

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 14/09/2027.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Kamila Sauer Veiga Leme

**Mecanismos genéticos e celulares envolvidos na
perda dentária e estratégias de prevenção.**

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências - Área
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

**Botucatu
2025**

Kamila Sauer Veiga Leme

**Mecanismos genéticos e celulares envolvidos na perda
dentária e estratégias de prevenção.**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências - Área
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

**Botucatu
2025**

L551m	Leme, Kamila Sauer Veiga Mecanismos genéticos e celulares envolvidos na perda dentária e estratégias de prevenção / Kamila Sauer Veiga Leme. -- Botucatu, 2025 118 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu Orientadora: Daisy Maria Fávero Salvadori 1. Senescência. 2. Metformina. 3. Própolis. 4. Células tronco mesenquimais dentárias. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE KAMILA SAUER VEIGA LEME, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 14 dias do mês de março do ano de 2025, às 14h, no(a) Sala de Bioinformática - Unipex - FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de KAMILA SAUER VEIGA LEME, intitulada **Mecanismos genéticos e celulares envolvidos na perda dentária e estratégias de prevenção**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. DAISY MARIA FAVERO SALVADORI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Patologia / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. DANIEL ARAKI RIBEIRO (Participação Presencial) do(a) Depto. de Biociências / Universidade Federal de São Paulo - Campus Baixada Santista, Profa. Dra. FERNANDA GONÇALVES BASSO LOMBARDI (Participação Virtual) do(a) Depto de Fisiologia e Patologia / FO/Araraquara - Unesp. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. DAISY MARIA FAVERO SALVADORI



Impacto Potencial Desta Pesquisa

Os principais impactos desta pesquisa foram a padronização de metodologias para o isolamento e caracterização de células tronco de polpa dentária e de ligamento periodontal, bem como para a indução, in vitro, de senescência por meio de estresse oxidativo. Esta pesquisa também apresentou a metformina e a própolis como potenciais agentes para a prevenção de danos teciduais e senescência prematura, que podem resultar em futuras perdas dentárias.

Potential Impact of This Research

This research primarily impacted the standardization of procedures for isolating and characterizing dental pulp and periodontal ligament stem cells, as well as for the in vitro induction of senescence through oxidative stress. Furthermore, this study identified metformin and propolis as promising compounds for protecting against tissue damage and premature senescence, which may lead to future tooth loss.

Kamila Sauer Veiga Leme

Mecanismos genéticos e celulares envolvidos na perda dentária e estratégias de prevenção.

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área Patologia.

Área de concentração: Patologia

Data da defesa: 14/03/2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori
UNESP – Faculdade de Medicina – Câmpus de Botucatu

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro
UNIFESP – Instituto de Saúde e Sociedade – Câmpus Baixada Santista

Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso
UNESP – Faculdade de Odontologia – Câmpus de Araraquara

Dedicatória

Ao Senhor Jesus,

Toda honra, toda glória, todo louvor! Obrigada Senhor, pela força, determinação, sabedoria, inteligência, saúde e paz! Obrigada pelas pessoas preciosas que o Senhor colocou em minha vida! Obrigada pelas chuvas de bênçãos todos os dias! Sem o Senhor nada disso seria possível! Louvores ao Deus da minha salvação! Amém!

Ao meu amado marido Osni,

Obrigada meu amor pelo cuidado, carinho, atenção, paciência, companheirismo e amor, muito amor todos esses anos! Foi você, meu Amor, que me sustentou todo esse tempo, sem você não teria conseguido! Amo muito você! E sempre o amarei! Obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos meus pais Ivone e Jarbas,

Meus amados pais, obrigada pela vida, pelo amor, cuidado, carinho, ensinamentos, paciência e orações! Obrigada por me fazerem a pessoa que sou hoje! Obrigada por me ensinarem sobre dedicação, força, determinação, humildade e por me ensinarem a acreditar e lutar pelos meus sonhos! Amo muito vocês! Muito obrigada pela vida que me deram!

Aos meus irmãos Carol e Julinho,

Obrigada meus amores! Obrigada pelo carinho, paciência, cuidado e amor que vocês sempre me deram! Obrigada por torcerem por mim e sempre acreditarem em mim! Agradeço a Deus todos os dias por me dar irmãos tão preciosos! Amo muito vocês! Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Aos meus sogros Clarice e Osni (*in memorian*),

Obrigada meus queridos! Obrigada pelo amor e carinho que sempre me deram! Obrigada por torcerem por mim e pelas incansáveis orações! Amo muito vocês!

Agradecimentos

À minha querida orientadora **Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori**, pelo carinho, atenção e ensinamentos de vida e estudos! Obrigada por me aceitar como sua aluna desde o mestrado e por sempre estar pronta a me ouvir e orientar! Obrigada pela paciência, confiança e pela amizade!

