

JADE ORMONDES DE FARIAS

EFEITOS DA SENESENCIA NA RESPOSTA IMUNE DE CÉLULAS  
PULPARES HUMANAS

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

2022

BRASÍLIA

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JADE ORMONDES DE FARIAS

EFEITOS DA SENESCENCIA NA RESPOSTA IMUNE DE CÉLULAS  
PULPARES HUMANAS

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências  
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

2022

BRASÍLIA

*Dedico este trabalho à minha mãe e irmã  
por todo o apoio e amor.*

## AGRADECIMENTOS

À orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Taia Maria Berto Rezende**, pela orientação, por me dar a oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa, por contribuir para o meu desenvolvimento científico e crescimento profissional e pelo respeito e profissionalismo.

Aos meus pais **João Farias** e **Esmeralda Ormondes** por abdicarem de tanto ao longo da vida para tornar a minha vida profissional e acadêmica possível. Em especial à minha mãe, por torcer para que cada pequena etapa dessa pesquisa obtivesse êxito, por ser meu exemplo de calma e paciência, por me ouvir tanto e me apoiar com tanto carinho.

A minha irmã **Ohanna** pelo apoio ao longo de tantos anos de estudo, por acreditar no meu trabalho e se empolgar com cada conquista. Pelo companheirismo e pela paciência com os dias de cansaço. As palavras se tornam insuficientes para agradecer a tanta parceria na vida.

Ao meu namorado **Gabriel Foster** pelo apoio e entusiasmo com minha vida profissional, pela companhia nos momentos difíceis e por tanto carinho diário nesse último ano.

Aos meus amigos **Arthur, Daniel, Giovanna, Isadora Oliveira, Mayara, Pedro, Rafael, Renato, Sophia, Tássio e Vinícius** pelos momentos de lazer que tornaram essa caminhada mais leve.

A todos os **colegas do grupo Biodonto** pelas discussões em grupo e pelas sugestões. Ao **Maurício** pela colaboração na análise da microscopia eletrônica de varredura e em tantos outros momentos desse trabalho, mas principalmente por me ensinar tanto em um momento tão inicial com tanta paciência, entusiasmo e otimismo. Ao **Danilo** obrigada pela parceria desde a iniciação científica, pela colaboração nas extrações de RNA e por dividir os desabafos de cansaço. A **Poliana, Stella, Mirna, Ingrid Aquino e Paula** pela paciência, pelos conselhos e por serem inspirações profissionais, em especial a **Stella** pela paciência ao me iniciar no meio científico, por me ensinar a escrever e por ter me auxiliado na escrita do projeto de mestrado.

Aos colegas de laboratório **Isadora Takahashi, Thaís Lima, Athamy, Michel, Érika e Júlia** pelo aprendizado, companhia nas bancadas e sala de cultura e pelos socorros laboratoriais. As minhas alunas de iniciação científica **Larissa e Débora** por toda ajuda e apoio.

À **Ingrid** pela colaboração no ensaio de MEV. A **Amandda** pela colaboração no ensaio de PCR.

A equipe de funcionários da Universidade Católica de Brasília, incluindo equipe da limpeza, segurança e aos técnicos de laboratório **Samuel e Fernanda** pela ajuda em tantos momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pela oportunidade.

Ao Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília, pelo acolhimento e estrutura.

À CAPES, CNPq, FAPDF, FUNDECT pelo auxílio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos.

*“Patience is the road to wisdom.”*

*Kao Kalia Yang*

## RESUMO

A senescência celular é um estado celular decorrente do envelhecimento e estresse crônico caracterizado principalmente por um estado permanente de parada do ciclo celular. Evidências indicam que a senescência pode afetar funções importantes como capacidade de defesa e reparo da polpa dentária, funções primordiais em tratamentos endodônticos conservadores. Esse trabalho objetivou avaliar as possíveis alterações morfológicas, além de alterações na capacidade migratória e proliferativa e efeitos na resposta imune de células da polpa dentária humana em estado de senescência. Inicialmente, as células foram tratadas com doxorrubicina para indução da senescência e a confirmação da indução foi realizada por meio de coloração de  $\beta$ -galactosidase. Em seguida, as alterações morfológicas foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura, a proliferação através da contagem das células não coradas pelo azul de tripano e a migração pelo método *Scratch*. As alterações na resposta imune foram avaliadas por meio da dosagem dos genes de citocinas pró inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) e citocinas anti-inflamatórias fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1) e interleucina 10 (IL-10) utilizando o ensaio de PCR. Para esse ensaio foi simulada uma situação de resposta inflamatória *in vitro* utilizando estímulos de lipopolissacarídeo (LPS) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Todos os ensaios foram realizados em triplicata técnica e biológicas e os dados obtidos foram submetidos a posterior análise estatística. Os resultados demonstraram alterações na morfologia evidenciando um aumento em relação ao tamanho celular e uma diminuição no número de prolongamentos das células senescentes, em relação ao grupo não senescente; além de uma redução na capacidade proliferativa e migratória. Em adição, observou-se um aumento na expressão gênica das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 e uma redução na expressão gênica de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 por células senescentes em comparação com células saudáveis. Em suma, a senescência demonstrou afetar a morfologia celular, reduzir a capacidade proliferativa e migratória, além de evidenciar um aumento da expressão de genes relacionados a inflamação e redução nos genes anti-inflamatórios, sugerindo uma situação inflamatória exacerbada associada a imunossupressão. Desta forma, a senescência celular possivelmente é um estado que afeta o prognóstico de tratamentos endodônticos conservadores pois afeta funções celulares primordiais relacionadas a esse tratamento.

Palavras-chave: senescência celular; células da polpa dentária; capeamento pulpar.

## ABSTRACT

Cellular senescence is a cellular state resulting from aging and chronic stress characterized mainly by a permanent state of cell cycle arrest. Evidence indicates that senescence can affect essential functions such as defense capacity and dental pulp repair and consequently affect the success of conservative endodontic treatments. This work aimed to evaluate the possible morphological changes, in addition to changes in the migratory and proliferative capacity and effects on the immune response of human dental pulp cells in a state of senescence. Initially, cells were treated with doxorubicin to induce senescence and confirm induction using  $\beta$ -galactosidase staining. Then, morphological alterations were evaluated by scanning electron microscopy, proliferation by counting cells not stained by trypan blue, and migration by the Scratch method. Changes in the immune response were evaluated by measuring the genes for pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6) and anti-inflammatory cytokines transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) and interleukin 10 (IL-10) using the PCR assay. For this assay, an in vitro inflammatory response situation was simulated using lipopolysaccharide (LPS) and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) stimuli. All assays were performed in technical and biological triplicate and the data obtained were submitted to subsequent statistical analysis. The results showed differences in morphology, an increase in cell size and a decrease in the number of extensions of senescent cells in the healthy control group, and a reduction in the proliferative and migratory capacity. In addition, there was an increase in the gene expression of the inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 and a decrease in the gene expression of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 by senescent cells compared to healthy cells. In short, senescence affects cell morphology, reduces proliferative and migratory capacity, increases inflammation-related genes' expression, and lowers anti-inflammatory genes, suggesting an exacerbated inflammatory situation associated with immunosuppression. Thus, cellular senescence is possibly a condition that affects the prognosis of conservative endodontic treatments, as it affects primordial cellular functions related to this treatment.

Keywords: cellular senescence; dental pulp cells; pulp capping.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático ilustrativo das possíveis causas e consequências da senescência celular em células da polpa dentária.

Figura 2: Fluxograma de desenvolvimento do trabalho.

Figura 3: Linha do tempo representativa dos tempos experimentais realizados no protocolo de indução da senescência celular.

Figura 4: Células da polpa dentária humana após ensaio de coloração de  $\beta$ -galactosidase. (A) Grupo não senescente. (B) Grupo exposto a doxorrubicina por 24 horas. Barra de escala: 100  $\mu$ m. (C) Número de células senescentes da polpa dentária humana coradas em azul após ensaio de coloração de  $\beta$ -galactosidase. Diferenças estatísticas verificadas pelo Teste t de *Student*. \* $p < 0,03$ .

Figura 5: (A) Células da polpa dentária humana fotografadas a partir de microscópio eletrônico de varredura. Cada linha representa o aumento utilizado para análise das amostras. A primeira linha representa ampliação de 2000x; a segunda linha, ampliação de 5000x. A primeira coluna representa o grupo não senescente e a segunda coluna o grupo de células senescentes. (B) e (C) Análise quantitativa das imagens geradas a partir de microscopia eletrônica de varredura das células da polpa dentária humana senescentes em relação ao grupo não senescente considerando (A) o número de prolongamentos celulares e (B) o tamanho celular. Diferenças estatísticas verificadas pelo Teste t de *Student*. \* $p < 0,03$ .

Figura 6: Avaliação do potencial proliferativo de cultura de células pulparem primárias saudáveis e senescentes, após 24 e 48 horas, por contagem de células vivas coradas por Azul de Tripano. Diferenças estatísticas verificadas pelo Teste t de *Student*. \* $p < 0,05$ .

Figura 7: (A) Imagens representativas do ensaio de migração celular, utilizando o método *scratch*. Os pontos denotam a presença de células dentro da ferida. As linhas verticais correspondem ao local onde a ferida foi realizada. A avaliação da migração foi realizada após 24h e 48h. As colunas representaram cada grupo testado. (B) Avaliação do potencial migratório de cultura de células pulparem

primárias saudáveis e senescentes, por contagem de células migradas para ferida por *scratch assay*, após 24 e 48 horas. Diferenças estatísticas verificadas pelo Teste t de *Student*. \* $p < 0,05$ .

Figura 8: (A) Expressão do gene TNF- $\alpha$  nas amostras de culturas de células pulpares primárias saudáveis estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), após 24h de incubação. (B) Expressão de TNF- $\alpha$  nas amostras de células pulpares primárias senescentes nas mesmas condições. (C) Análise comparativa da expressão de TNF- $\alpha$  nas amostras de células pulpares primárias saudáveis e senescentes. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \*\* $p \leq 0,01$  representa diferença estatística verificada pelo teste *two-way ANOVA* e pós teste Bonferroni.

Figura 9: (A) Expressão do gene IL-10 nas amostras de culturas de células pulpares primárias saudáveis estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), após 24h de incubação. (B) Expressão de IL-10 nas amostras de células pulpares primárias senescentes nas mesmas condições. (C) Análise comparativa da expressão de IL-10 nas amostras de células pulpares primárias saudáveis e senescentes. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \* $p < 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$  representam diferença estatística verificada pelo teste *two-way ANOVA* e pós teste Bonferroni.

Figura 10: (A) Expressão do gene IL-6 nas amostras de culturas de células pulpares primárias saudáveis estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), após 24h de incubação. (B) Expressão de IL-6 nas amostras de células pulpares primárias senescentes nas mesmas condições. (C) Análise comparativa da expressão de IL-6 nas amostras de células pulpares primárias saudáveis e senescentes. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \* $p < 0,05$  representam diferença estatística verificada pelo teste *two-way ANOVA* e pós teste Bonferroni.

Figura 11: (A) Expressão do gene TGF- $\beta$ 1 nas amostras de culturas de células pulpares primárias saudáveis estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), após 24h de incubação. (B) Expressão de TGF- $\beta$ 1 nas amostras de células pulpares primárias senescentes nas mesmas condições. (C) Análise comparativa da expressão TGF- $\beta$ 1 nas amostras de células pulpares primárias saudáveis e

senescentes. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \* $p \leq 0,05$  representa diferença estatística verificada pelo teste *two-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

Figura 12: *Heatmap* indicando a variação do nível de expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ 1 por células da polpa dentária humana em estado proliferativo e senescente nas diferentes condições inflamatórias *in vitro*: estímulo com LPS ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com e sem IFN- $\gamma$  ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers de cada gene utilizados no ensaio de PCR.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

DMEM - – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IL - interleucinas

LPS - lipopolissacarídeo

MEV - microscopia eletrônica de varredura

NF-kB - factor nuclear kappa B

NK - *natural killer*

PCR - reação de polimerase em cadeia

ROS - espécies reativas de oxigênio

SASP - fenótipo secretor associado a senescência

SA- $\beta$ -gal - enzima lisossomal associada à senescência  $\beta$ -galactosidase

SFB - soro fetal bovino

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- $\beta$  - fator de transformação do crescimento beta

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral- $\alpha$

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
1.1. Senescência celular	16
1.2. Senescência celular e resposta imunoinflamatória	18
1.3. Senescência e células da polpa dentária	20
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	23
<b>3. OBJETIVOS</b>	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	25
4.1. Caracterização da pesquisa	25
4.2. Caracterização da amostra	26
4.3. Critério de inclusão	26
4.4. Critérios de exclusão	26
4.5. Cultivo primário de células pulpares	26
4.6. Indução da senescência celular	27
4.7. Ensaio de $\beta$ -galactosidase para confirmação da senescência celular	28
4.8. Avaliação do potencial proliferativo	28
4.9. Avaliação da migração celular – método <i>Scratch</i>	29
4.10. Análise da morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	29
4.11. Avaliação da produção de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios por células pulpares	30
<u>Extração de RNA pelo método TRIzol™</u>	30
<u>Quantificação de RNA</u>	31
<u>PCR em tempo real</u>	32
4.12 Análises estatísticas	32
<b>5. RESULTADOS</b>	33
5.1. Confirmação da indução da senescência celular	33

<b>5.2. Avaliação das alterações morfológicas das culturas de células da polpa dentária em estado de senescência em comparação com células em proliferação</b> .....	35
<b>5.3. Avaliação da capacidade proliferativa de culturas de células da polpa dentária em estado de senescência em comparação com células em proliferação</b> .....	37
<b>5.4. Avaliação da atividade migratória de culturas de células da polpa dentária em estado de senescência em comparação com células em proliferação</b> .....	38
<b>5.5. Avaliação da produção de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios por células pulpares</b> .....	40
<b>5.5.1. Avaliação da expressão do fator de necrose tumoral (TNF-<math>\alpha</math>)</b> .....	40
<b>5.5.2. Avaliação da expressão de interleucina-10 (IL-10)</b> .....	41
<b>5.5.3. Avaliação da expressão de interleucina-6 (IL-6)</b> .....	42
<b>5.5.4. Avaliação da expressão do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-<math>\beta</math>1)</b> .....	44
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	54
<b>9. ANEXOS</b> .....	62

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Senescência celular

A palavra senescência deriva do latim *senex* que significa velho ou velhice (1). Em relação a estudos celulares o termo é relacionado a palavra envelhecimento e tem como sinônimo termos como senescência replicativa ou envelhecimento celular. As células que não são senescentes são chamadas de células jovens ou em estado de proliferação (1). A senescência tem como característica principal um estado celular caracterizado pela interrupção irreversível do ciclo celular (1). Na maioria dos casos as células senescentes interrompem a duplicação na fase G1, com exceção de alguns oncogenes que causam senescência gerando uma interrupção na fase G2, mas permanecem vivas e metabolicamente ativas (1).

Pode-se dividir esse estado celular, relacionando ao fator causal, em senescência replicativa ou senescência induzida por estresse. O processo chamado de senescência replicativa ou envelhecimento replicativo foi descrito pela primeira vez em 1961 por Dr. Leonard Hayflick. Em sua homenagem o termo “limite de Hayflick” foi denominado ao limite de replicações que as células realizam até chegar na senescência, a depender do tipo celular e das condições envolvidas. Esse encurtamento dos telômeros forneceu a primeira explicação molecular para o porquê de muitas células deixarem de se dividir na cultura (1). Nesse processo, o envelhecimento ocorre devido ao encurtamento dos telômeros, sendo que a cada replicação celular os telômeros são encurtados (2). Posteriormente, foi elucidado que telômeros disfuncionais desencadeiam a senescência através da via p53 (1).

Além do encurtamento dos telômeros as células podem atingir o estado de senescência em resposta a vários estímulos, sendo eles intrínsecos ou extrínsecos, caracterizando a senescência induzida por estresse (2). Essa senescência aumenta a expressão de p16 e ativa a via da proteína p16-retinoblastoma (1)



Em adição outras situações podem levar a senescência celular como ativação oncogênica, danos ao DNA, alterações epigenéticas e disfunções mitocondriais. Esses diferentes tipos de sinais de estresse dão origem a diferentes tipos de senescência como, respectivamente, senescência induzida por oncogene, senescência induzida por dano de DNA, senescência induzida epigeneticamente e senescência associada à disfunção mitocondrial (3).

Além da parada no ciclo celular, sabe-se que senescência tem como consequência algumas alterações a nível celular e algumas são consideradas marcadores típicos desse estado. Essas características são frequentemente observadas nas culturas *in vitro* com o intuito de confirmar a presença ou indução da senescência celular, além funcionarem como marcador para terapias de prevenção ou reversão da senescência (1). Uma dessas características são as alterações na morfologia celular como um aumento de volume e uma estrutura irregular (1). Sabe-se que a o mTORC1 é responsável por integrar vários sinais de estresse e modular o crescimento do volume celular e foi observado que a ativação do mTORC1 ocorre em resposta a estímulos indutores de senescência (4).

Já em relação a forma celular alterada sabe-se que um contribuinte para essa alteração é o rearranjo do citoesqueleto e dos filamentos de vimentina, uma proteína da família dos filamentos intermediários. Esses filamentos, compõem o citoesqueleto, juntamente com microtúbulos e microfilamentos de actina. A via de sinalização ATF6a, pode controlar o tamanho do retículo endoplasmático e as mudanças na forma da célula durante a senescência. O ATF6a é capaz de ativar o NF-kB e pode se ligar diretamente ao promotor da vimentina (4).

Além das mudanças estruturais e do aumento volumétricos as células senescentes também apresentam um vacúolo rico em citoplasma, um aumento de massa mitocondrial, alterações nucleares, um aumento do conteúdo lisossomal e uma regulação positiva de proteínas lisossômicas (1). Esse aumento do conteúdo lisossomal pode ocorrer devido a um acúmulo de lisossomos velhos ou da atividade aumentada da biogênese lisossomal (4).

Em consequência a essa alteração lisossômica a atividade da enzima lisossomal associada à senescência  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) apresenta uma

superexpressão e acúmulo lisossomal endógeno. Devido a isso a coloração dessa enzima é usada como um marcador típico desse estado celular (3).

Além da superexpressão de SA- $\beta$ -gal, pode-se observar em células senescentes expressão aumentada dos genes p21, p16 e p53 e altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) (5). Em adição, a essas alterações fenotípicas e genotípicas citadas, a senescência celular também é responsável por uma reprogramação metabólica que resulta na manifestação de diversas proteínas secretoras, como citocinas, quimiocinas e proteases, essa manifestação é caracterizada como fenótipo secretor associado a senescência (SASP) (6).

