

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Ana Clara Welerson Coelho Costa

**Os diferentes suplementos de meios de cultura para obtenção de
células-tronco da polpa dentária podem impactar na taxa de proliferação?
Uma revisão sistemática**

Juiz de Fora
2022

ANA CLARA WELERSON COELHO COSTA

**Os diferentes suplementos de meios de cultura para obtenção de células-tronco da polpa dentária podem impactar na taxa de proliferação?
Uma revisão sistemática**

Monografia apresentada à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof^ª. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo.

Juiz de Fora
2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Costa, Ana Clara .

Os diferentes suplementos de meios de cultura para obtenção de células-tronco da polpa dentária podem impactar na taxa de proliferação? Uma revisão sistemática / Ana Clara Costa. -- 2022.

30 f. : il.

Orientador: Antônio Márcio do Carmo

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia, 2022.

1. Células-tronco da polpa dentária. 2. Meio de cultura. 3. Proliferação celular . 4. Suplementos. 5. Influência celular. I. do Carmo, Antônio Márcio, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
REITORIA - FACODONTO - Coordenação do Curso de Odontologia

Ana Clara Welerson Coelho Costa

Os diferentes suplementos dos meios de cultura para obtenção de células-tronco da polpa dentária podem impactar na taxa de proliferação? Uma revisão sistemática

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Aprovado em 31 de agosto de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. . Antonio Marcio Resende do Carmo - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Gracieli Prado Elias

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Marcio Resende do Carmo, Professor(a)**, em 31/08/2022, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gracieli Prado Elias, Professor(a)**, em 31/08/2022, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba, Professor(a)**, em 31/08/2022, às 13:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0912014** e o código CRC **7AE64832**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio César e Ana Rosa, e à minha irmã, Ana Laura, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e me acolhendo acima de tudo.

AGRADECIMENTOS

“Que o amor sempre seja nosso guia”, assim inicio meus agradecimentos. Nessa desafiadora jornada para escrever esta monografia, me vi cercada de dúvidas, indecisões e muitas dificuldades, mas o amor sempre foi e sempre será minha luz e meu guia.

Amor aos que estão comigo há muito tempo, e aos que chegaram há pouco já se fazendo tão presentes e especiais. Amor à minha família que me apoia e me socorre nas inseguranças, aos meus pais que me mantêm segura e amada e à minha irmã que é o meu porto mais seguro do mundo. Amor à minha jornada, que foi tão especial e cercada de, inicialmente, desconhecidos mas que hoje são parte da minha família. Amor aos percalços, às dificuldades, às inseguranças e aos medos. Vocês me construíram e me guiaram até o fim, me fazendo ser quem sou hoje, e não existem palavras no universo capaz de descrever o que sinto por cada um de vocês.

À Deus: obrigada por ter escrito para mim uma história tão linda e ao lado de pessoas tão especiais. Que o Senhor me ilumine e me guarde para que eu possa levar amor e luz à vida de todos que cruzarem meu caminho.

Aos meus amigos: Clara, Theo, Anna, Gabi, Helena, Larissa, Iany, Paula, Rodrigo, Pillar e Rana, a gratidão que tenho por termos nossas histórias cruzadas é gigante. Obrigada por me apoiarem por toda essa trajetória e me darem todo amor do mundo.

Aos meus pais e irmã: Antônio, Ana Rosa e Ana Laura, passar por essa vida com pessoas como vocês é extremamente gratificante. Vocês me ensinaram a amar e a ser uma pessoa digna e honesta. Obrigada por serem parte de mim e saibam que por onde for levarei um pedaço imenso de vocês comigo.

Aos colegas que me ajudaram nesse trabalho: Antônio Márcio, Rômulo e Carlos, muito obrigada por toda paciência comigo. Escrever essa revisão é algo que queríamos muito desde o início e concluir esse trabalho ao lado de pessoas e profissionais tão dedicados, íntegros e compreensíveis foi essencial para essa jornada ser tão leve.

À minha família: avós, tias, tios e primos, sou extremamente sortuda por ter comigo pessoas tão especiais, obrigada por me abrigarem nas inseguranças e me apoiarem nas dificuldades. Que estejamos sempre juntos.

À minha tão amada faculdade e a todos os professores e funcionários: essa jornada não poderia ter sido melhor. Da coordenação até cada TAE, sou eternamente grata por fazerem parte da minha vida durante os últimos 5 anos. Aprendi uma lição em cada corredor da faculdade e o que já foram momentos difíceis, hoje são lições que aprendi para levar por toda a vida. Obrigada, UFJF, te levo no meu coração.

Vocês não foram apenas família, amigos, professores e funcionários, vocês foram meu guia! Obrigada por me preencherem e me fazerem ser quem sou, espero orgulhá-los e levar um pouquinho de cada um de vocês para onde for.

Muito obrigada!

COSTA, A. C. W. C. Os diferentes suplementos de meios de cultura para obtenção de células-tronco da polpa dentária podem impactar na taxa de proliferação? Uma revisão sistemática. Juiz de Fora (MG). Monografia (Curso de Graduação em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

RESUMO

Objetivo: O cultivo de células-tronco se faz cada dia mais importante, principalmente devido ao aumento do uso em diversas áreas para regeneração e múltiplas diferenciações celulares. O trabalho tem como objetivo observar os meios de cultura e os suplementos avaliando suas influências nas taxas de proliferação.