Aos meus queridos amigos de laboratório, **Amanda R. Tanamachi, Tony F. Grassi, Mariane A. P. Silva e Maria Vitória Destro** pelos ensinamentos, pela amizade, pela atenção, pela paciência e pelo carinho que vocês me deram! Esse trabalho também é de vocês! Agradeço muito a todos!

À **Profa. Dra. Márcia Guimarães**, coordenadora do Programa de Pós-graduação da Patologia, pelo carinho, atenção e ensinamentos! Muito obrigada professora!

À **Vânia Soler**, secretária do programa de Pós-graduação da Patologia, pela atenção e carinho! Obrigada Vânia!

Às meninas do laboratório de Cultura Celular, **Vickeline N. Androcio e Ana Paula D. P. Cruz**, obrigada pela paciência, pelas orientações e amizade!

Aos funcionários **Maria Regina Moretto, Renata C. Capela, Dijon H. S. Campos, Flávia H. Trovão, Márcio de Carvalho, Danielle Yamauchi e Leandro A. dos Santos** pela atenção aos meus experimentos e pela amizade! Obrigada!

Ao **José Eduardo Corrente**, pela atenção e carinho com minhas análises estatísticas. Obrigada!

A todos os funcionários da UNIPEX, pela atenção e carinho! Obrigada!

Às **Profas. Dras. Elenice Defune, Márjorie de Assis Golin e Aline Márcia Marques Braz** pela amizade, atenção e orientação aos meus experimentos de citometria. Obrigada!

A todos meus familiares e amigos que estiveram orando e torcendo por mim! Muito obrigada!

À **Capes** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro.

Epígrafe

“Porque um menino nos nasceu, um filho se nos deu; o governo está sobre os seus ombros; e o seu nome será: Maravilhoso Conselheiro, Deus Forte, Pai da Eternidade, Príncipe da Paz.”

Isaías, 9:6

RESUMO

A promoção e manutenção da saúde bucal sempre foram desafios para a odontologia. Devido à complexidade dos tecidos orais e da microbiota, mesmo com o avanço de técnicas e materiais, o desfecho pode ser a perda dentária derivada principalmente de cáries e doença periodontal, além de doenças sistêmicas como o diabetes. Todos esses processos geram resposta inflamatória, com aumento do estresse oxidativo que intensifica o envelhecimento precoce dos tecidos de suporte e sustentação do dente. Assim sendo, o controle de processos inflamatórios e do desbalanço oxidativo são importantes para prevenção da senescência celular e para melhoria da saúde dentária. A senescência celular, caracterizada pela parada irreversível da proliferação, é usualmente precedida pelo estado de pré-senescência, o qual é tipificado pela alteração da morfologia e metabolismo celular e pelo acúmulo de danos no DNA. Apesar do campo de pesquisa sobre senescência celular estar evoluindo rapidamente, há questões ainda não completamente elucidadas, especialmente com relação à progressão de mudanças que ocorrem em células primárias levando à indução da senescência e culminando na morte celular. Tecnologias emergentes e a padronização de metodologias estão proporcionando melhor compreensão sobre essa interação intrincada e certamente resultarão em estratégias mais eficazes para prevenir a senescência e os distúrbios relacionados. Portanto, no contexto geral, este estudo buscou estabelecer uma metodologia para auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos ou marcadores que caracterizam o estado de pré-senescência em células de tecidos de sustentação dos dentes, e avaliar alternativas para reduzir as alterações e retardar o processo de envelhecimento celular. Assim, utilizando o modelo de pré-senescência induzida pelo H_2O_2 e tendo como base a premissa de que o estresse oxidativo pode ser reduzido pela ação de agentes antioxidantes, este estudo objetivou investigar se os compostos metformina e própolis poderiam atuar como moduladores do processo de senescência em células tronco mesenquimais de polpa e do ligamento periodontal humanas. Para isso, foram isoladas por digestão enzimática e caracterizadas com anticorpos monoclonais de superfície (CD105, CD90, CD45 e CD34) as células tronco mesenquimais humanas da polpa dental (HDPSCs) e do ligamento periodontal (HPLSCs) e avaliados a cinética do ciclo, proliferação e migração celular, taxas de células senescentes e apoptóticas, alterações mitocondriais (massa e potencial de membrana) e no DNA, além do perfil de expressão de genes de vias de autofagia (*ATG7*), apoptose (*BCL2*, *TP53*), senescência (*GLB1*) e metabolismo energético celular (*PGC-1 α*). Primeiramente, os dados evidenciaram o aumento na atividade lisossomal (aumento da atividade da β -galactosidase) e mudanças no tamanho e morfologia das células (dois dos principais biomarcadores de senescência celular), confirmando a eficácia do modelo experimental utilizando o H_2O_2 para a indução de pré-senescência. Posteriormente, os resultados mostraram que a metformina e a própolis reduziram a atividade dos lisossomos, a quantidade de danos primários no DNA, além de induzir maior expressão dos genes *TP53* e *BCL2* e menor do *PGC-1 α* . Concluindo, nossos achados indicaram que a metformina e a própolis podem criar condições favoráveis para a redução de alterações celulares as quais poderiam promover a transição do estado de pré-senescência para a parada persistente do ciclo, retardando, assim, o envelhecimento e a morte celular.