Dessa forma apesar da senescência ter evoluído inicialmente para limitar a proliferação de células velhas ou danificadas, demonstrou-se que esse estado celular contribui para o envelhecimento, para diversas doenças relacionadas à idade e para uma diminuição das funções celulares no geral (7). Devido a isso, o melhor entendimento da relação da senescência celular e suas consequências nos tecidos dentários se faz necessário podendo contribuir para futuros estudos relacionados a prevenção ou regulação desse estado celular.

## **1.2. Senescência celular e resposta imunoinflamatória**

Assim como os outros sistemas do corpo humano o sistema imunitário também sofre modificações ocasionadas pela senescência celular (9). Imunosenescência é o termo utilizado para designar as alterações que o sistema imunológico apresenta durante o envelhecimento, caracterizada por um declínio progressivo das funções imunológicas e conseqüentemente um aumento da susceptibilidade a patologias no geral. Essas alterações são conseqüências de dois processos distintos, porém complementares: o efeito da senescência nas células imunes e o enfraquecimento das barreiras do organismo ocasionado indiretamente pela senescência celular tecidual, favorecendo a liberação de várias moléculas sinalizadoras às quais as células imunes respondem (8).

Diversos tipos celulares são afetados durante a imunossenescência como células na medula óssea, o timo, os linfócitos maduros presentes no sangue periférico e nos órgãos linfoides secundários, além dos elementos do sistema imunológico inato como monócitos, células natural killer (NK), e células dendríticas e do sistema adaptativo como linfócitos B e T (9). Sendo assim, sabe-se que a imunossenescência afeta tanto o sistema imune inato, quanto adaptativo, porém evidências indicam que a imunidade inata se apresenta mais preservada enquanto as alterações na imunidade adaptativa são mais significativas (9).

Esse estado atinge as subpopulações celulares, os padrões de secreção das citocinas, a tolerância imunológica dentre outras funções (10). Uma das principais características da senescência, o SASP, compromete funções do sistema imunológico, incluindo a eliminação de células senescentes. Além disso induz a senescência das células vizinhas promovendo assim a senescência celular de forma parácrina (8).

Além disso o envelhecimento é acompanhado por um estado de inflamação, o termo *inflammaging* é utilizado para designar esse estado inflamatório relacionado ao envelhecimento, caracterizado como uma inflamação crônica, de baixo grau, e estéril (11). O *inflammaging* é um fator de risco altamente significativo para morbidade e mortalidade em idosos, pois a maioria das doenças compartilham uma patogênese inflamatória (11).

Sabe-se que uma resposta inflamatória pode ser iniciada em resposta a traumas ou a infecções, por meio de células que após ativadas liberam citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6. Em relação ao envelhecimento foi demonstrado um aumento de duas a quatro vezes dos níveis séricos de mediadores inflamatórios que atuam como preditores de mortalidade independente da morbidade pré-existente (12). Em adição, leucócitos de indivíduos idosos produzem TNF- $\alpha$  em maior concentração, após indução com lipopolissacarídeo (LPS), quando comparados com os leucócitos de indivíduos jovens (13).

Dessa forma, as inflamações crônicas, juntamente com a perda da capacidade de resposta imune normal durante o envelhecimento, podem alterar a imunocompetência e promover doenças relacionadas ao envelhecimento (14). Sabe-se que as células da polpa dentária desempenham funções

imunomodulatórias. Considerando que as células da polpa dentária também sofrem alterações relacionadas a senescência celular, faz-se necessário o entendimento a respeito das alterações imunomodulatórias relacionadas as células desse tecido.

### **1.3. Senescência e células da polpa dentária**

A polpa é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, não mineralizado, altamente vascularizado e innervado, localizado no interior do dente, na câmara pulpar e canais radiculares. Esse tecido é composto de um material gelatinoso, de consistência viscosa, denominado de matriz extracelular composta por proteoglicanos e glicoproteínas, entrelaçados a feixes de fibras colágenas (15).

Derivada da crista neural craniana, a polpa é altamente especializada e abriga uma variedade de células como fibroblastos, odontoblastos, células vasculares, células mesenquimais indiferenciadas, células tronco da papila apical, células inflamatórias, neurônios sensoriais e simpáticos (16). Esse tecido é dividido em quatro camadas: a primeira, mais externa, composta de odontoblastos responsáveis pela produção de dentina além de papel importante na em situações de defesa; a segunda camada, pobre em células e rica em matriz extracelular; a terceira camada contém células progenitoras com plasticidade e pluripotência; e a camada mais interna, que compreende a área vascular e o plexo nervoso (15).

Essas células em condições normais e de saúde desempenham diversas funções como capacidade de formação e regeneração, resposta imunológica, funções sensoriais e nutrição (15). Porém, devido ao envelhecimento o tecido pulpar pode perder essas funções ou diminuir algumas capacidades importantes. Essas alterações incluem uma diminuição no tamanho e volume da polpa, calcificação nas artérias pulpares, redução no número de células (17), diminuição na circulação sanguínea pulpar (18) e redução na sensibilidade pulpar (19).

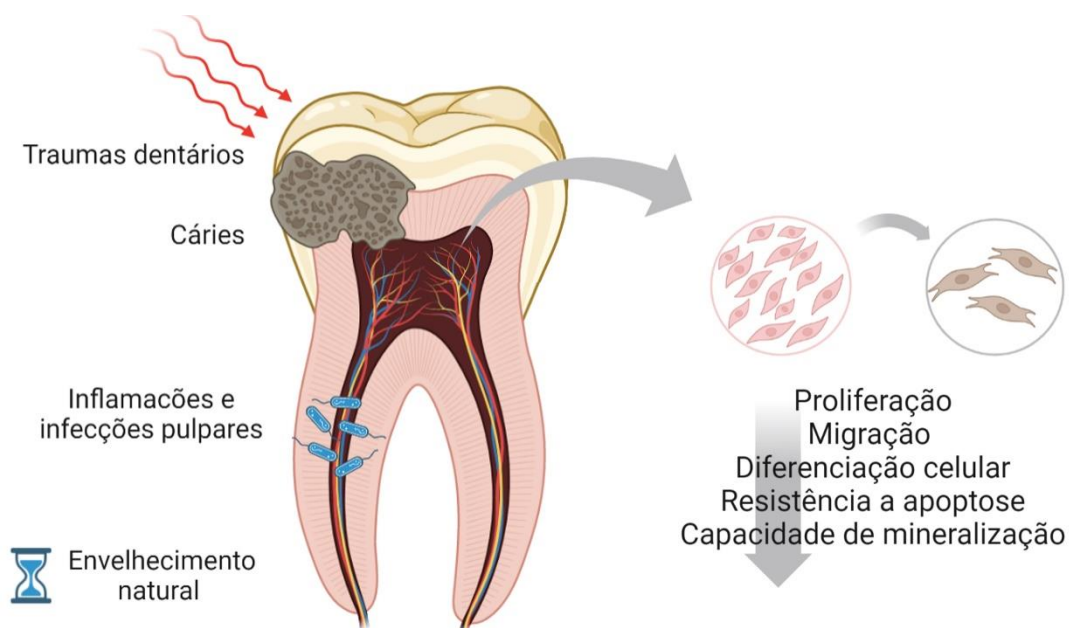


Figura 1: Desenho esquemático ilustrativo das possíveis causas e consequências da senescência celular em células da polpa dentária.

Além das alterações ocasionadas pelo envelhecimento sabe-se que situações estressantes como cárie crônica, bruxismo, traumas de oclusão e trincas na estrutura dentária foram citados como causas de estresse pulpar (20). Essas condições inflamatórias fracas e crônicas podem levar à indução de SASP pelas células da polpa dentária, causando alterações relacionadas a senescência (21) (Figura 1).

Além do envelhecimento e estresse crônico diversos outros fatores já têm sido relatados na literatura como causa desse estado celular, como por exemplo a diabetes. Após a realização da exposição de células pulpares a glicose, semelhante à condição hiperglicêmica em pacientes diabéticos, um estudo *in vitro* demonstrou um aumento do número de células senescentes e uma redução na capacidade de proliferação de células pulpares. Esse estudo sugere uma relação causal da diabetes e senescência de células pulpares (22).

Da mesma maneira um estudo *in vitro* simulou a presença de infecções como fator causal da senescência celular. Após repetidas exposições de células pulpares dentárias ao LPS, demonstrou-se que essas células apresentaram

sinais de senescência celular e uma redução na capacidade proliferativa, além do aumento de espécies reativas de oxigênio (23).

Em relação ao *inflammaging* na polpa dentária, sabe-se que o envelhecimento afeta a secreção de alguns fatores associados à senescência. Células inflamatórias liberam citocinas como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que promove um processo de mineralização da polpa dentária (26). Isso poderia explicar a geração de pontos de nucleação, que impulsionam a formação de cálculos pulparem em dentes de indivíduos idosos (27).

Alguns estudos já analisaram reduções no comprimento dos telômeros em células da polpa dentária. Esse fenômeno já foi demonstrado devido ao envelhecimento natural no qual foi possível demonstrar a idade dos pacientes por meio da análise telomérica por meio de qPCR (28–30). Em todos esses estudos foi observado uma tendência de encurtamento dos telômeros em relação a progressão da idade. Além disso, já foi demonstrado danos aos telômeros após a indução da senescência utilizando o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (31) e a visfatina (32) como agentes indutores.

Ademais, como consequência desse estado celular já foram demonstradas reduções na atividade da fosfatase alcalina (33), redução no potencial de proliferação, diferenciação celular e diferenciação neurogênica (34), uma menor resistência a apoptose (35) e um aumento da atividade autofágica (36).

Portanto, é razoável afirmar que situações comuns na cavidade bucal, relacionadas ao envelhecimento e ao estresse crônico, podem levar a senescência de células pulparem. Em adição pode-se inferir que esse estado celular pode afetar os prognósticos de tratamentos clínicos conservadores, como o capeamento pulpar, devido a sua relação com as funções das células do tecido pulpar dentário.

## 2. JUSTIFICATIVA

As células da polpa dentária desempenham funções importantes em situações fisiológicas e em tratamentos conservadores. Estudos demonstram que a capacidade de defesa celular, além da capacidade de reparação, é afetada pela senescência celular em diversos tecidos. Em adição, as alterações observadas em relação ao sistema imunológico em tecidos do corpo humano envelhecidos ou traumatizados, tornou comum na literatura termos como imunosenescência e *inflammaging* os quais estão relacionados a diversas doenças do corpo humano. Diante disso, faz-se necessário estudos que demonstrem como a senescência celular afeta as funções dos tecidos dentais incluindo os efeitos na resposta imune desses tecidos. Nesse sentido esse estudo avaliou as alterações morfológicas, a capacidade proliferativa, migratória e imunomoduladora de células senescentes da polpa dentária em relação a células em estado proliferativo, buscando elucidar os danos causados pela senescência e contribuir para novos estudos relacionados a senescência celular nesses tecidos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliação de alterações morfológicas e da capacidade proliferativa, migratória e imunomodulatória de células humanas senescentes derivadas da polpa dentária, em comparação com a resposta de células em estado de proliferação.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Isolamento, cultura e expansão de culturas primárias de células pulpares humanas.
- Realizar determinação do protocolo para indução da senescência celular por meio do contato com doxorrubicina.
- Avaliar a atividade migratória e proliferativa de culturas de células senescentes em comparação com a cultura de células pulpares em estado de proliferação.
- Avaliar alterações relacionadas a morfologia celular de células pulpares de senescentes e em estado de proliferação por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliar a produção das citocinas fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), interleucinas (ILs) – 6 e 10 nas culturas de células pulpares senescentes e em estado de proliferação, na ausência e presença de LPS e IFN- $\gamma$ .



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização da pesquisa

O presente estudo foi uma avaliação quantitativa e qualitativa *in vitro* dos efeitos da senescência celular na morfologia, na capacidade proliferativa e migratória e na resposta imunoinflamatória mediada por LPS e/ou IFN- $\gamma$ , mimetizando as possíveis consequências da senescência celular na polpa dentária em situações de saúde e de inflamação/infecção. Para tanto, este estudo foi dividido em 4 fases (Figura 2).

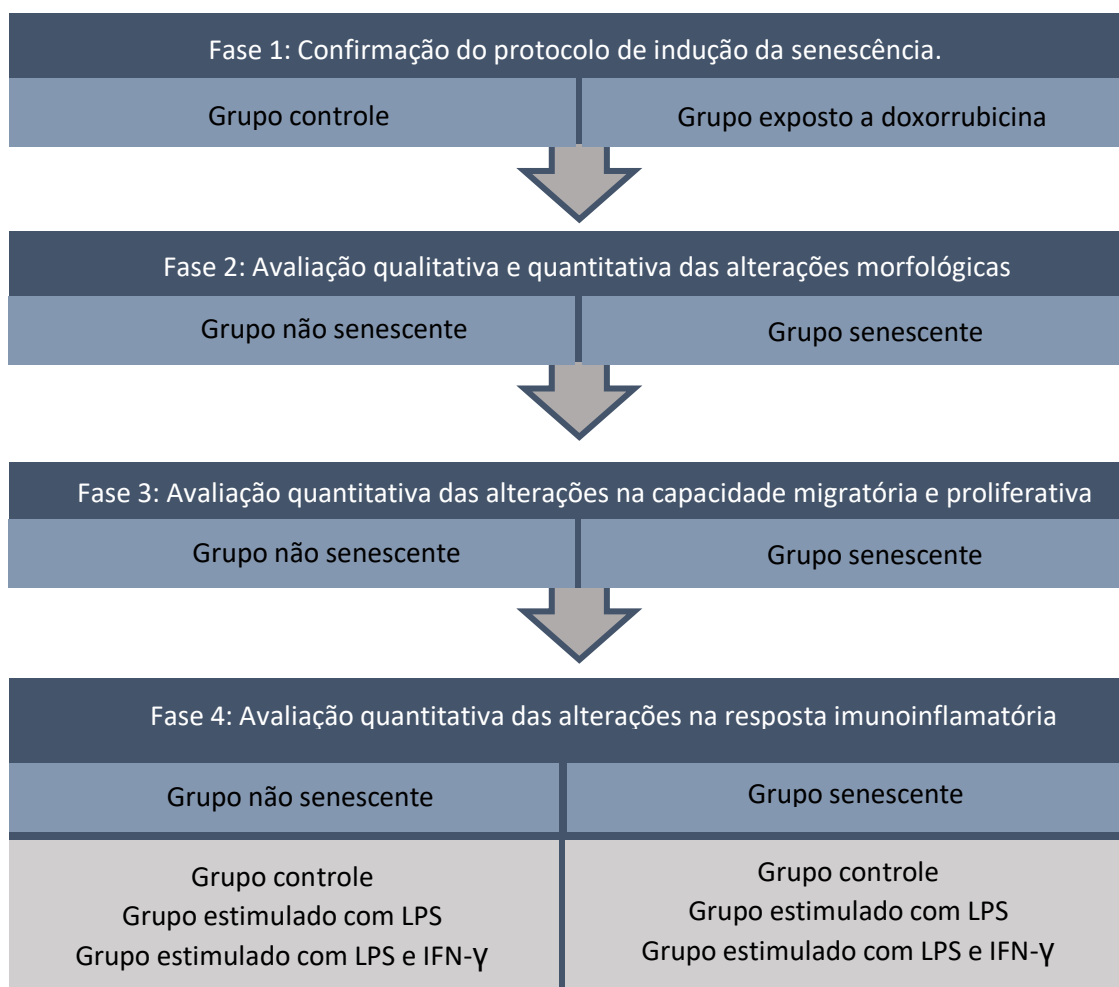


Figura 2: Fluxograma de desenvolvimento do trabalho.

## **4.2. Caracterização da amostra**

As amostras celulares foram coletadas de pacientes que tenham sido encaminhados para extração de terceiros molares na clínica integrada do curso de graduação da Universidade Católica de Brasília (UCB). Um total de 60 pacientes foram convidados a participar da pesquisa, colaborando com a doação do elemento dentário. Cada paciente preencheu anamnese e foi registrado em seu prontuário todos os alertas sistêmicos. Este projeto foi autorizado pelo comitê de ética em pesquisa humana da UCB (CEP/UCB: 4.714.331) (Anexo 1) e os pacientes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido. Todos os preceitos éticos foram obedecidos.

## **4.3. Critério de inclusão**

Foram incluídos no projeto, pacientes de ambos os sexos, encaminhados para exodontia de terceiros molares hígidos com ápice aberto ou fechado, inclusos ou semi-inclusos doados de pacientes com idade entre 18 e 30 anos.

## **4.4. Critérios de exclusão**

Pacientes com idade inferior a 18 anos ou acima de 30 anos, com terceiros molares afetados com lesões cariosas ou doença periodontal. Casos em que não houve assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

## **4.5. Cultivo primário de células pulpares**

As polpas dentárias foram obtidas a partir de terceiros molares íntegros extraídos de pacientes adultos entre 18 e 30 anos. Os dentes extraídos foram

imersos em meio de cultura DMEM para transporte, contendo 10% de soro bovino fetal (SFB),  $100 \text{ U.mL}^{-1}$  de penicilina,  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina e 1% de anfotericina B. Os frascos contendo os dentes foram mantidos sob refrigeração em caixa de isopor com gelo até o momento da remoção dos tecidos e cultivo primário em fluxo laminar. No fluxo laminar, após lavagem do dente com PBS, os mesmos foram fraturados com auxílio de alicate ortodôntico. A polpa dentária coronária e radicular foi cuidadosamente removida com auxílio de pinças, limas manuais ou curetas periodontais. As polpas serão lavadas com PBS, contendo  $100 \text{ U. mL}^{-1}$  de penicilina,  $100 \mu\text{g. mL}^{-1}$  de estreptomicina e 1 % de anfotericina B. O tecido pulpar obtido foi dilacerado com lâmina de bisturi, imerso em uma solução contendo Colagenase Tipo I na concentração de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Collagenase, Type I, poder, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA) e transferido para uma atmosfera umedecida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , na temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 90 minutos. Após a filtração a solução foi centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Após o *pellet* formado ser ressuspenso em meio de cultura DMEM suplementado contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil),  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de penicilina (Invitrogen, Grand Island, NY),  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina (Invitrogen) e  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) a suspensão celular foi transferida para um frasco de cultura com área de  $25 \text{ cm}^2$  (Kasvi, Paraná, Brasil) em uma atmosfera umedecida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , na temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Essas células foram subcultivadas conforme atingiam a confluência para obtenção do número de células suficiente para a realização do experimento (37).