Métodos: A pesquisa foi conduzida pelas bases de dados PubMed, Embase, Scielo, Lilacs, Scopus e Web of Science usando as palavras-chave “células-tronco mesenquimais”, “células-tronco da polpa dentária”, “células-tronco do dente decíduo esfoliado”, “meio de cultura” e “proliferação celular”. Os artigos selecionados deveriam contemplar os critérios de inclusão.

Resultados: No total 521 artigos foram selecionados, excluindo as duplicatas, dos quais, após aplicados os critérios de inclusão e exclusão, apenas 7 se mostraram satisfatórios para a revisão sistemática. A análise dos suplementos se fez após agrupamento dos artigos para base de comparação. O ácido ascórbico, glutamina, glutamax e anfotericina B mostraram grande influência nas taxas de proliferação. **Conclusão:** A influência dos suplementos dos meios de cultura nas taxas de proliferação celular das DPSCs é inegável, porém para avançarmos no uso de células-tronco para engenharia tecidual na odontologia e na medicina, serão necessários mais estudos para conseguirmos uma padronização da metodologia e dos resultados.

Palavras-chave: Células-tronco da polpa dentária, meio de cultura, proliferação celular, suplementos, influência celular.

COSTA, A. C. W. C. **Os diferentes suplementos de meios de cultura para obtenção de células-tronco da polpa dentária podem impactar na taxa de proliferação? Uma revisão sistemática.** Juiz de Fora (MG). Monografia (Curso de Graduação em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

ABSTRACT:

Objective: The cultivation of stem cells is becoming increasingly important, mainly due to the increased use in several areas for regeneration and multiple cell differentiations. This study aims to observe the culture media and supplements evaluating their influence on proliferation rates. **Methods:** The search was conducted through PubMed, Embase, Scielo, Lilacs, Scopus and Web of Science databases using the keywords “mesenchymal stem cells”, “dental pulp stem cells”, “stem cells from exfoliated deciduous teeth”, “culture medium” and “cell proliferation”. Included articles were eligible by inclusion criteria. **Results:** A total of 521 articles were selected, excluding duplicates, of which, after applying the inclusion and exclusion criteria, only 7 were satisfactory for this systematic review. The analysis of supplements was performed after grouping the articles for better comparison. Ascorbic acid, glutamine, glutamax and amphotericin B showed great influence on proliferation rates. **Conclusion:** The influence of culture media supplements on the cell proliferation rates of DPSCs is undeniable, but in order to advance in the use of stem cells for tissue engineering in dentistry and medicine, further studies will be needed to achieve a standardization of the methodology and the results.

Key words: Stem cells from dental pulp, culture medium, cellular proliferation, supplements, cellular influence.

LISTA DE ABREVIATURAS

MSC - Célula-tronco mesenquimal;

DPSC - Célula-tronco da polpa dentária;

SHED - Célula-tronco do dente decíduo esfoliado;

PDLSC - Célula-tronco do ligamento periodontal;

SCAP - Célula-tronco presentes na papila apical de dentes em desenvolvimento;

FBS – Soro fetal bovino;

PRISMA - Principais Itens para Relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises;

PDF – Formato portátil de documento;

PDT – Tempo de dobra da população celular;

AA - Ácido ascórbico;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4 RESULTADOS	19
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	27
7 REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Células-tronco mesenquimais adultas (MSC) são isoladas de uma variedade de tecidos humanos como pele, músculo, tecido adiposo, medula óssea e sangue (RICCIO et al, 2010). Com elevada capacidade de autorrenovação e diferenciação em multi-linhagens, estas têm atraído a atenção mundial durante os últimos anos como fontes atrativas de células progenitoras para engenharia e regeneração de tecidos (BAKOPOULOU et al, 2011). Do ponto de vista odontológico, acredita-se que o uso de células-tronco na engenharia tecidual pode trazer grandes avanços para terapias regenerativas pulpares e periodontais (TAMAKI et al, 2013). Se tratando de células-tronco presentes na cavidade bucal, podemos citar as células-tronco da polpa dentária (DPSC), que foi o primeiro tipo a ser isolada. Seguido dessas, foram isolados outros tipos de MSC como células-tronco do dente decíduo esfoliado (SHED), células-tronco do ligamento periodontal (PDLSC) e, mais recentemente, células-tronco presentes na papila apical de dentes em desenvolvimento (SCAP) (BAKOPOULOU et al, 2011). Entretanto, embora diferentes tipos de MSCs derivadas de tecidos dentários compartilham muitas características comuns, elas também apresentam heterogeneidade significativa, expressa através de múltiplas diferenças fenotípicas que, provavelmente, refletem propriedades funcionais distintas (BIANCO, 2008).

As DPSC representam uma população de células-tronco adultas originárias de células da crista neural que residem no nicho perivascular da polpa dentária e constituem uma fonte de células-tronco facilmente recrutáveis com baixa invasividade para o paciente (RICCIO et al, 2010). Logo, essas são isoladas de dentes extraídos, que geralmente são descartados após tratamentos odontológicos, podendo ser candidatas para futuras terapias celulares (BURGUER, 2003; KORDELAS et al, 2014). O uso de células-tronco, tanto na odontologia quanto na medicina, pode permitir que novas terapias regenerativas tratem não apenas doenças dentárias e periodontais, mas também doenças sistêmicas, como lesões nervosas e doenças neurodegenerativas (TAMAKI et al, 2013). As células-tronco da polpa dentária são caracterizadas por sua multipotencialidade e capacidade de se diferenciar em diversas linhagens restritas a células, como osteo/odontogênicas, adipogênicas, neurogênicas, condrogênicas e miogênicas, quando cultivadas em condições de cultura definidas (BAKOPOULOU et al, 2011).

