitótico suficiente para análise citogenética revelaram cariótipos normais, indicando estabilidade genética (Grupos A-C). No entanto, não foi possível verificar a estabilidade genética nas amostras do grupo D devido ao baixo índice de divisão celular. O grupo D apresentou uma menor taxa (23,30%) de células proliferando em 24 horas e uma maior taxa de células senescentes (56,50%) após a mensuração da atividade da β -Galactosidase ($p < 0,0001$). A análise dos marcadores por citometria de fluxo não revelou diferenças significativas entre os grupos. A expressão da β -Tubulina III por imunofluorescência não apresentou diferenças entre os grupos. No entanto, a expressão do marcador Nestina mostrou diferenças estatísticas entre os grupos A e D ($p < 0,0389$), B e D ($p < 0,0078$) e C e D ($p < 0,0008$). Com os resultados obtidos foi possível observar que os grupos A, B e C mostraram maior eficiência na formação de colônias, alta taxa de proliferação e baixa taxa de células senescentes em comparação ao grupo D. Com relação aos marcadores neuronais, todas as DPSC expressaram os marcadores de superfície e apresentaram potencial de expressão para β -Tubulina III, porém sem diferença estatística significativa, enquanto para o marcador Nestina foi possível observar a expressão em todos os grupos, com diferença estatística entre os grupos. Estes resultados demonstram uma limitação da idade sobre a proliferação, senescência e expressão de marcadores neuronais nas DPSC, indicando a necessidade de critérios específicos para o uso dessas células em estudos futuros.

Palavras-chave: Proliferação, Senescência, Envelhecimento

ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are multipotent, characterized by their ability for self-renewal and differentiation into various lineages. MSCs can be obtained from various tissues in the body, including dental tissues, such as dental pulp stem cells (DPSCs) derived from permanent teeth. DPSCs exhibit a high proliferation rate and low senescence rate *in vitro*, as well as an advantage in neuronal differentiation induction due to their ectodermal origin, which is common to neuronal lineage. This study aims to characterize and evaluate the properties of DPSCs in four age groups. This study was approved by the Research Ethics Committee of PUCPR (4,746,491). Permanent teeth (third molars) were collected from adults in four age groups: Group A (20-25 years), Group B (30-35 years), Group C (40-45 years), and Group D (50-55 years). The cells were isolated with type II collagenase and expanded *in vitro*. The cells were characterized by differentiation into two lineages and by immunophenotyping. To analyze the *in vitro* colony-forming capacity, a colony-forming unit (CFU-F) assay was performed. The genetic stability of the cells was verified by cytogenetics through G-banding. The proliferation and senescence rates of the cells were evaluated by flow cytometry. The expression of markers related to neuronal lineage/differentiation was analyzed by flow cytometry (CD56, CD146, and CD271) and immunofluorescence (β -Tubulin III and Nestin). All results were analyzed using GraphPad Prism 9.0. The cells exhibited MSC characteristics, corroborating with ISCT criteria. All groups differentiated into adipogenic and osteogenic lineages, with a possible limitation in both differentiations observed through staining. The quantification of adipogenic differentiation potential showed significant differences between groups A and C ($p < 0.0001$), A and D ($p < 0.0001$), B and C ($p < 0.0001$), and B and D ($p < 0.0017$), where groups C and D demonstrated a greater differentiation potential compared to the younger groups. In contrast, the quantification of osteogenic differentiation showed greater potential in groups B and D. The *in vitro* colony-forming potential decreased with advancing age ($p < 0.0001$). Samples with a sufficient mitotic index for cytogenetic analysis revealed normal karyotypes, indicating genetic stability (Groups A-C). However, genetic stability could not be verified in samples from group D due to the low cell division index. Group D showed a lower rate (23.30%) of proliferating cells within 24 hours and a higher rate of senescent cells (56.50%) after measuring β -Galactosidase activity ($p < 0.0001$). The analysis of markers by flow cytometry did not reveal significant differences between groups. The expression of β -Tubulin III by immunofluorescence showed no differences between groups. However, the expression of the Nestin marker showed statistical differences between groups A and D ($p < 0.0389$), B and D ($p < 0.0078$), and C and D ($p < 0.0008$). The results indicate that groups A, B, and C demonstrated greater efficiency in colony formation, high proliferation rates, and low senescence rates compared to group D. Regarding neuronal markers, all DPSCs expressed surface markers and showed potential expression for β -Tubulin III, but without significant statistical differences, while the expression of Nestin was observed in all groups, with statistical differences between the groups. These results demonstrate an age-related limitation on proliferation, senescence, and expression of neuronal markers in DPSCs, indicating the need for specific criteria for the use of these cells in future studies.

Keywords: Proliferation, Senescence, Aging

RESUMO POPULAR

Este estudo focou em entender como células especiais, chamadas de células estromais, que são encontradas na polpa de dentes como os sisos, funcionam e mudam conforme a idade da pessoa. Essas células são muito interessantes para a ciência porque têm a capacidade de se multiplicar e se transformar em vários tipos de células do corpo, como células de gordura, de osso e até células do sistema nervoso. Por isso, elas são usadas em pesquisas que buscam novos tratamentos para tratar doenças no futuro. No entanto, com o passar dos anos, as células do nosso corpo passam por mudanças naturais que podem fazer com que elas percam parte de suas habilidades. Por exemplo, células de pessoas mais velhas podem ter mais dificuldade em se multiplicar ou em se transformar em outros tipos de células. O objetivo deste estudo foi investigar como a idade dos doadores de dentes afeta essas células da polpa dentária. Para realizar a pesquisa, foram coletados dentes de pessoas em quatro grupos de idades diferentes, de 20 a 55 anos. Essas células foram isoladas e estudadas em laboratório para entender como elas se comportavam em relação a sua capacidade de formar colônias (ou seja, criar novas células), se multiplicar, e expressar marcadores que mostram sua capacidade de se transformar em células nervosas. Os resultados mostraram que as células de doadores mais jovens tinham uma capacidade maior de se multiplicar e menos sinais de envelhecimento em comparação com as células de doadores mais velhos. Isso significa que, conforme a idade avança, essas células podem ter um desempenho reduzido. Apesar disso, todas as células, independentemente da idade, mostraram que poderiam virar células nervosas. No entanto, um dos marcadores usados para identificar essa capacidade apareceu em menor quantidade nas células de pessoas mais velhas. Esses achados são importantes porque mostram que a idade do doador influencia as características e o comportamento dessas células. Isso deve ser levado em consideração em pesquisas futuras e no desenvolvimento de tratamentos que usam essas células para ajudar a regenerar tecidos e tratar doenças, especialmente aquelas que afetam o sistema nervoso, como o Alzheimer e outras condições neurodegenerativas. Essa compreensão ajuda a guiar a escolha das células mais adequadas para estudos e terapias, dependendo da idade do doador e do tipo de tratamento que se busca desenvolver. A pesquisa é um passo importante para garantir que as terapias que usam células da polpa dentária sejam seguras e eficazes para todos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS	18
2.2 CÉLULAS ESTROMAIS DERIVADAS DE TECIDOS DENTÁRIOS	19
2.3 CÉLULAS ESTROMAIS DERIVADAS DE POLPA DE DENTE PERMANENTE...	20
2.4 ESTABILIDADE CARIOTÍPICA	22
2.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR	23
2.6 SENESCÊNCIA CELULAR	25
2.7 MARCADORES NEURONAIS	26
2.8 ENVELHECIMENTO E CÉLULAS-TRONCO	29
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVO GERAL	34
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1 ISOLAMENTO E CULTIVO	36
5.2 CARACTERIZAÇÃO	36
5.2.1 Caracterização imunofenotípica	37
5.2.2 Diferenciação	37
5.2.3 Coloração	38
5.2.3.1 Quantificação da diferenciação osteogênica	38
5.2.3 Ensaio de unidade formadora de colônias fibroblastóides (CFU-F)	39
5.3 ANÁLISE CARIOTÍPICA	39
5.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO	40
5.5 ENSAIO DE SENESCÊNCIA	41
5.6 ANÁLISE DE MARCADORES NEURONAIS	41
5.6.1 Expressão de marcadores neuronais por citometria de fluxo	41
5.6.2 Expressão de marcadores neuronais por imunofluorescência	42
5.6.3 Quantificação da intensidade do sinal fluorescente	43
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6. RESULTADOS	43
6.1 DPSC DE FAIXAS ETÁRIAS MAIS AVANÇADAS APRESENTAM MENOS CÉLULAS ADERENTES E EM PROLIFERAÇÃO	43
6.2 DPSC DO GRUPO D APRESENTARAM MORFOLOGIA DIFERENTE DA FIBROBLASTÓIDE	44
6.2.1 DPSC de todos os grupos apresentaram características imunofenotípicas de MSC45	

6.2.2 DPSC apresentaram potencial para diferenciação osteogênica e adipogênica.....	48
6.2.3 DPSC do grupo com mais de 50 anos apresentaram um potencial reduzido na formação de colônias.....	52
6.3 DPSC DE FAIXA ETÁRIA MAIS AVANÇADA NÃO APRESENTOU NÚMERO SUFICIENTE DE METÁFASES PARA ANÁLISE.....	54
6.4 O FATOR IDADE REDUZ AS TAXAS DE PROLIFERAÇÃO DAS DPSC	55
6.5 AS DPSC ISOLADAS DE FAIXA ETÁRIA ACIMA DE 50 ANOS APRESENTAM MAIOR TAXA DE CÉLULAS SENESCENTES	56
6.6 AS DPSC NÃO APRESENTAM DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO DE MARCADORES NEURONAIS DE SUPERFÍCIE	57
6.7 AS DPSC NÃO DIFEREM NA EXPRESSÃO DO MARCADOR β TUBULINA III ..	58
6.8 AS DPSC DE FAIXA ETÁRIA MAIS AVANÇADA APRESENTAM UMA EXPRESSÃO REDUZIDA PARA O MARCADOR NESTINA	60
7. DISCUSSÃO	63
8. CONCLUSÃO	74
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	75
10. REFERÊNCIAS	77
11. APÊNDICE	90
12. ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

As células estromais mesenquimais (MSC – do inglês *mesenchymal stromal cells*), também conhecidas por células-tronco mesenquimais, tem atraído atenção do mundo científico desde o primeiro isolamento realizado na década de 60. Nessa época foi isolado MSC da medula óssea que segundo Friedenstein, eram consideradas células plástico aderentes e que possuíam morfologia fibroblastóide, além disso, as células isoladas mostravam alta capacidade proliferativa e expansão clonal (1,2). Embora a medula óssea seja uma das fontes mais utilizadas até hoje, outras fontes vêm sendo estudadas, como é o caso das células derivadas do tecido dentário (3–10).

Após a descoberta de células estromais derivadas de polpa de dente permanente (DPSC) por Gronthos e colaboradores (2000)(3), foi constatado que além dessa fonte ser capaz de regenerar uma matriz mineralizada com odontoblastos e tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos similares ao observado em dentes humanos normais, as DPSC são capazes também de se diferenciarem em outras linhagens, tais como: melanócitos, miócitos, cardiomiócitos e neurônios (10,11). Estudos demonstram que células derivadas dos tecidos dentários possuem forte atividade neuroregenerativa que podem auxiliar na recuperação de tecidos neuronais lesionados (12,13).

As MSC têm sido foco em estudos *in vitro*, pré-clínico e clínico devido a sua capacidade de regular processos inflamatórios, evento essencial na redução em danos de tecidos e devido a sua capacidade em promover reparo em tecidos (14).

Embora as MSC sejam consideradas ferramentas promissoras devido ao seu uso na medicina regenerativa, existem limitações relacionadas ao aumento da idade do doador que interferem na: diminuição da proliferação celular, do potencial de diferenciação bem como de regeneração (15). Por esse motivo estudar os efeitos que a idade tem na fonte celular é de

extrema importância, porque uma vez caracterizadas as células podem ser padronizadas trazendo dessa forma uma maior qualidade para estudos *in vitro* e *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

As MSC, também conhecidas como células estromais mesenquimais, são células adultas com propriedades multipotentes e funcionalmente definidas. Essas células possuem capacidade de autorrenovação, podendo se diferenciar em várias linhagens celulares, além de apresentarem uma extensa atividade parácrina e imunomoduladora (16–19). A descrição inicial dessas células foi feita por Friedenstein e colaboradores em 1966 (2), quando foram identificadas como precursores de fibroblastos da medula óssea (20,21).

Devido a necessidade de padronizar as MSC, a Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (ISCT - do inglês *International Society for Cell and Gene Therapy*), estabeleceu alguns critérios para a caracterização das MSC, sendo eles: aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, diferenciação em pelo menos três linhagens celulares (adipócitos, condrócitos e osteoblastos) e a caracterização imunofenotípica onde as MSC devem expressar os marcadores, CD73, CD90 e CD105 ($\geq 95\%$) e possuir uma expressão reduzida para CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR ($\leq 2\%$) (18,21,22). Alguns marcadores não mencionados pela ISCT, são usados em diversos estudos para caracterização das MSC, como é o caso do marcador STRO-1(23,24). Na comunidade científica, há uma busca incessante por marcadores capazes de determinar, de forma isolada, se as células podem ser classificadas como MSC. O STRO-1 (*stromal precursor antigen 1*) é um desses marcadores, mas sua aplicação não é universal para as fontes de MSC, devido a diversas limitações do seu uso. Uma dessas limitações está relacionada à incerteza sobre se sua expressão está correlacionada com a multipotência celular e o potencial clonogênico, uma vez que esse marcador reconhece células progenitoras de unidades formadoras de

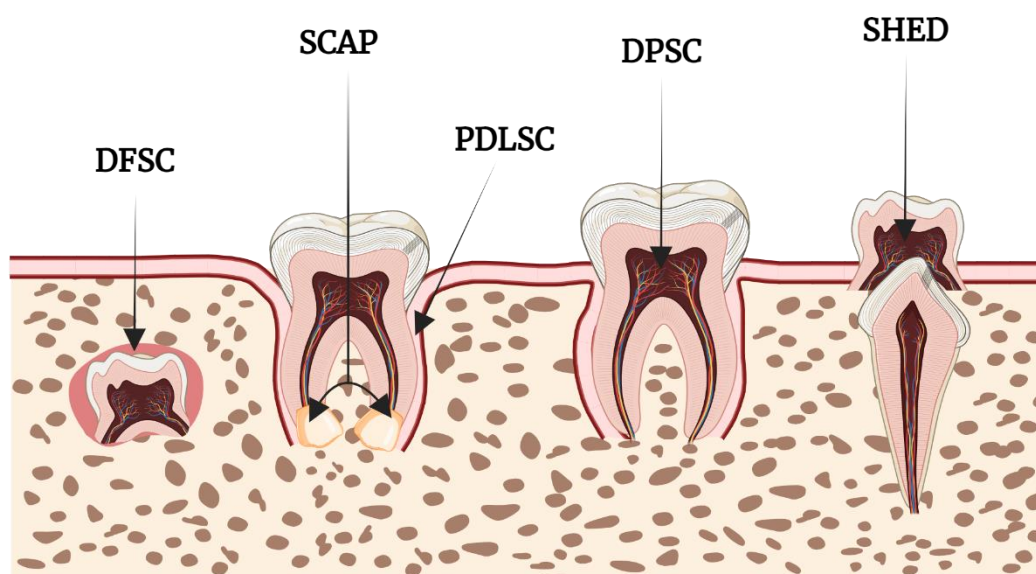
colônias fibroblastóides (24,25). Diversos estudos têm tentado demonstrar que a utilização deste marcador é possível, mas os resultados são controversos (26–29).

A fonte de MSC mais estudada é a medula óssea (MO), no entanto, essa fonte apresenta algumas limitações quanto a sua utilização como coleta invasiva e baixo rendimento, oferecendo entre 0,01% a 0,001% de MSC (30,31). Devido ao baixo número de células obtidas e a dificuldade da coleta, outras fontes têm sido pesquisadas como o cordão umbilical, tecido adiposo, e tecidos dentários (31,32).

2.2 CÉLULAS ESTROMAIS DERIVADAS DE TECIDOS DENTÁRIOS

O tecido dentário apresenta diferentes fontes de MSC como as células estromais da polpa de dente permanente (DPSC – do inglês *dental pulp stromal cells*), células estromais de dente decíduo esfoliado (SHED – do inglês *stromal cells from human exfoliated deciduous teeth*), células estromais da papila apical (SCAP – do inglês *stromal cells from apical papilla*), células estromais do ligamento periodontal (PDLSC – do inglês *periodontal ligament stromal cells*) e células precursoras do folículo dentário (DFPC – do inglês *dental follicle precursor cells*)(33,34) (Figura 1).

Figura 1. Diferentes fontes de MSC encontradas no tecido dentário.



DFSC: células precursoras do folículo dentário; SCAP: células estromais da papila apical; PDLSC: células estromais do ligamento periodontal; DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente; SHED: células estromais de dente decíduo esfoliado.

Fonte: adaptado de Madhoun (2021)

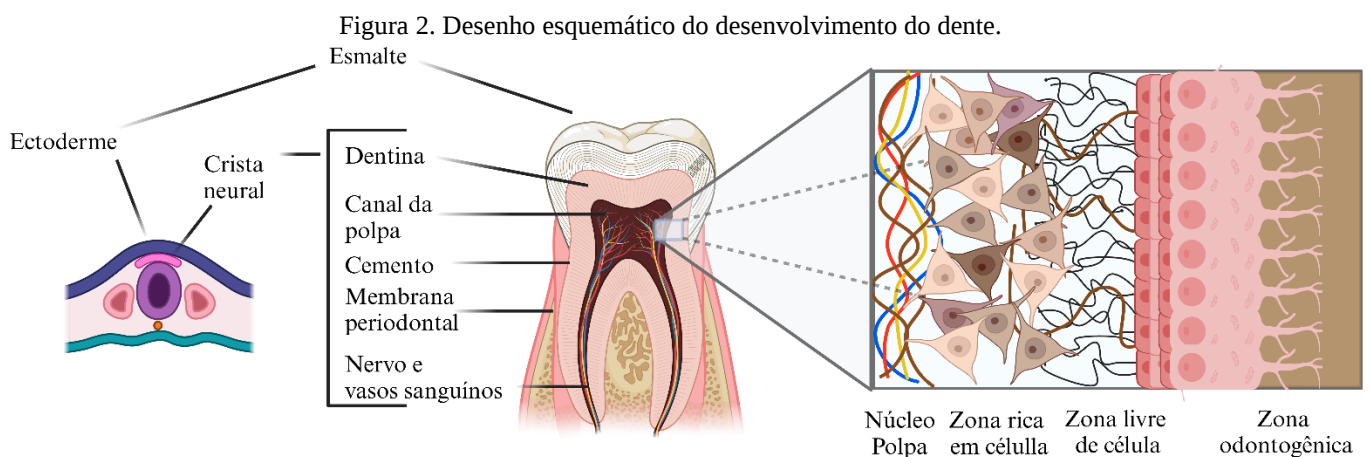
Alguns estudos sugerem que algumas células de tecidos dentários e periodontais podem possuir um potencial superior de diferenciação em múltiplas linhagens podendo ser comparado as células embrionárias e as células pluripotentes induzidas (35–38).

2.3 CÉLULAS ESTROMAIS DERIVADAS DE POLPA DE DENTE PERMANENTE

Uma das fontes de tecido dentário que pode ser utilizada e que está sendo muito explorada nos estudos para o isolamento de MSC é a polpa de dente (11,39,40). A polpa de dente é o tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado localizado no centro do dente e que consiste em quatro regiões: zona odontogênica periférica, zona intermediária livre de células, zona rica em células e núcleo da polpa. A zona odontogênica periférica, possui odontoblastos especializados que formam a dentina, enquanto a zona intermediária livre de células possui células especializadas que circundam a zona próxima à camada odontoblástica

periférica. Já a zona rica em células, possui fibroblastos, macrófagos, MSC que proliferam e se diferenciam em odontoblastos. E por fim o núcleo da polpa que consiste em diversas populações de células, como macrófagos e células dendríticas que mantem a funcionalidade e homeostase do dente (Figura 2) (3,41,42). Estas MSC possuem localização perivascular e potencial para diferenciação em diversas linhagens, semelhantes a MSC obtidas a partir de outros tecidos (37).

O tecido da polpa dentária é considerado “ectomesenquimal”, uma vez que essas células derivam das células ectodérmicas que crescem na periferia do tubo neural durante o desenvolvimento embrionário, migram para a região oral sofrendo transição para um fenótipo mesenquimal, diferenciando-se em células-tronco da crista neural e consequentemente em vários outros tipos celulares dentro da região craniofacial. Acredita-se que a capacidade de autorrenovação e multipotência das células da crista neural pré ou pós-migratórias sejam mantidas pelas MSC derivadas da crista neural em tecidos que estão em desenvolvimento conferindo propriedades regenerativas(11,43). Essas células podem ser isoladas de dentes permanentes e dentes decíduos que normalmente são descartados, não sendo necessária uma cirurgia extra para sua obtenção, o que torna a polpa de dente uma fonte não invasiva de MSC.



Fonte: adaptado de Madhoun (2021)(41).

As DPSC que são isoladas de terceiros molares apresentam características de MSC, tais como autorrenovação e multipotência, além de possuírem uma certa vantagem quando comparadas a MSC isoladas de outros dentes adultos, pelo fato de estas células não estarem completamente desenvolvidas, apresentando dessa forma uma característica mais imatura quando extraída (37,44,45). Além disso, a polpa apresenta uma vantagem no rendimento de células isoladas quando comparado a outras fontes como medula óssea e tecido de cordão umbilical, onde cerca de 5% das células são MSC (41).