Abstract

The promotion and maintenance of oral health have always been challenges for dentistry. Because of the complexity of oral tissues and microbiota, even with advancements in techniques and materials, the outcome may be tooth loss mainly due to caries and periodontal disease, along with systemic conditions such as diabetes. All these processes generate an inflammatory response, with increased oxidative stress that accelerates the premature aging of the supporting tissues of the tooth. Thus, controlling inflammatory processes and oxidative imbalance is important for preventing cellular senescence and enhancing dental health. Cellular senescence, defined by the irreversible arrest of proliferation, is usually preceded by the pre-senescence state, which is characterized by changes in cellular morphology and metabolism and the accumulation of DNA damage. Although the field of research on cellular senescence is growing rapidly, there are still questions that have not been fully elucidated, especially regarding the progression of changes that occur in primary cells leading to the induction of senescence and culminating in cell death. Emerging technologies and the standardization of methodologies are providing a better understanding of this intricate interaction and will certainly result in more effective strategies to prevent senescence and related disorders. In general, the purpose of this study was to establish a methodology for better understanding the mechanisms or markers that characterize the pre-senescence state in tooth-supporting tissues, as well as to evaluate alternatives for reducing changes and delaying the cellular aging process. Thus, using the H₂O₂-induced pre-senescence model the premise that antioxidants can reduce oxidative stress, this study aimed to investigate whether metformin and propolis could act as modulators of the senescence process in human pulp and periodontal ligament mesenchymal stem cells. Enzymatic digestion was used to isolate human dental pulp stem cells (HDPSCs) and periodontal ligament (HPLSCs), which were then characterized using surface monoclonal antibodies (CD105, CD90, CD45, and CD34). The kinetics of the cell cycle, proliferation and migration, senescent and apoptotic cell rates, mitochondrial changes (mass and membrane potential), and DNA, in addition to the gene expression profiles of autophagy (*ATG7*), apoptosis (*BCL2*, *TP53*), senescence (*GLB1*) and cellular energy metabolism (*PGC-1 α*) pathways were evaluated. Firstly, the data showed an increase in lysosomal activity (increased β -galactosidase activity) and changes in cell size and morphology (two primary biomarkers of cellular senescence), so validating the effectiveness of the experimental model using H₂O₂ for the induction of pre-senescence. Subsequently, the results showed that metformin and propolis reduced lysosomal activity, the amount of primary DNA damage, and induced increased expression of the *TP53* and *BCL2* genes and decreased expression of *PGC-1 α* . In conclusion, our findings indicated that metformin and propolis can create favorable conditions for the reduction of cellular alterations that could promote the transition from the pre-senescence state to persistent cycle arrest, thus delaying aging and cell death.

Sumário

RESUMO	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I	13
REVISÃO DE LITERATURA	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Considerações iniciais	14
1.2 Patogênese da senescência e consequências sobre a saúde bucal	16
1.2.1 Senescência prematura induzida por estresse	23
1.3 Doença periodontal	25
1.4 Quimioprevenção de danos genéticos e celulares: própolis e metformina	27
2. HIPÓTESE DO ESTUDO	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivos gerais	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO II	38
ARTIGO CIENTÍFICO I	38
A tutorial for isolating, characterizing, and inducing presenescence in human periodontal ligament and dental pulp stem cells	39
ABSTRACT	40
INTRODUCTION	41
MATERIALS AND METHODS	43
Reagents	43
Equipment	46
Reagent setup	48

Procedure.....	50
3. RESULTS AND DISCUSSION	58
4. CONCLUSION	63
5. REFERENCES	64
SUPPLEMENTARY MATERIALS	70
CAPÍTULO III	78
ARTIGO CIENTÍFICO II	78
Metformin and propolis can protect dental stem cells from premature senescence caused by oxidative stress	79
ABSTRACT	79
1.INTRODUCTION	79
2. MATERIALS AND METHODS	80
3. RESULTS	84
4. DISCUSSION	95
REFERENCES	98
CONCLUSÃO DA TESE	104
ANEXOS	106
Aceite do Comitê de Ética.....	107
Questionário de Saúde.....	112
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	115