Para manter as células vivas por mais tempo e avaliar a proliferação, a migração e a diferenciação, um meio basal deve ser complementado com vários fatores (VAN DER VALK et al, 2010), sendo o melhor ambiente para o crescimento de células aquele que se assemelhava à situação *in vivo* (TAUB, 1990). Diferentes estratégias de uso de antimicrobianos são empregadas em sistemas de cultivo de células pulpares humanas (LUI SI et al, 2008) e os esforços para identificar todos os componentes do meio de cultura que são fisiologicamente relevantes para manter a proliferação de células em cultura não foram bem sucedidos (TAUB, 1990). Como exemplo disso, temos o uso do soro fetal bovino (FBS) que é geralmente adicionado ao meio de cultura e usado para isolamento e expansão de MSC *in vitro* (MOCHIZUKI e NAKAHARA, 2018), porém seu uso é controverso por diversas razões, como riscos de reações imunológicas/alérgicas e transmissão de agentes nocivos, como príons, vírus ou microrganismos zoonóticos, ao hospedeiro (VAN DER VALK et al, 2010). Logo, a dificuldade encontrada é identificar os fatores reguladores no ambiente *in vivo* que são necessários para o cultivo de células *in vitro* (TAUB, 1990).

Diversos são os suplementos adicionados ao meio de cultura para isolamento de células-tronco reportado nos artigos e transitam desde meios apenas com antibióticos até meios suplementados com ácido ascórbico, glutamina, entre outras substâncias. No entanto, para que estudos *in vitro* sejam bem sucedidos, devem ser definidas condições que permitam a expressão ideal das funções diferenciadas, bem como o crescimento ideal das células de interesse (TAUB, 1990). A divergência de informações acerca da influência dos suplementos nos meios de cultura prejudica a homogeneidade e consenso entre os pesquisadores, o que impede o avanço dos controles de qualidade e segurança para ampla aplicação na engenharia de tecidos (MOCHIZUKI e NAKAHARA, 2018). A necessidade de mais estudos nessa área é de vital importância, visto que para alcançar uma boa reprodutibilidade experimental, a composição do meio de cultura celular é essencial (VAN DER VALK et al, 2010).

Portanto, com a heterogeneidade de informações e de protocolos para cultivo de células-tronco da polpa dentária, se fez necessária a importância de uma revisão sistemática acerca do tema em questão. Com o avanço dos conhecimentos, como maior entendimento dos suplementos e elaboração de protocolos mais bem-sucedidos para cultivo e proliferação de DPSCs haverá um maior domínio na

manipulação dessas células. Com isso, a aplicação de células-tronco nas terapias regenerativas e na engenharia tecidual será feita de maneira mais coordenada e adequada.

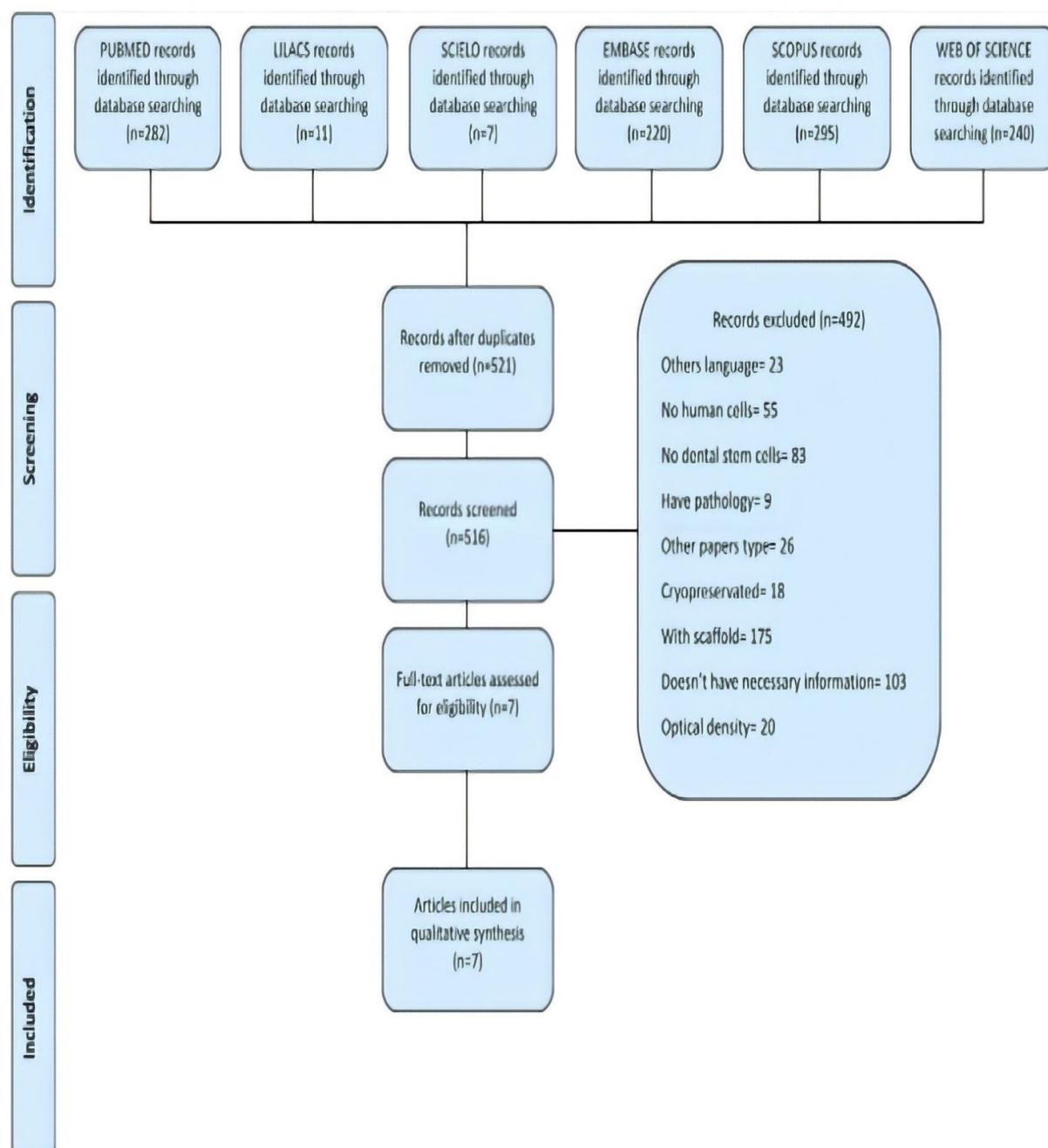
2 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho se propõe a fazer uma revisão sistemática acerca da influência dos diferentes suplementos adicionados nos meios de cultura de células-tronco da polpa dentária, enaltecendo as taxas de proliferação e tempo de dobra das populações celulares dos artigos analisados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente revisão sistemática foi conduzida seguindo o guia dos Principais Itens para Relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises (PRISMA) - figura 1. A pergunta para pesquisa foi: As diferentes substâncias que suplementam os meios de cultura influenciam na taxa de proliferação das células-tronco da polpa dentária?