As DPSC quando comparado a outras fontes de MSC apresentam um alto potencial clonogênico, alta taxa de proliferação, bem como capacidade de autorrenovação e capacidade para diferenciar-se em outras linhagens celulares como condrócitos, osteócitos, adipócitos, células neurais e miócitos. Além disso, apresentam uma menor porcentagem de senescência celular e *in vitro* possuem potencial para diferenciação neuronal expressando constitutivamente marcadores de proteínas neuroprogenitoras (34,45–47). Devido a sua origem embrionária as DPSC expressam marcadores neuronais antes mesmo de ser induzidas a diferenciação, o que as torna atrativas para o uso dessas células para tratamento em doenças neurodegenerativas (48).

2.4 ESTABILIDADE CARIOTÍPICA

Desde a descoberta do potencial das MSC para autorrenovação e a existência de diferentes tipos celulares que podem ser facilmente isolados e expandidos *in vitro*, surgiu o interesse em aplicar o uso dessas células na medicina regenerativa e terapias celulares. Devido ao crescente interesse em utilizar essas células para uso em terapias, se faz necessário expandir essas células *in vitro*, o que pode aumentar o risco do aparecimento de instabilidade genética levando a uma redução na eficácia e biossegurança para uso clínico (49–51).

As alterações cromossômicas ocorrem devido a expansão celular e outros fatores como envelhecimento, câncer ou doenças genéticas (52–54).

A avaliação da estabilidade genética é realizada com base no documento intitulado Sistema Internacional Para Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN, do inglês *International System For Human Cytogenetic Nomenclature*) que aborda um sistema completo da nomenclatura de cromossomos humanos e técnicas para realizar diagnósticos citogenéticos (55).

Segundo o documento, diversas técnicas são descritas como procedimento para bandeamento de cromossomo, e uma das técnicas que é frequentemente utilizada é a de bandeamento G. A técnica de bandeamento G consiste na coloração dos cromossomos com o corante Giemsa, que primeiramente são tratados brevemente com tripsina, enzima responsável por degradar de forma parcial algumas proteínas cromossômicas, relaxando a estrutura da cromatina e permitindo que o corante Giemsa acesse o DNA. Além disso, a técnica é hoje rotineiramente utilizada para diagnosticar uma ampla variedade de anormalidades cromossômicas e para diagnóstico, e foi adotado como padrão para cariótipo normal a análise de no mínimo 20 metáfases, enquanto para casos de suspeita de mosaicismo 30 a 50 metáfases devem ser avaliadas(56–58).

2.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A medição do ciclo celular da fase S começou na década de 60 com a incorporação de nucleosídeos radioativos para detectar a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*), no qual era usado autorradiografia para realizar a análise, porém era uma técnica lenta e considerada difícil (59). A marcação, detecção, e quantificação celular que sintetizam ativamente o DNA, ou células que se encontram na fase S do ciclo celular, não são apenas importantes para caracterização da biologia básica, mas também na definição de respostas celulares a tratamentos medicamentosos e avaliação da saúde celular (60).

Para detectar a síntese de DNA em células proliferativas é necessário incorporar precursores que marquem o DNA durante a fase S do ciclo celular. Para detecção dessa síntese, são adicionados às células precursores que podem ser quantificados e/ou visualizados após a coloração da amostra. Geralmente esses precursores possuem relação com desoxinucleotídeos, e dentre os mais utilizados se encontram a timidina e 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). O BrdU (análogo a timidina) pode ser utilizado em ensaios que fazem uso de microscópios de alta resolução incluindo imuno-histoquímica, além disso, é possível combinar o uso de citometria de fluxo (59,61,62). No entanto, o uso desse precursor pode apresentar problemas, uma vez que são utilizados fortes ácidos e altas temperaturas para revelar o epítipo mascarado e ao fazer uso de tais métodos pode ocorrer a desnaturação de DNA. Em virtude dos problemas apresentado pelo uso do BrdU (que podem afetar a integridade celular), outro precursor foi desenvolvido. Esse precursor é chamado de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) e é permeável a célula, o qual incorpora nas células durante a replicação do DNA. A incorporação do EdU durante a replicação do DNA ocorre devido a presença do grupo alcino que permite a detecção usando uma azida fluorescente que se liga covalentemente ao grupo alcino em uma reação conhecida como “química de clique”. A detecção desse método é rápida e específica sem necessidade da desnaturação do DNA (63).

Neste estudo, a avaliação da proliferação das DPSC é crucial, pois essa característica está intimamente relacionada à capacidade de autorrenovação e multipotência dessas células. A utilização do método do EdU permite uma análise precisa e não invasiva da cinética proliferativa das DPSC, fornecendo informações sobre o potencial dessas células para aplicações em terapia celular e regenerativa. Além disso, a comparação da proliferação das DPSC em diferentes idades ou condições poderia revelar possíveis alterações relacionadas ao envelhecimento, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase e da capacidade regenerativa dos tecidos dentários.

2.6 SENESCÊNCIA CELULAR

O estudo sobre senescência celular foi iniciado em 1961 por Hayflick e Moorhead. Nesse estudo os autores reportaram que fibroblastos humanos isolados de tecidos embrionários cessam a divisão após um certo número de divisões (64). A senescência celular é caracterizada por uma prolongada e irreversível suspensão do ciclo celular com características secretoras, dano molecular e alteração no metabolismo. Células que exibem características senescentes, normalmente se acumulam em tecidos envelhecidos (65).

Células senescentes são metabolicamente ativas e possuem algumas características *in vitro* e *in vivo* que são conhecidos como biomarcadores de senescência celular. Um dos marcadores mais utilizados para detecção da senescência é a detecção da β -galactosidase que pode ser investigada por diversos métodos, dentre eles, análise citoquímica, uma técnica baseada na coloração das células e técnicas por bioluminescência que detectem a enzima (como, por exemplo, citometria de fluxo)(66).

A atividade da β -galactosidase foi relatada pela primeira vez em 1995 por Dimri e colaboradores em fibroblastos dérmicos e queratinócitos epidérmicos em pH 4. Também foi observado que células senescentes contém β -galactosidase que pode ser detectada em pH 6. Células somáticas normais alcançam uma parada irreversível do crescimento e mudam seu estado funcional após um número finito de divisões. Esse processo é chamado de envelhecimento replicativo, um mecanismo para suprimir o crescimento de tumores é a principal causa geral do envelhecimento no corpo (66–68).

Independentemente da idade, células de mamíferos expressam atividade da β -galactosidase lisossomal em pH 4, no entanto, mesmo sendo essa a atividade máxima da enzima, só é possível distinguir células “idosas” e “jovens” utilizando reações bioquímicas em pH 6. Portanto, a detecção da β -galactosidase neste pH têm sido um padrão para

identificação de células senescentes e para o marcador β -galactosidase associada a senescência (SA- β -GAL) (66).

A senescência pode contribuir para a alteração do microambiente celular através da aquisição do fenótipo de secreção associado a senescência (SASP), nesse estado, as células não se dividem, mas secretam substâncias ativas biologicamente, como fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, proteases e SA- β -GAL. Essas substâncias têm capacidade de afetar células adjacentes de maneira parácrina (66,68–70).

Outras características complementares à detecção de SA- β -GAL podem ser utilizadas para identificar células senescentes. Uma delas é a alteração na morfologia celular. Culturas de células senescentes tendem a exibir uma morfologia mais achatada, ampla, multinucleada e com vacúolos visíveis (71). Essas mudanças na forma celular podem ser observadas em conjunto com a atividade da SA- β -GAL para uma caracterização mais completa das células senescentes (72).

A avaliação da senescência das DPSC é fundamental, pois essa característica pode estar relacionada à capacidade regenerativa e ao envelhecimento das DPSC. A análise da atividade da SA- β -GAL, juntamente com a investigação de alterações morfológicas, permite determinar se as DPSC isoladas de indivíduos de diferentes idades apresentam diferenças significativas em relação à senescência.

2.7 MARCADORES NEURONAIS

Células que possuem origem embrionária da ectoderme, apresentam um potencial para expressar marcadores neuronais em estágio de diferenciação ou até mesmo em estágio indiferenciado. Como citado anteriormente, as DPSC são células que tem potencial para diferenciação em diversas linhagens e devido a sua origem embrionária (ectoderme) existe o potencial dessas células em expressar marcadores neuronais (41,73,74).

Para avaliar o potencial que uma célula possui em expressar marcadores neuronais se faz necessário realizar a escolha dos marcadores que melhor representem a fonte celular em estudo, uma vez que existem uma ampla variedade de marcadores que podem ser específicos ou não de neurônios (75–78) . Dentre essa ampla variedade de marcadores, estudos realizados em DPSC abordam sobre a expressão de marcadores neuronais de superfície celular e intracelular. Os marcadores de superfície comumente utilizados são: CD56, CD146 e CD271. Enquanto para marcadores intracelulares são utilizados receptores de neurotrofina, neurofilamentos, marcador de filamento intermediário de células-tronco neuroectodérmica (Nestina) e β tubulina III (Tuj-1) (43,79,80).

O marcador CD56, também chamado de molécula celular de adesão neuronal (NCAM do inglês, *neural cell adhesion molecule*) que apesar de ser abundantemente expresso em células de origem neuronal, também pode ser encontrada em outros tecidos como coração, rins, músculos esqueléticos, células hematopoiéticas, incluindo células dendríticas e células *natural killers* (NK). O CD56 faz parte da superfamília de imunoglobulinas de moléculas de adesão celular. Além do seu papel como molécula de adesão celular, a sinalização do CD56 em células neuronais é extremamente importante para o crescimento de neuritos, migração celular, proliferação celular, plasticidade sináptica e diferenciação (42). d’Aquino e colaboradores (2011) demonstraram uma expressão de 30% para o marcador CD56 em célula precursora do folículo dentário, enquanto, Bonnamain e colaboradores (2013)(81) relataram uma expressão de 70% para as DPSC aderentes. Isso demonstra que as células de fontes dentárias já expressam este marcador antes mesmo da indução a diferenciação.

O marcador CD146, também conhecido como molécula de adesão celular de melanoma (MCAM, do inglês *melanoma cell adhesion molecule*), é uma molécula de adesão celular pertencente a superfamília de imunoglobulina. Ela tem sido associada a extensão de

neuritos e migração de neurônios promovendo o desenvolvimento do sistema nervoso (82). Nakashima e colaboradores (2009)(83) em seu artigo de revisão relataram um alto potencial neurogênico de subfrações celulares do marcador CD146 derivadas de DPSC. Sugiyama e colaboradores (2011)(84) relataram que em modelo de isquemia cerebral a população que expressa o marcador CD146, quando transplantado no corpo estriado de ratos adultos, acelerou a neovascularização da zona isquêmica. Por consequência isso auxiliou na regeneração neuronal sendo constatado a migração de células progenitoras em estágio de diferenciação neuronal que permaneceram próximo ao local das células transplantadas.

Outro marcador que pode ser utilizado para identificar células precursoras neuronais e neurônios é o marcador CD271, também conhecido como receptor de fator de crescimento do nervo de baixa afinidade (LNGFR, do inglês, *low-affinity nerve growth factor receptor*) ou receptor de neutrofina (p75 NTR). Durante o desenvolvimento esse marcador é amplamente expresso no sistema nervoso, sendo responsável por regular a diferenciação neuronal, migração e crescimento axonal. Além disso, é atribuído a esse marcador a função de regular aspectos da neurogênese (85). Xiao e colaboradores (2017)(86) relataram a presença do marcador p75 NTR no núcleo da polpa. Pan e colaboradores (2016)(87) avaliaram os padrões de expressão do marcador em oito doadores e constataram uma baixa expressão nas DPSC. Segundo os autores, essa expressão indica a existência de uma pequena população celular com características consistentes e propensa à diferenciação neuronal. Esses resultados já foram observados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa.

Outros marcadores que podem ser utilizados para avaliar o potencial neuronal dessas células são os marcadores intracelulares, como a β tubulina III e nestina. A β tubulina III, também conhecida como Tuj-1, faz parte da família da tubulina que formam e organizam estruturas celulares chamada microtúbulos. A β tubulina III é considerada um marcador de neurônios do sistema nervoso central e periférico em estágios iniciais da diferenciação

neuronal (88). Ariffin e colaboradores (2013)(89), demonstraram em seu estudo que as DPSC expressam o marcador β tubulina III de forma ativa cinco dias após a diferenciação neuronal. Estudos *in vitro* realizados em outros tecidos dentários (como por exemplo SHED), já demonstraram uma expressão positiva do marcador após a diferenciação neuronal e até mesmo em estágio indiferenciado (90), o que também já foi observado em estudos do nosso grupo de pesquisa.

A nestina também é conhecida como proteína de células-tronco neuroepiteliais e foi originalmente identificada em células-tronco neuroepiteliais de rato. Autores relatam que células que expressam nestina podem ter características de células progenitoras, como alta proliferação, diferenciação em outras linhagens e capacidade de regeneração. A nestina é classificada como filamento intermediário do tipo VI e devido a sua estrutura pode haver uma interação com outros componentes celulares, como microfilamentos e microtúbulos desempenhando um papel crítico para o desenvolvimento neural embrionário (91–94). A presença desse marcador foi relatada em DPSC em estágio indiferenciado por Martens e colaboradores (2012)(48), enquanto Goudarzi e colaboradores (2020)(95) demonstraram a presença da Nestina em DPSC sob condições de indução a diferenciação neuronal utilizando líquido cefalorraquidiano.

2.8 ENVELHECIMENTO E CÉLULAS-TRONCO

O envelhecimento é um fenômeno biológico no qual estruturas e funções do organismo deterioram com o tempo. Em muitos tecidos, a homeostase e a capacidade de resposta regenerativa a lesões dependem das CE daquele tecido específico. As CE nos tecidos normalmente apresentam padrões de diferenciação específicos do tecido, e sua habilidade de equilibrar a quiescência em conjunto com a atividade proliferativa parece desempenhar um papel importante na sobrevivência e manutenção de respostas fisiológicas e regenerativas apropriadas. A persistência CE ao longo da vida torna-as particularmente

susceptíveis ao acúmulo de danos celulares, que podem levar à morte celular, à senescência ou à perda da função regenerativa. Estudos relatam que as CE em muitos tecidos sofrem alterações profundas com a idade, exibindo uma capacidade de resposta enfraquecida à lesão tecidual, desregulação das atividades proliferativas e declínio das capacidades funcionais. Dessa forma, tais alterações simbolizam uma eficácia reduzida da substituição celular e regeneração de tecidos em organismos idosos (96–98).

Diversos tecidos são afetados pelo envelhecimento, dentre eles, MO, células estromais mesenquimais derivadas do cordão umbilical, células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo e tecidos derivados de células estromais de origem dentária como polpa de dente e ligamento periodontal (99–103).

Como citado anteriormente, dentre as MSC isoladas de tecidos adultos a MO é a mais estudada, portanto, autores vem discutindo a influência que a idade tem sobre essa fonte de MSC. Stolzing e colaboradores (2008)(99) levantaram questões sobre resultados controversos publicados acerca do número de MSC e envelhecimento. Stolzing afirma que essa disparidade nos resultados encontrados pode estar relacionada a forma como os grupos de estudo foram determinados assim como o tamanho da amostra, gênero, metodologia de isolamento e as condições de cultivo. Em seu estudo Stolzing e colaboradores (2008)(99), usaram amostras de MO com uma ampla faixa etária (5-55 anos), analisando a morfologia, proliferação, potencial de formar colônias *in vitro*, potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, marcadores de senescência e níveis de estresse. Os resultados encontrados pelo autor e colaboradores demonstraram uma tendência para perda progressiva da capacidade proliferativa, de formação de colônias, de redução do potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica e condrogênica, porém com um aumento no potencial para diferenciação adipogênica conforme aumento da idade do doador.

Outra MSC que é afetada pelo envelhecimento são as células estromais mesenquimais derivadas do cordão umbilical. Em seu estudo, Huang e colaboradores (2013)(100) avaliaram a influência da idade da mãe nas propriedades proliferativas, formação de colônias e potencial de diferenciação. Os dados obtidos pelo autor e colaboradores evidenciaram que mães mais de idade apresentavam uma redução ambos no potencial proliferativo e formação de colônias, bem como uma redução na diferenciação para linhagem osteogênica e um aumento no potencial para diferenciação adipogênica, como evidenciado por outras fontes de MSC (99,101).

Um estudo realizado por Maredziak e colaboradores (2016)(101) em MSC derivadas de tecido adiposo de diferentes faixas etárias avaliou o potencial de formação de colônias, taxa de proliferação, tempo de duplicação da população e potencial de diferenciação nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. Os resultados encontrados demonstraram que comparando doadores mais jovens e doadores mais de idade, as células de doadores mais de idade possuem potencial reduzido para proliferação, bem como potencial reduzido para diferenciação nas linhagens condrogênica e osteogênica e um aumento de características senescentes.

Estudos tem relatado que as populações celulares existentes dentro da polpa dentária que contribuem para manter os nichos das DPSC, sofrem modificações relacionadas ao envelhecimento o que inclui redução no canal da polpa causada pela continua deposição da dentina (104–106).

Nas DPSC, o envelhecimento também foi já foi descrito como o responsável por afetar funções como, o aumento no tamanho celular, redução na proliferação e diminuição do potencial de diferenciação (69,107). Yi et al. (2017)(107) e Iezzi et al. (2019)(106) observaram que as DPSC enfrentam interferências nos processos de mineralização, evidenciadas pela diminuição do potencial osteogênico. Além disso, foi demonstrado por

Feng e colaboradores (2013) (108) que as DPSC possuem baixo potencial para diferenciação neuronal. O envelhecimento, como um processo biológico, impacta profundamente a funcionalidade dos tecidos, incluindo as CE. Assim, a senescência das DPSC ilustra como a perda da função celular compromete a homeostase e a capacidade regenerativa dos tecidos dentários, resultando em um efeito negativo geral na saúde e funcionalidade dos organismos idosos.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos indicam que a idade pode impactar negativamente a capacidade proliferativa e o potencial de diferenciação das MSC, aspectos cruciais para sua aplicação nas pesquisas básicas e clínicas. Compreender essas variações é fundamental para a padronização e a melhoria da qualidade das células utilizadas em pesquisas e tratamentos. Portanto, a relevância desta pesquisa reside na necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da idade do doador nas propriedades das DPSC.

Além disso, estudos de marcadores neuronais específicos expressos pelas DPSC é essencial para entender seu potencial neurogênico e suas aplicações em doenças neurodegenerativas. A caracterização detalhada desses marcadores pode abrir novas fronteiras no tratamento dessas doenças, proporcionando alternativas terapêuticas mais eficazes. Além disso, explorar o potencial das DPSC em regeneração neural e suas possíveis utilizações em terapias celulares pode oferecer novas perspectivas para a medicina regenerativa e a neurociência.

Portanto, investigar as variações induzidas pela idade nas MSC e suas propriedades, bem como sua influência na expressão de marcadores neuronais das DPSC são passos importantes para o avanço da medicina regenerativa. Esse estudo não só contribui para o avanço do conhecimento científico sobre MSC e suas aplicações, mas também pode auxiliar as abordagens terapêuticas para diversas doenças, especialmente as neurodegenerativas.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação da idade do doador nas características das células estromais derivadas de polpa de dente.

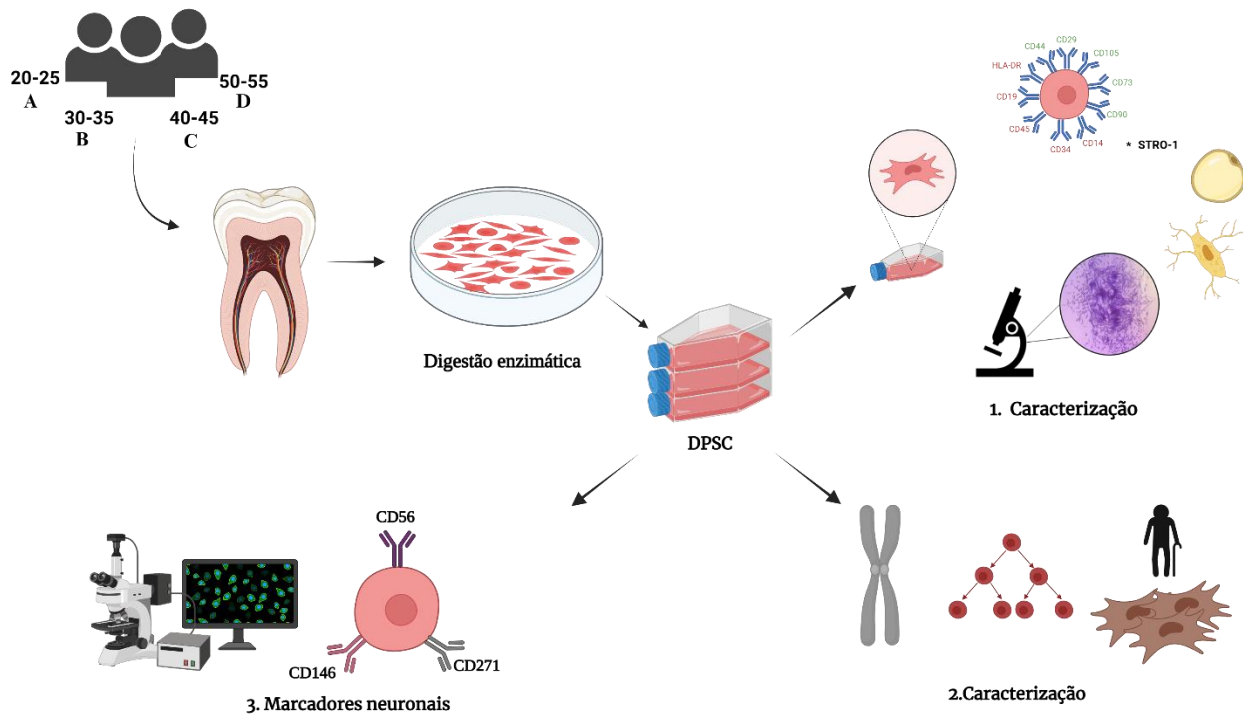
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar as DPSC de diferentes faixas etárias
- Caracterizar as DPSC conforme sugerido pela ISCT.
- Avaliar e quantificar o potencial clonogênico de DPSC.
- Avaliar a estabilidade genética de DPSC.
- Avaliar a capacidade de proliferação e senescência de DPSC.
- Avaliar a expressão de marcadores relacionados a diferenciação neuronal nas DPSC.
- Comparar os resultados obtidos nas diferentes faixas etárias.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Cultivo Celular (LECC) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, conforme a Figura 3.