#### **4.6. Indução da senescência celular**

A indução da senescência celular foi realizada utilizando-se a doxorubicina (Doxorubicin hydrochloride, Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) na concentração de  $500 \mu\text{M}$ . As células foram inseridas em placas de 6 poços e após a confluência foi adicionado  $1 \mu\text{L}$  por mL de doxorubicina ( $500\mu\text{M}$ ) em meio DMEM (GIBCO) suplementado (conforme descrito) em cada poço e mantido em contato com as células por um período de 24 horas (38). Os poços referentes ao grupo não senescente foram mantidos apenas meio com meio

DMEM suplementado, e não receberam a adição de doxorrubicina. Após as 24 horas foi realizada troca do meio de cultura celular a cada 72 horas. No oitavo dia foi realizado o ensaio de  $\beta$ -galactosidase para a confirmação desse protocolo de indução.

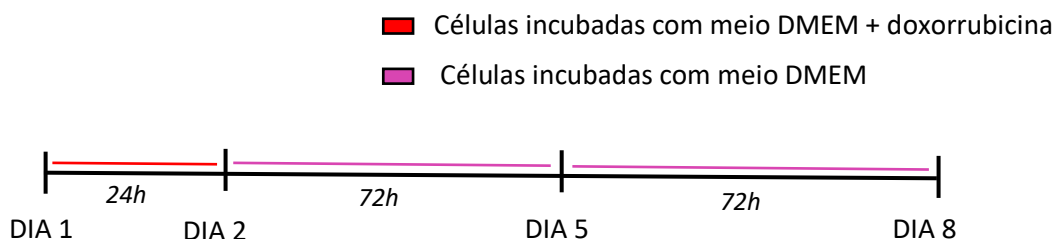


Figura 3: Linha do tempo representativa dos tempos experimentais realizados no protocolo de indução da senescência celular.

#### 4.7. Ensaio de $\beta$ -galactosidase para confirmação da senescência celular

O ensaio de coloração da beta-galactosidase foi realizado com intuito de confirmar a presença de células com acúmulo dessa enzima nos lisossomos, o que, segundo a literatura, é uma das características apresentadas por células senescentes (38). Após a realização do protocolo de indução da senescência nos devidos grupos o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS por 30 segundos. As células foram então fixadas com solução de fixação (formaldeído 2%) por 5 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, lavadas com solução de PBS novamente. Posteriormente, foram adicionados 150  $\mu$ L de solução de coloração de X-Gal (40mM – solução de ácido cítrico + fosfato de sódio, 5mM - hexacianoferrato de potássio, 150mM – cloreto de sódio, 2mM – cloreto de magnésio, 1mg/mL de X-Gal) por poço e as placas foram envolvidas externamente com laminado e mantidas em incubadora a 37 °C overnight. Após a incubação foi realizada a lavagem duas vezes com PBS por 30 segundos e uma vez com metanol. Finalizado o tempo de coloração, as células foram observadas e fotografadas em cada poço (região central da placa) sempre com o mesmo aumento, utilizando microscópio de luz invertido com

contraste de fase Axio Observer D1 (Zeiss). As células coradas e não coradas do grupo exposto a doxorrubicina e do grupo não senescente foram contabilizadas com auxílio do software Image J (NIH, Bethesda, MD).

#### **4.8. Avaliação do potencial proliferativo**

A avaliação do potencial proliferativo de células senescentes em comparação a células no estado proliferativo foi realizada por meio da técnica de exclusão do Azul de Tripano (39). O ensaio foi realizado após os tempos experimentais de 0h, 24h e 48h a fim de avaliar o potencial proliferativo. Obtidas culturas confluentes de células pulpareas, foi realizado sua tripsinização e ressuspensão celular em meio DMEM (Sigma Chemical) sem SFB (mesmas condições do ensaio de migração celular). Em placas de 24 poços, foram adicionadas  $1 \times 10^4$  de células pulpareas em 1 mL de DMEM (Sigma Chemical) sem SFB. Na sequência, completados os tempos experimentais, as células foram ressuspensas e foi adicionado solução à 0,4% do corante Azul de Tripan (Sigma Chemicals), por 1 minuto. As células foram contadas imediatamente utilizando câmara de Neubauer (Brand GmbH, Wertheim, Alemanha). Todas as contagens foram realizadas, utilizando três réplicas técnicas e biológicas de cada amostra em cada tempo experimental e comparadas com o número celular inicial do experimento.

#### **4.9. Avaliação da migração celular – método *scratch***

A avaliação da migração celular foi realizada pelo método de *scratch* (40). Neste ensaio, as células ( $2,5 \times 10^5$  células por poço) foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (Prolab) em meio DMEM (GIBCO), suplementado com  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de penicilina (Invitrogen) e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  estreptomicina (Invitrogen) e 10% de SFB (Cultilab), mantidas até formação de uma monocamada confluenta. Após, a indução da senescência nos devidos grupos, algumas das células confluentes foram removidas da cultura, com uma ponta de micropipeta de 1000

$\mu\text{L}$  de plástico com um orifício grande, reproduzindo uma ferida no centro do poço. As células restantes foram lavadas três vezes com meio citado anteriormente. Neste momento, o meio de cultura utilizado foi o DMEM suplementado com  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de penicilina e  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina isento de SFB. As culturas foram incubadas e monitoradas por até 48h. Fotografias com auxílio de microscopia foram realizadas nos tempos de 0, 24 e 48h, para posteriormente serem analisadas. As imagens foram tratadas e as células localizadas na região da ferida foram contabilizadas com auxílio do software *Image J* (NIH, Bethesda, MD).

#### **4.10. Análise da morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A avaliação da morfologia celular após a indução da senescência foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (JSM-7000F Scanning Microscope, JEOL, EUA). Para isso, lamínulas de vidro redondas com 13 mm x 13 mm (Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA) foram posicionadas na base da placa de 6 poços (Prolab, São Paulo, SP, Brasil), antes do cultivo das células. Em seguida, 2 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB (Cultilab) foi inserido, seguido pelas células ( $2 \times 10^5$ ). Após 24h, foi realizada a inserção da doxorubicina por 24h. Trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 72h por 7 dias. Após esse período, a lamínula foi fixada em glutaraldeído 2,5% por 24h, seguindo por duas lavagens com cacodilato de sódio. Posteriormente, as células foram fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 30 min em capela e realizado desidratação em solução de acetona 30, 50, 70, 95 e 100%. Após secagem da lamínula, esta foi metalizada e analisada em microscópio eletrônico de varredura (JMST33A Scanning Microscope, 56 JEOL, EUA) (41). As imagens foram captadas em aumentos de 2000x e 5000x para avaliação das alterações morfológicas causadas pela senescência. A análise quantitativa foi realizada em relação ao tamanho celular e ao número de prolongamento celulares através do software *Image J*.

#### 4.11. Avaliação da produção de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios por células pulpares

A partir das culturas celulares em estado de senescência e em estado de proliferação, ambos os grupos foram estimulados e após o período de incubação, foi avaliada a produção de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , ILs - 1 $\alpha$ , 6 e 10. As concentrações destes mediadores foram determinadas pelo método de PCR em tempo real com StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA). Para realização de um sistema *in vitro* que se assemelhe ao processo inflamatório pulpar foram utilizados estímulos com IFN- $\gamma$  (Interferon-gama, Sigma Aldrich) e LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli*, Sigma Aldrich) e a união de ambos por 24 horas.

##### Extração de RNA pelo método TRIzol™

A fim de extrair o RNA das amostras foi realizado a extração de RNA das células pelo método TRIzol™ (ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA) (42). Na placa de cultura de 6 poços onde as células foram mantidas e estimuladas foram adicionados 1000  $\mu$ L de TRIzol™ e realizada homogenização. Todo o conteúdo do poço foi transferido para um tubo, ao qual foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio (ThermoFisher Scientific). Os tubos foram agitados no vórtex por 15 segundos e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Foi realizada centrifugação a 4 °C, a 12.000g, por 15 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 500  $\mu$ L de isopropanol (ThermoFisher Scientific). A mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, a 12.000g, por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Então, 1000  $\mu$ L de etanol 75% foi adicionado ao *pellet*. Os tubos foram agitados no vórtex e centrifugados a 4 °C, a 12.000 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* de RNA mantido a temperatura ambiente até

secar. Por fim, a esse pellet foi adicionado 23  $\mu\text{L}$  de água *RNAse free* (ThermoFisher Scientific) e incubado a 55 °C.

### Quantificação de RNA

A fim de determinar o volume de RNA de cada amostra a ser utilizado na síntese de cDNA, o RNA foi quantificado no equipamento Qubit® (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA) com o Qubit® RNA Buffer (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific) e Qubit® RNA Reagent (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific) (222). Para cada quantificação, 1  $\mu\text{L}$  do fluorófolo foi adicionado e homogeneizado à 199  $\mu\text{L}$  do tampão. Deste volume, 199  $\mu\text{L}$  foram adicionados e homogeneizados à 1  $\mu\text{L}$  da amostra, sendo estes incubados no escuro, em temperatura ambiente, por dois minutos antes da leitura no equipamento. Após a quantificação, o aparelho permite calcular a concentração final de RNA, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a partir do volume inicial de amostra utilizado (1  $\mu\text{L}$ ).

### PCR em tempo real

A análise de expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real com StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific), a fim de verificar a expressão de genes indicativos de processos inflamatórios e antiinflamatórios. Para essa análise foram avaliadas a expressão dos genes de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1 e GAPDH, como gene constitutivo. A reação de quantificação foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante. Cada reação apresentou um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , sendo composto por: 5  $\mu\text{L}$  de SYBR Green; 0,5  $\mu\text{L}$  de primers sendo 0,25  $\mu\text{L}$  de primer de cada gene (Tabela 1) e 2,5  $\mu\text{L}$  de Água Nuclease *free* (ThermoFisher Scientific - KIT SYBR™ Green PCR Master Mix). O equipamento utilizado foi o StepOne (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA). No final dos ciclos, os resultados foram analisados para determinar diferença na expressão dos genes nas amostras



testadas. Os níveis relativos de expressão no grupo experimental foram calculados por  $\Delta$  ( $\Delta$ CT) ( $\Delta$ CTControle  $-$   $\Delta$ CTExperimento).

<b>GENE</b>	<b>FOWARD</b>	<b>REVERSE</b>
GAPDH	TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCAGCT	GGTGGTCCAGGGGTCTTAC
TGF- $\beta$ 1	GCTGTATTTAAGGACACCGTGC	TGACACAGAGATCCGCAGTC
TNF- $\alpha$	CACAGTGAAGTGCTGGCAAC	GATCAAAGCTGTAGGCCCCA
IL-10	GGTGGTCCAGGGGTCTTAC	ACTCTGCTGAAGGCATCTCG
IL-6	TCAATATTAGAGTCTCAACCCCA	TTCTCTTTCGTTCCCGGTGG

Tabela 1: Sequência dos primers de cada gene utilizados no ensaio de PCR.

#### 4.12. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas. Os resultados foram submetidos ao cálculo da média e desvio padrão para cada experimento. Para os ensaios relacionados a morfologia, proliferação e migração foi realizada análise estatística utilizando o Teste T de *Student*. Para os ensaios relacionados a imunomodulação foi realizada a verificação de normalidade e posterior estatística mediante a análise de variância de um fator (*one way ANOVA*) e quando necessário a análise de variância de dois fatores (*two way ANOVA*) e pós teste Bonferroni. As análises foram consideradas a um nível de significância de 95%. A análise estatística foi realizada no software Graph Pad Prism 5 (Califórnia, EUA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Confirmação da indução da senescência celular

Para a confirmação da indução da senescência nas células da polpa dentária partir do protocolo de indução utilizando 1  $\mu$ L/mL de doxorubicina (500 $\mu$ ) em meio de cultura DMEM por 24 horas (38), foi realizado o ensaio de

coloração de  $\beta$ -galactosidase. Foi possível observar coloração de 98% das células expostas a doxorrubicina em relação ao grupo não senescente ( $p < 0,03$ , Figura 4C). Essa coloração confirmou o estado celular necessário para os ensaios subsequentes após estimulação com doxorrubicina (Figura 4).

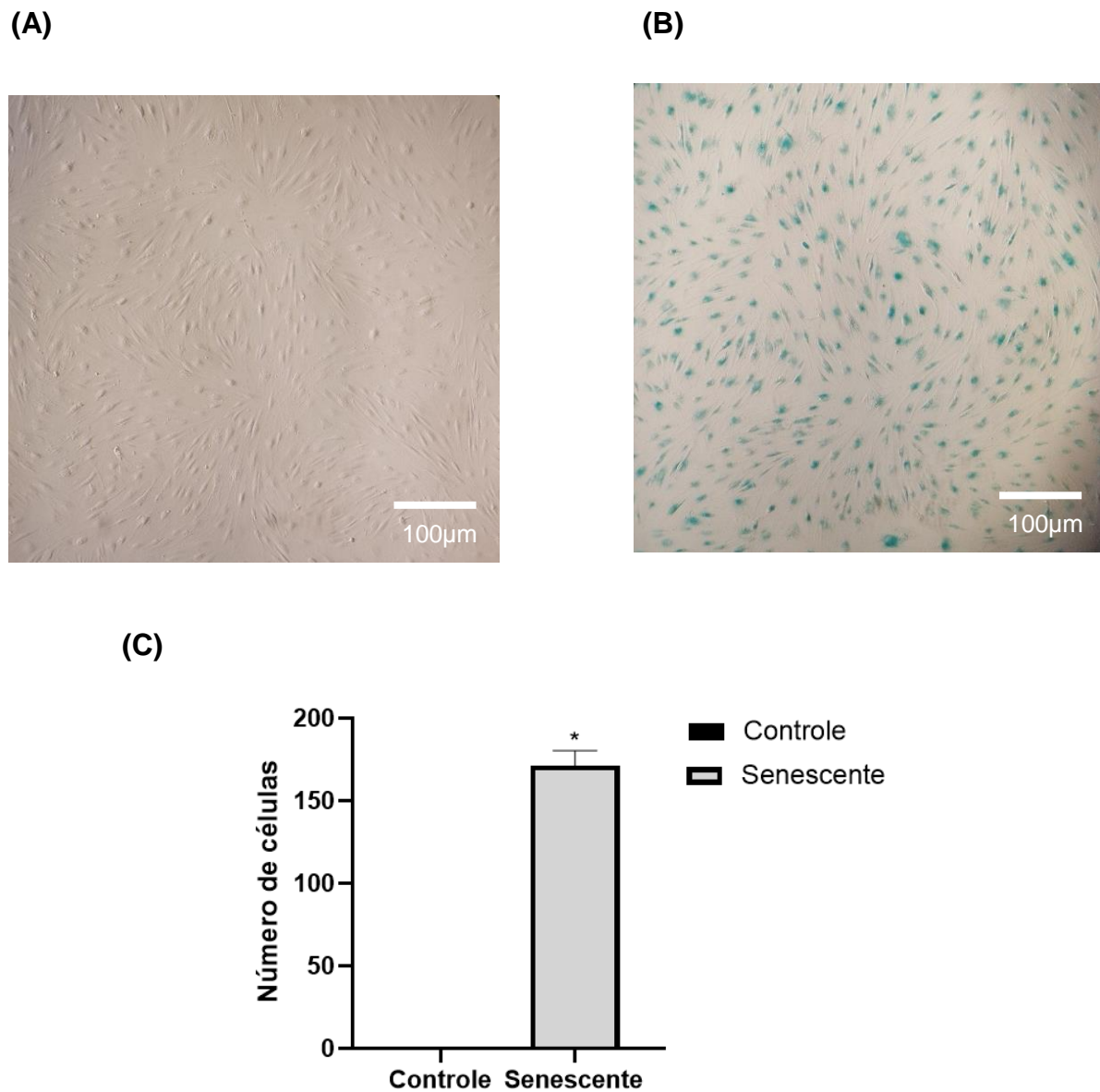


Figura 4: Células da polpa dentária humana após ensaio de coloração de  $\beta$ -galactosidase. (A) Grupo não senescente. (B) Grupo exposto a doxorrubicina por 24 horas. Barra de escala: 100  $\mu$ m. (C) Número de células senescentes da polpa dentária humana coradas em azul após ensaio de coloração de  $\beta$ -galactosidase. Diferenças estatísticas verificadas pelo Teste t de *Student*. \* $p < 0,03$ .

## **5.2. Avaliação das alterações morfológicas das culturas de células da polpa dentária em estado de senescência em comparação com células em proliferação**

Após o estabelecimento dos grupos experimentais de células saudáveis e senescentes da polpa dentária, a morfologia celular foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e microfotografias foram capturadas nos aumentos 2000x e 5000x (Figura 5A). As imagens foram avaliadas considerando dois parâmetros, o tamanho celular e a quantidade de prolongamentos celulares a partir do *software Image J*. Foi possível observar um aumento significativo do tamanho celular e uma redução na quantidade de prolongamentos celulares em células senescentes em relação ao grupo não senescente ( $p < 0,03$ , Figuras 5B e 5C).

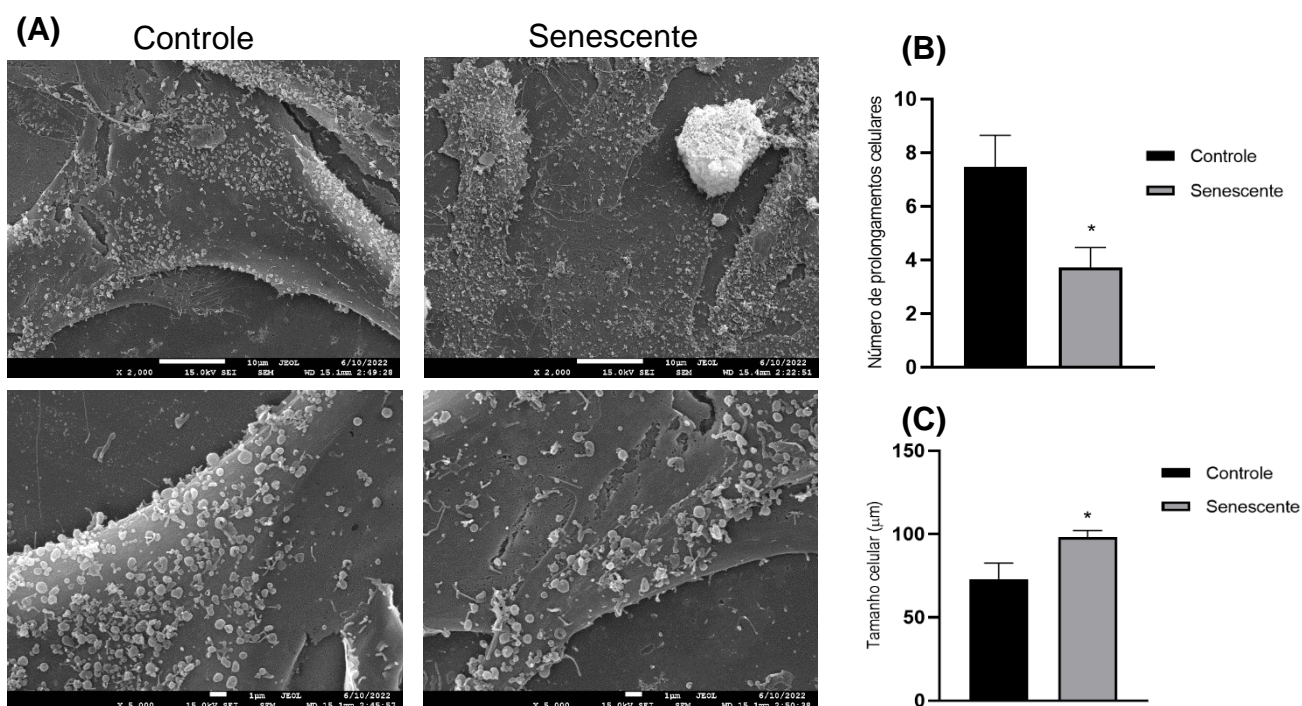


Figura 5: (A) Células da polpa dentária humana fotografadas a partir de microscópio eletrônico de varredura. Cada linha representa o aumento utilizado para análise das amostras. A primeira linha representa ampliação de 2000x; a segunda linha, ampliação de 5000x. A primeira coluna representa o grupo não senescente e a segunda coluna o grupo de células senescentes. (B) e (C) Análise quantitativa das imagens geradas a partir de microscopia eletrônica de varredura das células da polpa dentária humana senescentes em relação ao grupo não senescente considerando (A) o número de prolongamentos celulares e (B) o tamanho celular. Diferenças estatísticas verificadas pelo Teste t de Student. \* $p < 0,03$ .