Figura 1 - Diagrama de fluxo do processo de seleção de artigos (formato PRISMA)



3.1. Critério de elegibilidade

3.1.1. Critérios de inclusão

Estudos publicados na língua inglesa que avaliaram o uso de diferentes suplementos nos meios de cultura e seus efeitos na taxa de proliferação das células-troncos da polpa dentária. Além disso, tinham que conter as palavras-chave “mesenchymal stem cells”, “dental pulp stem cells”, “stem cells from human exfoliated deciduous teeth”, “culture media” e “cell proliferation”. Os artigos foram pesquisados pelas bases de dados PubMed, Scielo, LILACS, Web of Science, Scopus e Embase em junho de 2021. Por fim, os artigos incluídos deveriam conter informações sobre a taxa de proliferação e o número de passagens usadas, independente se dados sobre senescência foram analisados ou não.

3.1.2. Critérios de exclusão

Artigos publicados antes dos anos 2000 e duplicatas. Estudos que não usaram células humanas e os que adotaram qualquer outro tipo de célula-tronco que não fossem DPSC. As SHEDs não foram usadas na revisão sistemática em questão pois há evidências que seu comportamento celular, como proliferação, se difere das DPSCs, não podendo compará-las. Além disso, artigos que apresentaram análise de patologias, assim como uso de células geneticamente modificadas e uso de scaffold, foram excluídos. Para uma análise mais detalhada da proliferação foram adotados somente os dados de PDT, como será explicado na discussão, excluindo qualquer artigo que analisasse a proliferação por densidade óptica. Por fim, estudos que omitiram informações relevantes sobre metodologia e resultados não foram aceitos, além também de outros tipos de textos como cartas ao editor, revisões de literatura, relatos de caso, entre outros, não foram usados nessa revisão sistemática.

3.2. Estratégia de pesquisa

Foram feitas pesquisas eletrônicas de estudos científicos que avaliaram o crescimento de DPSC quando cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados e seus efeitos na taxa de proliferação. Foram utilizadas as bases de

dados Medline/PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), EMBASE (<https://www.embase.com/login>), Scielo (<https://scielo.org>), LILACS (<https://lilacs.bvsalud.org/>), Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>) e Web of Science (pelo Portal CAPES). As palavras-chave utilizadas foram: “mesenchymal stem cells”, “dental pulp stem cells”, “stem cells from human exfoliated deciduous”, “culture media” and “cell proliferation” que foram linkadas com diferentes estratégias dos operadores booleanos “E” e “OU”. Entre “dental pulp stem cells” e “stem human exfoliated deciduous” foi usado “OU”, resultando na estratégia de pesquisa **(mesenchymal stem cells) AND ((dental pulp stem cells) OR (stem cells from human exfoliated deciduous teeth)) AND (culture media) AND (cell proliferation)**. O processo foi repetido em todas as bases de dados já descritas a fim de garantir que nenhum resultado relevante fosse perdido durante a fase de identificação.

3.3. Seleção de estudos

Todos os títulos foram sistematicamente organizados no Microsoft Office Excel Online (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) e no EndNote Basic (Clarivate Analytics, Philadelphia, USA), onde foram excluídos os itens duplicados. Depois, títulos e resumos foram lidos por dois pesquisadores para possíveis inclusões na síntese qualitativa da revisão. Assim, os estudos foram classificados nas seguintes categorias: duplicatas, outro idioma que não fosse inglês, células animais, células que não fossem DPSC, células com patologia, células geneticamente modificadas e células-tronco associadas à scaffold. No final, estudos que atendiam aos critérios de inclusão foram baixados das bases de dados em suas versões completas e lidos em PDF. Estudos que omitiram informações relevantes e artigos incompletos foram excluídos da revisão em questão.