CAPÍTULO I
REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

A saúde física, mental e social são pilares fundamentais do bem-estar humano e, nesse contexto, a saúde oral é um indicador importante da saúde geral, bem-estar e qualidade de vida. O impacto das desordens orais pode ser observado em quatro dimensões principais - função oral, dor orofacial, aparência orofacial e impacto psicossocial – sendo que em todas a perda dentária é um dos fatores mais importantes (Schierz et al., 2021). A perda do elemento dental pode interferir em funções essenciais como mastigar, morder, falar e engolir, pode ocasionar dores por disfunções têmporo-mandibulares, traumas na mucosa, gengiva e língua por má-oclusão dentária, além de poder contribuir para o desenvolvimento de doenças como a depressão (Kusama et al., 2021). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em inglês WHO (World Health Organization), a pesquisa sobre saúde bucal deve seguir critérios como: índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPOD) - (DMFT- Decayde, Missing and Filled Teeth), e o índice periodontal comunitário (CPI – Community Periodontal Index), o qual considera sangramento gengival e bolsa periodontal (WHO, 2013). Pesquisadores brasileiros, utilizando os critérios da OMS, observaram grande associação entre a perda de mais de 13 dentes (por cáries e doença periodontal) e doenças como hipertensão arterial, artrite reumatóide, diabetes, depressão e hipercolesterolemia em jovens a partir de 18 anos, entre os anos de 2013 e 2019 (Lima et al., 2023). Pesquisa realizada na Austrália em 2017 e 2018 mostrou que a média de dentes cariados, perdidos e obturados por pessoa foi de 29,7 em adultos acima de 15 anos, e que aproximadamente 29% dos adultos apresentavam gengivite e prevalência de 30,1% de periodontite (Amarasena et al., 2021). Nos Estados Unidos, metade dos adultos com idade entre 20 e 64 anos apresenta perda

de ao menos um dente permanente, e um em cada seis adultos de 65 anos ou mais é totalmente desdentado; esses dados estão correlacionados a mecanismos inflamatórios de doenças sistêmicas crônicas e à doença periodontal (Zhang et al., 2022).

As principais causas de perdas dentárias são as cáries e a doença periodontal resultante do desequilíbrio bacteriano, que levam à perda óssea. O processo de cárie ocorre pela desmineralização dos tecidos duros do dente, parte inorgânica (esmalte e dentina), podendo chegar até o tecido mole, ou seja, a polpa (parte orgânica). Esse processo é desencadeado por ácidos formados pelo metabolismo de carboidratos presentes no meio bucal e realizado por bactérias (principalmente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*), e ocorre devido à pouca quantidade e baixo pH da saliva e por higienização deficiente. Além desses fatores, a cárie pode ser consequência da maior susceptibilidade dos tecidos dentais devido a síndromes genéticas (como as que causam amelogenese imperfeita) e deficiências nutricionais que podem levar a hipoplasia do esmalte (Rowińska et al., 2021).

Várias doenças sistêmicas podem favorecer a perda dentária. A hipertensão, doenças do coração e o diabetes mellitus, por exemplo, são descritos como fatores que atuam exacerbando a doença periodontal (Konishi et al., 2021). Quando a homeostase da cavidade oral é perturbada, podem surgir processos inflamatórios, responsáveis pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Rowińska et al., 2021).

Já é bastante conhecido que o estresse oxidativo pode bloquear o ciclo e induzir morte celular, iniciar processo carcinogênico e provocar alergias e desordens autoimunes relacionadas à excessiva estimulação das células e diminuição da tolerância do sistema imunológico (Watad et al., 2017). Além disso, o estresse

oxidativo pode levar à senescência (envelhecimento celular) por meio do desbalanço entre estímulos pro-oxidantes e as defesas antioxidantes (moléculas antioxidantes, como minerais, vitaminas, carotenoides, etc) (Varesi et al., 2022).

A infecção e a inflamação persistentes, causadas, por exemplo, por bactérias gram-negativas, podem induzir danos à molécula do DNA os quais podem sinalizar a entrada da célula em um processo de senescência. Apesar da resposta imune proteger contra a invasão bacteriana, o estresse oxidativo durante a inflamação pode indiretamente deteriorar tecidos periodontais levando ao dano de macromoléculas (Aquino-Martinez et al., 2020). Assim, a periodontite, uma das complicações orais mais comuns do diabetes mellitus (DM), pode causar redução na altura do osso alveolar e perda de massa óssea alveolar. Foi descrito que o ambiente hiperglicêmico do DM gera EROs e esse estresse oxidativo pode levar a disfunções nos telômeros de cromossomos e, conseqüentemente, à senescência de células tronco de ligamento periodontal, o que influencia a regeneração e reconstrução do tecido ósseo periodontal e, por fim, exacerba a perda óssea (Tang et al., 2022; Ye et al., 2024).

Vários estudos têm buscado respostas e possíveis formas de prevenção e redução dos eventos que levam à perda dentária. Contudo, muitos dos mecanismos reguladores ainda permanecem obscuros, dificultando a elaboração de estratégias ou métodos para melhorar a saúde bucal e proporcionar melhor qualidade de vida (Maeda, 2020).