### 5.3. Avaliação da capacidade proliferativa de culturas de células da polpa dentária em estado de senescência em comparação com células em proliferação

A avaliação do potencial proliferativo foi realizada após a coloração de exclusão por Azul de Tripano. A coloração foi realizada após os tempos experimentais de 24h e 48h a fim de avaliar o potencial proliferativo, ao longo dos tempos experimentais das células da polpa dentária senescentes em comparação com as células em proliferação. O experimento foi realizado com células da polpa na terceira passagem e foi observado um potencial proliferativo significativamente menor no grupo senescente, incluindo uma redução de 36% no tempo de 24h e de 35%, no tempo de 48h ( $p < 0,05$ , Figura 6).

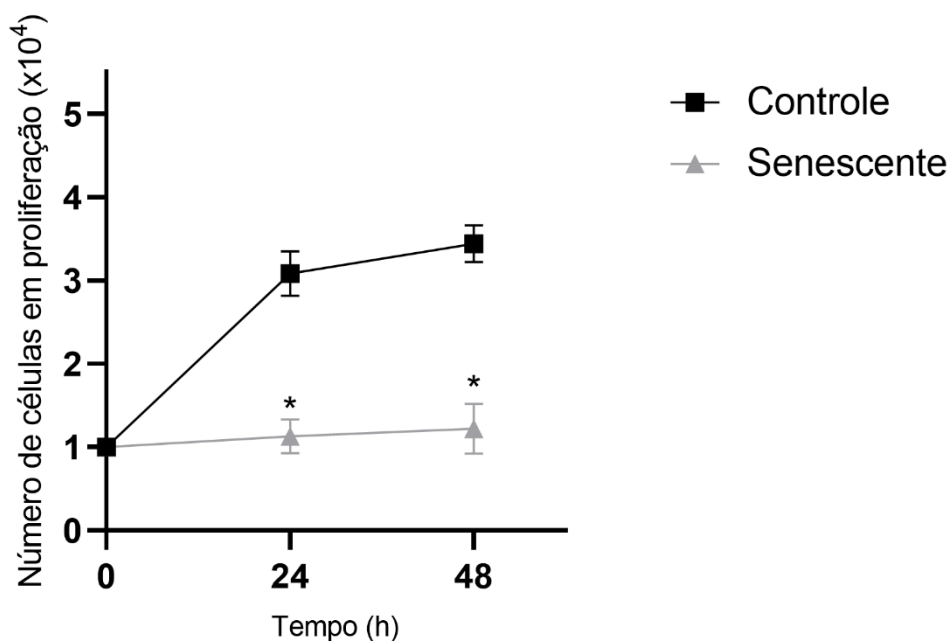
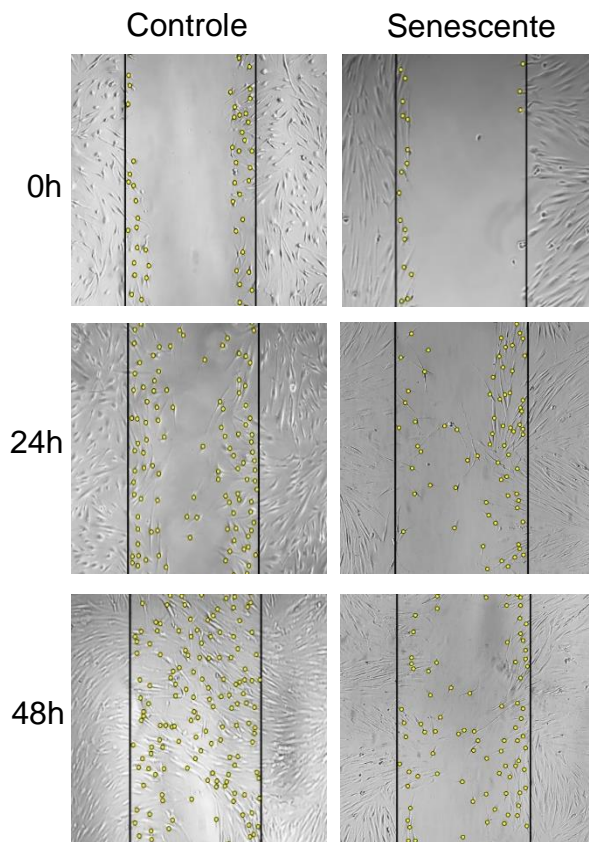


Figura 6: Avaliação do potencial proliferativo de cultura de células pulpares primárias saudáveis e senescentes, após 24 e 48 horas, por contagem de células vivas coradas por Azul de Tripano. Diferenças estatísticas verificadas pelo Teste t de *Student*. \* $p < 0,05$ .

#### **5.4. Avaliação da atividade migratória de culturas de células da polpa dentária em estado de senescência em comparação com células em proliferação**

O comportamento migratório das culturas primárias de células da polpa dentária senescentes foi avaliado em comparação com células em proliferação. Sendo que, as células da polpa dentária foram utilizadas na terceira passagem e após a realização do rompimento da adesão celular, as fotografias foram adquiridas nos tempos de 24 e 48h. O parâmetro avaliado foi o valor absoluto de células migradas para o interior da ferida, em cada grupo experimental nos diferentes tempos descritos. A contagem foi realizada utilizando o *software Image J*. Foi observada uma diminuição na capacidade migratória no grupo senescente em relação ao grupo não senescente em ambos os tempos experimentais ( $p < 0,05$ , Figura 7).

(A)



(B)

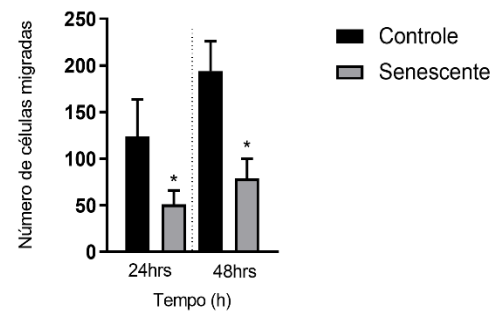


Figura 7: (A) Imagens representativas do ensaio de migração celular, utilizando o método *scratch*. Os pontos denotam a presença de células dentro da ferida. As linhas verticais correspondem ao local onde a ferida foi realizada. A avaliação da migração foi realizada após 24h e 48h. As colunas representaram cada grupo testado. (B) Avaliação do potencial migratório de cultura de células pulpares primárias saudáveis e senescentes, por contagem de células migradas para ferida por *scratch assay*, após 24 e 48 horas. Diferenças estatísticas verificadas pelo Teste t de *Student*. \*p < 0,05.

## 5.5. Avaliação da produção de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios por células pulpares

### 5.5.1. Avaliação da expressão do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )

A expressão do gene TNF- $\alpha$  em culturas de células saudáveis e senescentes expostas aos estímulos de LPS e IFN- $\gamma$  foi avaliada após 24h de incubação (Figuras 8 e 12). Observou-se uma maior expressão do gene no grupo não estimulado, quando se comparou a sua expressão pelas células senescentes e células saudáveis (Figura 8C,  $p < 0,01$ ).

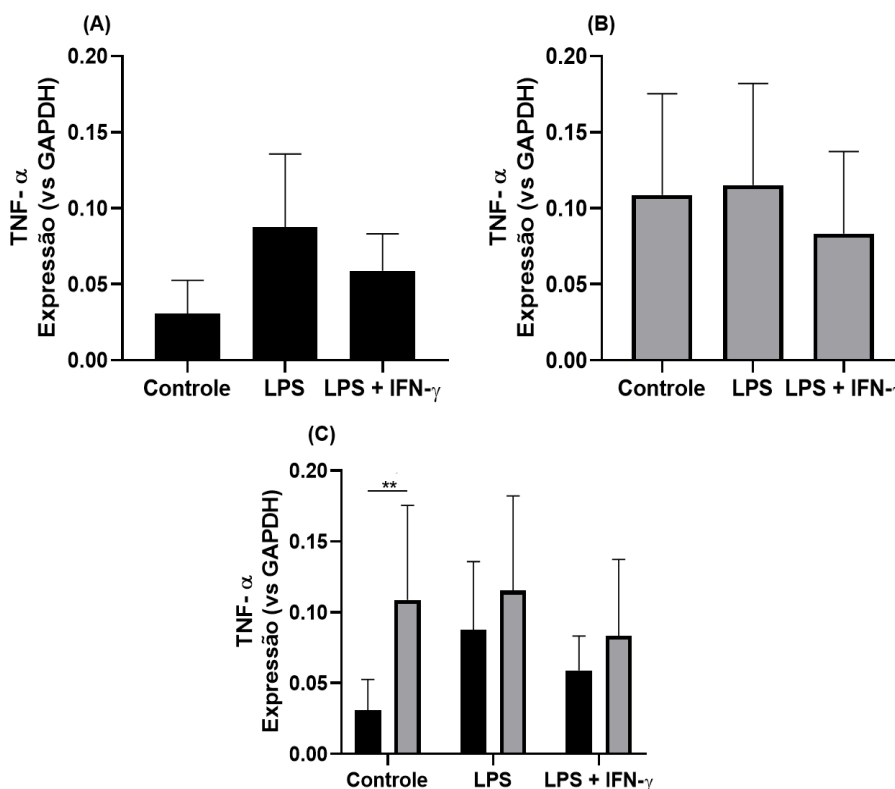


Figura 8: (A) Expressão do gene TNF- $\alpha$  nas amostras de culturas de células pulpares primárias saudáveis estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), após 24h de incubação. (B) Expressão de TNF- $\alpha$  nas amostras de células pulpares primárias senescentes nas mesmas condições. (C) Análise comparativa da expressão de TNF- $\alpha$  nas amostras de células pulpares primárias saudáveis e senescentes. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \*\* $p \leq 0,01$  representa diferença estatística verificada pelo teste *two-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.



### 5.5.2. Avaliação da expressão de interleucina-10 (IL-10)

A expressão do gene anti-inflamatório IL-10 em cultura de células saudáveis e senescentes expostas aos estímulos de LPS e IFN- $\gamma$  foi avaliada após 24h de incubação (Figuras 9 e 12). Observou-se uma maior expressão do gene nas células senescentes estimuladas com LPS, em relação ao grupo de células senescentes não estimuladas (\* $p \leq 0,05$ , Figura 9B). Em adição, uma redução foi observada na ausência de estímulos inflamatórios nas culturas de células senescentes em comparação com células saudáveis (\*\* $p \leq 0,01$ , Figura 9C).

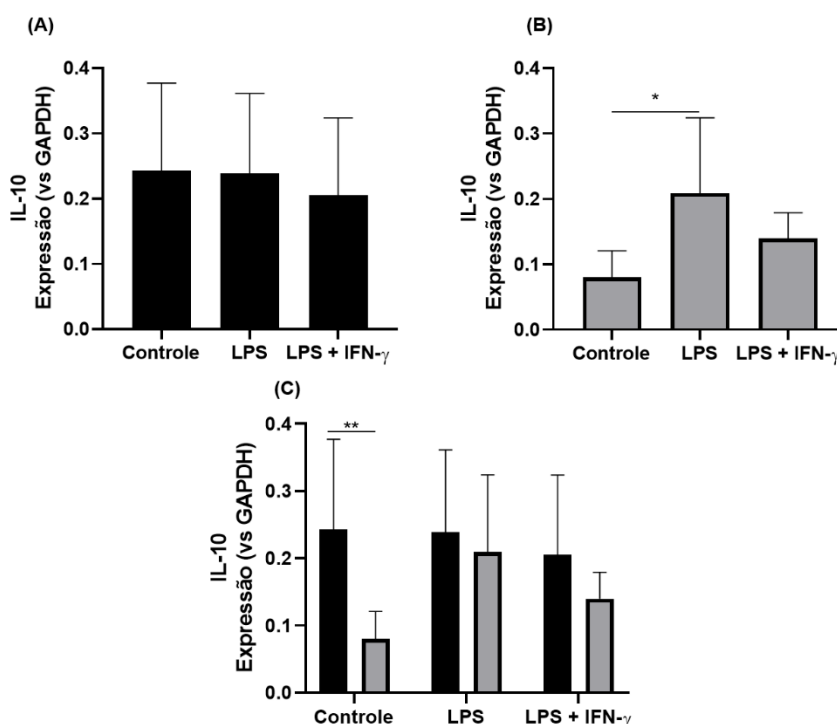


Figura 9: (A) Expressão do gene IL-10 nas amostras de culturas de células pulpares primárias saudáveis estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  (1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), após 24h de incubação. (B) Expressão de IL-10 nas amostras de células pulpares primárias senescentes nas mesmas condições. (C) Análise comparativa da expressão de IL-10 nas amostras de células pulpares primárias saudáveis e senescentes. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \* $p < 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$  representam diferença estatística verificada pelo teste *two-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### **5.5.3. Avaliação da expressão de interleucina-6 (IL-6)**

A expressão do gene inflamatório IL-6 em células saudáveis e senescentes expostas aos estímulos de LPS e IFN- $\gamma$  foi avaliada após 24h de incubação (Figuras 10 e 12). Observou-se uma maior expressão do gene pelas células saudáveis estimuladas com LPS e uma diminuição desta expressão, pelas células saudáveis estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$ , em relação ao grupo não senescente ( $p < 0,05$ , Figura 10A). O aumento da expressão gênica também foi observado no grupo de células senescentes em relação ao grupo de células saudáveis, na ausência de estímulo inflamatório ( $p < 0,05$  Figura 10C).

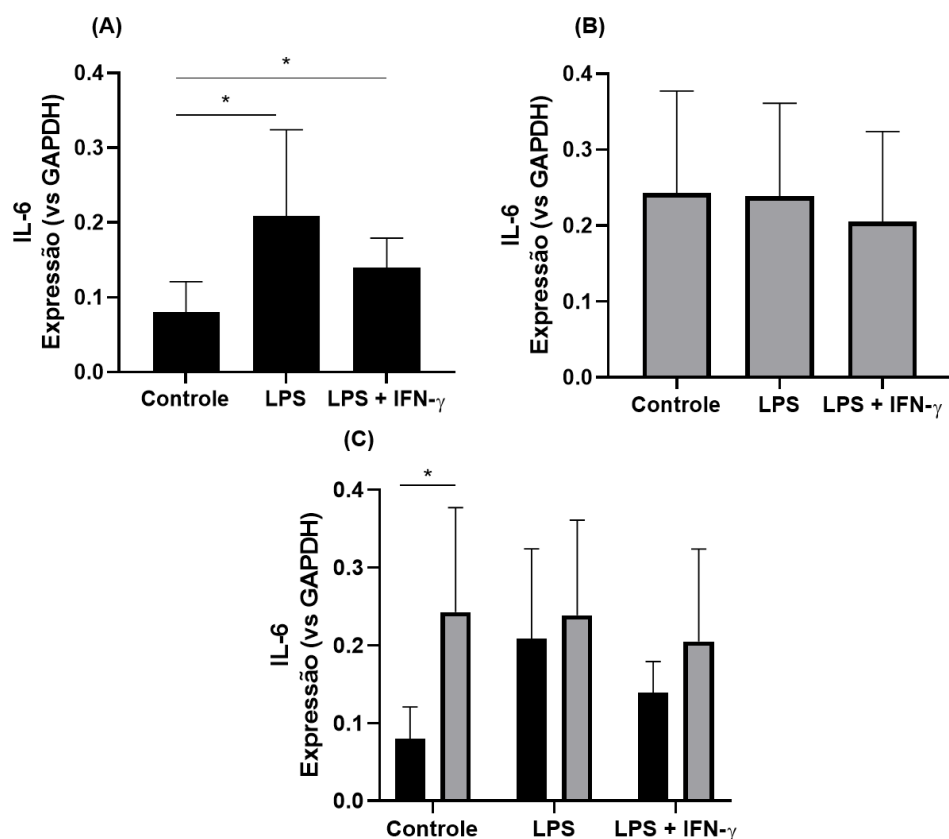


Figura 10: (A) Expressão do gene IL-6 nas amostras de culturas de células pulpares primárias saudáveis estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  (1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), após 24h de incubação. (B) Expressão de IL-6 nas amostras de células pulpares primárias senescentes nas mesmas condições. (C) Análise comparativa da expressão de IL-6 nas amostras de células pulpares primárias saudáveis e senescentes. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \* $p < 0,05$  representam diferença estatística verificada pelo teste *two-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

#### **5.5.4. Avaliação da expressão do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1)**

A expressão do gene TGF- $\beta$ 1 por células saudáveis e senescentes expostas aos estímulos de LPS e IFN- $\gamma$  foi avaliada após 24h de incubação (Figuras 11 e 12). Observou-se uma redução na expressão do gene no grupo não senescente, quando as culturas foram estimuladas com LPS e um aumento na expressão gênica quando as culturas foram estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$ , em relação ao grupo não senescente (\* $p \leq 0,05$ , Figura 11A). De forma semelhante, em células senescentes, também foi observada redução na expressão gênica nas culturas estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$ , em relação ao grupo não senescente (\* $p \leq 0,05$ , Figura 11B). Em adição, houve uma redução na expressão do gene em células senescentes em todas as situações experimentais testadas, quando comparado as culturas de células saudáveis (\* $p \leq 0,05$ , Figura 11C).