3.4. Extração de dados

Informações metodológicas foram extraídas dos estudos selecionados relacionadas aos autores, célula-tronco analisada, protocolo de isolamento das células, número de passagens usadas, meio de cultura e seus suplementos. Em adição a isso, dados sobre as taxas de proliferação e senescência foram analisados

dos artigos incluídos que avaliavam o uso de diferentes suplementos nos meios de cultura e seus impactos na proliferação das DPSC. Valores quantitativos sobre as taxas de proliferação (curva de crescimento) de cada artigo foram extraídos e tabulados para análise.

3.5. Análise de dados

Houve homogeneidade na proposta de pesquisa entre os estudos, mas variabilidade no número de passagens utilizados, suplementos adotados, taxa de proliferação de cada suplemento e testes de proliferação. Isso fez com que fosse inapropriada a condução de uma meta-análise, mas uma síntese qualitativa foi feita. As taxas de proliferação de cada artigo foram tabuladas e descritas, sendo separados em grupos, dependendo da composição do meio de cultura, o que fez ficarem mais claras as análises dos resultados. Por fim, a comparação entre os suplementos e seus efeitos na curva de crescimento celular foi feita.

Tabela 1 - Dados extraídos dos artigos analisados.

	Dente extraído	Idade do paciente	Meio de cultura	Troca de meio	PDT
Bakopoulou et al., 2011	3° molar impactado	16-18 anos	15% FBS+ 100 mM L-ascorbic acid phosphate + 2 mM L-glutamine + 0.25 mg/ml Amphotericin B	2 vezes por semana	0,75
D'Alimonte et al., 2017	3° molar	20-25 anos	15% FBS + 1% P/S, amphotericin B 1000x	A cada 3 dias	1,88
Laothumthut et al., 2015	3° molar impactado não erupcionado	18-20 anos	10% FBS + 1 % glutamine + amphotericin-B (25 µg/ml)	A cada 2 dias	0,32
Mochizuki e Nakahara, 2018	3° molar	20-37 anos	15% FBS	2 vezes por semana	1,72
Riccio et al., 2010	3° molar ou outros dentes permanentes	18-35 anos	20% FBS + 100 µM 2P-ascorbic acid + 2 mM L-glutamine	Não informado	9,32
Spina et al., 2016	3° molar ou dentes supranumerários	21-38 anos	10% FBS +200 mM L-glutamine	2 vezes por semana	5,43
Tamaki et al., 2013	3° molar	16-28 anos	15% FBS + 2 mM glutamine (GlutaMAX I)	A cada 2 dias	0,63

4 RESULTADOS

4.1. Pesquisa e seleção de estudos

O diagrama de fluxo (figura 1) resume o processo de seleção dos estudos da revisão sistemática. No total foram identificados 1.055 artigos juntando as seis bases de dados. Pelo EndNote, foram eliminadas 534 duplicatas, restando ainda 521 artigos. Depois, ao aplicarmos os critérios de inclusão foram excluídos mais 492 artigos. No final, restaram 7 artigos que se enquadraram nos critérios de inclusão e exclusão, dos quais seus dados foram satisfatórios para analisar os diferentes comportamento das taxas de proliferação em meios de cultura com diferentes suplementos.

4.2. Síntese dos resultados

A tabela 1 apresenta uma síntese dos dados coletados de cada artigo selecionado, evidenciando meio de cultura, PDT, quantidade de passagens usadas, entre outras informações relevantes para a atual revisão. Para melhor base comparativa, os estudos foram agrupados de acordo com o meio de cultura utilizado para as DPSC, sendo adotados 3 grupos, que estão explicitados na tabela 2.

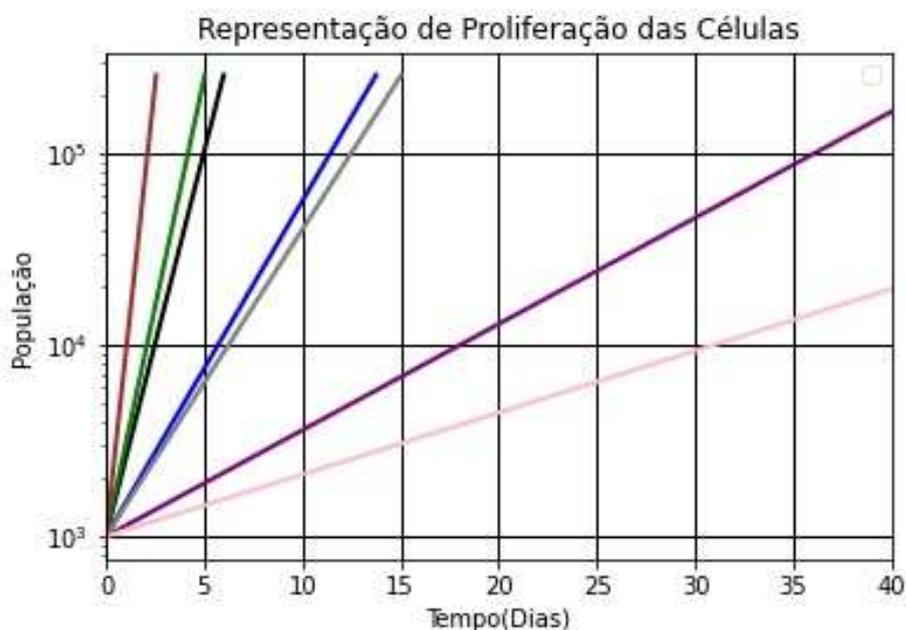
- GRUPO 1: analisa a presença de ácido ascórbico e glutamina no meio, além da concentração de FBS (15% e 10%);
- GRUPO 2: analisa a influência da glutamina no meio de cultura;
- GRUPO 3: analisa o comportamento da anfotericina B no meio.