1.2 Patogênese da senescência e consequências sobre a saúde bucal

O termo “senescência” surgiu pela observação de culturas de células de mamíferos por Hayflick e Moorhead em 1961, quando notaram que células primárias tinham vida útil finita em condições *in vitro*, contrastando com células cancerígenas

que se dividem sem limites. Curiosamente, o termo “senescência” como usado no artigo original desses pesquisadores, refere-se a um aumento na degradação celular e acúmulo de detritos celulares no estágio final da cultura (denominado “estágio III” pelos autores) (Hayflick e Moorhead, 1961; Ogrodnik, 2021).

A senescência celular (ou meramente “senescência”) é caracterizada pela parada irreversível da proliferação que ocorre em resposta a “gatilhos” intrínsecos e extrínsecos, como danos no DNA, estresse oxidativo, ativação/inativação de oncogenes e estresse de organelas (Van Deursen, 2014; He e Sharpless, 2017; Di Micco et al., 2021). Fisiologicamente, a senescência é um mecanismo de supressão da expansão desenfreada de células, que pode prevenir a pré-malignização (Kang et al., 2011; Amor et al., 2020) e atuar benéficamente na cura de feridas (Demaria et al., 2014). Patologicamente, o acúmulo aberrante de células senescentes pode gerar um ambiente inflamatório que leva a danos teciduais crônicos como fragilidade do esmalte e dentina, perda óssea, exposição do cemento, calcificação distrófica e morte pulpar, além de doenças como aterosclerose, diabetes e osteoartrites (He e Sharpless, 2017; Amor et al., 2020; Maeda, 2020). A senescência é também caracterizada por mudanças na expressão de múltiplos genes, alteração na ligação de histonas, mudança nos níveis de heterocromatina e/ou eucromatina, resistência a apoptose, aumento da atividade metabólica e aumento da produção de proteínas pró-inflamatórias que integram o fenótipo de secreção associado a senescência (*SASP-senescence-associated secretory phenotype*) (Tchkonia et al., 2013) (Figura 1). Múltiplos sinais podem levar a célula a entrar em senescência: sinais externos de danos ou perigo (danos ou padrões moleculares associados a patógenos), sinais metabólicos (altos níveis de glicose, ceramidas, certos ácidos graxos, prostanóides, hipóxia e EROs), fatores que repetidamente induzem a replicação celular (hormônio

REFERÊNCIAS

- Alekseenko LL, Zemelko VI, Domnina AP, Lyublinskaya OG, Zenin V V., Pugovkina NA, et al. Sublethal heat shock induces premature senescence rather than apoptosis in human mesenchymal stem cells. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(3):355–66. Doi: 10.1007/s12192-013-0463-6.
- Amador RR, Paulo J, Longo F, Lacava ZG, Dórea JG, De Fátima M, et al. Metformin (dimethylbiguanide) induced DNA damage in mammalian cells. *Genetics and Mol Bio*. 2012;35(1):153-158. Doi:10.1590/S1415-47572011005000060.
- Amarasena N, Chrisopoulos S, Jamieson LM, Luzzi L. Oral health of australian adults: Distribution and time trends of dental caries, periodontal disease and tooth loss. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(21):1-14. Doi: 10.3390/ijerph182111539.
- Amor C, Feucht J, Leibold J, Ho YJ, Zhu C, Alonso-Curbelo D, et al. Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies. *Nature*. 2020;583(7814):127–32. Doi.org/10.1038/s41586-020-2403-9.
- Anderson R, Lagnado A, Maggiorani D, Walaszczyk A, Dookun E, Chapman J, et al. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *EMBO J*. 2019;38(5):1–21. Doi: 10.15252/embj.2018100492.
- Aquino-Martinez R, Khosla S, Farr JN, Monroe DG. Periodontal disease and senescent cells: New players for an old oral health problem? *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):1–22. Doi: 10.3390/ijms21207441
- Attia SM, Helal GK, Alhaider AA. Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. *Chem Biol Interact*. 2009;180(2):296–304. Doi: 10.1016/j.cbi.2009.03.001
- Bankova V, Trusheva B, Popova M. Propolis extraction methods: a review. *Journal of Apicultural Research*. 2021;60(5):734-743. Doi: 10.1080/00218839.2021.1901426.
- Bruce JL, Hurford RK, Classon M, Koh J, Dyson N. Requirements for cell cycle arrest by p16(INK4a). *Mol Cell*. 2000;6(3):737–42. Doi: 10.1016/S1097-2765(00)00072-1.
- Chandeck C, Mooi WJ. Oncogene-induced Cellular Senescence. *Adv Anat Pathol*. 2010;17(1): 42-48.
- Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MHK. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2001;265(2):294–303. Doi: 10.1006/excr.2001.5182.
- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005;436(7051):725–730. Doi: 10.1038/nature03918.
- Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*. 2008;27(20):2801–2809. Doi: 10.1038/sj.onc.1210950.
- Curtis MA, Diaz PI, van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2020;83(1):14–25. Doi: 10.1111/prd.12296.