Figura 3 Desenho de estudo.



DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2023)

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (parecer nº 4.746.491). Dentes permanentes (3º molar) de adultos de quatro faixas etárias foram coletados na clínica odontológica M&M com indicação de extração. Os dentes coletados foram separados em quatro grupos conforme o Quadro 1.

Quadro 1 Separação das amostras em grupos conforme faixa etária.

Grupo	Faixa etária (anos)
Grupo A	20-25
Grupo B	30-35
Grupo C	40-45
Grupo D	50-55

5.1 ISOLAMENTO E CULTIVO

Os dentes após a extração, foram encaminhados para o LECC, imersos em solução de meio *Iscoves Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) (Gibco™, Invitrogen, NY, USA), penicilina e estreptomicina (Gibco™, Invitrogen, NY, USA), heparina (Cristália, Itapira, SP, BR) e fluconazol (Sanobiol, Minas Gerais, MG, BR). O isolamento foi realizado conforme descrito por Fracaro e colaboradores (2020)(109). Para o isolamento das DPSC, os dentes foram lavados uma vez em solução contendo clorexidina (PERIOGARD, Colgate®) e duas vezes com solução tampão salina fosfato (PBS) (Gibco™, Invitrogen, NY, USA), suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina, em seguida, foi realizada a extração da polpa com lima endodôntica e a transferência para uma placa de Petri, onde foi realizada a maceração mecânica com o auxílio de bisturi.

O macerado foi colocado em 1 mg/mL de solução de collagenase tipo II (Gibco™, Invitrogen, NY, USA), incubada a 37°C por uma hora sob agitação constante, então foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o botão de células ressuspendido. As células foram cultivadas em meio IMDM suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco™, Invitrogen, NY, USA), 1% penicilina e estreptomicina. As culturas foram armazenadas em incubadoras à 37°C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana. Quando as culturas atingirem cerca de 80%-90% de confluência, as células foram dissociadas utilizando tripsina/ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,25% (Gibco™, Invitrogen, NY, USA) e replaqueadas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO

Para a caracterização das DPSC, as amostras foram acompanhadas diariamente, analisadas quanto a sua morfologia e aderência ao plástico e foram caracterizadas imunofenotipicamente conforme as diretrizes da ISCT e diferenciadas em adipócitos e osteoblastos.

5.2.1 Caracterização imunofenotípica

Para a marcação, as células foram lavadas com PBS (Gibco™, Invitrogen, NY, USA) e incubadas no escuro durante 30 minutos com os anticorpos conforme o Quadro 2. Após a marcação, as células foram lavadas com tampão de lavagem e ressuspendidas em 500µL de uma solução contendo 1% de paraformaldeído (PFA) (Sigma Aldrich, MO, USA). Aproximadamente 100.000 células foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience, USA) e foram analisadas por meio do software FlowJo® (v10.1).

Quadro 2 Marcadores utilizados na caracterização das DPSC.

Marcadores	Fluorocromo	Marca	Catálogo	Diluição
CD14	FITC	BD Pharmigen	555397	1:20
CD19	FITC	BD Biosciences	340409	1:20
CD29	APC	BD Pharmigen	559883	1:20
CD34	APC	BD Pharmigen	555824	1:20
CD44	FITC	BD Pharmigen	555478	1:10
CD45	FITC	BD Biosciences	347463	1:20
CD73	APC	BD Pharmigen	560847	1:33
CD90	PE	BD Pharmigen	555596	1:50
CD105	APC	BD Pharmigen	562408	1:14
STRO-1	APC	Invitrogen	MA5-28635	1:20
HLA-DR	PerCP	BD Pharmigen	551375	1:100
7-AAD	-	BD Pharmigen	51-68981E	1:20

APC: alofocianina; CD: grupos de diferenciação celular; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP: complexo proteína clorofila peridina; APC: alofocianina

5.2.2 Diferenciação

As DPSC foram induzidas a diferenciação em duas linhagens celulares: adipogênica e osteogênica conforme descrito por Fracaro e colaboradores (2020) (109). Para isso, as células foram cultivadas em placas de vinte e quatro poços sobre lamínulas de vidro e foram utilizados meios específicos para a indução a diferenciação de cada tipo celular (*Differentiation Basal Medium- Osteogenic* (Lonza, USA) – diferenciação osteogênica)

(*Adipogenic Induction Medium* (Lonza, USA) – diferenciação adipogênica). A troca do meio foi realizada três vezes por semana durante três semanas.

5.2.3 Coloração

Para analisar a diferenciação celular, as células foram coradas após 21 dias de cultivo. O corante Alizarina Red S (Sigma Aldrich, MO, USA) foi utilizado para identificar a presença de cristais de cálcio, indicando diferenciação osteogênica. Para a diferenciação adipogênica, as células foram coradas com Oil Red O (Sigma Aldrich, MO, USA), que marca os vacúolos lipídicos. A quantificação das células adipogênicas foi realizada contando-se o número total de células e o número de células com vacúolos lipídicos corados com Oil Red O. A proporção de células diferenciadas foi calculada como uma porcentagem do total de células. As lâminas foram analisadas usando um microscópio NIKON Eclipse Ni (Nikon, Tokyo, JPN), e as imagens foram capturadas com o software NIS-Elements (v 4.20).

5.2.3.1 Quantificação da diferenciação osteogênica

Após a indução a diferenciação osteogênica, as células foram submetidas ao ensaio de quantificação da absorbância do corante Alizarina Red S (Sigma Aldrich, MO, USA) por espectrofotometria. As células foram brevemente lavadas com PBS (Gibco™, Invitrogen, NY, USA) e água destilada e fixadas com etanol 100% (Merk, Darmstadt, Alemanha) por 15 minutos. Foi adicionado o corante Alizarina Red S (Sigma Aldrich, MO, USA) por 40 minutos e as células foram lavadas com água destilada e PBS (Gibco™, Invitrogen, NY, USA). Em seguida, foi adicionado à solução de lixiviação à 10% de ácido acético (Sigma Aldrich, MO, USA) e 20% de metanol (Sigma Aldrich, MO, USA) por 15 minutos em agitador orbital à temperatura ambiente. A absorbância foi quantificada por espectrofotômetro (VersaMax Microplate Reader™, Molecular Device™, CA, USA) no comprimento de onda de 450nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Como controle foram

utilizadas as células que não foram induzidas a diferenciação osteogênica e como controle da reação foi utilizada a solução de lixiviação.

5.2.3 Ensaio de unidade formadora de colônias fibroblastóides (CFU-F)

Para o ensaio de formação de colônias, 600 células foram plaqueadas em placa de seis poços. Foram realizadas seis replicatas para cada amostra. As células foram cultivadas em meio IMDM suplementado com 15% de SBF durante 10 dias, fixadas e coradas com metanol (Sigma Aldrich, MO, USA) e cristal violeta (3%) (Sigma Aldrich, MO, USA). A contagem das colônias foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Leica DM IL LED, DE). Foram consideradas colônias aquelas que apresentarem 50 ou mais células. Para obter a porcentagem de eficiência de formação de colônias foi utilizado o seguinte cálculo: média da contagem da triplicata dividido pelo número de células plaqueadas inicialmente (600) multiplicado por 100.

5.3 ANÁLISE CARIOTÍPICA

A análise da estabilidade genética das células foi realizada por meio da técnica citogenética com bandeamento G na passagem quatro. Foram cultivadas 600,000 e 400,000 células em frascos de cultivo 75 cm² com meio de cultura IMDM suplementado com 15% de SBF, 1% de penicilina e estreptomicina, mantidas em incubadoras a 37°C, com 5% de CO₂. Essas células foram acompanhadas diariamente para que fosse possível obter o máximo possível de metáfases. Para interrupção mitótica, foi adicionada colchicina (0,1 µg/mL) (Sigma Aldrich, MO, USA) e, após quatro horas, o material foi dissociado para a coleta das células. Estas foram centrifugadas e colocadas em solução hipotônica composta por 0,075M de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, foram fixadas com metanol (Sigma Aldrich, MO, USA) e ácido acético (Sigma Aldrich, MO, USA) na proporção de 3:1, respectivamente.

As lâminas foram confeccionadas a 60% de umidade e temperatura ambiente entre 18-25°C e desidratadas em estufa a 60°C durante 24 horas. As lâminas foram tratadas com 0,002 g/mL de tripsina-EDTA e, em seguida, coradas utilizando uma diluição de 1:20 de solução de Giemsa e água destilada (Laborclin, Paraná, Brasil). A análise das metáfases foi realizada usando um microscópio Leica DM2000 com o software de cariotipagem LUCIA-KARYO. A análise e a interpretação dos resultados foram realizadas conforme sugerido pelo *International System Nomenclature Cytogenetic* (ISCN) (2005) (55).

5.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

Para a realização do ensaio de proliferação cerca 300.000 células na passagem quatro foram cultivadas em frascos de cultivo de 75cm² (CELLSTAR®, Greiner Bio-One, DE) com meio de cultura IMDM suplementado com 15% de SBF, 1% de penicilina e estreptomicina e foram mantidas em incubadoras a 37°C, com 5% de CO₂. Após três dias em cultivo, o meio foi trocado e adicionado o nucleosídeo 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) (Invitrogen, NY, USA), o qual é incorporado durante a síntese do DNA. Após 24 horas, as células foram dissociadas com o auxílio da tripsina/EDTA 0,25%, contadas e coradas com o 7-AAD para análise de viabilidade celular.

As amostras foram marcadas com o kit *Click-iT® Plus EdU Flow Cytometry Assay Kits* (Invitrogen, NY, USA), conforme as orientações do fabricante. As células foram fixadas, permeabilizadas, marcadas com o fluorocromo Alexa Fluor 488 e incubadas por 30 minutos na ausência de luz. Após as lavagens, as células foram ressuspensas com reagente de lavagem e permeabilização (Saponina+PBS+BSA 1%), adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience, USA) e foram analisadas por meio do software FlowJo® (v10.1).

5.5 ENSAIO DE SENESCÊNCIA

O ensaio de senescência foi realizado na passagem cinco com o auxílio do *Kit CellEvent™ Senescence Green Flow Cytometry Assay* (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) que avalia a expressão da β -galactosidase, comumente usada como um marcador para células senescentes. Para realizar este ensaio cerca 300.000 células foram cultivadas em frascos de cultivo de 75cm² com meio de cultura IMDM suplementado com 15% de SBF, 1% de penicilina e estreptomicina e foram mantidas em incubadoras a 37°C, com 5% de CO₂.

Após quatro dias em cultivo, as células foram dissociadas com o auxílio da tripsina/EDTA 0,25%, contadas e fixadas com 2% de PFA por 15 minutos na ausência de luz. As células foram lavadas e marcadas com reagente *CellEvent™ Senescence Green Probe* (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e incubadas por 90 minutos em estufa a 37°C, com ausência de luz e CO₂, conforme as orientações do fabricante. As células então foram lavadas, ressuspensas em PBS+BSA 1%, adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience, USA) e foram analisadas por meio do software FlowJo® (v10.1).

5.6 ANÁLISE DE MARCADORES NEURONAIS

Para avaliar a capacidade das DPSC em expressarem marcadores da linhagem neuronal, foram realizadas as seguintes avaliações: expressão de marcadores neuronais por citometria de fluxo na passagem quatro e imunofluorescência na passagem seis.

5.6.1 Expressão de marcadores neuronais por citometria de fluxo

Para avaliar a expressão de marcadores neuronais, as células foram lavadas com PBS e incubadas no escuro durante 30 minutos com os anticorpos conforme o Quadro 3. Após a marcação, as células foram lavadas com tampão de lavagem e ressuspensas em 500µL de uma solução contendo 1% de paraformaldeído (PFA). Aproximadamente 100.000 células foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience, USA) e foram analisadas por meio do software FlowJo® (v10.1).

Quadro 3 Marcadores neuronais utilizados na imunofenotipagem das DPSC

Marcadores	Alvo	Fluorocromo	Marca	Catálogo	Diluição
CD56	Células natural killer, células T ativadas, cérebro e cerebelo e tecidos neuroendócrinos	PE	BD Pharmagen	555516	1:20
CD146	Células da crista neural	PE	BD Pharmagen	550315	1:5
CD271	Células-tronco mesenquimais de baixa afinidade para receptor de crescimento do nervo (NGFR) ou p75NT (receptor da neurotrofina)	PE	BD Pharmagen	557196	1:10

CD: grupo de diferenciação celular FITC: Isocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina. DPSC: células-tronco derivadas de polpa de dente permanente.

5.6.2 Expressão de marcadores neuronais por imunofluorescência

A imunofluorescência foi utilizada para avaliar a expressão de marcadores neuronais. Foi realizada a análise e quantificação da expressão do marcador neuronal β tubulina III (tubulina específica de neurônios) e nestina (considerado marcador neuroprogenitor). Para esta avaliação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 4% de PFA (Sigma Aldrich, USA). As células foram novamente lavadas com PBS permeabilizadas e lavadas com solução de lavagem (PBS com 0,2% de albumina sérica bovina (BSA) (InLab, SP, BR). Foi realizado o bloqueio em temperatura ambiente e então adicionado o anticorpo primário anti- β tubulinaIII (Santa Cruz, 1:800) e anti-nestina (ThermoFisher, 1:200). As amostras foram incubadas *overnight*, à 4°C.

Após a incubação foi adicionado o anticorpo secundário anti-camundongo FITC (Sigma Aldrich, USA, 1:350) e anti-coelho-TRITC (Sigma Aldrich, USA, 1:350). O material foi lavado novamente com solução de lavagem e o núcleo corado com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI). As lâminas foram analisadas em Microscópio NIKON Eclipse Ni (Nikon, Tokyo, JPN) e as imagens digitais foram obtidas por meio do programa NIS-Elements (v 4.20).

5.6.3 Quantificação da intensidade do sinal fluorescente

A intensidade de fluorescência foi quantificada para avaliar a expressão da β III-tubulina e nestina nas DPSC das quatro faixas etárias. A quantificação da intensidade da fluorescência foi realizada conforme descrito por Jensen (2013)(110) usando o software ImageJ desenvolvido por Wayne Rasband versão 2.0 para Windows, Cambridge – Reino Unido. Dez imagens de cada amostra foram selecionadas e configuradas em 8 bits (Image-Type-8-bit). Para quantificar a intensidade do sinal fluorescente, o histograma (Image-Ajust-Threshold) foi usado com as seguintes configurações selecionadas: “Default” e “Dark Background”. Foi realizado a normalização dos resultados, dividindo a intensidade da fluorescência pelo número de núcleos (corados com DAPI) em cada imagem analisada.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados foi aplicado o teste de normalidade Shapiro Wilk, em seguida utilizado o teste de Kruskal Wallis. Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão. O nível de significância adotado foi 5% ($p=0,05$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* versão 9.00 para Windows, San Diego – Califórnia, EUA.

6. RESULTADOS

6.1 DPSC DE FAIXAS ETÁRIAS MAIS AVANÇADAS APRESENTAM MENOS CÉLULAS ADERENTES E EM PROLIFERAÇÃO

Foram coletadas e isoladas 25 amostras de DPSC e 19 apresentaram células aderentes e proliferando. O número de dentes coletados de DPSC de cada grupo está descrito na Tabela

1.

Tabela 1. Números de dentes coletados e isolados de cada grupo de DPSC.

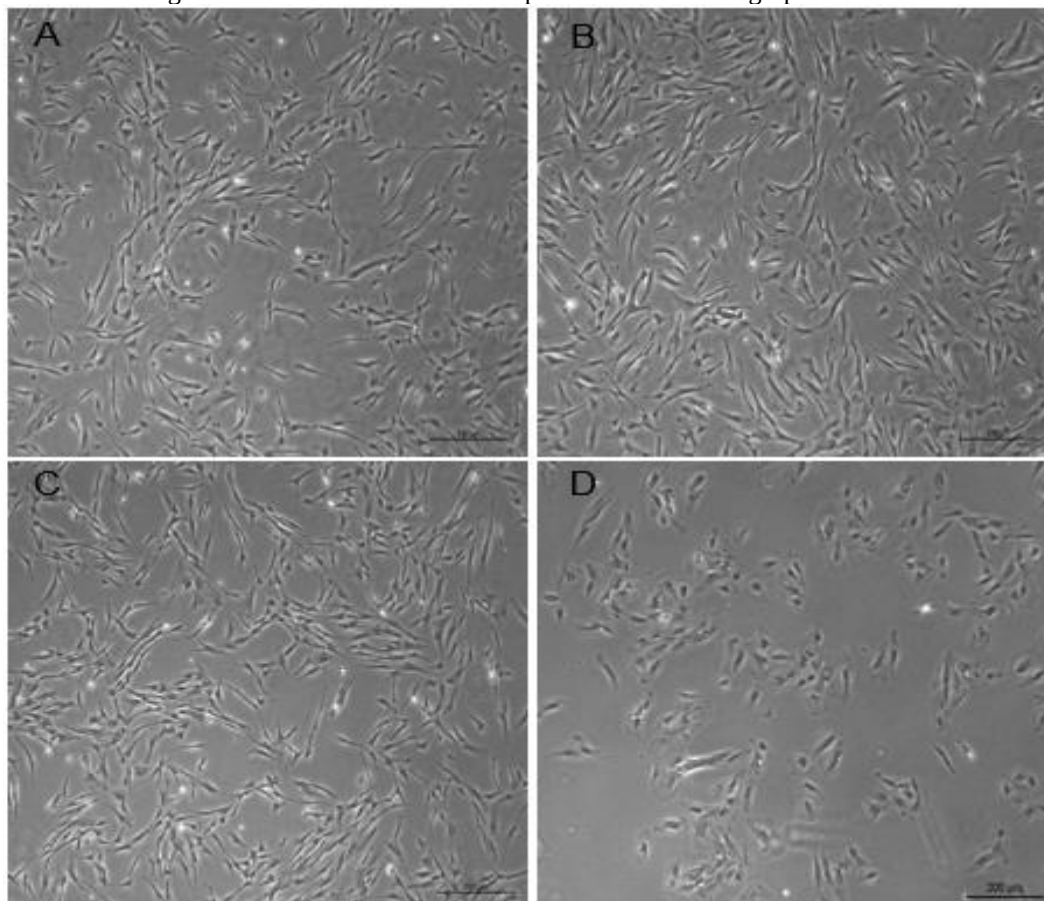
Doadores	Média da idade ($\pm$ DP)	Amostras coletadas e isoladas	Amostras com células aderentes e proliferando
Grupo A	23 $\pm$ 1,9	5	5
Grupo B	32 $\pm$ 1,8	6	5
Grupo C	42,5 $\pm$ 2,2	6	4
Grupo D	53,5 $\pm$ 1,9	8	5

DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

6.2 DPSC DO GRUPO D APRESENTARAM MORFOLOGIA DIFERENTE DA FIBROBLASTÓIDE

As DPSC apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico, conforme estabelecido pela ISCT (Figura 4), demonstrando a partir desse critério que as células isoladas podem ser consideradas MSC. Apesar de todos os grupos apresentarem morfologia conforme descrito pela ISCT, foi constatado no grupo D a presença de morfologia mais arredondada e achatada, diferente da fibroblastóide.

Figura 4 Cultivo de uma amostra representativa de cada grupo das DPSC



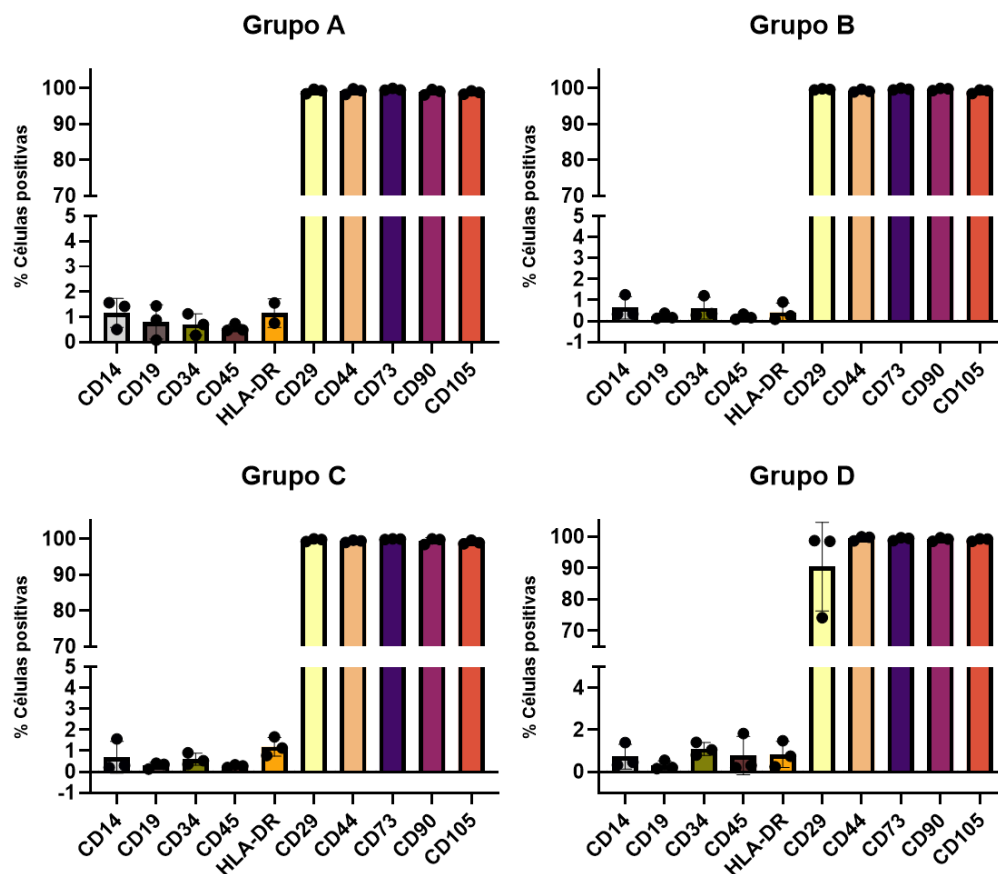
(A) Grupo A (B) Grupo B (C) Grupo C (D) Grupo D. As células apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico. Aumento: 50x. Barra: 200µm. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2022)

6.2.1 DPSC de todos os grupos apresentaram características imunofenotípicas de MSC

Por citometria de fluxo foram avaliados os marcadores de superfície de todos os grupos conforme as orientações da ISCT. As amostras de todas as faixas etárias analisadas apresentaram uma expressão positiva (maior que 95%) para os marcadores: CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105 e expressão reduzida (menor que 2%) para CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR (Figura 5).