Tabela 2 - Grupos feitos segundo o meio de cultura utilizado.

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
Bakopoulou et al., 2011	Mochizuki e Nakahara, 2018	Riccio et al., 2010
D'Alimonte et al., 2017	Tamaki et al., 2013	Bakopoulou et al., 2011
Tamaki et al., 2013		
Spina et al. 2016		
Laothumthut et al., 2015		

O gráfico 1 apresenta uma visão panorâmica de todos os 7 artigos utilizados e seus respectivos meios de cultura analisando a proliferação celular apresentada na fase de crescimento máxima, ou seja, na fase exponencial da curva de proliferação celular de cada artigo. Ao analisar o grupo 1, foi marcante a diferença do PDT entre 5 meios principais: 15% FBS, AA, glutamina e anfotericina B, adotado por Bakopoulou et al., 2011; 15% FBS e anfotericina B, empregada por D'Alimonte et al., 2017; 15% FBS e glutamina, usado por Tamaki et al., 2013; 10% FBS e glutamina, usado por Spina et al. 2016; e, por fim, 10% FBS, glutamina e anfotericina B por Laothumthut et al., 2015. O meio de cultura com 15% FBS, ácido ascórbico, anfotericina B e glutamina apresentou um PDT por volta de 0,75, ou seja, as células presentes proliferaram mais rápido em um menor espaço de tempo. Ainda no grupo 1, é interessante destacar que os meios de cultura adotados por Spina et al., 2016 e por Laothumthut et al., 2015, respectivamente com 10% FBS e glutamina e com 10% FBS, glutamina e anfotericina B apresentaram PDT de 5,43 e de 0,32. Isso evidencia que a glutamina associada à concentração de 10% FBS do meio, diminuiu drasticamente a proliferação celular quando comparados ao primeiro meio analisado. Além desses, foi analisado um meio no grupo 1 que apresentou taxa de proliferação intermediária em relação aos já apresentados anteriormente. Este foi suplementado apenas com 15% FBS e anfotericina B, o que o difere do primeiro meio analisado que apresentava AA e glutamina associados, o PDT observado foi de 1,88. O que é importante analisar é a diferença na taxa de

proliferação proporcionada pela presença do AA e da glutamina, que provocou grande diferença no PDT, de 0,75 para 1,88. Dessa forma, podemos afirmar mais uma vez que esses suplementos aceleram a proliferação celular quando usados para suplementação do meio de cultura de DPSC. Por fim, o meio de cultura suplementado que apresentou menor PDT, ou seja, maior taxa de proliferação, foi o adotado por Laothumthut et al., 2015 que utilizou glutamina e anfotericina B em um meio com 10% FBS e o PDT observado foi de 0,32, o menor PDT observado em todo o estudo. Portanto, é importante a comparação entre o meio utilizado por Laothumthut et al., 2015 e o utilizado por Spina et al., 2016, que se diferem apenas pela presença de anfotericina B, mas ainda assim apresentaram grande diferença no PDT obtido (0,32 e 5,43, respectivamente). Além disso, o PDT obtido por Spina et al., 2016 foi de 5,43 enquanto o de Tamaki et al., 2013 foi de 0,63, isso evidencia a importância da concentração empregada de FBS no meio de cultura e sua influência na taxa de proliferação celular dos DPSC, visto que a única diferença entre eles foi a concentração de FBS (10 e 15%) e o emprego de GLUTAMAX™, que será discutido mais à frente.

Gráfico 1 - Visão panorâmica da taxa de proliferação dos sete artigos analisados.

	15% FBS+100 mM L-ascorbic acid phosphate+ 2 mM Lglutamine + 0.25 mg/ml Amphotericin B (Bakopoulou et al., 2011)
	15% FBS + 1% P/S, amphotericin B 1000x, and centrifuged (D'Alimonte et al., 2017)
	10% FBS+ 1 % glutamine + 25 µg/ml amphotericin-B (Laothumthut et al., 2015)
	15% FBS (Mochizuki e Nakahara, 2018)
	20% FBS + 100 µM 2P-ascorbic acid + 2 mM L-glutamine (Riccio et al., 2010)
	10% FBS +200 mM L-glutamine (Spina et al., 2016)
	15% FBS + 2 mM glutamine (GlutaMAX I) (Tamaki et al., 2013)

No grupo 2 foram analisados dois artigos e seus meios de cultura, que foram: Mochizuki e Nakahara, 2018 que utilizou um meio com 15% de FBS e antibióticos apenas, e, mais uma vez, o Tamaki et al., 2013 que usou o meio com 15% FBS e glutamina. Ao comparar-se o PDT obtido por Mochizuki e Nakahara, 2018 com o obtido por Tamaki et al., 2013 nota-se que houve uma grande diferença. Mais uma vez, o meio de cultura adotado por Tamaki et al., 2013 se destacou por apresentar uma taxa de proliferação muito maior, porém, dessa vez, a única diferença entre os dois meios analisados foi a presença da glutamina. Enquanto o estudo que adotou o

meio de cultura apenas com 15% FBS apresentou PDT de 1,72, o estudo que inseriu a glutamina no meio de cultura com 15% FBS obteve um PDT de 0,63. Portanto, isso evidencia uma grande influência positiva da glutamina na taxa de proliferação, diminuindo o PDT e acelerando o crescimento celular.