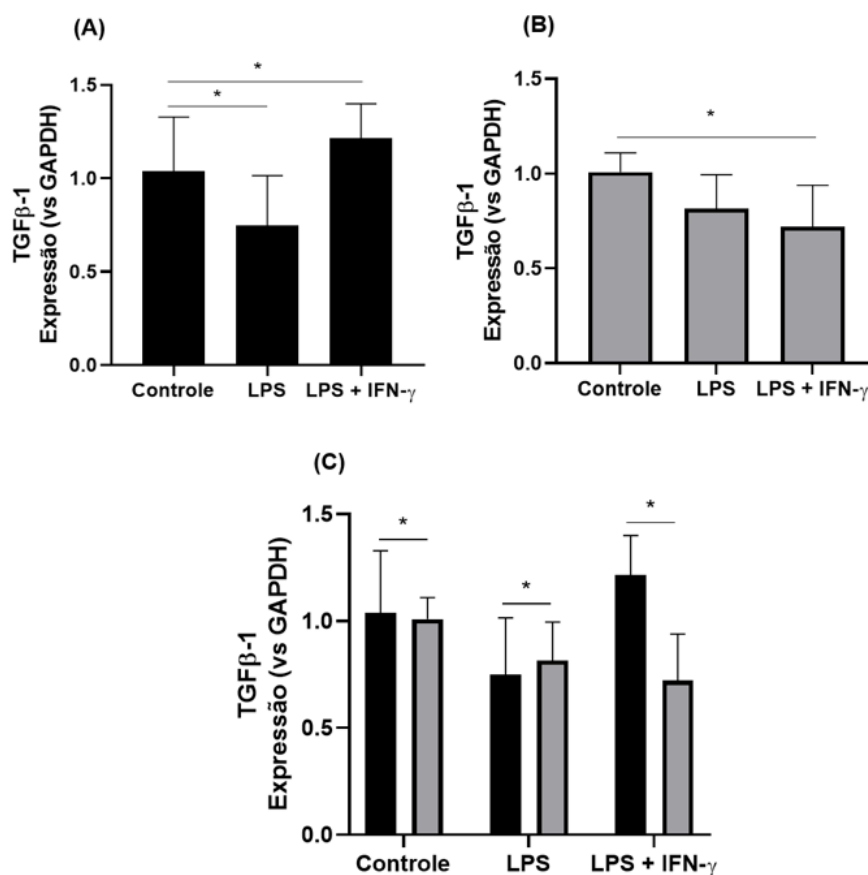


Figura 11: (A) Expressão do gene TGF-β1 nas amostras de culturas de células pulpares primárias saudáveis estimuladas com LPS e IFN-γ (1 μg.mL<sup>-1</sup>), após 24h de incubação. (B) Expressão de TGF-β1 nas amostras de células pulpares primárias senescentes nas mesmas condições. (C) Análise comparativa da expressão TGF-β1 nas amostras de células pulpares primárias saudáveis e senescentes. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \*p<0,05 representa diferença estatística verificada pelo teste *two-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

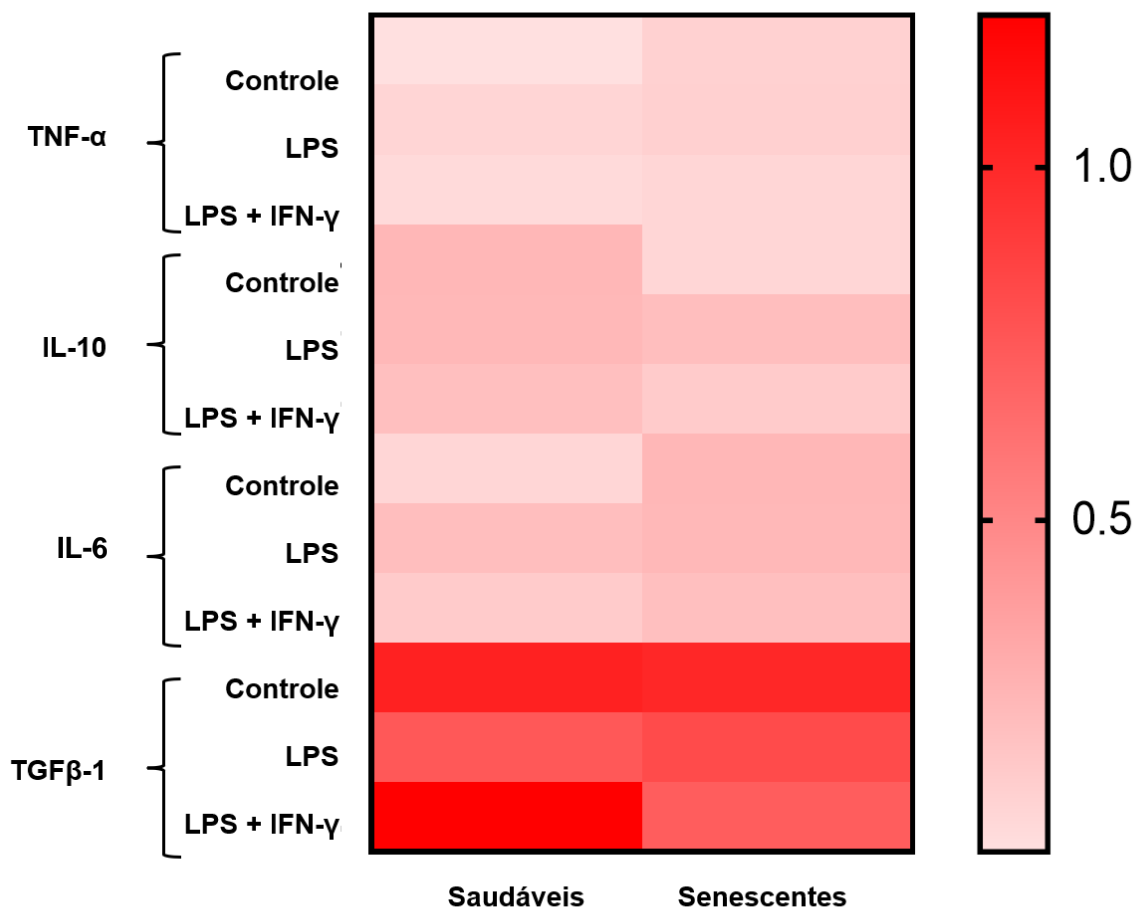


Figura 12: *Heatmap* indicando a variação do nível de expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ 1 por células da polpa dentária humana em estado proliferativo e senescente nas diferentes condições inflamatórias *in vitro*: estímulo com LPS ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com e sem IFN- $\gamma$  ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A preservação da saúde do tecido pulpar é primordial para a manutenção das funções do complexo dentino-pulpar como capacidade formadora, nutritiva, defensiva e sensorial (15). Ao longo da vida do paciente, diferentes estímulos orais podem levar a alterações no tecido pulpar, como a ocorrência de cárie, realização de restaurações, doença periodontal, traumatismos dentais, trauma oclusal, dentre outros (15,43,44). Todos estes exemplos podem levar a alterações pulpares, culminando na senescência deste tecido. A senescência celular é caracterizada por uma parada irreversível no ciclo celular, além de alterações morfológicas, metabólicas, lisossomais, e nos fatores de secreção (45). Assim, uma polpa senescente apresenta alterações em suas funções defensivas e sensoriais, fatores essenciais para o sucesso de tratamentos endodônticos conservadores (46).

Sabe-se que frente a estímulos externos, a polpa dentária é o tecido que apresenta capacidade de defesa (47). Essas reações de defesa pulpar podem culminar em uma resposta regressiva ou uma resposta inflamatória, a depender da intensidade e duração do estímulo, e da situação clínica do tecido pulpar e órgão dental. As reações inflamatórias pulpares culminam nos quadros clínicos de pulpíte, que na grande maioria dos casos, inviabilizam a realização de um tratamento conservador. Já as alterações regressivas são caracterizadas pela formação de nódulos pulpares, calcificações difusas e reabsorções externas e internas (47,48).

Dessa forma, para que um tratamento conservador culmine em sucesso é necessário o equilíbrio das respostas de defesa do tecido pulpar, para que a regeneração e o reparo do complexo dentino-polpa ocorram (46). Os eventos de migração celular, proliferação, diferenciação de células especializadas estão relacionados ao processo de resposta imunoinflamatória e devem ocorrer de maneira eficaz e controlada para o sucesso do tratamento endodôntico conservador (49). Dessa forma, pode-se afirmar que as células da polpa dentária precisam estar em um estado de saúde para desempenhar suas funções de defesa (46). Porém, diferentes situações clínicas podem levar a senescência

celular, podendo afetar o desempenho das defesas pulpares, muitas vezes comprometendo o sucesso clínico de procedimentos endodônticos conservadores.

Desta forma, para melhor entendimento das alterações ocasionadas pela senescência nas células da polpa dentária humana, um modelo de senescência foi estabelecido. Neste modelo, a indução da senescência celular foi estabelecida pelo uso da doxorrubicina. A doxorrubicina é um agente antineoplásico bem estabelecido na literatura como agente indutor da senescência, sendo utilizada como protocolo de indução em diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos (50) e células pulpares (38). Assim, em nosso modelo experimental, a doxorrubicina diluída em meio de cultura celular foi utilizada como agente indutor da senescência em culturas de células primárias pulpares humanas.

Para a confirmação da indução do processo de senescência o ensaio de  $\beta$ -galactosidase foi realizado nas culturas, após 7 dias, por ser a coloração mais bem descrita para análise de senescência (51,52). Alguns estudos utilizam essa metodologia apenas para observação visual das células coradas (52), outros estudos utilizam a contagem das células coradas para comparação entre os estados celulares (53). Um estudo sugeriu, para fibroblastos, o valor de 80% de células coradas como indicador de senescência em cultura (54). Neste estudo, quase 99% das células após indução da senescência apresentaram aumento da atividade da  $\beta$ -galactosidase nos lisossomos, em relação as culturas não senescentes.

Além do aumento da atividade da  $\beta$ -galactosidase, diversas outras características são relacionadas a células senescentes e frequentemente usadas para identificá-las, como mudanças na morfologia celular (55). As células senescentes são normalmente aumentadas, achatadas, multinucleadas e vacuolizadas (56). Nesse trabalho, por meio de fotografias obtidas por MEV foi possível analisar quantitativamente dois critérios de alteração morfológica. Em relação ao tamanho celular, foi observado que as células senescentes se apresentavam maiores, em comparação com as células saudáveis, confirmando mais um parâmetro das características de senescência, já estabelecido na literatura. Em adição, foi observado um menor número de prolongamentos



celulares nas culturas senescentes em comparação com as culturas não senescentes. Sabe-se que as extensões celulares desempenham um papel importante em vários processos fundamentais, incluindo remodelação regulatória da matriz (57) e cicatrização de feridas (58), indicando uma possível redução nas funções das células senescentes. Porém, mais estudos são necessários acerca das consequências dessas alterações morfológicas, tanto relacionadas ao tamanho celular aumentado, quanto a diminuição das extensões celulares, pois o significado e as consequências funcionais dessas alterações ainda não foram completamente esclarecidos.

Outro ponto de grande importância para o reparo tecidual, é a capacidade proliferativa e migratória (49). Nesse estudo foi observado que as células senescentes proliferaram menos do que as células saudáveis, após 48 horas, demonstrando uma redução na capacidade proliferativa. Sabe-se que a senescência é caracterizada por uma parada irreversível no ciclo celular e a redução na capacidade proliferativa é uma das marcas típicas desse estado (1). Fato também observado previamente em culturas de células-tronco da polpa dentária em estado de senescência (59). Da mesma forma, também foi observado que as células senescentes apresentaram menor potencial migratório que as células saudáveis. Em adição, um estudo realizado com células tronco da polpa dentária de pacientes entre 12-16 e 50-65 anos de idade demonstrou uma redução na capacidade migratória relacionada a senescência (60), corroborando os resultados obtidos nesse trabalho.

Considerando a importância dos eventos relacionados a resposta imune da polpa dentária e as alterações imunomodulatórias já observadas em células senescentes esse trabalho avaliou a expressão das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, 1L-10 e TGF- $\beta$ 1. A análise da expressão destes mediadores foi avaliada após o estabelecimento de simulação inflamatória *in vitro*, com estímulos de LPS com e sem IFN- $\gamma$ . O LPS é uma molécula que se encontra abundantemente na membrana externa das bactérias gram-negativas e possui envolvimento no processo inflamatório por meio da promoção de respostas biológicas (61). Já o IFN- $\gamma$  estimula redes intra e intercelulares a fim de regular a imunidade inata e adquirida além de regular positivamente uma variedade de parâmetros pró-inflamatórios (62). Esses estímulos foram escolhidos por simularem uma

condição clássica de resposta ao processo inflamatório, situações já simuladas previamente em outros estudos *in vitro* (63–65).

Já foi relatado que os estímulos microbianos ou de trauma induzem a liberação de TNF- $\alpha$ , uma citocina considerada como marcador de inflamação precoce (66). Em adição o TNF- $\alpha$  também está relacionado ao *inflammaging* e a um aumento constante da resposta inflamatória basal (8). Da mesma forma, também já foi relatado um aumento na expressão de TNF- $\alpha$ , relacionado ao envelhecimento de células dendríticas (67). Corroborando aos resultados já relatados na literatura nesse estudo foi observado um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  em células pulpares senescentes em relação ao grupo não senescente. Porém, em situação simulada de uma resposta imunoinflamatória (estímulo com LPS e IFN- $\gamma$ ) não foi observada diferença significativa na expressão do gene por células senescentes em relação ao grupo não senescente.

A IL-6 é uma citocina relacionada tanto a ações anti-inflamatórias como pró-inflamatórias. Estudos também mostram a IL-6 como protagonista durante a atividade inflamatória crônica, na qual atua como mediadora entre as fases aguda e crônica (68). Em adição, é considerada um dos principais mediadores de resposta do hospedeiro após agressões (8). Estudos já relataram uma maior presença de IL-6 em dentes com cárie profunda em comparação com polpas de dentes hígidos normais (69) e redução da expressão desse gene após tratamento restaurador (70). Em relação a senescência, essa citocina está associada a produção de proteína C reativa contribuindo para um perfil inflamatório (8). Neste estudo foi observado uma maior expressão do gene em células senescentes em relação ao grupo não senescente, sugerindo um perfil inflamatório exacerbado. Este resultado corrobora com os quadros de “*inflammaging*”, no qual a expressão da citocina IL-6 também está aumentada (71). Porém não foi observada diferença significativa entre células senescentes e saudáveis nos grupos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ .

Por outro lado, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória clássica e está relacionada a regulação da integridade e homeostase tecidual, reduzindo a inflamação e atuando no reparo tecidual (72). Sua ação em resposta a inflamação ocorre por meio de uma sinalização que inibe a produção de citocinas

inflamatórias, fatores estimuladores de colônias e várias quimiocinas em monócitos e macrófagos (72). Neste estudo foi possível observar um aumento dessa citocina em células saudáveis no grupo em que foi simulada uma situação infecciosa, ou seja, após o estímulo com LPS. Esse resultado corrobora com a função da citocina devido a sua ação anti-inflamatória. Em adição, foi observada uma redução na expressão quando comparada a expressão por células senescentes em relação a células saudáveis, sugerindo uma supressão na resposta anti-inflamatória das células senescentes. Essa diminuição na expressão da citocina anti-inflamatória também corrobora com o quadro de “*inflammaging*” (71). Este fato sugere um restabelecimento do equilíbrio da resposta inflamatória mais lento nas células senescentes o que possivelmente em um contexto de tratamento conservador, afetaria o prognóstico do tratamento.

Caminhando no processo de reparo, o TGF- $\beta$  é uma molécula sinalizadora que induz a proliferação celular, diferenciação celular, quimiotaxia em monócitos e células epiteliais, mesenquimais e neuronais (73). Em adição é considerado um potente regulador de respostas pró-inflamatórias e reações defensivas do complexo dentina-polpa (74). Um estudo demonstrou um efeito positivo do TGF- $\beta$ 1 na proliferação e ciclo celular (75). Neste trabalho foi possível observar uma redução na expressão de TGF- $\beta$ 1 quando comparada a expressão por células senescentes em relação a células saudáveis, incluindo os grupos experimentais contendo LPS e IFN- $\gamma$ , esse resultado corrobora com a redução do potencial proliferativo e de diferenciação. Este fato também pode contribuir negativamente para o sucesso de procedimentos endodônticos conservadores realizados em uma polpa senescente.

Assim, este trabalho demonstrou que as células dentárias pulpare humanas em estado de senescência celular apresentam alterações relacionadas a morfologia, além de uma redução na capacidade de proliferação e migração. Em adição, notou-se um aumento da expressão de genes relacionados a inflamação e redução nos genes anti-inflamatórios, sugerindo uma situação inflamatória exacerbada associada a imunossupressão. Dessa forma, pode-se inferir que possivelmente há um declínio geral das funções celulares do tecido pulpar dentário o que possivelmente pode afetar tratamentos clínicos

conservadores. Entretanto, limitações podem ser observadas neste estudo, além das limitações por se tratar de um trabalho *in vitro* a análise da expressão gênica para TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 não demonstrou diferença estatística entre os grupos que simularam uma situação inflamatória por meio dos estímulos com LPS e IFN- $\gamma$ . Sendo assim, considerando essas limitações e uma vez que existem outras possíveis alterações relacionadas a senescência em células pulpares, novos estudos são necessários.

A temática de senescência pulpar não é um assunto com um volume grande de informações na literatura. Em uma busca no *Pubmed* relacionando os termos: senescência em células pulpares, observamos apenas 30 estudos (busca realizada em: 23/11/2022). Desta forma, pouco se sabe sobre como os efeitos agressores pulpares se relacionam aos processos de senescência e como estas alterações celulares podem repercutir ao longo das respostas pulpares em procedimentos endodônticos conservadores. De forma semelhante, pouco se sabe sobre os processos de senescência em células do ligamento periodontal ou células da papila apical que também podem ter repercussões em processos cicatriciais do periodonto apical ou lateral, assim como em procedimentos endodônticos regenerativos. Assim, este trabalho deu início a uma linha de pesquisa no nosso laboratório, relacionada aos efeitos da senescência em diferentes células do elemento dental e da importância de se desenvolver estratégias para controle deste processo ao longo do tempo. Desta forma, as perspectivas do trabalho estão relacionadas ao melhor entendimento das alterações causadas pela senescência celular em todos os tecidos dentários e possíveis consequências em tratamentos clínicos, além do desenvolvimento de métodos para prevenir esse estado celular.