Figura 5. Caracterização imunofenotípica das DPSC de quatro faixas etárias.

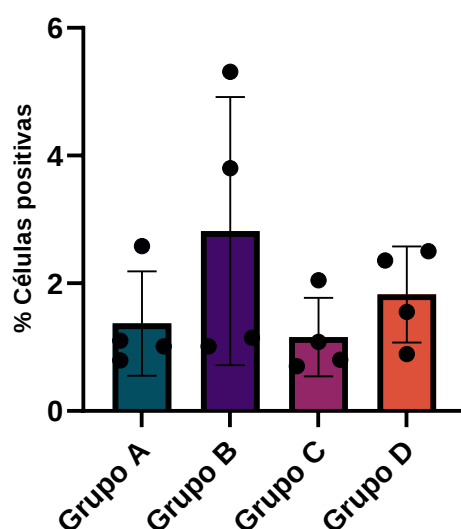


DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2023)

Também foi verificada a expressão do marcador de superfície STRO-1, considerado um marcador mesenquimal que nesse estudo apresentou uma expressão reduzida para todos os grupos (menor que 3,0%) e quando comparado a expressão entre os grupos, não foi observado diferença estatística significativa ($p=0,5584$) (Figura 6).

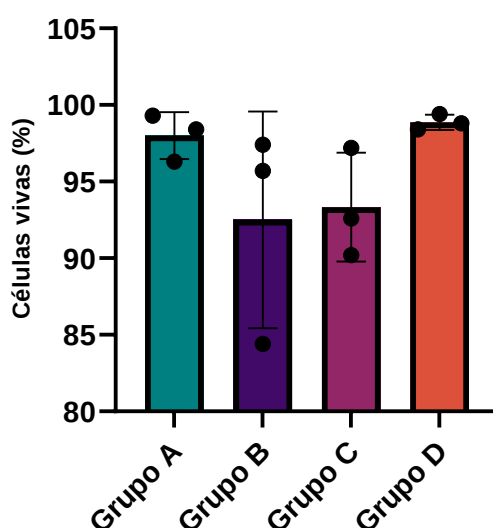
Figura 6 Porcentagem de células positivas para o marcador STRO-1.



Fonte: a autora (2024)

Para verificar a viabilidade das células de cada grupo, foi utilizado o corante 7-AAD. A média da viabilidade do grupo A foi de $98 \pm 1,5$, do grupo B foi de $92,5 \pm 7,6$, do grupo C foi de $93,3 \pm 3,6$ e do grupo D foi de $98,7 \pm 0,5$. Quando comparado a viabilidade celular entre os grupos não foi constatado diferença estatística significativa ($p = 0,2063$) (Figura 7).

Figura 7 Viabilidade celular das quatro faixas etárias de DPSC.



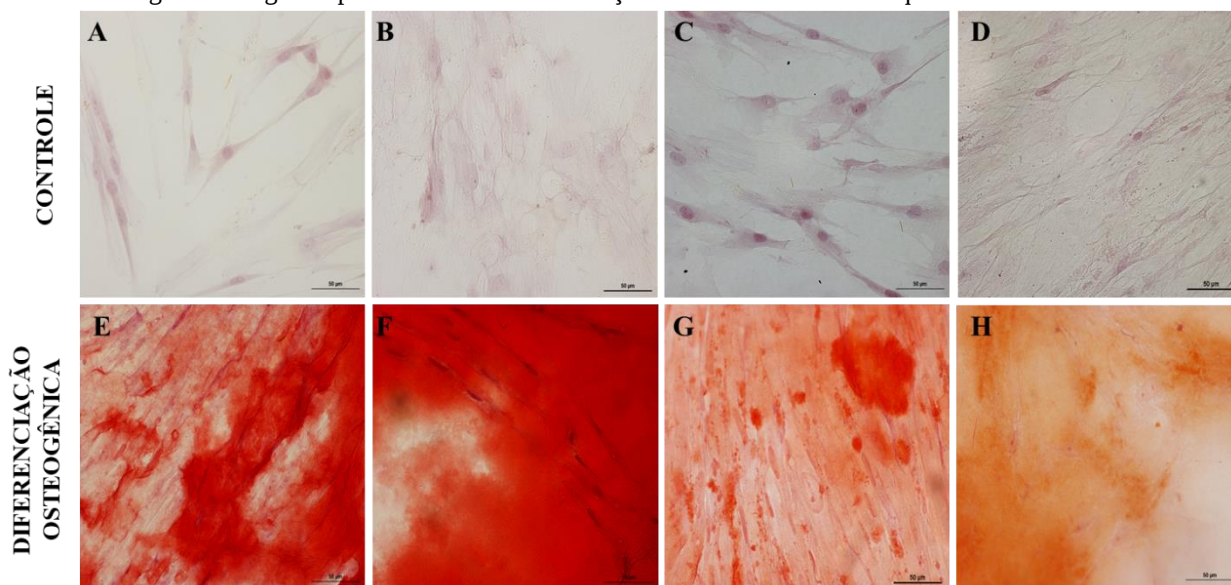
DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2024)

6.2.2 DPSC apresentaram potencial para diferenciação osteogênica e adipogênica

Para a diferenciação, três amostras de cada faixa etária foram diferenciadas nas linhagens adipogênica e osteogênica. Após 21 dias de indução à diferenciação adipogênica, foi possível observar a presença de poucos vacúolos lipídicos corados em vermelho em todas as amostras (Figura 8E, 8F, 8G e 8H). Nas amostras controle não foi possível observar a formação de vacúolos lipídicos corados com Oil Red O (Figura 8A, 8B, 8C e 8D). Nas amostras induzidas a diferenciação osteogênica, foi possível observar a presença de cristais de cálcio corados em vermelho após os 21 dias (Figura 8M, 8N, 8O e 8P). Nas amostras controle não foi possível observar a formação desses cristais de cálcio (Figura 8I, 8J, 8K e 8L).

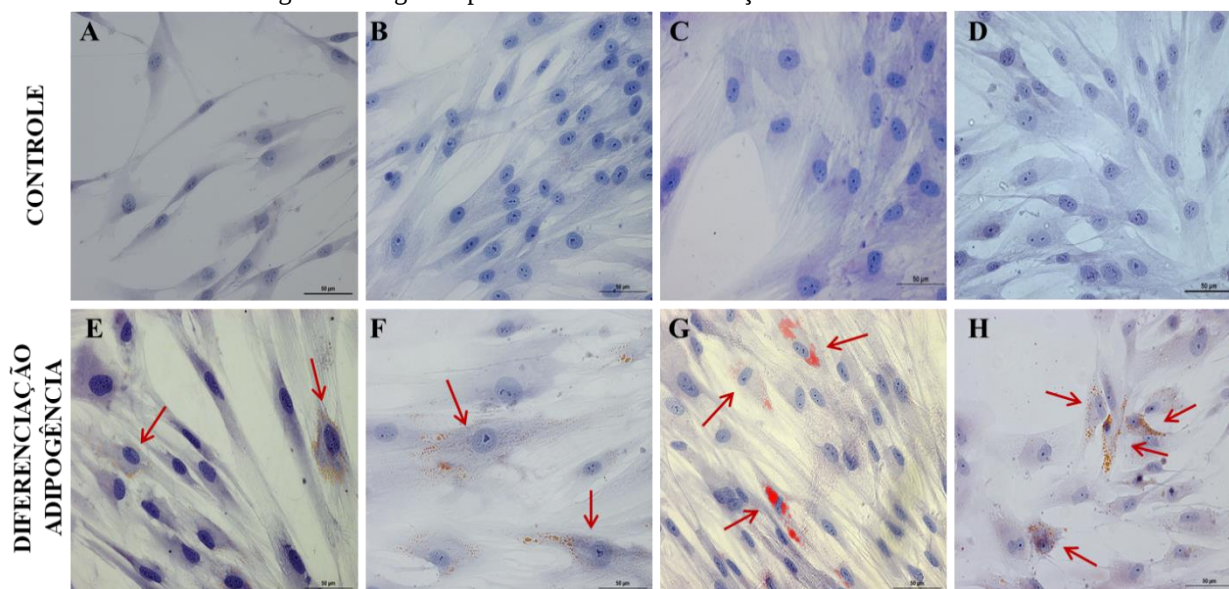
Figura 8 Imagem representativa da diferenciação *in vitro* das DPSC das quatro faixas etárias.



(A) DPSC Grupo A linhagem osteogênica: controle. (B) DPSC Grupo B linhagem osteogênica: controle. (C) DPSC Grupo C linhagem osteogênica: controle. (D) DPSC Grupo D linhagem osteogênica: controle. (E) DPSC Grupo A linhagem osteogênica: diferenciação, presença de cristais de cálcio corados em vermelho. (F) DPSC Grupo B linhagem osteogênica: diferenciação, presença de cristais de cálcio corados em vermelho. (G) DPSC Grupo C linhagem osteogênica: diferenciação, presença de cristais de cálcio corados em vermelho. (H) DPSC Grupo D linhagem osteogênica: diferenciação, presença de cristais de cálcio corados em vermelho. Coloração: Alizarina Red S. Imagens representativas. Aumento: 400x. Barra: 50µm. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2023)

Figura 9 Imagem representativa da diferenciação *in vitro* das DPSC.

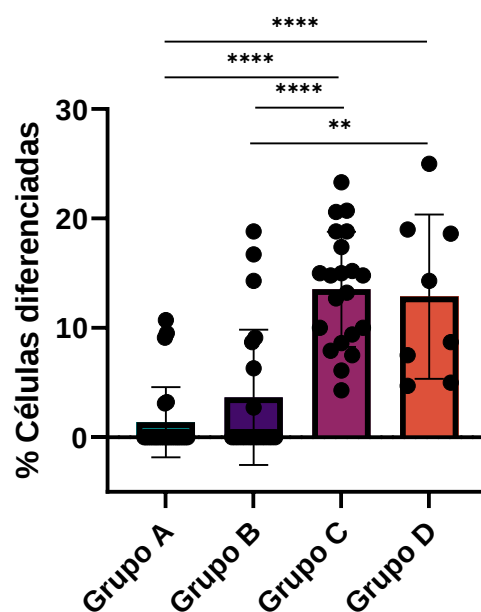


(A) DPSC Grupo A linhagem adipogênica: controle. (B) DPSC Grupo B linhagem adipogênica: controle. (C) DPSC Grupo C linhagem adipogênica: controle. (D) DPSC Grupo D linhagem adipogênica: controle. (E) DPSC Grupo A linhagem adipogênica: diferenciação, presença de vacúolos lipídicos. (F) DPSC Grupo B linhagem adipogênica: diferenciação, presença de vacúolos lipídicos. (G) DPSC Grupo C linhagem adipogênica: diferenciação, presença de vacúolos lipídicos. (H) DPSC Grupo D linhagem adipogênica: diferenciação, presença de vacúolos lipídicos. Coloração: Oil Red O. Imagens representativas. Aumento: 400x. Barra: 50µm. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2023)

Foi avaliado nas DPSC, o potencial de diferenciação adipogênica por meio da quantificação de células que apresentaram vacúolos lipídicos corados com Oil Red O. Houve diferença estatística significativa entre os grupos A e C ($p<0,0001$), entre os grupos A e D ($p<0,0001$), entre os grupos B e C ($p<0,0001$) e entre os grupos B e D ($p<0,0017$) (Figura 9). Os dados demonstraram que as maiores faixas etárias (grupos C e D) apresentaram um maior potencial para diferenciação adipogênica quando comparado as menores faixas etárias (grupos A e B). Nos controles não foi observado a presença de vacúolos lipídicos.

Figura 10 Quantificação das DPSC diferenciadas para a linhagem adipogênica após a coloração utilizando Oil Red.

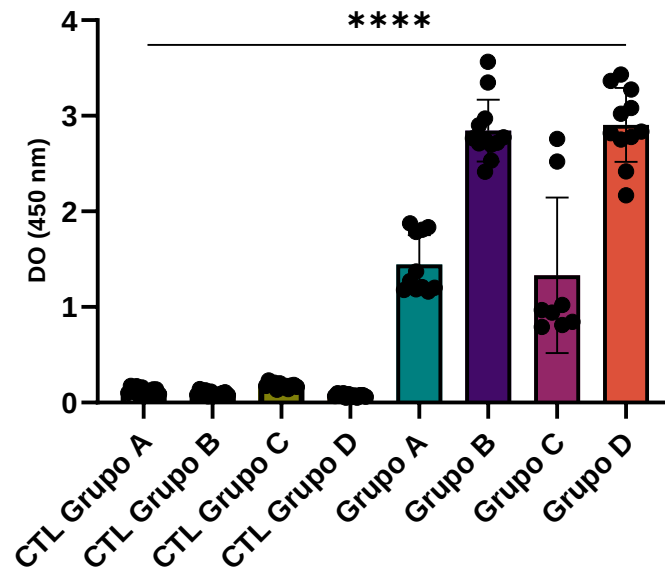


Dados expressos em média e desvio padrão. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente. ** $p < 0,0017$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: a autora (2023)

Foi avaliado também o potencial de diferenciação osteogênica, através da quantificação da Alizarina Red S (corante responsável por corar cristais de cálcio) por espectrofotometria. Foi possível observar diferença estatística significativa entre controles e diferenciação osteogênica dos respectivos grupos ($p < 0,0001$) (Figura 10).

Figura 11. Quantificação das DPSC diferenciadas para a linhagem osteogênica utilizando espectrofotometria após a coloração com Alizarina Red.

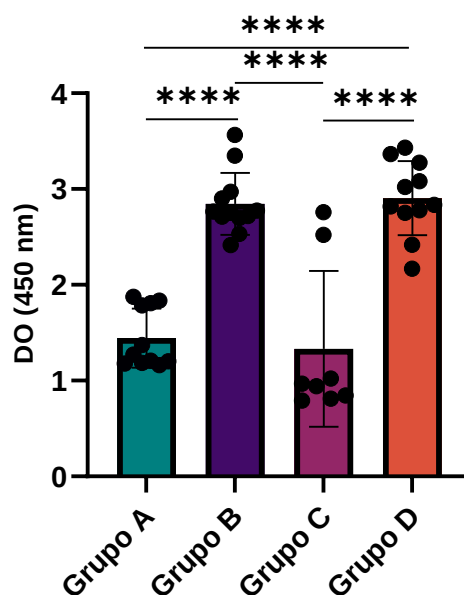


Dados expressos em média e desvio padrão. CTL: controle. DO: densidade ótica. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente. **** $p < 0,0001$.

Fonte: a autora (2023)

Também foi possível observar diferença significativa entre os grupos. Quando avaliado a quantificação para a linhagem osteogênica, foi observado diferença estatística entre o grupo A e B ($p < 0,0001$), A e D ($p < 0,0001$), B e C ($p < 0,0001$) e C e D ($p < 0,0001$) (Figura 11).

Figura 12 Quantificação das DPSC diferenciadas para linhagem osteogênica.



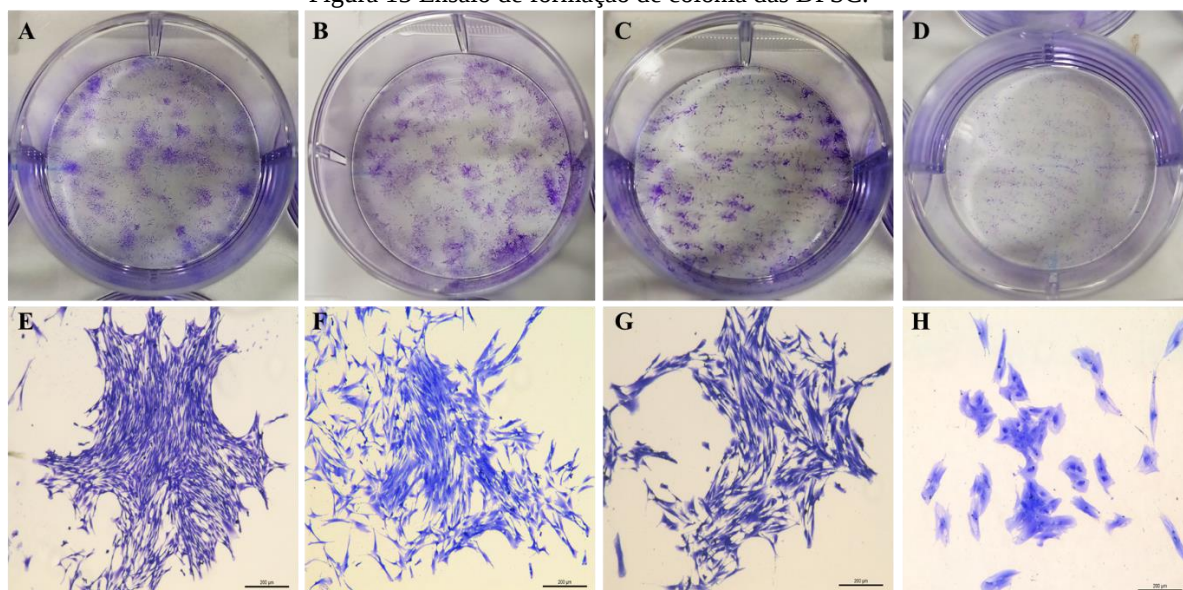
Dados expressos em média e desvio padrão. DO: densidade ótica. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente. **** $p < 0,0001$.

Fonte: a autora (2024)

6.2.3 DPSC do grupo com mais de 50 anos apresentaram um potencial reduzido na formação de colônias

O ensaio de unidades formadoras de colônia foi realizado para verificar o potencial das DPSC de diferentes faixas etárias em formar colônias. Após 10 dias em cultivo houve formação de colônias em todos os grupos estudados, conforme Figura 12.

Figura 13 Ensaio de formação de colônia das DPSC.

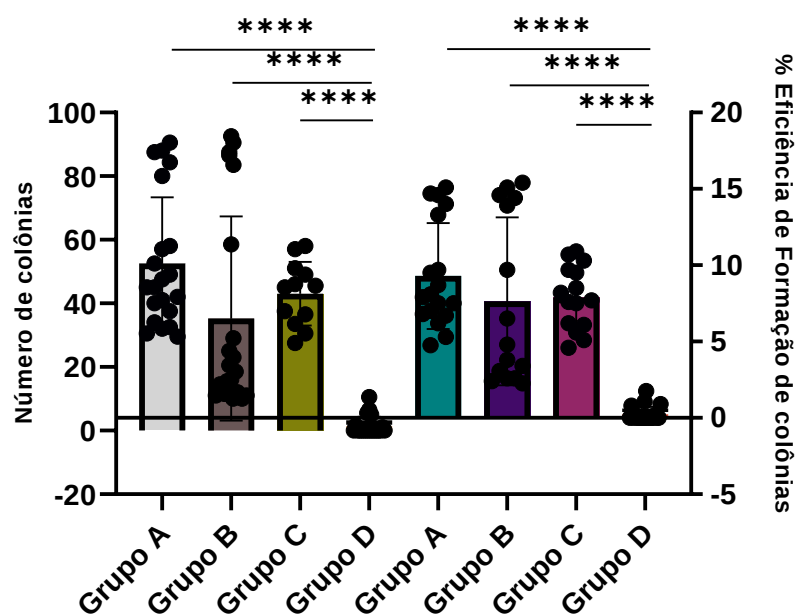


Imagens representativas das colônias formadas pelos grupos. (A) Grupo A (B) Grupo B (C) Grupo C e (D) Grupo D coradas com Violeta Cristal. (E) Morfologia das colônias do Grupo A (F) Morfologia das colônias do Grupo B (G) Morfologia das colônias do Grupo C e (H) Morfologia das colônias do Grupo D. Aumento: 50x. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2023)

Após a contagem das CFU-F, a média de colônias observadas no grupo A foi de $52,54 \pm 20,8$, no grupo B foi de $35,24 \pm 37,8$, no grupo C foi de $43,08 \pm 9,97$ e no grupo D foi de $1,43 \pm 2,90$. Quanto a média da eficiência de formação de colônias do grupo A foi de 9,2%, do grupo B foi de 7,6%, do grupo C foi de 7,8% e do grupo D foi de 0,23%. Quando comparado, os grupos A, B e C apresentaram uma diferença estatística significativa na formação de colônias ($p < 0,0001$) e na eficiência de formação de colônias ($p < 0,0001$) em relação ao grupo D (Figura 13). Esses resultados demonstram que as amostras coletadas de pacientes entre 50 e 55 anos tem um potencial reduzido para formar colônias quando comparado com as outras faixas etárias.

Figura 14 Média do número de colônias e porcentagem de eficiência de formação de colônias dos grupos de DPSC.



Dados expressos em média e desvio padrão. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente. **** $p < 0,0001$.

Fonte: a autora (2023)

6.3 DPSC DE FAIXA ETÁRIA MAIS AVANÇADA NÃO APRESENTOU NÚMERO SUFICIENTE DE METÁFASES PARA ANÁLISE

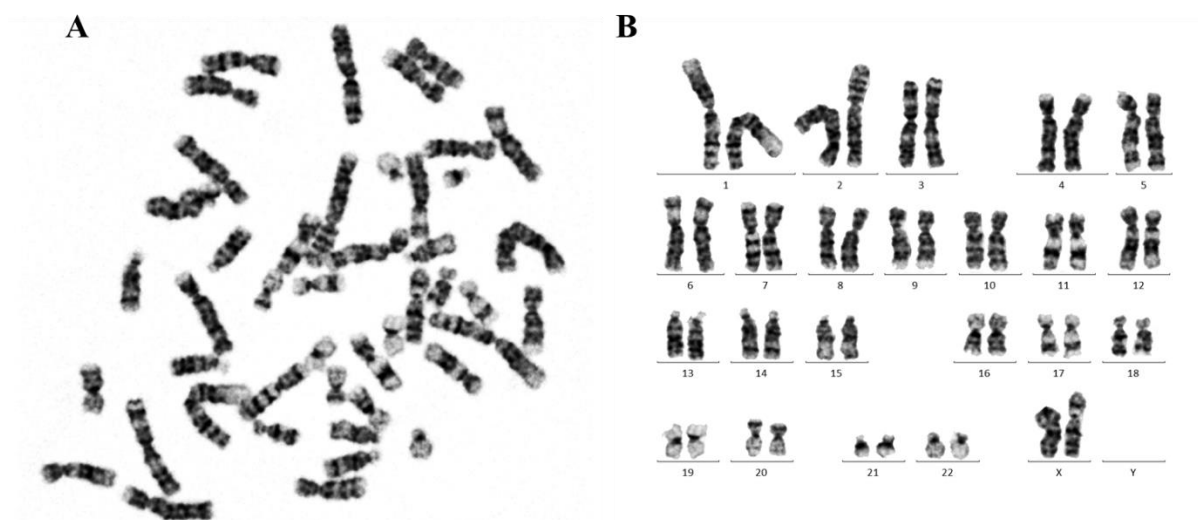
Para análise citogenética, três amostras de cada faixa etária foram processadas (Tabela 2). Quando possível foram analisadas pelo menos 20 metáfases por amostra conforme sugere o ISCN. A análise citogenética de DPSC de indivíduos com idade entre 20 e 45 anos (Grupos A, B e C) demonstrou cariótipos normais (46,XX ou 46,XY) em todas as amostras, com metáfases suficientes analisadas (Tabela 2 e Figura 14). No entanto, na faixa etária mais avançada (50-55 anos, Grupo D), houve desafios significativos na obtenção de células e metáfases suficientes para uma análise abrangente, na qual o grupo apresentou número insuficiente de células e metáfases, impossibilitando uma análise conclusiva.

Tabela 2. Cariótipos dos diferentes grupos e amostras de DPSC.

Grupo	Amostra	Cariótipo
A	A1	46,XX[20]
	A2	46,XX[20]
	A3	46,XX[20]
B	B1	46,XX[20]
	B2	46,XX[20]
	B3	46,XY[20]
C	C1	46,XX[20]
	C2	46,XY[20]
	C3	46,XY[20]
D	D1	*
	D2	*
	D3	**

* Número de células insuficientes para aplicação da técnica. ** Número insuficiente de metáfases para análise. DPSC: células-tronco estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Figura 15 Análise cariotípica.



(A) Metáfase de uma DPSC apresentando as bandas dos cromossomos tratados com tripsina e Giemsa. (B) Cariograma representativo das amostras de DPSC, exibindo os 23 pares de cromossomos humanos (22 autossomos e 1 par de cromossomos sexuais). Os cromossomos estão organizados em pares homólogos e numerados de 1 a 22, seguidos pelos cromossomos sexuais X e Y.

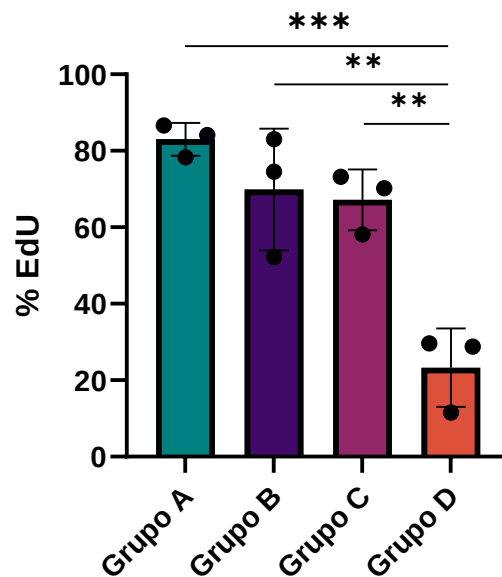
Fonte: Mateus de Oliveira Lisboa (2022)

6.4 O FATOR IDADE REDUZ AS TAXAS DE PROLIFERAÇÃO DAS DPSC

Para verificar a capacidade de proliferação das diferentes faixas etárias de DPSC, foi mensurado por citometria de fluxo a quantidade de células em divisão pela incorporação do nucleosídeo EdU durante a síntese de DNA, por um período de 24 horas, na passagem quatro.

Quando analisado a porcentagem de células proliferativas, o grupo D teve a menor porcentagem de proliferação (23,30%) quando comparado aos grupos A (83%), B (69,90%) e C (67,2%) com diferença significativa entre os grupos A e D ($p<0,0005$), B e D ($p<0,0027$) e C e D ($p<0,0040$) (Figura 15).

Figura 16 Proliferação das DPSC de diferentes faixas etárias.



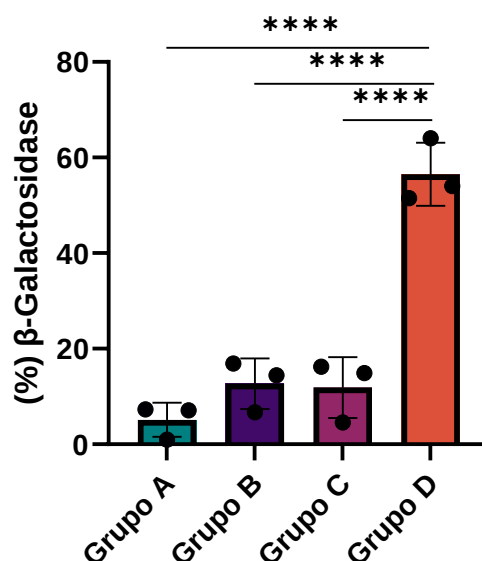
Avaliação da incorporação do nucleosídeo EdU durante 24 horas nos grupos A, B, C e D. Dados expressos em média e desvio padrão. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente. ** $p<0,0027$; ** $p<0,0040$; *** $p<0,0005$.

Fonte: a autora (2023)

6.5 AS DPSC ISOLADAS DE FAIXA ETÁRIA ACIMA DE 50 ANOS APRESENTAM MAIOR TAXA DE CÉLULAS SENESCENTES

Para avaliar a porcentagem de células senescentes, foi mensurado a expressão da enzima β -Galactosidase (enzima presente em células senescentes) por citometria de fluxo nos grupos de DPSC nas diferentes faixas etárias. Após a mensuração da β -galactosidase, foi possível observar que o grupo D (56,50%) teve uma maior porcentagem de células em senescência quando comparado com o grupo A (5,13%), B (12,7%) e C (11,9%) com diferença significativa ($p<0,0001$; $p<0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 16).

Figura 17 Senescência das DPSC de diferentes faixas etárias.



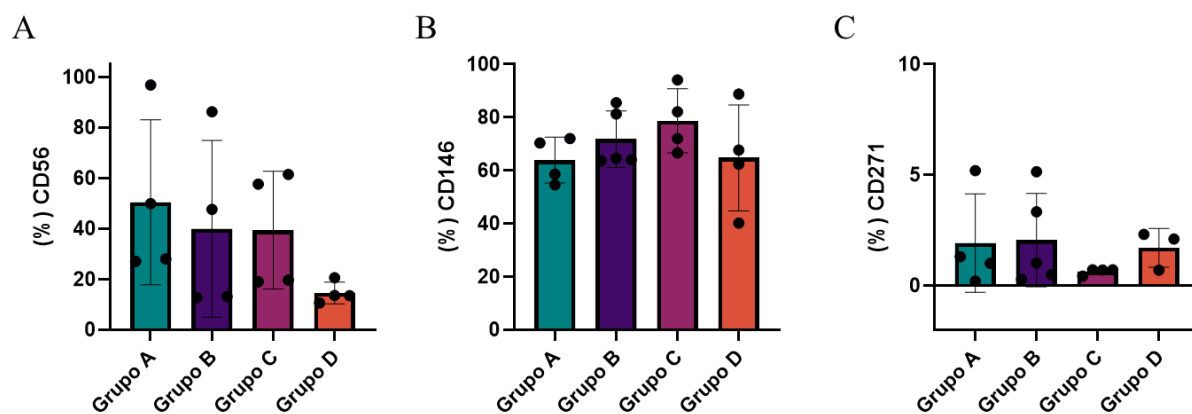
Avaliação da expressão da enzima β -Galactosidase, por citometria de fluxo entre os grupos. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente. **** $p < 0,0001$ (comparação entre os grupos A, B e C em relação ao grupo D).

Fonte: a autora (2023)

6.6 AS DPSC NÃO APRESENTAM DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO DE MARCADORES NEURONAIS DE SUPERFÍCIE

A fim de avaliar a expressão de marcadores neuronais em amostras de DPSC de diferentes faixas etárias, foi realizada uma análise imunofenotípica por citometria de fluxo utilizando os marcadores CD56, CD146 e CD271 (Figura 17). Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de células positivas para os marcadores CD56 ($p=0,3187$), CD146 ($p=0,3826$) e CD271 ($p=0,6858$) entre os grupos analisados.

Figura 18 Expressão dos marcadores neuronais avaliados por citometria de fluxo nos grupos A, B, C e D de DPSC.



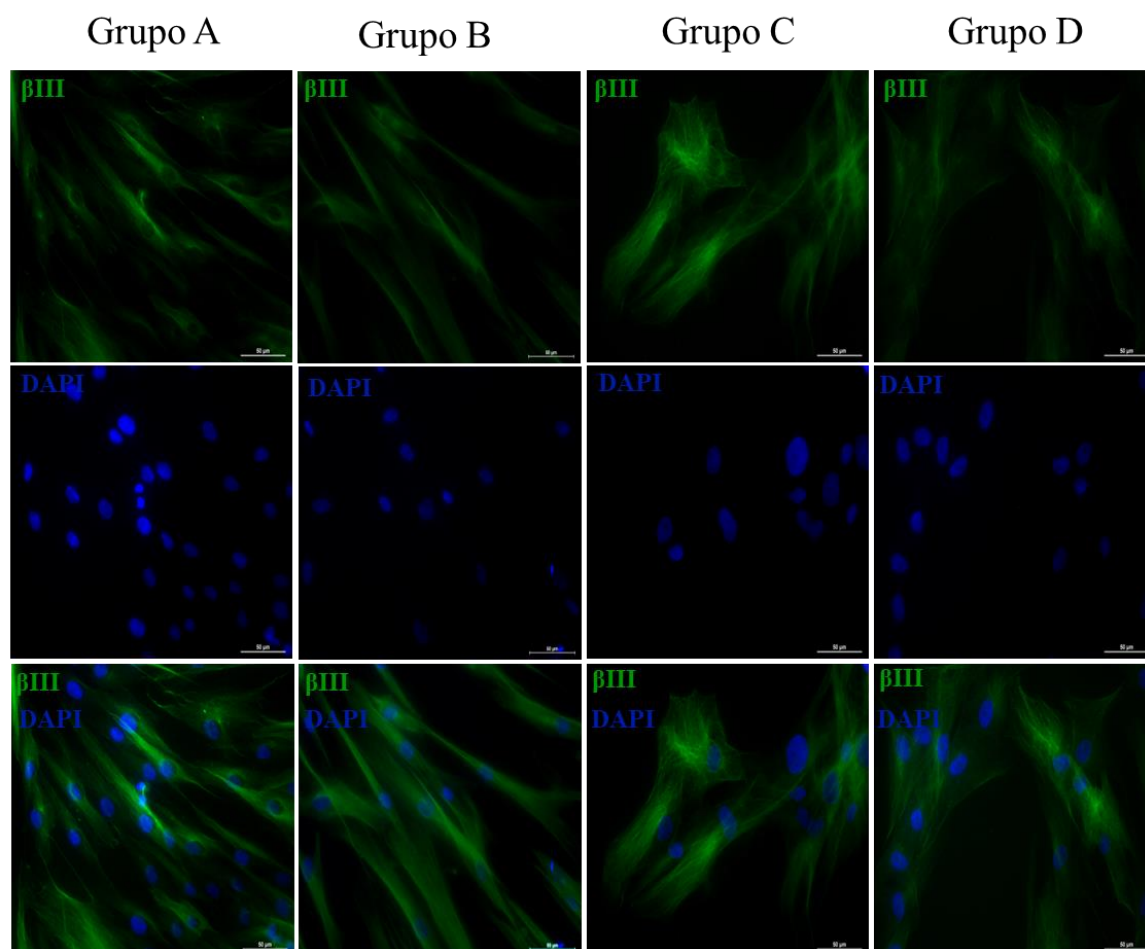
(A) Expressão do marcador CD56 para todos os grupos. (B) Expressão do marcador CD146 para todos os grupos (C) Expressão do marcador CD271 para todos os grupos. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente. CD: grupos de diferenciação celular.

Fonte: a autora (2023)

6.7 AS DPSC NÃO DIFEREM NA EXPRESSÃO DO MARCADOR β TUBULINA III

A expressão da β Tubulina III (tubulina específica de neurônios) foi verificada nas DPSC em estágio indiferenciado. Todos os grupos foram marcados com o anticorpo anti- β Tubulina III. Foi possível observar a expressão em todos os grupos avaliados (Figura 18).

Figura 19 Expressão in vitro das DPSC de todos os grupos marcadas com o anticorpo anti- β tubulinaIII e intensidade de fluorescência da expressão da β tubulinaIII.

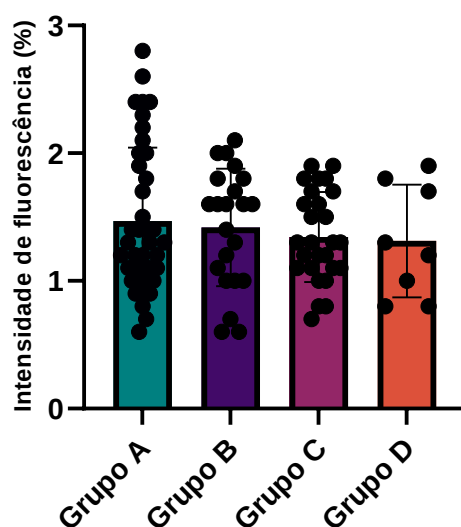


Imagens representativas de imunofluorescência de DPSC de todos os grupos. Anti- β tubulinaIII marcadas em verde (β III). Núcleo celular marcado em azul (DAPI). Aumento: 400x. Barra: 50 μ m. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2023)

Quando quantificado a intensidade de fluorescência do marcador β tubulinaIII entre os grupos, não foi observado diferença estatística significativa ($p=0,7109$), demonstrando uma homogeneidade das amostras na expressão desse marcador (Figura 19).

Figura 20 Quantificação da intensidade de fluorescência do marcador β tubulina III nas DPSC.



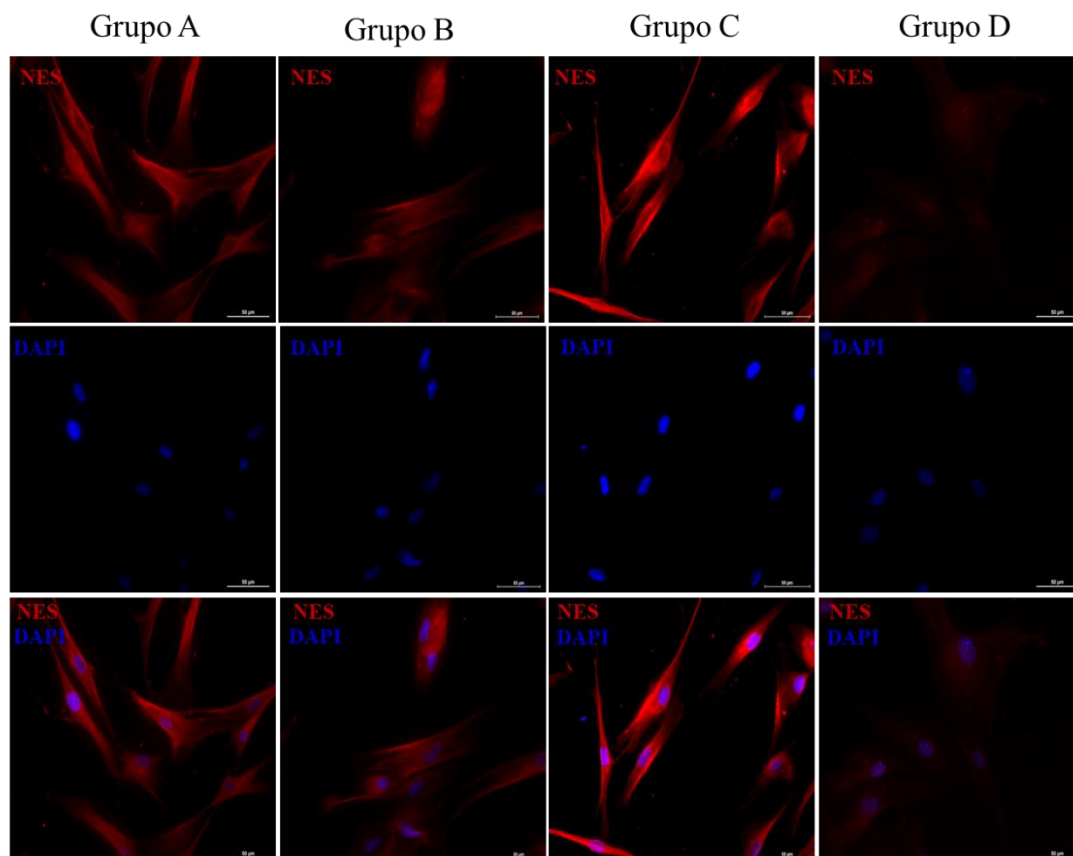
DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2023)

6.8 AS DPSC DE FAIXA ETÁRIA MAIS AVANÇADA APRESENTAM UMA EXPRESSÃO REDUZIDA PARA O MARCADOR NESTINA

A expressão do marcador Nestina (considerado um marcador da crista neural) foi verificada em todos os grupos. As amostras foram marcadas com o anticorpo anti-Nestina. Foi possível observar a expressão desse marcador em todas as faixas etárias (Figura 20).

Figura 21 Expressão do anticorpo anti-nestina nas DPSC de todos os grupos.

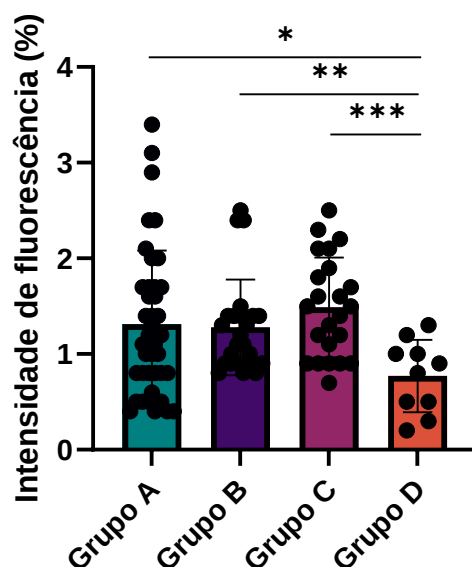


Imagens representativas de imunofluorescência de DPSC de todos os grupos. Anti-Nestina marcadas em vermelho (NES). Núcleo celular marcado em azul (DAPI). Aumento: 400x. Barra: 50µm. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente.

Fonte: a autora (2023)

Foi possível observar uma maior expressão deste marcador nos grupos A e C e uma menor expressão em B e D. Houve diferença estatística significativa entre os grupos A e D ($p < 0,0389$), entre os grupos B e D ($p < 0,0078$) e entre os grupos C e D ($p < 0,0008$) (Figura 21).

Figura 22 Quantificação da intensidade de fluorescência da DPSC de todos os grupos marcadas com anti-Nestina.



Os dados foram expressos em média e desvio padrão. DPSC: células estromais derivadas de polpa de dente permanente * $p < 0,0389$; ** $p < 0,0078$; *** $p < 0,0008$.

Fonte: a autora (2023)

Essa diminuição na expressão da nestina no grupo D pode indicar diversas situações, como a diferenciação celular para a linhagem neuronal. No entanto, quando analisada em conjunto com os outros resultados, essa hipótese não se sustenta.

7. DISCUSSÃO

Um total de 25 amostras foram coletadas e isoladas, sendo que 19 amostras apresentaram células aderentes e proliferando, podendo ser observado que conforme aumento da faixa etária do doador, menor a capacidade das células aderirem e proliferarem, assim como descrito por Wu e colaboradores (2015)(111). Usualmente a baixa capacidade de isolamento é associada a contaminação do cultivo por fungo ou bactéria, porém esse não foi o motivo do baixo potencial de isolamento neste estudo (112). A redução na capacidade das células aderirem nos grupos com faixa etária mais avançada (grupo C e grupo D) pode estar associada ao fato de as células passarem por algum estresse tentando se adaptar ao meio, tais como: níveis alterados de nutrientes e fatores de crescimento, bem como ausência de componentes e tipos celulares que circundam a matriz extracelular, aumento nos níveis de oxigênio e, além disso, pode também estar relacionada em como a estrutura do dente reage ao envelhecimento (35). Assim como outros tecidos, o dente também está sujeito ao envelhecimento, dessa forma sua estrutura passa por alterações, que segundo alguns autores afetam de forma direta o volume de polpa (41,69,113,114). Uma dessas alterações está diretamente ligada a deposição secundária da dentina causando calcificação nas artérias pulpares e por consequência provocando a constrição do canal da polpa impedindo a circulação sanguínea (69). Essas modificações observadas com o passar do tempo na estrutura do dente/polpa podem ser as responsáveis pelo menor potencial de isolamento, pois pode diminuir a quantidade de células disponíveis no tecido.

Um dos critérios estabelecidos pela ISCT para que uma célula seja considerada MSC é a aderência ao plástico e morfologia fibroblásticoide (18). Todos os grupos apresentaram células aderentes ao plástico e similaridades em sua morfologia, no entanto, foi possível notar no grupo D células com uma morfologia mais arredondada e achatada quando comparado aos outros grupos que apresentaram uma morfologia mais alongada e similar a

fibroblastos(100,115). Esse tipo de morfologia constatada no grupo D é comumente encontrada em células que demonstram um comportamento mais senescente (71).

Ao analisar os resultados da citometria de fluxo para caracterização imunofenotípica das DPSC dos quatro grupos, foi constatado que as células apresentaram um perfil imunofenotípico positivo (maior que 95%) para os marcadores CD73, CD90 e CD105 e reduzido (menor que 2%) para os marcadores CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR, corroborando com os critérios estabelecidos pela ISCT e com outros estudos que avaliaram a expressão dos mesmos marcadores quanto a faixa etária(18,116,117). Neste estudo além de terem sido utilizados os marcadores sugeridos pela ISCT, foram adicionados ao painel de citometria os marcadores CD29, CD44 e STRO-1 que autores descrevem também como marcadores presentes nas MSC (103,118,119).

A expressão positiva do marcador CD29 (pertencente à família das integrinas, contribui para a locomoção e adesão célula-célula) e do marcador CD44 (receptor de superfície celular que atua na interação célula-célula, adesão celular e migração), foi observada em todos os grupos, corroborando com outros estudos que utilizaram esses marcadores para caracterizar MSC (103,108,117,120–124).

O marcador STRO-1 tem sido regularmente utilizado para reconhecimento e isolamento de vários tipos de MSC (23). Apesar de ser considerado um marcador de MSC, sua expressão no presente estudo se mostrou controverso apresentando uma baixa expressão em todas as faixas etárias, assim como constatado por outros pesquisadores em células estromais isoladas de polpa e outros tecidos dentários como PDLSC e GF (103,118).

A viabilidade celular é usada para medir a proporção de células vivas dentro uma população, dessa forma, é utilizada em ensaios que são capazes de determinar a saúde geral das células o que por sua vez, nos ajudam a otimizar o cultivo ou até mesmo condições de determinado experimento. Uma forma de avaliar a viabilidade celular é por citometria de

fluxo utilizando o 7-AAD, um corante impermeável a membrana de células intactas, porém, que podem entrar facilmente em células com a membrana comprometida. Ao analisar os resultados obtidos nesse estudo, não foi observado diferença estatística entre os grupos o que torna consistente com os resultados encontrados por Liu e colaboradores (2017) (116) onde a viabilidade celular da fração vascular estromal de tecido adiposo não muda de forma significativa com a idade do doador. Embora não constatado diferença entre os grupos, foi possível observar uma queda na viabilidade celular nos grupos B e C, o que pode estar atrelado a variabilidade das amostras dentro de cada grupo.

Para caracterizar os grupos a fim de conferir o potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica e adipogênica, foi realizado a indução à diferenciação em ambas as linhagens por um período de 21 dias. Após os 21 dias de diferenciação foi constatado na diferenciação osteogênica a presença de cristais de cálcio em todos os grupos, corroborando com parte dos critérios estabelecidos pela ISCT. No entanto, foi possível observar nos grupos C e D uma diferença na coloração, os quais pareciam possuir uma menor quantidade de cristais de cálcio corados com Alizarina Red S quando comparado aos grupos A e B. Para inferir melhores conclusões sobre essa possível diferença entre os grupos, foi realizada a quantificação da diferenciação. A análise quantitativa da diferenciação osteogênica por densidade óptica (DO) revelou um padrão divergente do esperado. Os grupos B e D apresentaram valores aumentados de DO, enquanto os grupos A e C mostraram valores reduzidos. Embora estes resultados contrariem a hipótese inicial de que doadores mais jovens teriam maior potencial de diferenciação osteogênica, estudos conduzidos por Beane (2014)(125) e Horinouchi (2020)(126) e colaboradores indicam que as DPSC, assim como as células estromais derivadas do tecido adiposo, podem manter seu potencial de diferenciação osteogênica independentemente da idade do doador.

Kawagishi-Hotta e colaboradores (2016)(115), avaliando a capacidade de diferenciação osteogênica em MSC de tecido adiposo, observaram que o potencial de diferenciação não está correlacionado com a idade do doador, mas foi notado diferenças individuais em grupos mais velhos. Essas diferenças individuais no potencial de diferenciação osteogênico aumentaram de forma gradativa e proporcional a idade do doador. Portanto, ao comparar os resultados obtidos pelos autores citados acima e os resultados do nosso estudo, podemos dizer que o potencial de diferenciação osteogênica não sofre alterações independentemente da idade do doador.

Quando avaliado o potencial de diferenciação adipogênica, foi constatado a presença de poucos vacúolos lipídicos em todos os grupos (18). Isso comprova resultados anteriores que demonstraram o potencial limitado de diferenciação adipogênica das DPSC quando comparada com outras fontes de MSC. Fracaro e colaboradores (2020) (109) comparando DPSC e tecido adiposo utilizando dois meios de indução a diferenciação adipogênica (meio comercial e meio caseiro) relataram que as células de polpa de dente possuem um potencial reduzido para diferenciação adipogênica (média de 0% de células com vacúolos lipídicos em ambos os meios de indução a diferenciação) quando comparada ao tecido adiposo que apresentou uma média de 49,2% e 48,5% de células com vacúolos para meio comercial e meio caseiro, respectivamente.

Quando comparadas as diferentes faixas etárias, as células dos grupos C e D apresentaram um maior potencial de diferenciação adipogênica em relação aos grupos A e B, em concordância com estudos prévios (100,127). Esses resultados sugerem que a idade pode influenciar a tendência das DPSC para diferenciação adipogênica. Conforme observado por Dastgurdi e colaboradores (2018)(128), o método de isolamento também pode afetar o potencial de diferenciação das DPSC: o uso de collagenase I e dispase favorece a diferenciação osteogênica e condrogênica, enquanto o uso exclusivo de collagenase tende a

aumentar a expressão adipogênica. Esses achados ressaltam a importância de padronizar as metodologias de isolamento e cultivo para DPSC e outras células estromais mesenquimais, a fim de minimizar variáveis que possam interferir na capacidade de diferenciação. Neste estudo, utilizamos exclusivamente colagenase II para o isolamento, o que garantiu a uniformidade metodológica, mas ainda assim, variações entre as faixas etárias foram evidentes.

Além disso, outra explicação possível para o aumento do potencial de diferenciação adipogênica nos grupos C e D está relacionada à ação das espécies reativas de oxigênio (ROS). Estudos recentes sugerem que as ROS desempenham um papel importante na regulação da diferenciação celular (129–132). Em geral, o aumento e acúmulo de ROS estão associados a uma redução no potencial osteogênico das MSC. Sob condições patológicas, como envelhecimento e doenças metabólicas, as MSC tendem a se diferenciar em adipócitos em vez de osteoblastos (130). Esse fenômeno pode explicar o maior potencial de diferenciação adipogênica observado nas células dos grupos C e D, indicando que a idade e o acúmulo de ROS podem ser fatores cruciais na definição do destino dessas células.

O ensaio de CFU-F é utilizado para confirmar o potencial clonogênico, uma característica das MSC onde é avaliado a habilidade dessas células em gerar células-tronco idênticas com morfologia celular adequada (133). Nesse estudo foi possível observar uma diferença estatística significativa no número médio de colônias e eficiência na formação de colônias entre os grupos A, B e C quando comparado ao grupo D. Diversos autores realizaram o ensaio de CFU-F em tecidos dentários e outras fontes, porém, o número inicial de células e o tempo de cultivo difere muito entre os estudos, o que dificulta a comparação dos resultados. Apesar da dificuldade em comparar os resultados, estudos já demonstraram que o potencial clonogênico de doadores mais velhos é reduzido devido a declínio gradual

no número de MSC formadoras de colônias, reforçando o que foi encontrado neste estudo (103,116,134,135).

Uma vez caracterizadas as DPSC dos quatro grupos, foi avaliada a estabilidade genética das células. Há muito tempo as MSC vem sendo estudadas como potencial para uso clínico e, portanto, muitas vezes se faz necessário expandir as células *in vitro* de forma a atingir um número suficiente para uso terapêutico aumentando a probabilidade de alterações genéticas ocorrerem (49). Devido a necessidade de expansão das células *in vitro*, existe o risco de as células adquirirem e acumularem alterações genéticas, causando problemas nos efeitos terapêuticos dessas células e promovendo a senescência celular, que por sua vez pode afetar a eficácia no tratamento e segurança do paciente. Além disso a instabilidade genética pode comprometer a confiança nos resultados obtidos nos testes *in vitro* (136).

Para que essas células possam ser utilizadas de forma segura como terapia, é frequentemente realizada análise cariotípica nas células em cultivo. Neste estudo, a análise cariotípica foi conduzida para avaliar se a expansão *in vitro* afetou a estabilidade genética das células. Em todas as amostras em que foi possível analisar um número suficiente de células de acordo com ISCN, não foram encontradas anormalidades cromossômicas, assim como constatado por Brunet e colaboradores (2023) (98). Isso indica que as amostras obtidas de doadores com essas idades apresentam estabilidade genética, sugerindo a biossegurança dessas amostras para possíveis aplicações clínicas.

A análise citogenética do grupo D (50-55 anos) foi impossibilitada pela ausência de metáfases apropriadas para avaliação cariotípica, comprometendo a verificação da estabilidade cromossômica nestas células. Esta limitação metodológica é particularmente relevante no contexto de possíveis aplicações terapêuticas, especialmente considerando que estudos prévios evidenciam uma maior susceptibilidade à instabilidade genética associada ao envelhecimento (135). A impossibilidade de validar a integridade cromossômica em

células provenientes de doadores desta faixa etária traz preocupações quanto à biossegurança e aponta para a necessidade de métodos alternativos de análise genética para esta população ou a não utilização dessas amostras em estudos envolvendo a medicina regenerativa (137).

As DPSC são conhecidas por compartilharem algumas características de outras fontes de MSC como habilidade de diferenciação em diversos fenótipos. Por outro lado, as DPSC têm propriedades distintas quando comparadas a outras MSC como um maior potencial de proliferação, capacidade de regenerar tecidos, plasticidade e propriedades imunomodulatórias (138). Apesar das DPSC possuírem boas taxas de proliferação, a idade do doador pode influenciar nesse potencial. Foi observado em outras fontes de tecido dentário e tecido adiposo que a proliferação sofre influência com a idade do doador (101,107,127,131). E apesar de as metodologias serem diferentes do aplicado nesse estudo e os grupos de faixa etária apresentarem amostras mais heterogêneas, foi possível observar uma tendência para faixas etárias mais avançadas possuírem uma menor capacidade proliferativa quando comparado a grupos mais jovens (101,107,127,131). Além disso, observa-se uma relação entre a proliferação celular, capacidade de formação de colônias e senescência no grupo D, caracterizado por uma menor taxa de proliferação, redução no número e formação de colônias, além de uma maior porcentagem de células senescentes.

A senescência é caracterizada como um processo responsável pela interrupção do ciclo celular de forma irreversível, porém esse processo também é notado em todos os tecidos do corpo com o avanço da idade (69,106,139). Uma das formas de avaliar a senescência celular é o biomarcador β -Galactosidase que em condições ácidas de pH é convertida em monossacarídeos (66,68). Conforme resultados observados pelos autores Iezzi e colaboradores (2019)(102) em DPSC e Choudhery e colaboradores (2014)(135) em tecido lipoaspirado, a idade pode influenciar no número de células senescentes. Avaliando os resultados desses estudos é possível constatar que os grupos pertencentes aos doadores

com idade mais avançada possuem uma tendência a apresentar uma alta porcentagem de células senescentes, assim como observado no nosso estudo. Estes resultados também podem ser relacionados com a morfologia, onde no grupo D as células apresentaram morfologia diferente da esperada (fibroblastóide).

As DPSC são conhecidas por terem origem embrionária ectomesenquimal, e desde sua descoberta têm sido realizados estudos para avaliar seu potencial neuronal e pelo fato dessas células possuírem a capacidade de expressar marcadores mesmo em estágio indiferenciado (45,140).

O marcador CD56 está presente nas DPSC e tem sido utilizado como um indicador robusto para confirmar sua origem ectodérmica. Este marcador é sugestivo de uma população de células-tronco derivadas da crista neural que persiste no nicho da polpa dentária em adultos (141). Em nosso estudo, foi observado uma tendência de redução na expressão do CD56 conforme aumento da idade do doador, demonstrando que células isoladas de diferentes doadores e faixas etárias podem ter diferenças na expressão de marcadores neuronais, assim como constatado por Balasankar e colaboradores (2022) (141). Além disso, sabe-se que conforme envelhecemos ocorre a deposição de camada secundária da dentina, o que por sua vez pode alterar o volume da polpa e dessa forma haver a redução do número de células que expressam o marcador CD56, o que poderia explicar o que foi observado em nosso estudo (41).

O marcador CD146, é uma molécula de adesão celular que pode promover o desenvolvimento do sistema nervoso através da adesão entre neurônios e células gliais com células endoteliais (82). No presente estudo foi possível observar uma expressão acima de 60% em todos os grupos, porém sem diferença estatística, assim como observado por Yi e colaboradores (2017)(107) em DPSC de faixas etárias estudadas pelo grupo. Enquanto Zhang e colaboradores (2012)(103) em PDLSC de diferentes faixas etárias relatou variações

significativas na expressão do CD146 em diferentes faixas etárias além de uma menor expressão.

O marcador CD271, é uma molécula considerada importante para a sobrevivência de células neurais (142). O fator de crescimento nervoso (NGF) tem um papel importante no desenvolvimento e diferenciação neuronal de células não neurais. O NGF pode se ligar a receptores de superfície específicos como p75 (também chamado de CD271) e TrkA que segundo Mitsiadis e Pagella (2016) (114) precedem o início da inervação dentária no crescimento da papila dentária. Pensando que essas moléculas estão presentes no desenvolvimento do dente e crescimento dos nervos na polpa dentária, é possível que a distribuição dessas fibras nervosas diminui conforme envelhecemos, o que poderia explicar os resultados encontrados em nosso estudo. Outro estudo avaliou o comportamento das SHED na expressão do marcador CD271 sob diferentes concentrações de SBF. Lisboa e colaboradores (2024) (143), constataram que a expressão do marcador CD271 muda conforme concentração de SBF. Concentrações reduzidas (sem SBF ou 1%) de SBF aumentam a expressão do CD271, enquanto concentrações altas de SBF (15%) diminuem a expressão do marcador. Esses resultados encontrados pelo autor, pode estar relacionado ao que foi observado em nosso estudo visto que o cultivo das DPSC foi realizado com 15% SBF.

As DPSC de todos os grupos expressaram β Tubulina III e Nestina marcadores considerados de neurônios imaturos e precursor neural, respectivamente. A β Tubulina III é um marcador neuronal que desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso e na orientação dos axônios (144,145). Todos os grupos expressaram o marcador β Tubulina III e não houve diferença estatística entre os grupos, assim como observado por Dave e colaboradores (2022) (146) ao avaliar a expressão do marcador em células-tronco derivadas da gengiva. Estudos que avaliaram o potencial das DPSC de faixas etárias

diferentes em expressar o marcador realizaram a indução à diferenciação neuronal e constataram que o perfil de expressão diminui conforme aumento da idade do doador (102,111).(108)

A nestina é uma proteína do citoesqueleto que tem sido muito utilizada como um marcador de células-tronco do sistema nervoso central e em cultivo de células *in vitro* (94,147). Bressan e colaboradores (2012) (148) realizaram a indução à diferenciação neuronal para avaliar se a expressão da nestina entre diferentes grupos de faixa etária se mantinha durante as passagens e foi constatado que em doadores acima de 45 anos a porcentagem de células expressando o marcador era reduzida. Outros autores também notaram a redução na expressão da nestina evidenciando diferenças na intensidade da fluorescência (102,108). O mesmo comportamento foi observado na quantificação da intensidade de fluorescência, onde o grupo D apresentou uma redução na expressão do marcador Nestina comparado aos outros grupos.

Com os resultados obtidos em todos os ensaios para melhor compreensão em como a idade pode interferir nas propriedades das DPSC, foi observado que existe uma tendência em células derivadas de pacientes acima de 50 anos em possuir propriedades de células com morfologia característica de células senescentes, com uma baixa proliferação, bem como um potencial reduzido para formação de colônias *in vitro*. No entanto, quando avaliado os marcadores neuronais por citometria de fluxo (CD56, CD146 e CD271) e imunofluorescência (β Tubulina III) não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos. Portanto, ao avaliar a influência da idade no potencial das DPSC em expressar os marcadores neuronais em questão, pode-se dizer que a idade parece ter pouca influência na expressão de marcadores neuronais mencionados acima. Porém, foi observado também que as DPSC podem apresentar um potencial reduzido para expressão de marcadores neuronais como o marcador Nestina, considerado um marcador da crista neural.

Dessa forma, futuros estudos que fazem uso dessas células deveriam levar em consideração a idade do paciente como um critério para inclusão em projetos.

8. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a faixa etária exerce uma influência significativa nas características das células estromais derivadas da polpa dentária. Amostras provenientes de indivíduos com idade superior a 50 anos apresentam alterações em características fundamentais, como potencial proliferativo e capacidade de diferenciação, além de uma maior presença de células senescentes. Essas mudanças sugerem que amostras de faixas etárias mais avançadas podem ser menos adequadas para uso em ensaios básicos, pré-clínicos e clínicos, uma vez que seu comportamento e estabilidade podem não atender aos requisitos necessários para resultados consistentes e replicáveis.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Os resultados deste estudo evidenciam que a idade do doador afeta significativamente as propriedades das células estromais derivadas da polpa dentária. As comparações entre faixas etárias mostraram que células de doadores com mais de 50 anos apresentam características distintas, incluindo menor capacidade de proliferação e diferenciação, além de uma proporção mais alta de células senescentes. Essa influência da idade pode limitar o uso de células de doadores mais velhos em algumas pesquisas e aplicações clínicas.

No entanto, este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. O número de amostras pode ter limitado a representatividade dos dados para determinadas faixas etárias, o que pode influenciar a generalização dos resultados. Além disso, as análises de marcadores neuronais foram realizadas em um contexto *in vitro*, o que pode não refletir completamente o comportamento das células em um ambiente *in vivo* mais complexo. Fatores como a heterogeneidade das condições de saúde dos doadores e a metodologia de isolamento e cultivo também podem impactar os resultados obtidos.

Mesmo com essas limitações, os resultados ressaltam a importância de considerar a idade do doador ao selecionar células para estudos em medicina regenerativa e terapias celulares, especialmente quando se busca aplicações que envolvem diferenciação e alta capacidade proliferativa. Este trabalho contribui para um entendimento mais profundo sobre as limitações e potencialidades das células estromais dentárias de diferentes idades, fornecendo informações para futuras pesquisas que busquem otimizar o uso dessas células.

Durante a realização deste projeto, foi possível coletar e isolar dentes de diferentes faixas etárias e avaliar o potencial dessas células.

Ao observar as colorações da diferenciação osteogênica, foi observado uma ligeira moderação na coloração conforme aumento da idade do doador. A partir dessa constatação, foi realizado o ensaio de quantificação da coloração da Alizarina Red S por

espectrofotometria. Porém, foi observado que doadores da faixa etária de 30 e 50 anos apresentaram um maior potencial para diferenciação osteogênica quando comparado as de faixa etária de 20 e 40 anos. Portanto, para melhor entendimento desses dados seria interessante realizar RT-qPCR observando os níveis de expressão de marcadores relacionados a diferenciação osteogênica.

Ao avaliar os marcadores neuronais por citometria de fluxo, não foi observado diferença estatística entre os grupos. Dessa forma, seria interessante aumentar o n das amostras para melhor entender o papel que a idade exerce sobre os marcadores.