O terceiro grupo analisado apresenta dois meios de cultura distintos, o de Riccio et al., 2010, que adotou um meio suplementado com 20% FBS, AA e glutamina; e o de Bakopoulou et al., 2011, que utilizou o meio, já citado, com 15% FBS, AA, glutamina e anfotericina B. A comparação desses dois meios de cultura é de extrema importância uma vez que eles apresentaram taxas de proliferação muito distintas e com grande diferença de PDT. O estudo que adotou 20% FBS, AA e glutamina mostrou o maior PDT analisado na revisão sistemática em questão com um valor de 9,32. Em contrapartida apenas com a diferença na concentração de FBS e a presença de anfotericina B o PDT do estudo de Bakopoulou et al., 2011 foi de 0,75, isso demonstra uma taxa de proliferação quase 8x maior do que a do estudo de Riccio et al., 2010. Uma das limitações do estudo é que por falta do emprego de outros meios de cultura nos artigos não sabemos se essa exacerbada diferença se deve à concentração de FBS ou à presença de anfotericina B em um meio com 20% FBS, porém a vantagem no uso de AA, glutamina e anfotericina B em um meio com 15% FBS é claramente evidenciada pelos resultados apresentados.

5 DISCUSSÃO

5.1 Contagem celular das DPSCs

A contagem celular em câmara de Neubauer apresentou melhor capacidade em proporcionar valores concretos, quando comparada com a análise de densidade óptica. A absorvância é o resultado da análise da densidade óptica e é baseada na absorção de radiação dos comprimentos de onda entre as regiões que variam desde a faixa do ultravioleta, passando pela luz visível, até a zona do infravermelho. Logo, esta é uma medida indireta da concentração celular em uma suspensão.

Desse modo, o PDT foi o método de padronização utilizado para comparar os artigos analisados. O que possibilitou fazer uma comparação direta para obter informações sobre a proliferação celular e analisar diferentes suplementos para os meios de cultura e seus potenciais de toxicidade. As células foram tratadas com tripsin-EDTA e contadas pelo hemocitômetro (TAMAKI, et al., 2013; SPINA, et al., 2016; BAKOPOULOU, et al., 2011; D'ALIMONTE, et al., 2017 e MOCHIZUKI; NAKAHARA, 2018).

5.2 Análise dos suplementos e sua influência na taxa de proliferação

5.2.1 Glutamina e GLUTAMAX™

Ao analisar os resultados de Tamaki et al., 2013; Mochizuki e Nakahara, 2018 é evidente que o uso de glutamina interfere na proliferação celular. A glutamina contribui para a gliconeogênese e também para o anabolismo de diversas proteínas da célula. Por outro lado, sua quebra e seu metabolismo estão associados à produção de amônia, um produto de alta toxicidade celular que fica presente no meio de cultura (VAN DER VALK et al., 2010).

A fim de evitar as desvantagens presentes no uso da glutamina no meio de cultura celular, muitos autores vêm optando por usar glutamato ou GLUTAMAX™. O glutamato tem um grupo amina menos do que a glutamina e é mais termoestável, porém sua influência no meio depende do tipo de célula que será cultivada (BUTLER e CHRISTIE, 1994). Já o GLUTAMAX™, apresenta dipeptídeos em sua composição: glicil-glutamina e alanil-glutamina. A presença desses peptídeos, que

são mais estáveis, resulta na redução da produção de amônia e maior resistência ao calor (VAN DER VALK et al., 2010). Logo, seu uso em meios de cultura é mais defendido pela comunidade científica.

5.2.2 Concentração e uso de FBS

O FBS é o soro padrão usado atualmente, possuindo fatores de crescimento, proteínas, vitaminas, hormônios e diversos outros elementos essenciais para crescimento e manutenção das células dos meios de cultura (VAN DER VALK et al., 2010), entretanto existem diversas desvantagens e contradições em seu uso. O sofrimento desnecessário ao feto do animal no útero (VAN DER VALK et al., 2004), as variações na composição do soro, além também, do nível de contaminação por vírus (20-50%) são atores que contraindicam seu uso nos meios de cultura atualmente (VAN DER VALK et al, 2010).

O uso de FBS se mostrou interessante até uma concentração de 15%, uma vez que ao comparar o PDT de artigos que usaram FBS a 15% em seu meio com artigos que usaram FBS a 20% ocorreu um drástico aumento do mesmo nos de maior concentração. Ou seja, foi visto que quando usado em concentrações superiores ocorreu uma redução na proliferação e no número de células vivas. Essa queda na proliferação em altas concentrações, como 20% usado por Riccio, M. et al., 2010, reafirma que este soro proporciona um estresse nas células ao tornar o meio mais tóxico (HESHAM et al, 2009). É interessante observar que após analisar os meios e proliferações, a concentração de 20% mesmo que associada a ácido ascórbico e a glutamina reduziu a proliferação celular (RICCIO et al, 2010) quando comparado à concentração de 15% sem suplementação (MOCHIZUKI et al, 2018). Logo, de acordo com a análise feita, a concentração de 15% de FBS foi a mais interessante quando desejada maiores taxas de proliferação celular.