-
- Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*. 2014;31(6):722–733. Doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012.
- Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(2):75–95. Doi:10.1038/s41580-020-00314-w.
- Freund A, Patil CK, Campisi J. P38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J*. 2011;30(8):1536–1548. Doi: 10.1038/emboj.2011.69.
- Furukawa M, Wang J, Kurosawa M, Ogiso N, Shikama Y, Kanekura T, et al. Effect of green propolis extracts on experimental aged gingival irritation in vivo and in vitro. *J Oral Biosci*. 2021;63(1):58–65. Doi: 10.1016/j.job.2020.12.003.
- Gao X, Qin W, Chen L, Fan W, Ma T, Schneider A, et al. Effects of Targeted Delivery of Metformin and Dental Pulp Stem Cells on Osteogenesis via Demineralized Dentin Matrix under High Glucose Conditions. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(4):2346–2356. Doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c00124.
- Gil-Montoya JA, de Mello ALF, Barrios R, Gonzalez-Moles MA, Bravo M. Oral health in the elderly patient and its impact on general well-being: A nonsystematic review. *Clin Interv Aging*. 2015;10:461–467. Doi: 10.2147/CIA.S54630.
- Goligorsky MS, Chen J, Patschan S. Stress-induced premature senescence of endothelial cells: A perilous state between recovery and point of no return. *Cur Opin in Hematol*. 2009;16(3): 215–219, 2009. Doi: 10.1097/MOH.0b013e32832a07bd.
- GORGOLIS V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*. 2019; 179(4):813–827. Doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of Mitogen-activated Protein Kinase b H2O2. *J Biol Chem*. 1996;271(8):4138–4142. Doi: 10.1074/jbc.271.8.4138.
- Han J, Sun P. The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends in Biochem Sci*. 2007;32(8):364–371. DOI: 10.1016/j.tibs.2007.06.007.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exper Cell Res*. 1961;25(3):585–621.
- He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell*. 2017;169(6):1000–1011. Doi:10.1016/j.cell.2017.05.015.
- Hillmann G, Geurtsen W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. *Cell Tissue Res*. 1997;289(1):145–154. Doi: 10.1007/s004410050860.
- Iezzi I, Pagella P, Mattioli-Belmonte M, Mitsiadis TA. The effects of ageing on dental pulp stem cells, the tooth longevity elixir. *Eur Cell Mater*. 2019;37:175–185. Doi: 10.22203/eCM.v037a11.
- Javid AZ, Hosseini SA, Gholinezhad H, Moradi L, Haghighi-Zadeh MH, Bazzyar H. Antioxidant and anti-inflammatory properties of melatonin in patients with type 2 diabetes mellitus with periodontal disease under non-surgical periodontal therapy: A double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:753–761. Doi: 10.2147/DMSO.S242208.