10. REFERÊNCIAS

1. Kozłowska U, Krawczenko A, Futoma K, Jurek T, Rorat M, Patrzalek D, et al. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. *World J Stem Cells*. 2019;11(6):347–74.
2. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro I e Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Embryol. exp. Morph.* 1966; 16(3): 581-590.
3. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>. doi: 10.1073/pnas.240309797.
4. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: A review. *Stem Cells Int* [Internet]. 2016; 2016:4709572. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/4709572>. doi: 10.1155/2016/4709572.
5. Awais S, Balouch SS, Riaz N, Choudhery MS. Human Dental Pulp Stem Cells Exhibit Osteogenic Differentiation Potential. *Open Life Sci*. 2020;15(1):229–236.
6. Chen Y, Huang H, Li G, Yu J, Fang F, Qiu W. Dental-derived mesenchymal stem cell sheets: a prospective tissue engineering for regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2022; 13:38. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02716-3>. doi: 10.1186/s13287-022-02716-3.
7. Huang X, Li Z, Liu A, Liu X, Guo H, Wu M, et al. Microenvironment Influences Odontogenic Mesenchymal Stem Cells Mediated Dental Pulp Regeneration. *Front Physiol* [Internet]. 2021;12: 656588. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.656588>. doi: 10.3389/fphys.2021.656588.
8. Bonaventura G, Incontro S, Iemmolo R, La Cognata V, Barbagallo I, Costanzo E, et al. Dental mesenchymal stem cells and neuro-regeneration: a focus on spinal cord injury. *Cell Tissue Res*. 2020; 379:421-428.
9. Pisciotta A, Bertani G, Bertoni L, Di Tinco R, De Biasi S, Vallarola A, et al. Modulation of Cell Death and Promotion of Chondrogenic Differentiation by Fas/FasL in Human Dental Pulp Stem Cells (hDPSCs). *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020;8:279. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00279>. doi: 10.3389/fcell.2020.00279.
10. Nuti N, Corallo C, Chan BMF, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev and Rep* [Internet]. 2016; 12:51-523. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9661-9>. doi: 10.1007/s12015-016-9661-9.
11. Kok ZY, Alaidaroos NYA, Alraies A, Colombo JS, Davies LC, Waddington RJ, et al. Dental Pulp Stem Cell Heterogeneity: Finding Superior Quality “needles” in a Dental Pulpal “haystack” for Regenerative Medicine-Based Applications. *Stem*

- Cells Int [Internet]. 2022; 9127074. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/9127074>. doi: 10.1155/2022/9127074.
12. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Critical reviews in oral biology & medicine: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009; 88(9):792–806.
 13. Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*. 2018; 20(4):479–98.
 14. Poblano-Pérez LI, Castro-Manreza ME, González-Alva P, Fajardo-Orduña GR, Montesinos JJ. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Dental Tissues: Immunomodulatory Properties and Clinical Potential. *I. J. Mol. Sci*. 2024; 25(4) 1986.
 15. Marei MK, El Backly RM. Dental mesenchymal stem cell-based translational regenerative dentistry: From artificial to biological replacement. *Front Bioeng. Biotechnol* [Internet]. 2018;6:49. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00049>. doi: 10.3389/fbioe.2018.00049.
 16. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. *J Pathol*. 2009; 217(2):318–24.
 17. Daley GQ. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Phil Trans R Soc B* [Internet]. 2015. 370:20140376. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0376>. doi: 10.1098/rstb.2014.0376.
 18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317.
 19. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regen Med* [Internet]. 2019; 4:22. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>. Doi: 10.1038/s41536-019-0083-6.
 20. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641–50.
 21. Väänänen HK. Mesenchymal stem cells. *Ann. Med*. 2005;37(7):469–79. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07853890500371957>. doi: 10.1080/07853890500371957.
 22. Bianco P. “Mesenchymal” stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev Biol* [Internet]. 2014. 30: 677–704. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013132>. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013132.
 23. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2007;9(1):204. doi: 10.1186/ar2116.
 24. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014;32(6): 1408–19.

25. Hochuli AHD, Senegaglia AC, Selenko AH, Fracaro L, Brofman PRS. Dental Pulp from Human Exfoliated Deciduous Teeth-derived Stromal Cells Demonstrated Neuronal Potential: In Vivo and In Vitro Studies. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2021;16(5):495–506.
26. Berbéri A, Sabbagh J, Bou Assaf R, Ghassibe-Sabbagh M, Al-Nemer F, El Majzoub R, et al. Comparing the osteogenic potential of schneiderian membrane and dental pulp mesenchymal stem cells: an in vitro study. *Cell Tissue Bank*. 2021;22(3):409–17.
27. Machado CDV, Carvalho CM, Campos TMC, Passos ST, Telles PD da S. Isolation and culture of stem cells derived from dental pulp of permanent teeth: a successful method. *Revista da Faculdade de Odontologia – UPF* [Internet]. 2015;20(2). Disponível em: <https://doi.org/10.5335/rfo.v20i2.4655>. doi: 10.5335/rfo.v20i2.4655.
28. Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J. Vis. Exp* [Internet]. 2012;(69):e4372. doi: 10.3791/4372.
29. Jeon M, Song JS, Choi BJ, Choi HJ, Shin DM, Jung HS, et al. In vitro and in vivo characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained by enzymatic disaggregation and outgrowth. *Arch Oral Biol*. 2014;59(10):1013–23.
30. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* [Internet]. 2012. 2012: 812693. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/812693>. doi: 10.1155/2012/812693.
31. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and Functional Properties of Human Bone Marrow Mesenchymal Progenitor Cells. *J. Cell. Physiol*. 1999;181(1):67-73.
32. Bianco P, Cossu G. Uno, nessuno e centomila: Searching for the Identity of Mesodermal Progenitors. 1999;251(2):257-263.
33. Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Ann Med*. 2017; 49(8):644–51.
34. Victor AK, Reiter LT. Dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. *Hum. Mol. Genet*. 2017;26(R2):R166–71.
35. Morsczeck C. Cellular senescence in dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*. 2019; 99:150–5. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.012>. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.012.
36. Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. High-Efficiency RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 2005;23(3):299–305.
37. Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, García-Murga V, Etxaniz J, Unda F. Neural crest stem cells from dental tissues: A new hope for dental and neural

- regeneration. *Stem Cells Int* [Internet]. 2012;2012:103503. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/103503>. doi: 10.1155/2012/103503.
38. Faruqu FN, Zhou S, Sami N, Gheidari F, Lu H, Al-Jamal KT. Three-dimensional culture of dental pulp pluripotent-like stem cells (DPPSCs) enhances Nanog expression and provides a serum-free condition for exosome isolation. *FASEB Bioadv.* 2020;2(7):419–33.
 39. Zhang R, Xie L, Wu H, Yang T, Zhang Q, Tian Y, et al. Alginate/laponite hydrogel microspheres co-encapsulating dental pulp stem cells and VEGF for endodontic regeneration. *Acta Biomater.* 2020;113:305–16.
 40. Liu P, Zhang Y, Ma Y, Tan S, Ren B, Liu S, et al. Application of dental pulp stem cells in oral maxillofacial tissue engineering. *Int. J. Med. Sci.* 2022;19(2):310–20.
 41. Al Madhoun A, Sindhu S, Haddad D, Atari M, Ahmad R, Al-Mulla F. Dental Pulp Stem Cells Derived From Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review. *Front Cell Dev Bio* [Internet]. 2021;9:717624. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.717624>. doi: 10.3389/fcell.2021.717624.
 42. Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, et al. Immunophenotyping reveals the diversity of human dental pulp mesenchymal stromal cells in vivo and their evolution upon in vitro amplification. *Front Physiol* [Internet]. 2016; 7:512. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00512>. doi: 10.3389/fphys.2016.00512.
 43. Chang CC, Chang KC, Tsai SJ, Chang HH, Lin CP. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *J Formos Med Assoc.* 2014;113(12):956–965.
 44. Abuarqoub D, Aslam N, Almajali B, Shajrawi L, Jafar H, Awidi A. Neuro-regenerative potential of dental stem cells: a concise review. *Cell Tissue Res.* 2020; 382(2):267-79.
 45. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531–535.
 46. D'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Studer M, de Angelis GC, Laino L, et al. Human neural crest-derived postnatal cells exhibit remarkable embryonic attributes either in vitro or in vivo. *Eur Cell Mater.* 2011;21:304–16.
 47. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology.* 2013;101(2):121–132.
 48. Martens W, Wolfs E, Struys T, Politis C, Bronckaers A, Lambrechts I. Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. *Cells Tissues Organs.* 2012;196(6):490–500.
 49. Stultz BG, McGinnis K, Thompson EE, Lo Surdo JL, Bauer SR, Hursh DA. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture. *Cytotherapy.* 2016;18(3):336–43.

50. Oliveira PH, Da Silva CL, Cabral JMS. Concise review: Genomic instability in human stem cells: Current status and future challenges. *Stem Cells*. 2014;32(11):2824–32.
51. Malagutti-Ferreira MJ, Crispim BA, Barufatti A, Cardoso SS, Guarnier LP, Rodríguez FF, et al. Genomic instability in long-term culture of human adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Braz. J. Med. Bio Res* [Internet]. 2023;56:e12713. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1414-431X2023e12713>. doi: 10.1590/1414-431X2023e12713.
52. Venkatesan S, Natarajan AT, Hande MP. Chromosomal instability-mechanisms and consequences. Vol. 793, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Elsevier B.V.; 2015. p. 176–84.
53. Iourov IY, Yurov YB, Vorsanova SG, Kutsev SI. Chromosome instability, aging and brain diseases. *Cells*. 2021;10(5):1256. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10051256>. Doi: 10.3390/cells10051256.
54. Al Zouabi L, Bardin AJ. Stem cell DNA damage and genome mutation in the context of aging and cancer initiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2020;12(10):a036210. doi: 10.1101/cshperspect.a036210.
55. Castle H, Sweden S, Lindsten JE, Harold Keinger HP, Hamerton JL. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978) ISCN (1978) Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Cytogenet. Cell Genet* [Internet]. 1978; 21(6):309-409. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000130909>. doi: 10.1159/000130909.
56. Ozkan E, Lacerda MP. Genetics, Cytogenetic Testing And Conventional Karyotype. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
57. O'Connor C. Karyotyping for Chromosomal Abnormalities. *Nature Education*. 2008;1(1):27;
58. Bickmore WA. Karyotype Analysis and Chromosome Banding. *eLS* [Internet]. 2001 Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001160>. doi: 10.1038/npg.els.0001160.
59. Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J*. 1995;27(2):339-69.
60. Buck SB, Bradford J, Gee KR, Agnew BJ, Clarke ST, Salic A. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'- deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques*. 2008;44(7):927–9.
61. Balu DT, Hodes GE, Hill TE, Ho N, Rahman Z, Bender CN, et al. Flow cytometric analysis of BrdU incorporation as a high-throughput method for measuring adult neurogenesis in the mouse. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2009;59(2):100–107.

62. Matatall KA, Kadmon CS, King KY. Detecting hematopoietic stem cell proliferation using BrdU incorporation. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2018;1686:91–103. Disponible em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7371-2_7. doi: 10.1007/978-1-4939-7371-2_7.
63. Chehrehasa F, Key B, St John JA. The cell surface carbohydrate blood group A regulates the selective fasciculation of regenerating accessory olfactory axons. *Brain Res* [Internet]. 2008; 1203:32–8. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.084>. doi: 10.1016/j.brainres.2008.01.084.
64. Hayflick L, Moorhead PS. The Serial Cultivation Of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* [Internet]. 1961; 25:585-621. Disponible em: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6). doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
65. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(1):3-11.
66. Valieva Y, Ivanova E, Fayzullin A, Kurkov A, Igrunkova A. Senescence-Associated β -Galactosidase Detection in Pathology. *Diagnostics (Basel)* [Internet]. 2022;12(10):2309. Disponible em: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102309>. doi: 10.3390/diagnostics12102309.
67. Dimri GP, Leet X, Basile G, Acosta M, Scorr G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1995;92(20):9363-7.
68. de Mera-Rodríguez JA, Álvarez-Hernán G, Gañán Y, Martín-Partido G, Rodríguez-León J, Francisco-Morcillo J. Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Reliable in vivo Marker of Cellular Senescence During Embryonic Development? *Front Cell Dev Bio* [Internet]. 2021; 9:623175. Disponible em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.623175>. doi: 10.3389/fcell.2021.623175.
69. Maeda H. Aging and Senescence of Dental Pulp and Hard Tissues of the Tooth. *Front Cell Dev Bio* [Internet]. 2020; 8:605996. Disponible em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.605996>. doi: 10.3389/fcell.2020.605996.
70. Byun HO, Lee YK, Kim JM, Yoon G. From cell senescence to age-related diseases: Differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Rep*. 2015; 48(10):549–58.
71. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res ver* [Internet]. 2006;5(1):91–116. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.10.001>. doi: 10.1016/j.arr.2005.10.001.
72. Liu J, Ding Y, Liu Z, Liang X. Senescence in Mesenchymal Stem Cells: Functional Alterations, Molecular Mechanisms, and Rejuvenation Strategies. *Front Cell Dev Bio* [Internet]. 2020; 8:258. Disponible em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00258>. doi: 10.3389/fcell.2020.00258.
73. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Kusano K, Baba S. Clinical potential and current progress of dental pulp stem cells for various systemic diseases in regenerative

- medicine: A concise review. *Int. J. Mol. Sci* [Internet]. 2019;20(5):1132. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20051132>. doi: 10.3390/ijms20051132.
74. Ratajczak J, Bronckaers A, Dillen Y, Gervois P, Vangansewinkel T, Driesen RB, et al. The Neurovascular Properties of Dental Stem Cells and Their Importance in Dental Tissue Engineering. *Stem Cells Int* [Internet]. 2016; 2016:9762871. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/9762871>. doi: 10.1155/2016/9762871.
 75. Pruszek J, Ludwig W, Blak A, Alavian K, Isacson O. CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells*. 2009;27(12):2928–2940.
 76. De Gioia R, Biella F, Citterio G, Rizzo F, Abati E, Nizzardo M, et al. Neural stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci* [Internet]. 2020; 21(9):3103. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21093103>. doi: 10.3390/ijms21093103.
 77. Huang L, Wang G. The Effects of Different Factors on the Behavior of Neural Stem Cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2017; 2017:9497325. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/9497325>. doi: 10.1155/2017/9497325.
 78. Yuan SH, Martin J, Elia J, Flippin J, Paramban RI, Hefferan MP, et al. Cell-surface marker signatures for the Isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(3)e17540. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017540>. doi: 10.1371/journal.pone.0017540.
 79. Luzuriaga J, Polo Y, Pastor-alonso O, Pardo-rodríguez B, Larrañaga A, Unda F, et al. Advances and perspectives in dental pulp stem cell based neuroregeneration therapies. *Int. J. Mol. Sci* [Internet]. 2021; 22(7):3546. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22073546>. doi: 10.3390/ijms22073546.
 80. Fujii Y, Hatori A, Chikazu D, Ogasawara T. Application of Dental Pulp Stem Cells for Bone and Neural Tissue Regeneration in Oral and Maxillofacial Region. *Stem Cells Int* [Internet]. 2023; 2023:2026572. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2023/2026572>. doi: 10.1155/2023/2026572.
 81. Bonnamain V, Thinard R, Sergent-Tanguy S, Huet P, Bienvenu G, Naveilhan P, et al. Human dental pulp stem cells cultured in serum-free supplemented medium. *Front Physiol* [Internet]. 2013; 4:357. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00357>. doi: 10.3389/fphys.2013.00357.
 82. Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett*. 2013;330(2):150–62.
 83. Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):435–40.
 84. Sugiyama M, Iohara K, Wakita H, Hattori H, Ueda M, Matsushita K, et al. Dental pulp-derived CD31-/CD146- side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(9–10):1303–11.

85. Meier S, Alfonsi F, Kurniawan ND, Milne MR, Kasherman MA, Delogu A, et al. The p75 neurotrophin receptor is required for the survival of neuronal progenitors and normal formation of the basal forebrain, striatum, thalamus and neocortex. *Development* [Internet]. 2019;146(18):dev181933. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.181933>. doi: 10.1242/dev.181933.
86. Xiao L, Ide R, Saiki C, Kumazawa Y, Okamura H. Human dental pulp cells differentiate toward neuronal cells and promote neuroregeneration in adult organotypic hippocampal slices in vitro. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017;18(8):1745. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18081745>. doi: 10.3390/ijms18081745.
87. Pan W, Kremer KL, Kaidonis X, Ludlow VE, Rogers ML, Xie J, et al. Characterization of p75 neurotrophin receptor expression in human dental pulp stem cells. *Int. J. Devl Neuroscience*. 2016;53(1):90–8.
88. Lee S, Choi K, Ahn H, Song K, Choe J, Lee I. TuJ1 (class III β -tubulin) expression suggests dynamic redistribution of follicular dendritic cells in lymphoid tissue. *Eur J Cell Biol*. 2005;84(2–3):453–9.
89. Zainal Ariffin SH, Kermani S, Zainol Abidin IZ, Megat Abdul Wahab R, Yamamoto Z, Senafi S, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into neuron-like cells in serum-free medium. *Stem Cells Int* [Internet]. 2013;2013:250740. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/250740>. doi: 10.1155/2013/250740.
90. Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z, Karbalaie K, Mousavi S, Talebi A, et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *International Journal of Developmental Biology*. 2011;55(2):189–95.
91. Dahlström J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J. Cell Sci* [Internet]. 1992;103(Pt.2): 589-97. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.103.2.589>. doi: 10.1242/jcs.103.2.589.
92. Lothian C, Lendahl U. An Evolutionarily Conserved Region in the Second Intron of the Human Nestin Gene Directs Gene Expression to CNS Progenitor Cells and to Early Neural Crest Cells. *Eur. J. Neurosci*. 1997;9(3):452-62.
93. Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov K V., Tarasova Y, et al. Nestin expression - A property of multi-lineage progenitor cells? *Cell. Mol. Life Sci*. 2004;61(19-20):2510–22.
94. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell. Mol. Life Sci*. 2018;75(12):2177–95.
95. Goudarzi GG, Hamidabadi HG, Bojnordi MN, Hedayatpour A, Niapour A, Zahiri M, et al. Role of cerebrospinal fluid in differentiation of human dental pulp stem cells into neuron-like cells. *Anat Cell Biol*. 2020;53(3):292-300.
96. Ho AD, Wagner W, Mahlknecht U. Stem Cell and Ageing: The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine.

- EMBO Rep. [Internet]. 2005;6(Suppl):S35-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400436>. doi: 10.1038/sj.embor.7400436.
97. Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: Mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat. Med.* 2014; 20(8):870–80.
 98. Brunet A, Goodell MA, Rando TA. Ageing and rejuvenation of tissue stem cells and their niches. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio* [Internet]. 2023;24(1):45–62. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00510-w>. doi: 10.1038/s41580-022-00510-w.
 99. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev.* 2008;129(3):163–73.
 100. Huang S, Feng C, Wu Y, Yang S, Ma K, Wu X, et al. Dissimilar characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells from donors of different ages. *Cell Tissue Bank.* 2013;14(4):707–13.
 101. Maredziak M, Marycz K, Tomaszewski KA, Kornicka K, Henry BM. The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2016; 2016:2152435. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/2152435>. doi: 10.1155/2016/2152435.
 102. Iezzi I, Cerqueni G, Licini C, Lucarini G, Mattioli Belmonte M. Dental pulp stem cells senescence and regenerative potential relationship. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):7186–97.
 103. Zhang J, An Y, Gao LN, Zhang YJ, Jin Y, Chen FM. The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. *Biomaterials.* 2012;33(29):6974–86.
 104. Pagella P, Neto E, Lamghari M, Mitsiadis TA. Investigation of orofacial stem cell niches and their innervation through microfluidic devices. *Eur Cell Mater* [Internet]. 2015; 29:213–23. Disponível em: <https://doi.org/10.22203/ecm.v029a16>. doi: 10.22203/ecm.v029a16.
 105. Carvalho TS, Lussi A. Age-related morphological, histological and functional changes in teeth. *J. Oral Rehabil* [Internet]. 2017; 44(4):291–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/joor.12474>. doi: 10.1111/joor.12474.
 106. Iezzi I, Pagella P, Mattioli-Belmonte M, Mitsiadis TA. The effects of ageing on dental pulp stem cells, the tooth longevity elixir. *Eur. Cells Mater* [Internet]. 2019; 37:175–85. doi: 10.22203/eCM.v037a11.
 107. Yi Q, Liu O, Yan F, Lin X, Diao S, Wang L, et al. Analysis of senescence-related differentiation potentials and gene expression profiles in human dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2017;203(1):1–11.
 108. Feng X, Xing J, Feng G, Sang A, Shen B, Xu Y, et al. Age-dependent impaired neurogenic differentiation capacity of dental stem cell is associated with wnt/ β -catenin signaling. *Cell Mol Neurobiol.* 2013;33(8):1023–31.

109. Fracaro L, Senegaglia AC, Herai RH, Leitolis A, Boldrini-Leite LM, Rebelatto CLK, et al. The expression profile of dental pulp-derived stromal cells supports their limited capacity to differentiate into adipogenic cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020;21(8):2753. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21082753>. doi: 10.3390/ijms21082753.
110. Jensen EC. Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *Anat. Rec (Hoboken)*. 2013; 296(3):378–81.
111. Wu W, Zhou J, Xu CT, Zhang J, Jin YJ, Sun GL. Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. *Mol. Med. Rep.* 2015;12(4):5127–34.
112. Smojver I, Katalinić I, Bjelica R, Gabrić D, Matišić V, Molnar V, et al. Mesenchymal Stem Cells Based Treatment in Dental Medicine: A Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci* [Internet]. 2022; 23(3):1662. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23031662>. doi: 10.3390/ijms23031662.
113. Daud S, Nambiar P, Hossain MZ, Rahman MRA, Bakri MM. Changes in cell density and morphology of selected cells of the ageing human dental pulp. *Gerodontology*. 2016;33(3):315–21.
114. Mitsiadis TA, Pagella P. Expression of nerve growth factor (NGF), TrkA, and p75NTR in developing human fetal teeth. *Front. Physiol* [Internet]. 2016; 7:338. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00338>. doi: 10.3389/fphys.2016.00338.
115. Kawagishi-Hotta M, Hasegawa S, Igarashi T, Yamada T, Takahashi M, Numata S, et al. Enhancement of individual differences in proliferation and differentiation potentials of aged human adipose-derived stem cells. *Regen Ther* [Internet]. 2017; 6:29–40. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2016.12.004>. doi: 10.1016/j.reth.2016.12.004.
116. Liu M, Lei H, Dong P, Fu X, Yang Z, Yang Y, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Elderly Exhibit Decreased Migration and Differentiation Abilities with Senescent Properties. *Cell Transplant*. 2017;26(9):1505–19.
117. Sato M, Kawase-Koga Y, Yamakawa D, Fujii Y, Chikazu D. Bone regeneration potential of human dental pulp stem cells derived from elderly patients and osteo-induced by a helioxanthin derivative. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(20):1–14.
118. Choi JK, Hwang HI, Jang YJ. The efficiency of the in vitro osteo/dentinogenic differentiation of human dental pulp cells, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2015;35(1):161–8.
119. Kiang JG. Mesenchymal stem cells and exosomes in tissue regeneration and remodeling: Characterization and therapy. In: Nikolai V. Gorbunov, organizador. *Tissue Barriers in Disease, Injury and Regeneration*. Elsevier; 2021. p. 159–85.
120. Horibe H, Murakami M, Iohara K, Hayashi Y, Takeuchi N, Takei Y, 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 [Internet]. 2014;9(5):e98553. Disponible em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098553>. doi: 10.1371/journal.pone.0098553.
121. Yoshida T, Matsuda Y, Naito Z, Ishiwata T. CD44 in human glioma correlates with histopathological grade and cell migration. *Pathol Int*. 2012;62(7):463–70.
 122. Crosby HA, Lalor PF, Ross E, Newsome PN, Adams DH. Adhesion of human haematopoietic (CD34+) stem cells to human liver compartments is integrin and CD44 dependent and modulated by CXCR3 and CXCR4. *J. Hepatol*. 2009;51(4):734–49.
 123. Bhandi S, Al Khatani A, Abdulaziz Sumayli H, Yahya Sabyei M, Mohammed Al Zailai A, Ali Sumayli M, et al. Comparative analysis of cytokines and growth factors in the conditioned media of stem cells from the pulp of deciduous, young, and old permanent tooth. *Saudi J. Biol. Sci*. 2021;28(6):3559–65.
 124. Ode A, Kopf J, Kurtz A, Schmidt-Bleek K, Schrade P, Kolar P, et al. CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater* [Internet]. 2011; 22:26–42. doi: 10.22203/ecm.v022a03.
 125. Beane OS, Fonseca VC, Cooper LL, Koren G, Darling EM. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. PLoS One [Internet]. 2014; 9(12):e115963. Disponible em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115963>. doi: 10.1371/journal.pone.0115963.
 126. Horinouchi CDS, Barisón MJ, Robert AW, Kuligovski C, Aguiar AM, Dallagiovanna B. Influence of donor age on the differentiation and division capacity of human adipose-derived stem cells. *World J. Stem Cells*. 2020;12(12):1640–51.
 127. Yang RL, Huang HM, Han CS, Cui SJ, Zhou YK, Zhou YH. Serine Metabolism Controls Dental Pulp Stem Cell Aging by Regulating the DNA Methylation of p16. *J. Dent. Res*. 2021;100(1):90–7.
 128. Ebrahimi Dastgardi M, Ejeian F, Nematollahi M, Motaghi A, Nasr-Esfahani MH. Comparison of two digestion strategies on characteristics and differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Arch. Oral Biol* [Internet]. 2018; 93:74–9. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.05.008>. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.05.008.
 129. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: A review. *Stem Cells Dev*. 2015; 24(10):1150–63.
 130. Zhang YL, An Y, Sun LJ, Qu HL, Li X, He XT, et al. NADPH-dependent ROS accumulation contributes to the impaired osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells under high glucose conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2023; 14:1152845. Disponible em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1152845>. doi: 10.3389/fendo.2023.1152845.

131. Kornicka K, Marycz K, Tomaszewski KA, Marędziak M, Smieszek A. The Effect of Age on Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stromal Stem Cells (hASCs) and the Impact of Stress Factors in the Course of the Differentiation Process. *Oxid. Med. Cell Longev* [Internet]. 2015; 2015:309169. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/309169>. doi: 10.1155/2015/309169.
132. Drehmer DL, de Aguiar AM, Brandt AP, Petiz L, Cadena SMSC, Rebelatto CK, et al. Metabolic switches during the first steps of adipogenic stem cells differentiation. *Stem Cell Res.* 2016;17(2):413–21.
133. Sedgley CM, Botero TM. Dental Stem Cells and Their Sources. *Dent. Clin. North Am.* 2012; 56(3):549-61.
134. Zheng W, Wang S, Ma D, Tang L, Duan Y, Jin Y. Loss of Proliferation and Differentiation Capacity of Aged Human Periodontal Ligament Stem Cells and Rejuvenation by Exposure to the Young Extrinsic Environment. *Tissue Eng. Part A.* 2009; 15(9):2363-71.
135. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J. Transl. Med.* [Internet]. 2014; 12:8. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-8>. doi: 10.1186/1479-5876-12-8.
136. Neri S. Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect. *Int. J. Mol. Sci* [Internet]. 2019; 20(10):2406. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20102406>. doi: 10.3390/ijms20102406.
137. Vijg J, Suh Y. Genome instability and aging. *Annu. Rev. Physiol* [Internet]. 2013; 75:645–68. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183715>. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183715.
138. Nel S, Durandt C, Murdoch C, Pepper MS. Determinants of Dental Pulp Stem Cell Heterogeneity. *J. Endod* [Internet]. 2022; 48(10):1232–40. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2022.06.013>. doi: 10.1016/j.joen.2022.06.013.
139. Mi L, Hu J, Li N, Gao J, Huo R, Peng X, et al. The Mechanism of Stem Cell Aging. *Stem Cell Rev. Rep.* 2022; 18(4):1281–93.
140. Sultan N, Amin LE, Zaher AR, Scheven BA, Grawish ME. Dental pulp stem cells: Novel cell-based and cell-free therapy for peripheral nerve repair. *World J. Stomatol.* 2019;7(1):1–19.
141. Balasankar A, Chan SYC, Babu VPS, Yam G, Tin GB, Singhal S. Dental pulp stem cells retain mesenchymal phenotype despite differentiation toward retinal neuronal fate in vitro. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2022; 9:821361. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.821361>. doi: 10.3389/fmed.2022.821361.
142. Tomlinson MJ. CD271 Negative Human Dental Pulp Cells Yield Significantly More Adherent Colony Forming Cells than the Positive Phenotype. *Int. J. Stem Cell Res. Ther.* 2016;3(1):025. doi: 10.23937/2469-570X/1410025.

143. Lisboa M de O, Selenko AH, Hochuli AHD, Senegaglia AC, Fracaro L, Brofman PRS. The influence of fetal bovine serum concentration on stemness and neuronal differentiation markers in stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Tissue Cell* [Internet]. 2024; 91:102571. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102571>. doi: 10.1016/j.tice.2024.102571.
144. Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mörk SJ. Class III β -tubulin isotype: A key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J. Child Neurol.* 2003; 18(12):851–66.
145. Dráberová E, Del Valle L, Gordon J, Marková V, Bertrand L, De Chadarevian JP, et al. Class III A-Tubulin Is Constitutively Coexpressed With Glial Fibrillary Acidic Protein and Nestin in Midgestational Human Fetal Astrocytes: Implications for Phenotypic Identity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67(4):341-54.
146. Dave JR, Chandekar SS, Behera S, Desai KU, Salve PM, Sapkal NB, et al. Human gingival mesenchymal stem cells retain their growth and immunomodulatory characteristics independent of donor age. *Sci Adv* [Internet]. 2022; 8(25):eabm6504. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm6504>. doi: 10.1126/sciadv.abm6504.
147. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG. CNS Stem Cells Express a New Class of Intermediate Filament Protein. *Cell.* 1990; 60(4):585-95.
148. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Pinton P, Stellini E, Botticelli D, et al. Donor Age-Related Biological Properties of Human Dental Pulp Stem Cells Change in Nanostructured Scaffolds. *PLoS One.* 2012;7(11):e49146. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049146>. doi: 10.1371/journal.pone.0049146.

11. APÊNDICE

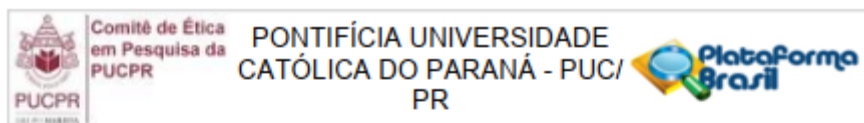
Apêndice 1. Tabela referente aos dados dos doadores

Grupo	Amostra	Sexo	Idade	Ingere bebida alcoólica	Faz uso de cigarro	Presença de células aderentes e proliferando
A	A1	F	22	N	N	V
	A2	M	25	S	N	V
	A3	F	21	N	N	V
	A4	F	22	N	N	V
	A5	M	25	S	N	V
B	B1	F	33	S	N	V
	B2	M	31	N	N	V
	B3	F	35	S	N	V
	B4	M	30	S	N	X
	B5	M	31	S	S	V
	B6	F	32	S	N	V
C	C1	M	42	N	N	V
	C2	M	45	S	N	V
	C3	M	45	S	N	V
	C4	M	40	N	N	X
	C5	M	43	N	N	X
	C6	F	40	N	N	V
D	D1	F	52	S	N	V
	D2	F	52	N	N	V
	D3	M	50	N	N	V
	D4	M	55	S	N	X
	D5	M	55	N	N	V
	D6	M	55	S	N	V
	D7	M	54	N	N	X
	D8	F	55	N	N	X

F: feminino; M: masculino; N: não; S: sim; V: células aderidas e proliferando; X: células não aderidas

12. ANEXOS

Anexo 1. Parecer Consubstanciado do CEP PUCPR.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de marcadores neuronais em células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente permanente de diferentes faixas etária

Pesquisador: Letícia Fracaro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48365121.6.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.746.491

Apresentação do Projeto:

O presente projeto visa avaliar a expressão de marcadores neuronais de células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente permanente de duas faixas etárias. As células serão isoladas e cultivadas com meio e soro fetal bovino. As células serão caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo e induzidas a diferenciação em 3 linhagens (adipogênica, osteogênica e condrogênica) e coradas com corantes específicos para análise conforme sugerido pela ISCT e serão submetidas as análises de unidades formadoras de colônias fibroblásticas. Será analisada a análise cariotípica, pesquisando anormalidades cromossômicas. Será analisado o ensaio de proliferação e senescência. Será analisado a expressão de marcadores neuronais por imunofluorescência, perfil imunofenotípico por citometria de fluxo e expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão de marcadores neuronais de células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente permanente de duas faixas etárias

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos que se aplicam aos participantes da pesquisa são inerentes aos procedimentos de coleta de material e não à pesquisa. Dessa forma, os riscos não se aplicam diretamente a pesquisa.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 4.746.491

Justificativa de Ausência	TCLEparamaioresde18anos.pdf	29/04/2021 11:47:01	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_do_Orientador_2021_2022.pdf	29/04/2021 11:16:52	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 31 de Maio de 2021

Assinado por:
Ana Carla Efig
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br

Anexo 2. Apresentação dos resultados parciais no XII Congresso ABTCel-Gen (2022).



ABTCel-Gen Scientific Meeting
OCTOBER 25TH TO 27TH, 2022 | RIO DE JANEIRO - RJ

We certify that
Ana Helena Selenko, M.O. Lisboa¹; A.C. Senegaglia¹; P.R.S. Brofman¹; L. Fracaro¹

presented the study entitled
DOES AGE INTERFERE WITH THE EXPRESSION OF NEURONAL MARKERS IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS DERIVED FROM PERMANENT TOOTH PULP?

during the XII Brazilian Association of Cell and Gene Therapy – ABTCel-Gen
held at the National Cancer Institute (INCA) - Rio de Janeiro, between October
25th and 27th, 2022.



ABTCel-Gen
International Society
ISCT
Cell & Gene Therapy®



Support:    Sponsors:      

60

DOES AGE INTERFERE WITH THE EXPRESSION OF NEURONAL MARKERS IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS DERIVED FROM PERMANENT TOOTH PULP?

A. H. Selenko¹, M. O. Lisboa¹, A. C. Senegaglia¹, P. R. S. Brofman¹,
L. Fracaro¹

¹Core for Cell Technology, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

Background: Mesenchymal stromal cells (MSC) are undifferentiated cells that can differentiate and self-renew. MSC from dental pulp (DPSC) are easy to collect and have an advantage in inducing neuronal differentiation compared to MSCs from other tissues, as they share the same embryonic origin of the nervous system, the ectoderm. Characterizing DPSC from different age groups can identify the best sample for storage in biobanks, favoring the use of these cells. Evaluating and characterizing the presence of neuronal markers in this population may facilitate a new therapeutic strategy for regenerating and repairing neuronal cells and tissues. This study characterized and evaluated the expression of neuronal markers and the genetic stability of DPSC in two age groups.

Publicado na revista Cytotherapy – Fator de impacto: 6.196 (2024).

Volume 24, Issue 10, Supplement S10-S11 - Abstracts of the XII Congress of ABTCel-Gen.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S1465-3249\(22\)00903-3](https://doi.org/10.1016/S1465-3249(22)00903-3).

MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM HUMAN EXFOLIATED DECIDUOUS TEETH SHOW LIMITED DIFFERENTIATION POTENTIAL INTO ADIPOGENIC LINEAGE

A. H. D. Hochuli¹, A. C. Senegaglia¹, A. H. Selenko¹, P. R. S. Brofman¹, L. Fracaro¹

¹*Core for Cell Technology, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil*

Introduction: Mesenchymal stromal cells (MSC) act in the repair and maintenance of adult tissues. These cells secrete several soluble factors that can decrease inflammation and increase the repair of damaged tissue. An easy source to collect MSC is dental pulp. MSC from human exfoliated deciduous teeth (SHED), which have an ectoderm origin, are considered immature and express pluripotency markers, encouraging their use in regenerative medicine. To be considered MSC, cells must follow the guidelines established by the International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT), which include the capacity to differentiate into osteogenic, adipogenic, and chondrogenic lineages. However, the differentiation in the

Publicado na revista Cytotherapy – Fator de impacto: 6.196 (2024).

Volume 24, Issue 10, Supplement S10-S11 - Abstracts of the XII Congress of ABTCel-Gen.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S1465-3249\(22\)00897-0](https://doi.org/10.1016/S1465-3249(22)00897-0).

Anexo 3. Apresentação dos resultados parciais no III Simpósio Araucária (2022).



Anexo 4. Apresentação dos resultados parciais no 1º Encontro de Rotas Biotecnológicas (2022).



Anexo 5. Participação em artigo como co-autora (2023)



JAOS
JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE

Original Article
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2022-0489>

Mesenchymal stromal cells derived from exfoliated deciduous teeth express neuronal markers before differentiation induction

Abstract

Letícia FRACARO* 
Agner Henrique Dorigo HOCHULI* 
Ana Helena SELENKO* 
Luiz Guilherme Achcar CAPRIGLIONE* 
Paulo Roberto Siud BROFMAN* 
Alexandra Cristina SENEGAGLIA* 

Objective: This study aimed to evaluate neuronal markers in stromal cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) and standardize the isolation and characterization of those cells. **Methodology:** Healthy primary teeth were collected from children. The cells were isolated by enzymatic digestion with collagenase. By following the International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT) guidelines, SHED were characterized by flow cytometry and differentiated into osteogenic, adipogenic, and chondrogenic lineages. Colony-forming unit-fibroblasts (CFU-F) were performed to assess these cells' potential and efficiency. To clarify the neuronal potential of SHED, the expression of nestin and β III-tubulin were examined by immunofluorescence and SOX1, SOX2, GFAP, and doublecortin (DCX), nestin, CD56, and CD146 by flow cytometry. **Results:** SHED showed mesenchymal stromal cells characteristics, such as adhesion to plastic, positive immunophenotypic profile for CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, and CD166 markers, reduced expression for CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR, and differentiation in three lineages confirmed by staining and gene expression for adipogenic differentiation. The average efficiency of colony formation was 16.69%. SHED expressed the neuronal markers nestin and β III-tubulin; the fluorescent signal intensity was significantly higher in β III-tubulin ($p < 0.0001$) compared to nestin. Moreover, SHED expressed DCX, GFAP, nestin, SOX1, SOX2, CD56, CD146, and CD271. Therefore, SHED had a potential for neuronal lineage even without induction with culture medium and specific factors. **Conclusion:** SHEDs may be a new therapeutic strategy for regenerating and repairing neuronal cells and tissues.

Publicado na revista JAOS – Fator de impacto: 3,144 (2022-2023).

DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2022-0489>.

Anexo 6. Coorientação PIBIC (2022-2023)



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina e Ciências da Vida

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a pesquisa intitulada "CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE POLPA DE DENTE PERMANENTE" foi realizada e concluída por Tatiane Mie Arakaki Moraes da Silva, no Programa PIBIC da PUCPR, na modalidade de Iniciação Científica Voluntária, na vigência 2022-2023, sendo orientada por mim Leticia Fracaro e coorientada pela mestranda Ana Helena Selenko. Os resultados desta pesquisa foram apresentados na modalidade de apresentação Vídeo-Pôster, no XXXI SEMIC (Seminário de Iniciação Científica) da PUCPR que ocorreu nos dias 24, 25 e 26 de outubro de 2023.

Por ser verdade, afirmo a presente declaração

Curitiba, 11 de janeiro de 2024.

Leticia Fracaro – PhD
Laboratório Experimental de Cultivo Celular
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Anexo 7. Apresentação em forma de pôster na ISSCR 2024.

4:45 PM – 5:45 PM

**TOPIC: MESENCHYMAL STROMAL CELLS,
ADIPOSE, AND CONNECTIVE TISSUE**

482

**DONOR AGE EFFECTS ON DENTAL
PULP MESENCHYMAL STROMAL CELL
CHARACTERISTICS**

Selenko, Ana Helena - *Core for Cell Technology, Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, Brazil*

Lisboa, Mateus - *Core for Cell Technology, Pontifícia Universidade
Católica do Paraná, Brazil*

Senegaglia, Alexandra - *Core for Cell Technology, Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, Brazil*

Brofman, Paulo Roberto - *Core for Cell Technology, Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, Brazil*

Fracaro, Letícia - *Core for Cell Technology, Pontifícia Universidade
Católica do Paraná, Brazil*

The mesenchymal stromal cells (MSC) from dental pulp (DPSCs) have the potential for self-renewal and differentiation capacity in several cell lineages besides having a higher proliferation rate when compared with other MSCs sources. Due to their shared embryonic origin with the nervous system, DPSCs can potentially treat neurodegenerative diseases. To determine the optimal age for utilizing these cells in future studies, this research aimed to characterize DPSCs from different age groups and investigate age-related variations in their genetic stability and functional properties. The Local Research Ethics Committee approved this project. Healthy teeth from four age groups (n = 5, each

FRIDAY, 12 JULY 2024
POSTER ABSTRACT GUIDE



649

Anexo 8. Apresentação dos resultados parciais no IV Simpósio Araucária (2024).



Anexo 9. Participação em artigo como co-autora (2024)

Tissue and Cell 91 (2024) 102571



The influence of fetal bovine serum concentration on stemness and neuronal differentiation markers in stem cells from human exfoliated deciduous teeth

Mateus de Oliveira Lisboa^{a,b,*}, Ana Helena Selenko^{a,b}, Agner Henrique Dorigo Hochuli^{a,b}, Alexandra Cristina Senegaglia^{a,b}, Letícia Fracaro^{a,b,*}, Paulo Roberto Slud Brofman^{a,b}

^a Core for Cell Technology, School of Medicine and Health Sciences – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná 80215-901, Brazil

^b National Institute of Science and Technology for Regenerative Medicine, INCT-REGENERAR, 21941-599, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Mesenchymal stromal cells
Heterogeneity
Neuronal potential
Dental pulp stem cells
P75
NCAM

ABSTRACT

Dental Stem Cells (DSCs) from discarded teeth are a non-invasive and ethically favorable source with the potential for neurogenesis due to their ectodermal origin. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) are particularly promising due to their high differentiation potential and relative immaturity compared to other Mesenchymal Stromal Cells (MSCs). Markers like CD56 and CD271 are critical in identifying MSC subpopulations for therapeutic applications because of their roles in neurodevelopment and maintaining stemness. This study investigates how fetal bovine serum (FBS) concentrations affect the expression of CD56 and CD271 in SHED, influencing their stemness and neuronal differentiation potential. SHEDs were isolated from various donors, cultured, and characterized for MSC traits using markers such as CD14, CD19, CD29, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD56, and CD271. Culturing SHED in different FBS conditions (standard 15 %, reduced 1 % and 5 %, and FBS-free) showed that lower FBS concentrations increase CD271 and CD56 expression while maintaining the standard MSC immunophenotype. Importantly, the enhanced expression of these markers can be induced even after SHEDs have been expanded in standard FBS concentrations. These findings suggest that FBS concentration can optimize SHED culture conditions, enhancing their suitability for regenerative medicine and tissue engineering applications.

Publicado na revista Tissue and Cell – Fator de impacto: 2,7 (2023-2024).

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102571>