5.2.3 Presença de anfotericina B

O emprego da anfotericina B no meio de cultura é usado para prevenir a contaminação fúngica, porém a adição de antimicrobianos aos meios de cultura deve ser criteriosamente realizada pois estes devem apresentar simultaneamente

um amplo espectro de ação e um mínimo efeito nocivo para o cultivo (LUIZI et al., 2007). Apesar de aumentar a toxicidade da cultura, a vantagem é uma proliferação mais segura, associando suplementos que aceleram a proliferação celular e permitem um desenvolvimento sem maiores danos às células cultivadas.

No presente estudo, ao comparar a taxa de proliferação de Laothumthut et al., 2015 (presença de anfotericina B) e Spina et al., 2016 (ausência de anfotericina B) é possível observar que, apesar das concentrações de glutamina serem diferentes, a presença do antifúngico foi um fator que promoveu a grande diferença entre os PDT encontrados, resultando em uma taxa de proliferação muito maior do meio que apresentou anfotericina B em sua cultura.

5.2.4 Presença de ácido ascórbico

O ácido ascórbico é usado para combater os radicais livres no meio de cultura e realizar um combate à senescência (YANG et al, 2018) ele também é importante para a síntese de colágeno *in vivo* e para uma completa hidroxilação do colágeno *in vitro* (FENG et al., 1977). O atraso da senescência das células cultivadas permite que a proliferação celular atinja sua zona de platô - período em que o número de células viáveis é constante, sendo a fase em que o número de mortes celulares se iguala ao número de novas divisões celulares - em um ponto mais alto, ou seja, com um maior número de células vivas. Além disso, é possível realizar um maior número de passagens e evitar mortes celulares precoces.

Na revisão em questão, o autor Bakopoulou et al., 2011 foi o único a utilizar o AA em seu meio de cultura associada com 15% FBS, glutamina e anfotericina B, apresentando PDT entre os três maiores, ou seja, apresentou alta taxa de proliferação quando comparada a outros estudos. O autor fez o uso da vitamina pois este defende que é essencial para aumentar a viabilidade celular e estimular a produção de colágeno tipo I.

6 CONCLUSÃO

A partir desta revisão sistemática, podemos afirmar que o meio de cultura e os suplementos adicionados influenciam diretamente na taxa de proliferação das DPSCs. Porém, mais estudos são necessários para analisar individualmente cada suplemento, trazendo assim maior grau de evidência científica e padronização de metodologias de acordo com a exigência de cada estudo.

Além disso, como discutido na revisão, para podermos comparar diferentes estudos e seus resultados, deve ser possível a criação de um padrão de comparação. Ao apresentarmos resultados em PDT e densidade óptica, o padrão de comparação desejado não acontece, vez que temos dois métodos completamente diferentes, inviabilizando uma análise detalhada entre estudos.

7 REFERÊNCIAS

Bakopoulou A. et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). **Archives of Oral Biology**, 2011.

Bianco P., Robey P.G., Simmons P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts and assays. **Cell Stem Cell** 2008;2:313–9.

Burger S. R. Current regulatory issues in cell and tissue therapy. **Cytotherapy**. 2003;5:289–98.

Butler M., Christie, A. Adaptation of mammalian cells to non-ammoniacal media. **Cytotechnology**, 1994. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

D'Alimonte, I. et al. Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells: A Comparative Analysis between Human Subcutaneous Adipose Tissue and Dental Pulp. **Stem Cells and Development**, 2017.

Feng J. et al. Determination of L-ascorbic acid levels in culture medium: Concentrations in commercial media and maintenance of levels under conditions of organ culture. **In Vitro**, 1977.

Hesham E. A. et al. Serum concentration effects on the kinetics and metabolism of HeLa-S3 cell growth and cell adaptability for successful proliferation in serum free medium. **World Applied Sciences Journal**, 2009.

Kordelas L. et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. **Leukemia**. 2014;28:970–3.

Laothumthut, T. et al. Shotgun proteomics analysis of proliferating STRO-1-positive human dental pulp cells after exposure to nacreous water-soluble matrix. **Clinical Oral Investigations**, 2015.

Luisi, S. B. et al. Use of amphotericin B as antifungal agent in a culture medium for human dental pulp cells for human dental pulp cells. **Rev. odonto ciênc.** 2008.

Mochizuki, M. and T. Nakahara. Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. **Stem Cell Research and Therapy**, 2018.

Riccio, M. et al. Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. **European Journal of Histochemistry**, 2010.

Spina, A. et al. NZ-GMP approved serum improves hDPSC osteogenic commitment and increases angiogenic factor expression. **Frontiers in Physiology**, 2016.

Tamaki, Y. et al. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. **Odontology**, 2013.

Taub, M.. The use of defined media in cell and tissue culture. **Toxicology in Vitro**, 1990. 4(3), 213–225.

Van der Valk, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro, Elsevier Ltd**, 2010.

Van der Valk, L. et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in Vitro, Elsevier Ltd**, 2004.

Yang Y. K. et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, 2018.