## 7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- A senescência celular está relacionada a uma alteração da morfologia de células pulpareas, aumentando o tamanho celular e reduzindo o número de prolongamentos celulares.
- A capacidade de proliferação e de migração celular se apresentou reduzida em células senescentes da polpa dentária.
- Observou-se um aumento na expressão das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 por células senescentes e uma redução na expressão da citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ 1 por células senescentes.
- As situações experimentais envolvendo uma situação inflamatória não demonstraram diferença estatística significativa.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Campisi J, D'Adda Di Fagagna F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. Vol. 8, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. p. 729–40.
2. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Molecular Cell Biology*. 2000;1:72–6.
3. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
4. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. Vol. 28, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 436–53.
5. 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.
6. Ohtani N. Deciphering the mechanism for induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP) and its role in aging and cancer development. *J Biochem* [Internet]. 2020; Available from: <https://academic.oup.com/jb/advance-article-abstract/doi/10.1093/jb/mvz055/5531459>
7. Lee S, Lee JS. Cellular senescence: a promising strategy for cancer therapy. 2008;31(2):276–9.
8. Rodrigues LP, Teixeira VR, Alencar-Silva T, Simonassi-Paiva B, Pereira RW, Pogue R, et al. Hallmarks of aging and immunosenescence: Connecting the dots. Vol. 59, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd; 2021. p. 9–21.
9. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. Vol. 22, *Transplant International*. 2009. p. 1041–50.

10. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. Vol. 39, *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc.; 2004. p. 687–99.
11. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, de Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244–54.
12. Candore G, Caruso C, Colonna-Romano G. Inflammation, genetic background and longevity. Vol. 11, *Biogerontology*. 2010. p. 565–73.
13. Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. Vol. 102, *Mechanisms of Ageing and Development*. 1998.
14. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. Vol. 69, *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. Oxford University Press; 2014. p. S4–9.
15. Yu C, Abbott P v. An overview of the dental pulp: Its functions and responses to injury. *Aust Dent J*. 2007;52(1 SUPPL.):S4–6.
16. Iezzi I, Mattioli Belmonte M, Licini C, Lucarini G, Cerqueni G. Dental pulp stem cells senescence and regenerative potential relationship. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):7186–97.
17. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(4):474–82.
18. Dzeletovic B, Stratimirovic DJ, Stojic D, Djukic LJ. Linear and nonlinear analysis of dental pulp blood flow oscillations in ageing. *Int Endod J*. 2020 Aug 1;53(8):1033–9.
19. Carvalho TS, Lussi A. Age-related morphological, histological and functional changes in teeth. Vol. 44, *Journal of Oral Rehabilitation*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 291–8.
20. Abou-Rass M. The stressed pulp condition: An endodontic-restorative diagnostic concept.

21. Maeda H. Aging and Senescence of Dental Pulp and Hard Tissues of the Tooth. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
22. Asghari M, Nasoohi N, Hodjat M. High glucose promotes the aging of human dental pulp cells through Wnt/beta-catenin signaling. *Dent Med Probl*. 2021;58(1):39–46.
23. Feng X, Feng G, Xing J, Shen B, Tan W, Huang D, et al. Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs). *Cell Tissue Res*. 2014;356(2):369–80.
24. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. Vol. 5, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010. p. 99–118.
25. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Vol. 65, *Acta Odontologica Scandinavica*. 2007. p. 1–13.
26. Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M, Simunovic-Soskic M. Detection of Tumor Necrosis Factor in Normal and Inflamed Human Dental Pulps. Vol. 33, *Archives of Medical Research*. 2002.
27. Lee YH, Kim GE, Cho HJ, Yu MK, Bhattarai G, Lee NH, et al. Aging of in vitro pulp illustrates change of inflammation and dentinogenesis. *J Endod* [Internet]. 2013;39(3):340–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.10.031>
28. Kumei Y, Akiyama H, Onizuka T, Kobayashi C. Variation of telomeric DNA content in gingiva and dental pulp. *Arch Oral Biol*. 2011 Dec;56(12):1641–5.
29. Takasaki T, Tsuji A, Ikeda N, Ohishi M. Age estimation in dental pulp DNA based on human telomere shortening. *Int J Legal Med*. 2003 Aug;117(4):232–4.



30. Tejasvi MLA, CK AA, Reddy ER, Kulkarni P, Bhayya H, Kugaji MS. Individuals Age Determination from Human Dental Pulp Through DNA Analysis by PCR. *Glob Med Genet*. 2021 Jun;08(02):057–61.
31. Youp Ok C, Park S, Jang HO, Takata T, Lee OH, Bae MK, et al. FK866 Protects Human Dental Pulp Cells against Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence Citation. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/antiox>
32. Ok CY, Park S, Jang HO, Takata T, Bae MK, Kim YD, et al. Visfatin Induces Senescence of Human Dental Pulp Cells. *Cells*. 2020 Jan 12;9(1).
33. Shiba H, Mouri Y, Komatsuzawa H, Mizuno N, Xu W, Noguchi T, et al. Enhancement of alkaline phosphatase synthesis in pulp cells co-cultured with epithelial cells derived from lower rabbit incisors. *Cell Biol Int*. 2003 Oct 1;27(10):815–23.
34. Iezzi I, Cerqueni G, Licini C, Lucarini G, Mattioli Belmonte M. Dental pulp stem cells senescence and regenerative potential relationship. *J Cell Physiol*. 2019 May 1;234(5):7186–97.
35. Zhai Y, Wei R, Liu J, Wang H, Cai W, Zhao M, et al. Oncotarget 7276 [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget) Drug-induced premature senescence model in human dental follicle stem cells [Internet]. Vol. 8, *Oncotarget*. 2017. Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
36. Li L, Zhu YQ, Jiang L, Peng W. Increased autophagic activity in senescent human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2012 Dec;45(12):1074–9.
37. Naz S, Khan FR, Zohra RR, Lakhundi SS, Khan MS, Mohammed N, et al. Isolation and culture of dental pulp stem cells from permanent and deciduous teeth. *Pak J Med Sci*. 2019 Jul 1;35(4):997–1002.
38. Yaghoobi MM, Sheikoleslami M, Ebrahimi M. Effects of hydrogen peroxide, doxorubicin and ultraviolet irradiation on senescence of human dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*. 2020 Sep 1;117.

39. Crowley LC, Marfell BJ, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Jul 1;2016(7):643–6.
40. Cory G. Scratch-wound assay. *Methods in Molecular Biology.* 2011;769:25–30.
41. Boyde A. Scanning electron microscopy of bone. *Methods in Molecular Biology.* 2012;816:365–400.
42. Fisher Scientific - T. TRIzol LS Reagent User Guide - Pub. No. MAN0000806 - Rev. A.0.
43. Yong D, Cathro P. Conservative pulp therapy in the management of reversible and irreversible pulpitis. *Aust Dent J.* 2021;1–11.
44. Jontell M, Ok " T, Dahigren' U, Bergenholtz' G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. 1998.
45. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J.* 2021 Jan 10;288(1):56–80.
46. Yong D, Cathro P. Conservative pulp therapy in the management of reversible and irreversible pulpitis. *Aust Dent J.* 2021 Mar 19;66(S1).
47. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine–Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 2;22(3):1480.
48. Yu C, Abbott P v. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. Vol. 52, S4 *Australian Dental Journal Endodontic Supplement.* 2007.
49. da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J.* 2018 Aug;51(8):829–46.
50. Espitia-Corredor JA, Shamon L, Olivares-Silva F, Rimassa-Taré C, Muñoz-Rodríguez C, Espinoza-Pérez C, et al. Resolvin E1 attenuates doxorubicin-induced cardiac fibroblast senescence: A key role for IL-1 $\beta$ .

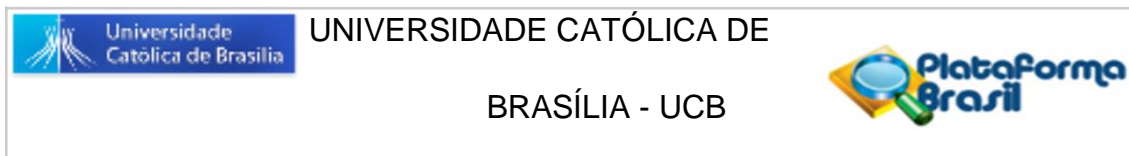
- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2022 Nov;1868(11):166525.
51. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to Detect Biomarkers of Cellular Senescence The Senescence-Associated-Galactosidase Assay.
  52. Dimri GP, Leet X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo (replicative senescence/tumor suppression/18-galactosidase) Communicated by Arthur. *Cell Bioigy*. 1995;92(September):9363–7.
  53. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to Detect Biomarkers of Cellular Senescence. In 2007. p. 21–31.
  54. Itahana K, Itahana Y, Dimri GP. Colorimetric Detection of Senescence-Associated  $\beta$  Galactosidase. In 2013. p. 143–56.
  55. Beck J, Horikawa I, Harris C. Cellular Senescence: Mechanisms, Morphology, and Mouse Models. *Vet Pathol*. 2020 Nov 3;57(6):747–57.
  56. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*. 2018 Apr 2;128(4):1238–46.
  57. Yuda A, Lee WS, Petrovic P, McCulloch CA. Novel proteins that regulate cell extension formation in fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2018 Apr;365(1):85–96.
  58. Gurtner GC, Wong VW. Filamin A Mediates Wound Closure by Promoting Elastic Deformation and Maintenance of Tension in the Collagen Matrix. *Journal of Investigative Dermatology*. 2015 Nov;135(11):2569–71.
  59. Ning T, Shao J, Zhang X, Luo X, Huang X, Wu H, et al. Ageing affects the proliferation and mineralization of rat dental pulp stem cells under inflammatory conditions. *Int Endod J*. 2020 Jan 18;53(1):72–83.
  60. Tian S, Liu Y, Dong F, Dou Y, Li W, Wang J. Knockdown of microRNA-584 promotes dental pulp stem cells proliferation by targeting TAZ. *Cell Cycle*. 2020 May 2;19(9):1048–58.

61. Watanabe S, Inoue J. Intracellular Delivery of Lipopolysaccharide Induces Effective Th1-Immune Responses Independent of IL-12. *PLoS One*. 2013 Jul 17;8(7):e68671.
62. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*. 2004 Dec;202(1):8–32.
63. Hong JH, Kim MR, Lee BN, Oh WM, Min KS, Im YG, et al. Anti-Inflammatory and Mineralization Effects of Bromelain on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation of Human Dental Pulp Cells. *Medicina (B Aires)*. 2021 Jun 8;57(6):591.
64. Liao C, Wang Y, Ou Y, Wu Y, Zhou Y, Liang S. Effects of sclerostin on lipopolysaccharide-induced inflammatory phenotype in human odontoblasts and dental pulp cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019 Dec;117:105628.
65. Dhar R, Kimseng R, Chokchaisiri R, Hiransai P, Utaipan T, Suksamrarn A, et al. 2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcone from *Chromolaena odorata* possesses anti-inflammatory effects via inhibition of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol [Internet]*. 2018;40(1):43–51. Available from: <https://doi.org/10.1080/08923973.2017.1405437>
66. Song F, Sun H, Huang L, Fu D, Huang C. The Role of Pannexin3-Modified Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Repairing Rat Cranial Critical-Sized Bone Defects. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44(6):2174–88.
67. Agrawal A, Gupta S. Impact of aging on dendritic cell functions in humans. *Ageing Res Rev*. 2011 Jul;10(3):336–45.
68. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol*. 2001 Apr;22(4):199–204.
69. ElSalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J*. 2013 Jun;46(6):573–80.

70. Schmidt J, Hübler C, Krohn S, Schmalz G, Schneider H, Berg T, et al. Detection of Inflammatory and Homeostasis Biomarkers after Selective Removal of Carious Dentin—An In Vivo Feasibility Study. *J Clin Med*. 2021 Mar 2;10(5):1003.
71. Minciullo PL, Catalano A, Mandraffino G, Casciaro M, Crucitti A, Maltese G, et al. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016 Apr 12;64(2):111–26.
72. Salminen A. Increased immunosuppression impairs tissue homeostasis with aging and age-related diseases. *J Mol Med*. 2021 Jan 6;99(1):1–20.
73. Niwa T, Yamakoshi Y, Yamazaki H, Karakida T, Chiba R, Hu JCC, et al. The dynamics of TGF- $\beta$  in dental pulp, odontoblasts and dentin. *Sci Rep*. 2018 Dec 13;8(1):4450.
74. Pääkkönen V, Vuoristo J, Salo T, Tjäderhane L. Effects of TGF- $\beta$ 1 on interleukin profile of human dental pulp and odontoblasts. *Cytokine*. 2007 Oct;40(1):44–51.
75. Salkın H, Gönen ZB, Ergen E, Bahar D, Çetin M. Effects of TGF- $\beta$ 1 Overexpression on Biological Characteristics of Human Dental Pulp-derived Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Stem Cells*. 2019 Mar 30;12(1):170–82.

## ANEXOS

### ANEXO I - Parecer Comitê de ética



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFEITOS DA SENESCÊNCIA NA RESPOSTA IMUNE DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS

**Pesquisador:** Taia Maria Berto Rezende

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 45180020.8.0000.0029

**Instituição Proponente:** Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.714.331

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília da estudante Jade Ormondes de Farias sob orientação da professora Taia Maria Berto Rezende.

#### RESUMO

A polpa dentária em condições fisiológicas possui função de defesa, além da sua capacidade de reparo e dos mecanismos importantes nos processos patológicos. Algumas evidências indicam que as alterações decorrentes ao envelhecimento celular podem afetar diretamente a eficiência desses mecanismos. Várias modificações envolvidas no processo de envelhecimento celular podem ser atribuídas à senescência celular, uma resposta biológica que limita a proliferação de células, caracterizado principalmente por um estado permanente de parada do ciclo celular. Como outro fator relacionado ao processo de envelhecimento celular, pode-se citar a autofagia e a apoptose. Nesse sentido, o entendimento das consequências da senescência celular nos mecanismos das células pulpares faz-se necessário. Desta forma, o presente

trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade migratória, imunomodulatória, de auto degradação e morte celular de células pulpare humanas senescentes, em comparação com a resposta de células em estado de proliferação. Os testes de viabilidade serão realizados em células pulpare humanas através do método de MTT e a confirmação da senescência celular será realizada por meio do ensaio de  $\beta$ - galactosidase. Além disso, será avaliada a atividade migratória através do scratch assay, avaliação da proliferação por azul de tripan, a produção de citocinas por meio de ELISA e eventos de autofagia e apoptose através do Western blotting. Os resultados obtidos podem auxiliar no entendimento das alterações imunomodulatórias causados pela senescência em células pulpare, nortendo novas pesquisas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 16 de Maio de 2021

---

**Assinado por:**

**MARCELO HENRIQUE SOLLER RAMADA**

**(Coordenador(a))**

## ANEXO II - Artigo de revisão submetido a Revista *Clinical Oral Investigations*

This is a new page that we are continually improving. [We would love to hear your feedback and suggestions.](#)



Clinical Oral Investigations

[My account](#)

---

### Dental pulp and apical papilla cells senescence: causes, consequences, and prevention

Current status

## We've received your submission and are now running technical checks

We are checking your submission against our journal guidelines and policies. If there is anything we need we will email [taiambr@gmail.com](mailto:taiambr@gmail.com).

### Progress so far

#### Progress so far

1. Submission received - complete
2. Initial technical check - in progress

### Your submission

#### Your submission

Title

Dental pulp and apical papilla cells senescence: causes, consequences, and prevention

Type

Review

Journal

Clinical Oral Investigations

Submission ID

dd4fae0b-a391-4288-a2cc-7a32c332d73c

### Need help?

If you have any questions about this submission, you can email the [Editorial Office](#).

- [Manage cookies / Do not sell my data](#)
- [Help and support](#)
- [Privacy policy](#)
- [Terms and conditions](#)
- [Accessibility statement](#)



Dental pulp and apical papilla cells senescence: causes, consequences, and prevention

Jade Ormondes de Farias<sup>1</sup>, Taia Maria Berto Rezende<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte, Brasília – DF – Brazil.

<sup>2</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01-Brasília – DF – Brazil.

<sup>3</sup> Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SHAN 916 Módulo B Avenida W5 – Asa Norte, Brasília - DF – Brazil.

**\*Corresponding author data:**

Universidade Católica de Brasília

Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia

SGAN 916N – Av. W5 – Campus II – Modulo C, room C-221, Zip code: 70.790-160, Brasília-DF, Brazil

Fone: + 55-61-981349001

e-mail: taiambr@gmail.com

Secondary e-mail: [taia@p.ucb.br](mailto:taia@p.ucb.br)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4148-0659>

ORCID:

Jade Ormondes de Farias: 0000-0001-9347-3330

Taia Maria Berto Rezende: 0000-0002-4148-0659

## ABSTRACT

Dental pulp under physiological conditions has a defense function, repair capacity, and important mechanisms in pathological processes. In addition, the dental papilla is involved in important defense processes and an essential function in the pulp revascularization process. It is known that dental pulp and apical papilla undergo a natural aging process, in addition to stressful situations such as bruxism, inflammation, and infections. Both aging and stressful situations can lead to cellular senescence. Some evidence indicates that the changes resulting from this cellular state can directly affect the efficiency of cells in these tissues and affect conservative and regenerative clinical treatments. Thus, it is necessary to understand the causes and consequences of cellular senescence in addition to the development of methods for senescence prevention. This review aims to provide an overview of possible causes and consequences of senescence in dental pulp and stem cells from apical papilla and discusses possible methods to prevent this cellular state.

Keywords: senescence, pulp cells, apical papilla cells

## INTRODUCTION

Dental pulp and apical papilla cells present important functions for dental health, and their condition makes an essential contribution to the effectiveness of different clinical treatments. Different cells compose the pulp tissue and each one is related to a pulp function. Defense cells (such as T lymphocytes, macrophages, and dendritic cells) are responsible for immunity, participating in the process of phagocytosis of cellular debris and pulp irritants, producing cytokines, growth factors, and acting as presenters of antigens to the other defense cells [1]. On the other hand, fibroblasts are involved in the formation of collagen fibers and pulp tissue matrix proteins [2]. Finally, ectomesenchyme cells can differentiate into adipose, bone, dentin, cartilaginous and nervous tissue [2].

In a healthy pulp situation and in the absence of noxious stimuli, the pulpal defense, sensory and repair functions are on alert but not activated [2]. However, different stimuli can activate a pulp response which may affect the effectiveness of conservative treatments, and even endodontic treatment due to the absence of pulp obliterations and calcifications. In addition, the health of apical papilla may affect the effectiveness of endodontic regenerative therapy [3], since stem cells from apical papilla (SCAPs) act on the formation of dental pulp and root [4]. It has been known that SCAPs present two to three times greater proliferation and differentiation capacity when compared to ectomesenchyme pulp cells [4].

However, cellular senescence can affect all these functions of dental pulp and apical papilla cells. In addition to harming dental health, the senescence of these cells can directly affect the effectiveness of clinical treatments that depend on tissue functionality. Thus, some studies are already under development to prevent or reverse the process of senescence in these cells [5, 6]. As such, this review specifically addresses what is known about the causes and consequences of cellular senescence in these cells, in addition to providing suggestions for prevention or reversal of this process.