-
- Kajiya M, Kurihara H. Molecular mechanisms of periodontal disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):1–3. Doi: 10.3390/ijms22020930.
- Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature.* 2011;479(7374):547–551. Doi:10.1038/nature10599.
- Khosla S, Farr JN, Tchkonja T, Kirkland JL. The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(5):263–275. Doi:10.1038/s41574-020-0335-y.
- Kilbey A, Terry A, Cameron ER, Neil JC. Oncogene-induced senescence: An essential role for Runx. Vol. 7, *Cell Cycle.* 2008;7(15):2333-2340. Doi: 10.4161/cc.6368p. 2333–40.
- Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine.* 2017;21:21–28. Doi:10.1016/j.ebiom.2017.04.013.
- Konishi M, Verdonschot RG, Kakimoto N. An investigation of tooth loss factors in elderly patients using panoramic radiographs. *Oral Radiol.* 2021;37(3):436–442. Doi: 10.1007/s11282-020-00475-6.
- Kuang Y, Hu B, Feng G, Xiang M, Deng Y, Tan M, et al. Metformin prevents against oxidative stress-induced senescence in human periodontal ligament cells. *Biogerontology.* 2020;21(1):13–27. Doi: 10.1007/s10522-019-09838-x.
- Kudlova N, De Sanctis, JB, Hajduch M. Cellular senescence: molecular targets, biomarkers, and senolytic drugs. *Inter J Mol Sci.* 2022;23(4168):1-26. Doi.org/10.3390/ijms23084168.
- Kusama T, Kiuchi S, Umehara N, Kondo K, Osaka K, Aida J. The deterioration of oral function and orofacial appearance mediated the relationship between tooth loss and depression among community-dwelling older adults: A JAGES cohort study using causal mediation analysis. *J Affect Disord.* 2021;286:174–179. Doi: 10.1016/j.jad.2021.02.071.
- Liang H, Li W, Yang H, Cao Y, Ge L, Shi R, et al. FAM96B inhibits the senescence of dental pulp stem cells. *Cell Biol Int.* 2020;44(5):1193–1203. Doi: 10.1002/cbin.11319.
- Lima EN, Araújo LF, Florêncio CMGD. Health Conditions and Tooth Loss in the Population of Brazil: National Health Survey (2013 and 2019). *J Adv Oral Res.* 2023;14(1):67–80. Doi: 10.1177/23202068231163013.
- Liu L, Rando TA. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J Cell Biol.* 2011;193(2):257–266. Doi: 10.1083/jcb.201010131.
- López-Valverde N, Pardal-Peláez B, López-Valverde A, Flores-Fraile J, Herrero-Hernández S, Macedo-De-Sousa B, et al. Effectiveness of Propolis in the Treatment of Periodontal Disease: Updated Systematic Review with Meta-Analysis. *Antioxidants* 2021;10(2):269. Doi:10.3390/antiox10020269.
- Lou Z, Chen J. Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res.* 2006;312(14):2641–2646. Doi: 10.1016/j.yexcr.2006.06.009.p. 2641–6.
- Maeda H. Aging and Senescence of Dental Pulp and Hard Tissues of the Tooth. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(605996):1–9. Doi: 10.3389/fcell.2020.605996.
- Maya-Mendoza A, Ostrakova J, Kosar M, Hall A, Duskova P, Mistrik M, et al. Myc and Ras oncogenes engage different energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress. *Mol Oncol.* 2015;9(3):601–616. Doi: 10.1016/j.molonc.2014.11.001.

-
- McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive Oxygen Species-Induced Activation of the MAP Kinase Signaling Pathways. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1–16. Doi: 10.1089/ars.2006.8.1775.
- Mitsiadis TA, Orsini G, Jimenez-Rojo L. Stem cell-based approaches in dentistry. *Eur Cell Mater*. 2015;30:248–257. Doi: 10.22203/eCM.v030a17.
- Morsczech C. Cellular senescence in dental pulp stem cells. *Arc Oral Biol*. 2019;99:150–155. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.012.
- Na HJ, Park JS, Pyo JH, Lee SH, Jeon HJ, Kim YS, et al. Mechanism of metformin: Inhibition of DNA damage and proliferative activity in *Drosophila* midgut stem cell. *Mech Ageing Dev*. 2013;134(9):381–390. Doi: 10.1016/j.mad.2013.07.003.
- Ogrodnik M. Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. *Aging Cell*. 2021;20(4):1-19. Doi: 10.1111/ace.13338.
- Onaran I, Guven GS, Ozdaş SB, Kanigur G, Vehid S. Metformin does not prevent DNA damage in lymphocytes despite its antioxidant properties against cumene hydroperoxide-induced oxidative stress. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2006;611(1–2):1–8. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.06.036.
- Othman EM, Oli RG, Arias-Loza PA, Kreissl MC, Stopper H. Metformin protects kidney cells from insulin-mediated genotoxicity in vitro and in male Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology*. 2016;157(2):548–559. Doi: 10.1210/en.2015-1572.
- Ott C, Jung T, Grune T, Höhn A. SIPS as a model to study age-related changes in proteolysis and aggregate formation. Vol. 170, *Mech Age and Develop*. 2018;170: 72–81. Doi: 10.1016/j.mad.2017.07.007.
- Palmer AK, Gustafson B, Kirkland JL, Smith U. Cellular senescence: at the nexus between ageing and diabetes. *Diabetologia*. 2019;62(10):1835–1841. Doi: 10.1007/s00125-019-4934-x.
- Prakash R, Mishra RK, Ahmad A, Khan MA, Khan R, Raza, SS. Sivelestat-loaded nanostructured lipid carriers modulate oxidative and inflammatory stress in human dental pulp and mesenchymal stem cells subjected to oxygen-glucose deprivation. *Mat Sci and Eng*. 2021;120(111700):1-11. Doi:10.1016/j.msec.2020.111700.
- Ripari N, Sartori AA, Honorio MDS, Conte FL, Tasca KI, Santiago KB, et al. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: A review and perspectives for COVID-19 treatment. *J Pharm and Pharmacol*. 2021;73(3):281–299. Doi: 10.1093/JPP/RGAA067.
- Rowińska I, Szyperska-ślaska A, Zariczny P, Pasławski R, Kramkowski K, Kowalczyk P. The influence of diet on oxidative stress and inflammation induced by bacterial biofilms in the human oral cavity. *Materials*. 2021;14(1444):1-33. Doi: 10.3390/ma14061444.
- Sarıaydın T, Çal T, Aydın Dilsiz S, Canpınar H, Ündeğer Bucurgat Ü. In vitro assessment of cytotoxic, apoptotic and genotoxic effects of metformin. *İst J Pharm*. 2021;51(2):167–174. Doi: 10.26650/istanbuljpharm.2021.0079.
- Schierz O, Baba K, Fueki K. Functional oral health-related quality of life impact: A systematic review in populations with tooth loss. *J Oral Rehab*. 2021;48(3):256-270. Doi: 10.1111/joor.12984.
- Siteni S, Barron S, Luitel K, Shay JW. Radioprotective effect of the anti-diabetic drug metformin. *PLoS One*. 2024;19(7):e0307598. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0307598>. Acesso em: 26 dez. 2024.

-
- Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct.* 2011;2011:1–6. Doi: 10.1155/2011/792639.
- Tang L, Li T, Chang Y, Wang Z, Li Y, Wang F, et al. Diabetic oxidative stress-induced telomere damage aggravates periodontal bone loss in periodontitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;614:22–28. Doi: 10.1016/j.bbrc.2022.04.039.
- Tchkonia T, Zhu Y, Van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: Therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013;123(3):966–972. Doi: 10.1172/JCI64098.
- Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium. *Stem Cells Dev.* 2019;28(15):974–985. Doi: 10.1089/scd.2019.0031.
- Toussaint O, Dumont P, Remacle J, Dierick JF, Pascal T, Fripiat C, et al. Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one in vivo reality, two possible definitions? *Scient World J.* 2002;2(1):230–247. Doi: 10.1100/tsw.2002.100.
- Toussaint O, Royer VÂ, Salmon M, Remacle JÂ. Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(5-6):1007–1009. Doi: 10.1016/S0006-2952(02)01170-X.
- Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, Marchisio M, Mazzon E, Paganelli R, et al. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. *Stem Cells Dev.* 2019;28(15):995–1003. Doi: 10.1089/scd.2019.0025.
- Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014;509(7501):439–446. Doi: 1038/nature13193
- Varesi A, Chirumbolo S, Campagnoli LIM, Pierella E, Piccini GB, Carrara A, et al. The Role of Antioxidants in the Interplay between Oxidative Stress and Senescence. *Antioxidants.* 2022;11(1224)1-42. Doi: 10.3390/antiox11071224.
- Vial G, Detaille D, Guigas B. Role of mitochondria in the mechanism(s) of action of metformin. *Front in Endoc.* 2019;10(294):1-8. Doi: 10.3389/fendo.2019.00294.
- Von Zglinicki T. Replicative senescence and the art of counting. *Exp Gerontol.* 2003;38(11–12):1259–1264. Doi: 10.1016/j.exger.2003.09.015.
- Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Front Physiol.* 2017;8(910):1–13. Doi: 10.3389/fphys.2017.00910.
- Watad A, Quaresma M, Brown S, Cohen Tervaert JW, Rodríguez-Pint I, Cervera R, et al. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (Shoenfeld's syndrome) - An update. *Lupus.* 2017;26(7):675–681. Doi: 10.1177/0961203316686406.
- World Health Organization. Oral health surveys: basic methods. World Health Organization, 2013.
- Yaghoobi MM, Sheikholeslami M, Ebrahimi M. Effects of hydrogen peroxide, doxorubicin and ultraviolet irradiation on senescence of human dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol.* 2020;117(104819):1-9. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104819.
- Ye X, Wang Y, Tian Y, Bi R, Li M, Yang C, et al. Metformin alleviates junctional epithelium senescence via the AMPK/SIRT1/autophagy pathway in periodontitis induced by hyperglycemia. *Heliyon.* 2024;10(6):e27478. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27478>. Acesso em: 26 dez. 2024.

-
- Yeo RWY, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ, et al. Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(3):336–341. Doi: 10.1016/j.addr.2012.07.001.
- Zhang Y, Leveille SG, Shi L. Multiple chronic diseases associated with tooth loss among the US adult population. *Front Big Data.* 2022;5(932618):1-10. Doi: 10.3389/fdata.2022.932618.
- Zheng W, Wang S, Ma D, Tang L, Duan Y, Jin Y. Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(9):2363-2371. Doi: 10.1089/ten.tea.2008.0562.
- Zhou D, Borsa M, Simon AK. Hallmarks and detection techniques of cellular senescence and cellular ageing in immune cells. *Aging Cell.* 2021;20(2):1–17. Doi: 10.1111/accel.13316.
- Zulhendri F, Felitti R, Fearnley J, Ravalia M. The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review. *J Oral Biosc.* 2021;63(1):23-34. Doi: 10.1016/j.job.2021.01.001.p. 23–34.

CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO I

Artigo enviado para revista **Stem Cells International** (Fator de impacto: 3.8)