## CELLULAR SENESENCE

*Senescence* can be defined as a permanent state of cell cycle arrest, and it is believed to have evolved initially to limit the proliferation of old or damaged cells. However, cellular senescence has been shown to contribute to aging and age-related diseases [7]. The intrinsic and extrinsic mechanisms of cellular senescence are known. Replicative senescence is associated with the cell's replication threshold (Hayflick threshold) and is triggered by telomere shortening. The other pathway, known as stress-induced premature senescence, can be induced by extrinsic stressors such as DNA damage and oxidative stress, bringing about early cell cycle arrest [8].

Typical hallmarks of cellular senescence include increased cell morphology, shortened telomere length, upregulated expression by p21, p16, and p53 genes, high levels of reactive oxygen species, and high senescence associated with  $\beta$ -

galactosidase activity [9]. In addition, senescent cells show altered intracellular protein expression, altered responses to growth factors, and altered secretion profiles, such as the production of pro-inflammatory cytokines, which contribute to aging and the progression of age-related diseases [9].

This cellular state is related to several diseases such as fibrosis, type 2 diabetes, cirrhosis, cardiovascular diseases, osteoarthritis, and kidney dysfunction [10]. Methods of prevention and regulation of this cellular state have also been researched [11]. It is still necessary to understand the senescence process better and explore methods to prevent this state in dental tissue cells.

## SENESCENCE OF DENTAL PULP

Dental pulp undergoes biological and molecular changes with age. These changes include a decrease in pulp size and volume, calcification in pulpal arteries, a reduction in the number of cells [12], a decrease in pulpal blood circulation [13], and a reduction in pulp sensitivity [14]. In addition, stressful situations such as chronic caries, bruxism, traumas from occlusion and cracks in tooth structure have been cited as causes of pulpal stress [15]. These weak and chronic inflammatory conditions might lead to the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors by dental pulp cells, thereby causing senescence alterations (Figure 01) [16].

Senescence caused by age and stressful situations can possibly affect important functions of cells, such as repair and response functions, and may also affect the efficacy of conservative treatments, such as pulp capping. With advancing age, dental pulp cells show reductions in proliferation and alkaline phosphatase activity, thereby indicating impaired restoration of injured pulp tissue [17]. Senescence of dental pulp cells induced by replicative and premature stress shows a decrease in odontogenic markers such as dentin sialophosphoprotein and dentin matrix-1, and osteogenic markers such as bone morphogenetic protein-2 and -7, runt-related transcription factor-2, osteopontin, alkaline phosphatase activity, and mineralized nodule formation. All these facts indicate that a decline in physiological pulp activity impairs age-related changes in dentin

function through senescence as an accumulation of oxidative stress. This process is accompanied by age-related pathologic conditions such as chronic inflammation [18].

Besides repair and response functions, senescence can also affect the protective events of pulp. Different mediators are involved in these protective event[19] among these, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  is an inflammatory cytokine derived from immune cells [1]. It is known that the TNF- $\alpha$  concentration increases in older people's blood, compared to younger ones [20]. A study evaluated the association of TNF- $\alpha$  with odontoblastic differentiation in young and aged pulp cells. This study demonstrated that TNF- $\alpha$  promoted the odontoblastic differentiation of senescent dental pulp cells and suggests that the pulp chamber's calcification with age may be related to increased reactivity of pulp cells to TNF- $\alpha$  [21].

To better understand the mechanism of the ageing process within dental pulp, a study was conducted to establish whether autophagy is involved. Another study demonstrated a relationship between senescence and autophagy in pulp cells. In this study, autophagic protein marker (LC3-P and Beclin 1) expression increased in senescent DPCs compared to young cells, and transmission electron microscopy analysis revealed that senescent DPCs had more autophagic vacuoles [22].

It is known that several pathological and clinical situations can lead to pulp damage, such as inflammation and infection due to the presence of microorganisms or trauma, in addition to iatrogenic events during dental procedures [19, 23]. To date, no study has enumerated the different causes that can progress to a state of pulpal senescence. However, it is possible to assume that senescence reduces dental pulp repair and defense, and that the aging process could affect nutritional and vascularization capacity. Nonetheless, no studies report the influences of senescence on necrosis, apoptosis, or the immunomodulatory and sensory capacity of the dental pulp. Therefore, a better understanding of cellular senescence and its causes and consequences in the pulp environment is necessary. It may contribute to the future development of therapeutic strategies that enable improvements in the quality of dental treatments and prevention of senescence throughout life.

## SENESCENCE AND APICAL PAPILLA

Conservative therapies, such as regenerative therapy that recovers the dentin-pulp complex, are increasingly attracting attention in endodontics [3, 24, 25]. Recent developments in tissue engineering have enabled researchers to shed light on the process of dentin-pulp regeneration, which involves the use of stem cells [26]. Stem cells from the apical papilla (SCAP), a group of dental stem cells related to developing roots, have been shown to be a promising tool for regenerative endodontic procedures and regeneration in general [27]. However, senescence is a barrier in this treatment [28, 29].

The function and proliferative potential of stem cells declines with age [30] besides exhibiting typical senescence features such as enlarged cell shape, decreased proliferation, and decreased differentiation potential [31] (Figure 01). In addition, increases in SA- $\beta$ -gal activity and p16INK4A expression were also noticed in aged stem cells when compared to cells from younger individuals [31]. Aging also affects the ability of stem cells to contribute to mineralization processes. In fact, decreased osteogenic potential was observed in aged human DPSCs [32]. This decrease has been associated with changes in expression of bone-related genes, such as BMP2,  $\beta$ -catenin, RUNX2 and BGLAP [32].

In addition to their important differentiation potential, stem cells have a remarkable capacity for inhibiting the immune response, an activity known generally as immunomodulation or immunoregulation [33]. Recently, a study addressed how cellular senescence influences the therapeutic potential of stem cells, testing their immunoregulatory activity *in vitro* and *in vivo* [34]. Senescence abrogated the stem cells' protective immunoregulatory function effect in a mouse model of sepsis [34].

In this way, for an effective therapeutic alternative based on stem cells, like regenerative therapies, proper cell migration is crucial [35]. However, a study shows that a migratory defect in senescent stem cells was associated with their altered immunomodulation ability [35]. Thus, it can be said that senescence

affects the immunomodulatory capacity, migration capacity and proliferation of stem cells. These are essential functions for adequate regenerative therapy. Therefore, further studies are needed to understand the causes of senescence, as well as studies to prevent senescence in these cell types.

## PREVENTION OF CELLULAR SENESCENCE

Senescence caused by aging and stress is harmful to several cellular functions of the dental pulp and apical papilla, impairing their main functions (Figure 01). Studies have been successfully developed in different tissues of the human body, through different mechanisms, to prevent or attenuate this cellular state (Table 01).

Deferoxamine mesylate was shown to be effective in reversing the senescence of bone marrow stromal cells in rats [36]. This was stated due to decreased levels of  $\beta$ -galactosidase, reduced levels of ROS and reduced levels in the expression of stemness/senescence-associated genes after treatment [36]. Similarly, YAP1-gene knockdown inhibits alveolar-epithelial-cell senescence, as determined by  $\beta$ -galactosidase staining, and alleviates Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) in mice. This reduction alleviated the clinical symptoms of IPF mice, as determined by body weight and lung index [37].

Cellular senescence is harmful to dental tissues and can be a barrier to conservative treatments. Because of this, some studies have been conducted with the objective of preventing, reversing, or attenuating cellular senescence in these tissues. A study shows that TGF- $\beta$ 1 transfection has a positive effect on proliferation and the cell cycle, and prevents cellular senescence and apoptosis in dental pulp-derived mesenchymal stromal cells [38]. In addition, visfatin-induced senescence was associated with both the induction of telomere damage and the upregulation of senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors as well as NF- $\kappa$ B activation, which were all inhibited by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor (FK866) in dental pulp cells [39]. In dental pulp stem cells, it was demonstrated that the depletion of MSX2 inhibits

senescence and restores their self-renewal capacity, demonstrating the vital role of the MSX2 axis in the regulation of DPSC senescence, thereby revealing a potential target for antagonizing DPSC aging [40].

Likewise, some substances have been tested for the same purpose. Vitamin C treatment maintained a slender morphology, higher growth rate and migration capacity, stemness, and osteogenic differentiation capability of periodontal ligament stem cells *in vitro* [5]. This study also identified that Vitamin C treatment alleviated senescence through inhibition of Notch3[5]. Also in periodontal ligament stem cells, melatonin supplementation restored senescent cells to a younger state and restored autophagy [6]. This study affirmed this rejuvenation by reduced levels of  $\beta$ -galactosidase and senescence-associated proteins p16, p21, p53 in an *ex vivo* model [6].

So, these studies can be the basis for the development of new agents or products applied clinically, which will be useful to prevent or attenuate senescence.

## CONCLUSION

This review provided an overview of the findings regarding the senescence of dental pulp and apical papilla cells, in addition to making suggestions to prevent or reverse this cellular state. Even though studies have advanced to research related to the prevention of senescence, there are still few studies establishing causes and consequences of senescence in the dental papilla and pulp. Even so, development and clinical application of products to prevent or reverse senescence are extremely attractive approaches. Consequently, the prevention of pulp and apical papilla senescence is essential to preserve the damage to these tissues and enable the effectiveness of conservative treatments.



## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (409196/2018–5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) (00193–00000782/2021-63 e 00193-00000229/2021-21).

## REFERENCES

- [1] M. Jontell, "T Ok, U. Dahigren', and G. Bergenholtz', "Immune defense mechanisms of the dental pulp," 1998.
- [2] C. Yu and P. v Abbott, "An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury," 2007.
- [3] P. R. de S. Araújo *et al.*, "Pulp Revascularization: A Literature Review," *Open Dent J*, vol. 10, no. 1, pp. 48–56, Feb. 2017, doi: 10.2174/1874210601711010048.
- [4] V. Petrovic and V. Stefanovic, "Dental tissue - New source for stem cells," *TheScientificWorldJournal*, vol. 9, pp. 1167–1177, Oct. 14, 2009. doi: 10.1100/tsw.2009.125.
- [5] Y. Yang *et al.*, "Vitamin C alleviates the senescence of periodontal ligament stem cells through inhibition of Notch3 during long-term culture," *J Cell Physiol*, vol. 236, no. 2, pp. 1237–1251, Feb. 2021, doi: 10.1002/jcp.29930.
- [6] Y. Z. Tan *et al.*, "Melatonin induces the rejuvenation of long-term ex vivo expanded periodontal ligament stem cells by modulating the autophagic process," *Stem Cell Res Ther*, vol. 12, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/s13287-021-02322-9.
- [7] S. Lee and J.-S. Lee, "Cellular senescence: a promising strategy for cancer therapy," vol. 31, no. 2, pp. 276–279, 2008.
- [8] D. Weiskopf, B. Weinberger, and B. Grubeck-Loebenstein, "The aging of the immune system," *Transplant International*, vol. 22, no. 11, pp. 1041–1050, Nov. 2009. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x.
- [9] W. S. Toh *et al.*, "Cellular senescence in aging and osteoarthritis: Implications for cartilage repair," *Acta Orthop*, vol. 87, pp. 6–14, Dec. 2016, doi: 10.1080/17453674.2016.1235087.
- [10] D. McHugh and J. Gil, "Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues," *Journal of Cell Biology*, vol. 217, no. 1. Rockefeller University Press, pp. 65–77, Jan. 01, 2018. doi: 10.1083/jcb.201708092.

- [11] L. Roger, F. Tomas, and V. Gire, "Mechanisms and regulation of cellular senescence," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 23. MDPI, Dec. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms222313173.
- [12] P. E. Murray, H. R. Stanley, J. B. Matthews, A. J. Sloan, and A. J. Smith, "Age-related odontometric changes of human teeth," *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, vol. 93, no. 4, pp. 474–482, 2002, doi: 10.1067/moe.2002.120974.
- [13] B. Dzeletovic, D. J. Stratimirovic, D. Stojic, and L. J. Djukic, "Linear and nonlinear analysis of dental pulp blood flow oscillations in ageing," *Int Endod J*, vol. 53, no. 8, pp. 1033–1039, Aug. 2020, doi: 10.1111/iej.13306.
- [14] T. S. Carvalho and A. Lussi, "Age-related morphological, histological and functional changes in teeth," *Journal of Oral Rehabilitation*, vol. 44, no. 4. Blackwell Publishing Ltd, pp. 291–298, Apr. 01, 2017. doi: 10.1111/joor.12474.
- [15] M. Abou-Rass, "The stressed pulp condition: An endodontic-restorative diagnostic concept."
- [16] H. Maeda, "Aging and Senescence of Dental Pulp and Hard Tissues of the Tooth," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8. Frontiers Media S.A., Nov. 30, 2020. doi: 10.3389/fcell.2020.605996.
- [17] H. Shiba *et al.*, "Enhancement of alkaline phosphatase synthesis in pulp cells co-cultured with epithelial cells derived from lower rabbit incisors," *Cell Biol Int*, vol. 27, no. 10, pp. 815–823, Oct. 2003, doi: 10.1016/S1065-6995(03)00159-8.
- [18] Y. H. Lee *et al.*, "Aging of in vitro pulp illustrates change of inflammation and dentinogenesis," *J Endod*, vol. 39, no. 3, pp. 340–345, 2013, doi: 10.1016/j.joen.2012.10.031.
- [19] K. M. Galler, M. Weber, Y. Korkmaz, M. Widbiller, and M. Feuerer, "Inflammatory response mechanisms of the dentine–pulp complex and the periapical tissues," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 3. MDPI AG, pp. 1–23, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms22031480.
- [20] L. Rink, I. Cakman, and H. Kirchner, "Altered cytokine production in the elderly," 1998.
- [21] A. Nozu *et al.*, "Senescence and odontoblastic differentiation of dental pulp cells," *J Cell Physiol*, vol. 234, no. 1, pp. 849–859, 2018, doi: 10.1002/jcp.26905.
- [22] L. Li, Y. Q. Zhu, L. Jiang, and W. Peng, "Increased autophagic activity in senescent human dental pulp cells," *Int Endod J*, vol. 45, no. 12, pp. 1074–1079, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02064.x.
- [23] L. Bjørndal, S. Simon, P. L. Tomson, and H. F. Duncan, "Management of deep caries and the exposed pulp," *International Endodontic Journal*, vol. 52, no. 7. Blackwell Publishing Ltd, pp. 949–973, Jul. 01, 2019. doi: 10.1111/iej.13128.
- [24] F. Banchs and M. Trope, "Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol?," *J Endod*, vol. 30, no. 4, pp. 196–200, 2004, doi: 10.1097/00004770-200404000-00003.
- [25] K. Reynolds, J. D. Johnson, and N. Cohenca, "Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspids using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: A

case report," *Int Endod J*, vol. 42, no. 1, pp. 84–92, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01467.x.

[26] D. Tzifas and K. Kodonas, "Differentiation Potential of Dental Papilla, Dental Pulp, and Apical Papilla Progenitor Cells," *Journal of Endodontics*, vol. 36, no. 5, pp. 781–789, May 2010. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.006.

[27] O. A. Nada and R. M. el Backly, "Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 6. Frontiers Media S.A., Jul. 24, 2018. doi: 10.3389/fbioe.2018.00103.

[28] M. M. Bonab, K. Alimoghaddam, F. Talebian, S. H. Ghaffari, A. Ghavamzadeh, and B. Nikbin, "Aging of mesenchymal stem cell in vitro," *BMC Cell Biol*, vol. 7, Mar. 2006, doi: 10.1186/1471-2121-7-14.

[29] C. Morsczech, "Cellular senescence in dental pulp stem cells," *Archives of Oral Biology*, vol. 99. Elsevier Ltd, pp. 150–155, Mar. 01, 2019. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.012.

[30] A. S. I. Ahmed, M. H. Sheng, S. Wasnik, D. J. Baylink, and K.-H. W. Lau, "Effect of aging on stem cells," *World J Exp Med*, vol. 7, no. 1, p. 1, 2017, doi: 10.5493/wjem.v7.i1.1.

[31] X. Feng *et al.*, "P16INK4A mediates age-related changes in mesenchymal stem cells derived from human dental pulp through the DNA damage and stress response," *Mech Ageing Dev*, vol. 141–142, pp. 46–55, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.mad.2014.09.004.

[32] I. Iezzi, M. Mattioli Belmonte, C. Licini, G. Lucarini, and G. Cerqueni, "Dental pulp stem cells senescence and regenerative potential relationship," *J Cell Physiol*, vol. 234, no. 5, pp. 7186–7197, 2019, doi: 10.1002/jcp.27472.

[33] F. Gao *et al.*, "Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects," *Cell Death and Disease*, vol. 7, no. 1. Nature Publishing Group, 2016. doi: 10.1038/cddis.2015.327.

[34] X. Y. Sun *et al.*, "Efficacy of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: A meta-analysis of preclinical studies," *Stem Cell Res Ther*, vol. 11, no. 1, Jun. 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01730-7.

[35] J. Carlos Sepúlveda *et al.*, "Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model," *Stem Cells*, vol. 32, no. 7, pp. 1865–1877, 2014, doi: 10.1002/stem.1654.

[36] L. Yi, Y. Ju, Y. He, X. Yin, Y. Xu, and T. Weng, "Intraperitoneal injection of Desferal® alleviated the age-related bone loss and senescence of bone marrow stromal cells in rats," *Stem Cell Res Ther*, vol. 12, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/s13287-020-02112-9.

[37] W. Xu *et al.*, "Efficacy of YAP1-gene knockdown to inhibit alveolar-epithelial-cell senescence and alleviate Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)," *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 18, pp. 451–459, 2021, doi: 10.21873/CGP.20271.

[38] H. Salkin, Z. B. Gönen, E. Ergen, D. Bahar, and M. Çetin, "Effects of TGF-β1 overexpression on biological characteristics of human dental pulp-derived mesenchymal stromal cells," *Int J Stem Cells*, vol. 12, no. 1, pp. 170–182, 2019, doi: 10.15283/ijsc18051.

- [39] C. Y. Ok *et al.*, “Visfatin Induces Senescence of Human Dental Pulp Cells,” *Cells*, vol. 9, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/cells9010193.
- [40] X. He *et al.*, “ROR2 Downregulation Activates the MSX2/NSUN2/p21 Regulatory Axis and Promotes Dental Pulp Stem Cell Senescence,” *Stem Cells*, vol. 40, no. 3, pp. 290–302, Mar. 2022, doi: 10.1093/stmcls/sxab024.
- [41] Y. Yang *et al.*, “Vitamin C alleviates the senescence of periodontal ligament stem cells through inhibition of Notch3 during long-term culture,” *J Cell Physiol*, vol. 236, no. 2, pp. 1237–1251, Feb. 2021, doi: 10.1002/jcp.29930.
- [42] X. Xu *et al.*, “Adipose Tissue–derived Microvascular Fragments as Vascularization Units for Dental Pulp Regeneration,” *J Endod*, vol. 47, no. 7, pp. 1092–1100, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.joen.2021.04.012.

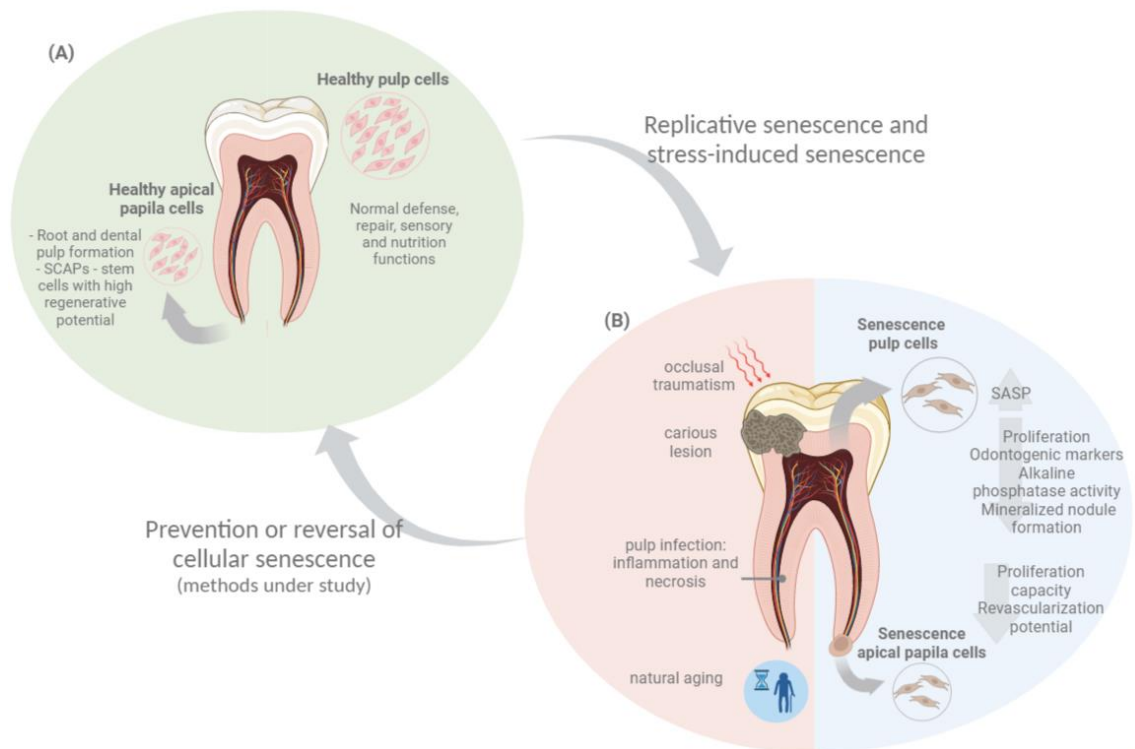


Figure 01: Schematic figure of (A) healthy and (B) senescent dental pulp cells, their causes, and consequences. Created by BioRender.com. SCAPs, stem cells from apical papilla; SASP, senescence-associated secretory phenotype.

Tissue	Method	Reference
Periodontal ligament stem cells	Vitamin C by inhibition of Notch receptor	(Yang et al., 2021)
Dental pulp stem cells	Combination of Adipose tissue–derived microvascular fragments and dental pulp stem cells	(Xu et al., 2021)
Periodontal ligament stem cells	Melatonin supplementation	Tan et al. 2021
Dental pulp-derived mesenchymal stromal cells	TGF- $\beta$ 1 transfection	Salkin et al. 2019
Dental pulp stem cells	Depletion of MSX2	He et al. 2022
Dental pulp cells	Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor (FK866)	Ok et al. 2020

Table 01: References related to proposals to prevent or reverse cellular senescence in different tissues.

## ANEXO III – Participação em demais artigos durante o período de mestrado.

Artigo 1 - Ormondes de Farias J, Resende Ferreira AC, Cardoso Kostopoulos AG, Berto Rezende TM, Dias SC. Synergistic activity and immunomodulatory potential of levofloxacin and Synoeca-MP peptide against multi-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog*. 2022 Feb;163:105403. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105403. Epub 2022 Jan 13. PMID: 35033636.

Microbial Pathogenesis 163 (2022) 105403



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)

## Synergistic activity and immunomodulatory potential of levofloxacin and Synoeca-MP peptide against multi-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*

Jade Ormondes de Farias<sup>a</sup>, Arthur Corrêa Resende Ferreira<sup>b</sup>,  
Alessandra Godoi Cardoso Kostopoulos<sup>c</sup>, Taia Maria Berto Rezende<sup>a,b,d,\*</sup>,  
Simoni Campos Dias<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte, Brasília, DF, Brazil

<sup>b</sup> Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SHAN 916 Módulo B Avenida W5 - Asa Norte, Brasília, DF, Brazil

<sup>c</sup> Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte, Brasília, DF, Brazil

<sup>d</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01, Brasília, DF, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Synoeca-MP  
Antimicrobial peptide  
*Klebsiella pneumoniae*  
Immune system  
Inflammatory mediators

## ABSTRACT

The purpose of this article is to study the isolated and combined effect of the peptides Synoeca-MP and IDR-1018 against multi-resistant clinical isolates of *K. pneumoniae* (Kp2177569 - LACEN) *in vitro*. The bactericidal activity of the peptide Synoeca-MP in combination with three different classes of commercial antimicrobials and its immunomodulatory potential was also evaluated. Synoeca-MP showed better antimicrobial activity than IDR-1018 and presented synergistic action combined with levofloxacin. Therefore, Synoeca-MP and levofloxacin, and the combination of both, were used in subsequent analyses. In the presence of heat-killed antigens, cellular viability and TNF- $\alpha$  levels was maintained, the production of NO increased and a reduction in IL-10 production was observed. The synergistic antibacterial effect between Synoeca-MP and levofloxacin was effective against multidrug-resistant strains of *K. pneumoniae*. The association of Synoeca-MP and levofloxacin may present a low modulating action of pro and anti-inflammatory mediators, based on these results.

## 1. Introduction

*Klebsiella pneumoniae* is a microorganism of great relevance in the clinical context because it presents resistance to several antibiotics, besides possessing the ability to evade the host's immune system [1]. However, *K. pneumoniae* belongs to the human intestinal microflora, respiratory tract, urinary tract, gastrointestinal tract, and other parts. Therefore, when the organism's immunity decreases, an imbalance in bacterial flora happens [2]. In that case, *K. pneumoniae* will cause respiratory, digestive, and urinary tract infections, leading to primary pneumonia, meningitis, peritonitis, traumatic infection, septicemia, and urinary infection [2]. The antibiotic resistance of *K. pneumoniae* strains is associated mainly with the production of extended-spectrum beta-lactamases [3]. In addition, virulence factors are also responsible for bacterial resistance, such as bacterial capsules and lipopolysaccharides (LPS) [4].

Antimicrobial therapy has encountered several barriers, mainly due

to the emergence of multiresistant strains, which reinforces the need for the development of new antimicrobial and adjuvant agents. Within this scenario, immunomodulatory peptides may be an alternative for protecting the host immune system.

Synoeca-MP, extracted from the purified venom of the wasp *Synoeca surinama*, has a molecular mass of 1594.8 Da and is composed of 14 amino acid residues [5]. The peptide also showed inhibitory results like those demonstrated by other mastoparan peptides previously tested against *Candida albicans* [5]. Synoeca-MP demonstrated antibacterial activity against bacterial strains that are resistant and sensitive to antibiotics and demonstrated antimicrobial effectiveness against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Pseudomonas aeruginosa* [5]. In addition, Synoeca-MP was associated with chlorhexidine, boosting the drug's effect [5]. However, in later trials, Synoeca-MP showed marked toxicity in mouse bone marrow-derived osteoclast cells [6]. IDR-1018 is another widely studied antimicrobial peptide. It is a cationic peptide with 12 amino acid residues and a

\* Corresponding author. Universidade Católica de Brasília, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, SGAN 916N - Av. W5 - Campus II - Modulo C, room C-221, Zip code: 70, Brasília, DF, Brazil.

E-mail addresses: [taiambr@gmail.com](mailto:taiambr@gmail.com), [taia@p.ucb.br](mailto:taia@p.ucb.br) (T.M. Berto Rezende).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105403>

Received 28 June 2021; Received in revised form 9 January 2022; Accepted 11 January 2022

Available online 13 January 2022

0882-4010/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Artigo 2 - Farias JO, de Freitas Lima SM, Rezende TMB. Physiopathology of nitric oxide in the oral environment and its biotechnological potential for new oral treatments: a literature review. *Clin Oral Investig*. 2020 Dec;24(12):4197-4212. doi: 10.1007/s00784-020-03629-2. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33057827.

Clinical Oral Investigations  
<https://doi.org/10.1007/s00784-020-03629-2>

REVIEW



## Physiopathology of nitric oxide in the oral environment and its biotechnological potential for new oral treatments: a literature review

Jade Ormondes de Farias<sup>1,2,3</sup> · Stella Maris de Freitas Lima<sup>1,2</sup> · Taia Maria Berto Rezende<sup>1,2,3</sup>

Received: 1 September 2020 / Accepted: 7 October 2020  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

### Abstract

**Objectives** A narrative review on the NO properties and their relationship with the oral environment describing NO's molecular origin, role, and perspectives regarding oral pathological, physiological, and regenerative processes for future applications and possible use as prevention or treatment in dentistry.

**Materials and methods** Pubmed was searched using the word “nitric oxide.” Reviews, clinical studies, and experimental studies were eligible for the screening process. Similar search procedures were then performed with the additional search words “conservative dentistry,” “orthodontics,” “endodontics,” “implants,” “periodontics,” “oral cancer,” “pulp revascularization,” and “oral surgery.” Furthermore, references of included articles were examined to identify further relevant articles.

**Results** There is a relationship between NO production and oral diseases such as caries, periodontal diseases, pulp inflammation, apical periodontitis, oral cancer, with implants, and orthodontics. Studies on this relationship and uses of NO, in diagnosis, prevention, and treatment, are being developed. Also, some NO and oral cavity patents have already registered.

**Conclusions** The understanding of how NO can interfere in oral health maintenance or disease processes can contribute to elucidate the disease development and optimize treatment approaches.

**Clinical relevance** NO has considerable biotechnological potential and can contribute to improving diagnostics and treating the oral environment. As a biomarker, NO has an important role in the early diagnosis of diseases. Regarding treatments, NO can possibly be used as a regulator of inflammation, anti-biofilm action, replacing antibiotics, inducing apoptosis of cancerous cells, and contributing to the angiogenesis. All these studies are initial considerations regarding the relationship between NO and dentistry.

**Keywords** Nitric oxide · Oral pathologies · Oral environment

### Introduction

Nitric oxide (NO) was synthesized around 1610 by the Belgian scientist Jan Baptista van Helmont (1577–1644) [1].

In 1987, NO was discovered as a chemical responsible for the vascular relaxation of the endothelium-derived relaxing factor (EDRF) [1]. Regarding this discovery, two Nobel prizes were awarded to researchers, and NO was named molecule of the year by the *Journal Science* in 1992 [1, 2].

Although initial reports involving NO focused on its role as a regulator of vascular tone, it was discovered that NO has broader actions. Among these actions are physiological and pathological functions throughout the human body, including its role in the oral environment [3]. This molecule is systemically related to the events of vascular regulation, homeostasis, bone formation and resorption, neurotransmission, and immune functions [4, 5]. Some of these functions can happen at different conditions in the oral cavity. This process has been studied over the years, advancing the discoveries in various subjects (Fig. 1a). Therefore, this review aims to present a summary of data on NO literature, its discovery, and

✉ Taia Maria Berto Rezende  
 taiaibr@gmail.com; taia@ucb.br

<sup>1</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01, Brasília, DF, Brazil

<sup>2</sup> Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916N – Módulo B Avenida W5–Campus II –Módulo C, room C-221, Asa Norte, Brasília, DF 70.790-160, Brazil

<sup>3</sup> Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil

Artigo 3 - Farias, Jade Ormondes de et al. Triclosan antimicrobial activity against dental-caries-related bacteria. Brazilian Journal of Oral Sciences [online]. 2023, v. 22 [Accessed 25 November 2022], e238076. Available from: <<https://doi.org/10.20396/bjos.v22i00.8668076>>. Epub 17 Oct 2022. ISSN 1677-3225.



Volume 22  
2023  
e238076

Original Article

## Triclosan antimicrobial activity against dental-caries-related bacteria

Jade Ormondes de Farias<sup>1</sup> , Jamilca de Almeida do Espírito Santo<sup>2</sup> , Ingrid Aquino Amorim<sup>3</sup> , Taia Maria Berto Rezende<sup>1,2,3\*</sup> 

<sup>1</sup> Postgraduate in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

<sup>2</sup> Dentistry Course, Catholic University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

<sup>3</sup> Postgraduate in Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasília, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

Triclosan (TCS) is a chlorinated diphenyl ether and a possible active agent against microorganisms. Due to its probability of reducing dental plaque accumulation, TCS can be added as a substance for oral hygiene. **Aim:** To evaluate the efficacy and antimicrobial capacity of TCS against *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus mutans*. **Methods:** This work evaluates the percentage of bacteria inhibition of *P. aeruginosa* (ATCC 27853) and *S. mutans* (ATCC 25175). TCS concentrations between 2 and 128 µg.mL<sup>-1</sup> were tested. **Results:** An inhibitory potential of TCS was found against *S. mutans*. No percentage of inhibition was detected against *P. aeruginosa* (technical and biological triplicate). **Conclusion:** TCS, an antimicrobial agent used in dentifrices, can reduce *S. mutans* levels therefore these dentifrices should be indicated for patients with a high risk of caries. However, further study is needed, including antimicrobial analyses against other microbial conditions.

**Keywords:** Dental caries. Triclosan. *Streptococcus mutans*.

**Corresponding author:**

Taia Maria Berto Rezende  
Universidade Católica de Brasília  
e-mail: [taiambr@gmail.com](mailto:taiambr@gmail.com),  
[taia@p.ucb.br](mailto:taia@p.ucb.br)

**Editor:** Dr. Altair A. Del Bel Cury

**Received:** January 9, 2022

**Accepted:** May 25, 2022





Artigo 4 - Lima SMF, Freire MS, Cantuária APC, Martins DCM, Amorim IA, Dantas EMGL, Farias JO, Castro MB, Silva JS, Barriviera FA, Barriviera M, Almeida JA, Uehara IA, Silva MJB, Oliveira APL, Silva ON, Hancock REW, Franco OL, Rezende TMB. The use of host defense peptides in root canal therapy in rats. *Clin Oral Investig*. 2021 Jun;25(6):3623-3632. doi: 10.1007/s00784-020-03684-9. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33200281.

Clinical Oral Investigations  
<https://doi.org/10.1007/s00784-020-03684-9>

ORIGINAL ARTICLE



## The use of host defense peptides in root canal therapy in rats

Stella M. F. Lima<sup>1,2</sup> · Mirna S. Freire<sup>2,3,4</sup> · Ana Paula C. Cantuária<sup>2,5</sup> · Danilo C. M. Martins<sup>1,2,5</sup> · Ingrid A. Amorim<sup>2</sup> · Elaine M. G. L. Dantas<sup>1,2</sup> · Jade O. Farias<sup>1,2</sup> · Márcio B. Castro<sup>6</sup> · Jackson S. Silva<sup>7,8</sup> · Fernando A. Barriviera<sup>8</sup> · Maurício Barriviera<sup>8</sup> · Jeesser A. Almeida<sup>9</sup> · Isadora A. Uehara<sup>10</sup> · Marcelo J. B. Silva<sup>10</sup> · Ana Paula L. Oliveira<sup>11</sup> · Osmar N. Silva<sup>12</sup> · Robert E. W. Hancock<sup>13</sup> · Octávio L. Franco<sup>2,3,12</sup> · Taia M. B. Rezende<sup>1,2,5</sup>

Received: 20 August 2019 / Accepted: 6 November 2020  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

### Abstract

**Objectives** In order to evaluate host defense peptides (HDPs) HHC-10 and synoeca-MP activity in in vitro osteoclastogenesis process and in vivo induced apical periodontitis, testing the effect of molecules in the inflammatory response and in apical periodontitis size/volume after root canal treatment.

**Materials and methods** In vitro osteoclastogenesis was assessed on bone marrow cell cultures extracted from mice, while in vivo endodontic treatment involved rats treated with Ca(OH)<sub>2</sub> or HDPs. In vitro osteoclasts were subjected to TRAP staining, and in vivo samples were evaluated by radiographic and tomographic exams, as well as histologic analysis.

**Results** None of the substances downregulated the in vitro osteoclastogenesis. Nevertheless, all treatments affected the average of apical periodontitis size in rats, although only teeth treated with HDPs demonstrated lower levels of the inflammatory process. These results demonstrated the in vivo potential of HDPs. Radiographic analysis suggested that HHC-10 and synoeca-MP-treated animals presented a similar lesion size than Ca(OH)<sub>2</sub>-treated animals after 7-day of endodontic treatment. However, tomography analysis demonstrated smaller lesion volume in synoeca-MP-treated animals than HHC-10 and Ca(OH)<sub>2</sub>-treated animals, after 7 days.

**Conclusions** These molecules demonstrated an auxiliary effect in endodontic treatment that might be related to its immunomodulatory ability, broad-spectrum antimicrobial activity, and possible induction of tissue repair at low concentrations. These results can encourage further investigations on the specific mechanisms of action in animal models to clarify the commercial applicability of these biomolecules for endodontic treatment.

**Clinical significance** HDPs have the potential to be adjuvant substances in endodontic therapy due to its potential to reduce inflammation in apical periodontitis.

**Keywords** Host defense peptides · Synoeca-MP · HHC-10 · Apical periodontitis · Antimicrobial peptide

✉ Taia M. B. Rezende  
 taiambr@gmail.com; taia@ucb.br

<sup>1</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>2</sup> Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916N, Av. W5, Campus II, Modulo C, room C-221, Brasília, Distrito Federal 70790-160, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Doutorado da Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>4</sup> Curso de Odontologia, Faculdades Integradas da União Educacional do Planalto Central, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>6</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>7</sup> Curso de Odontologia, Centro Universitário do Distrito Federal, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>8</sup> Fenelon Radiologia, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>9</sup> Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>10</sup> Laboratório de Biomarcadores Tumorais e Osteoimunologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

<sup>11</sup> Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

<sup>12</sup> S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>13</sup> Centre for Microbial Diseases and Immunity Research, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada