

# Uso De Células Estaminais Dentárias Na Neurorregeneração e Neuroproteção

Fabiana Da Silva Vieira

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária  
(Ciclo Integrado)

Gandra, 29 de Setembro de 2022

**Fabiana Da Silva Vieira**

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária  
(Ciclo Integrado)

# **Uso De Células Estaminais Dentárias Na Neurorregeneração e Neuroproteção**

Trabalho realizado sob a Orientação de Prof. Dr. João Fontes

## Declaração de integridade

Eu, acima identificada, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.



## Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor João Fontes, por todo o apoio, ajuda, disponibilidade e paciência na elaboração desta dissertação.

Martim, pequenino, mas a minha maior força, o meu amor maior. Por ti, todos os dias tento ser uma pessoa melhor. Espero que um dia olhes para mim como um exemplo.

À minha mãe, por ser o meu conforto, a minha melhor amiga, por me encheres o ego e além de tudo, obrigada por todo o amor que me deste e dás desde o meu primeiro suspiro.

Ao meu pai, que me ensinou a lutar pelos meus sonhos, a ser ambiciosa. Nunca me vou esquecer que “Só a morte não tem solução”, agora sei que podem aparecer todas as adversidades, mas com amor e dedicação conseguimos fazer tudo.

A ti mana, se existe uma alma-gêmea destinada a mim neste Mundo, és tu. Não tenho palavras para o que és para mim, para sempre juntas, longe ou perto.

A ti Ivo, o irmão que a vida me deu. Dos meus maiores exemplos de amor e resiliência.

À minha binómia Isabel, literalmente quem me deu, não uma, mas as duas mãos neste caminho. A minha coluna, a minha primeira e melhor parceira no primeiro passo do que vai ser o resto das nossas vidas.

A toda a minha família e amigos que me apoiaram desde sempre, que me levantaram quando caí e que celebraram sempre todos os meus feitos, sem vocês isto não teria sido possível.

*“Some infinities are bigger than others”*



## Resumo

As células estaminais são células indiferenciadas, sublimes nas qualidades de autorregeneração, plasticidade e multidiferenciação. Podem emergir de várias fontes: sangue, cordão umbilical, placenta e tecido dentário. Este último, o tecido dentário, é rico em células estaminais mesenquimatosas e por isso, cada vez mais é visto com grande potencial na medicina regenerativa, de destacar na neuroregeneração e neuroproteção. Ao ser de uma obtenção fácil e tendo uma grande oferta, estas células estaminais afirmam-se perante outros tipos celulares com fontes diferentes, uma vez que fogem às questões éticas e à colheita dolorosa.

O principal objetivo desta revisão sistemática é analisar o potencial regenerativo das células estaminais do tecido dentário a nível neuronal, após cultura *in vitro* e *in vivo*.

Foram comparados resultados de vários artigos de modo a chegar a uma conclusão incisiva sobre o verdadeiro potencial da aplicabilidade clínica destas células com visão no passado, presente e futuro.

Concluiu-se que a utilidade das células estaminais dentárias na neuroregeneração não é uma ilusão, mas sim uma realidade. No entanto, mais estudos são necessários.





## Abstract

Stem cells are undifferentiated cells, sublime in the qualities of self-regeneration, plasticity, and multi-differentiation. It can emerge from several sources: blood, umbilical cord, placenta, and dental tissue. The last one, dental tissue, is rich in mesenchymal stem cells and is therefore increasingly seen with great potential in regenerative medicine, especially in neuroregeneration and neuroprotection. Being easily obtainable and having a large supply, these stem cells stand out against other cell types with different sources as they avoid ethical issues and painful harvesting.

The main objective of this systematic review is to analyze the regenerative potential of dental tissue stem cells at the neuronal area, after *in vitro* and *in vivo* culture.

Results from several articles were compared to reach an incisive conclusion about the true potential of the clinical applicability of these cells with vision in the past, present, and future.

It was concluded that the usefulness of dental stem cells in neuroregeneration is not an illusion, but a reality. However, more studies are needed.



## Índice

1	Introdução .....	1
2	Objetivo .....	3
3	Materiais e Métodos .....	4
4	Resultados.....	5
5	Discussão.....	23
5.1.	Células Estaminais: Uma Odisseia da Ciência .....	23
5.1.1	Tipos de Células Estaminais .....	24
5.1.1.1	Células Unipotentes.....	24
5.1.1.2	Células Totipotentes .....	24
5.1.1.4	Células Multipotentes.....	24
5.1.1.5	Células Pluripotentes Induzidas.....	25
5.1.1.6	Células Estaminais Embrionárias .....	25
5.1.1.7	Células Estaminais Adultas.....	25
5.1.2	Benefícios das Células Estaminais .....	26
5.1.3	Riscos e Malefícios das Células Estaminais .....	27
5.2	Células Estaminais do Tecido Dentário.....	29
5.2.1	DPSC's – Células Estaminais da Polpa Dentária.....	29
5.2.2	SHED's – Células Estaminais do Dente Decíduo Esfoliado .....	30
5.2.3	PDLSC's – Células Estaminais do Ligamento Periodontal .....	30
5.2.4	SCAP's – Células Estaminais da Papila Apical .....	30
5.2.5	DFPC's – Células Estaminais do Folículo Dentário .....	31
5.3	Isolamento e Cultura Celular .....	32
5.3.1	Marcação imunocitoquímica.....	32
5.3.2	Separação de células ativadas por fluorescência (FACS).....	32
5.3.3	Seleção imunomagnética (MACS).....	33
5.3.4	Método da Digestão Enzimática .....	34
5.3.5	Método do Explante.....	34
5.4	Indução neuronal .....	35
5.4.1	Método de Indução Química .....	35
5.4.2	Método de Indução por Fator de Crescimento. ....	36
6	Neuroproteção .....	37
7	Neurorregeneração .....	39
8.	Conclusão .....	41
9.	Referências Bibliográficas.....	42
10.	Anexos.....	46



## Índice de Figuras

Figura 1. Fluxograma .....	5
Figura 2. Transformação maligna das células mesenquimais .....	27
Figura 3. Malefícios das células mesenquimais .....	28
Figura 4. Citomorfologia Neuronal: 1. Núcleo Celular 2. Dendrite 3. Bainha de mielina 4. Axónio 5. Célula de Schwann 6. Terminais do axónio .....	40



## Abreviaturas

- DPSC's- Células Estaminais da Polpa Dentária
- SHED's- Células Estaminais de Dentes Decíduos Esfoliados
- SCAP's- Células Estaminais da Papila Apical
- PDLSC's- Células Estaminais do Ligamento Periodontal
- SCAP's- Células Estaminais da Papila Apical
- DFPC's- Células Estaminais do Folículo Dentário
- CEMO's e MSC's- Células Estaminais Mesenquimais da Medula Óssea
- APDC's- Células Derivadas Da Polpa Apical
- CPC's- Células Pulpares Coronais
- TGSC's- Células Estaminais do Gérmen Dentário
- TH- Tirosina Hidroxilase
- SGN's- Neurónios do gânglio espiral
- NMDA- N-Metil D-Aspartato
- GFAP-Proteína glial fibrilar ácida
- KCl- Cloreto de potássio
- ATP- Adenosina trifosfato
- Ca<sup>2+</sup> - Cálcio
- DA- Doença de Alzheimer
- NGF- Fator de crescimento neuronal
- BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro
- RT-PCR- Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
- Oct4, Sox2 e Nanog- Marcadores pluripotentes
- CD44, CD90, CD105- Marcadores mesenquimais
- CD34 e CD45- Marcadores hematopoiéticos
- Na<sup>+</sup>- Sódio
- K<sup>+</sup> - Potássio
- Nestina, MAP2,  $\beta$ 3-tubulina, Musashi, NURR1, Tau, PSA-NCAM, NeuN, SOX2, SOX9 -  
Marcadores neuronais

**N-tubulina, TUJ1, Map2ab-** Marcador neuronal precoce  
**TEA** - Tetraetilamônio  
**RSV-** Resveratrol  
**AO-** Ácido ocadáico  
**NF-M-** Proteína do neurofilamento  
**TTX** - Tetrodotoxina  
**KDR-**Correntes de potássio retificadoras retardadas  
**EGF-** Fator de Crescimento Epidérmico  
**MEM-** Meio Basal de *Eagle*  
**DMEM-** MEM suplementado com vitaminas e aminoácidos  
**IF-** Imunofluorescência  
**Ngn1-** Neurogenina1  
**NT-3-** Neurotrofina-3  
**GDNF-** Fator neurotrófico derivado de células gliais  
**PNL-**Lesão nervosa periférica  
**FBS-**Soro fetal bovino  
**FGF-B ou bFGF** - Fator de crescimento de fibroblasto básico  
**PBS-** Solução salina tamponada com fosfato  
**SHH-** Proteína principal da via de sinalização *hedgehog*  
**FGF8-** Fator de crescimento de fibroblastos 8  
**PrPC-** Proteína do príão  
**PDGFaa-** Fator de crescimento derivado de plaquetas AA  
**Ab1-40-** Peptídeo Beta-Amilóide 1-40  
**PLL-** Poli-L-lisina  
**NMDA-** N-metil D-Aspartato  
**DP-** Doença de Parkinson



## 1 Introdução

A presente revisão sistemática foi desenvolvida para a UC Dissertação no quinto ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, e aborda a temática “Uso de células estaminais dentárias na Neuroregeneração e Neuroproteção”.

Doenças neuro degenerativas tal como lesões no tecido nervoso são uma das áreas mais complexas, sensíveis e intimidantes no quadro da medicina, uma vez que a cura para essas lesões nos parece, desde tempos antigos, um objetivo inalcançável. Por essa razão, o sistema nervoso é um dos maiores alvos na medicina regenerativa. E se conseguíssemos pesquisar e desenvolver através da medicina dentária, mais concretamente das células estaminais do tecido dentário, uma terapia para planejar e atenuar os efeitos resultantes desses acidentes nervosos?

As células estaminais foram descobertas em meados de 1960 e são desde esse tempo estudadas minuciosamente, uma vez que se apresentam como um elixir da juventude celular, resguardando a saúde celular e evitando a sua degeneração. A precursora desta família celular que nos é mais íntima é a medula óssea, onde as suas células após isoladas, apresentaram rapidamente uma grande capacidade de autorregeneração, multidiferenciação, clonagem e plasticidade (1) (2), o que as distingue dos outros géneros celulares, apresentando como únicos defeitos os métodos invasivos e dolorosos de colheita (3) que acarretam bastantes questões éticas consigo (4), e a possível teratogenicidade. (5–7)

No entanto, com o decorrer do tempo e com a emergência de estudos *in vitro* e *in vivo*, foram avistadas e analisadas outras fontes de células estaminais, como por exemplo: sangue periférico, cordão umbilical, líquido amniótico, placenta, tecido adiposo, tecido dentário, entre outros.

Focando no tecido dentário, as células foram isoladas pela primeira vez há mais de duas décadas, permitindo conhecer as células estaminais dentárias, sendo que este subtipo celular revelou as mesmas características que as células estaminais convencionais, com a vantagem de apresentar um método de recolha mais fácil e inofensivo, uma maior oferta, uma fuga às questões éticas e um menor potencial cancerígeno. (4,5)

Podendo ser divididas nas cinco seguintes populações: DPSC's (células estaminais da polpa dentária), SHED's (células estaminais de dentes decíduos esfoliados), DFPC's (células estaminais do folículo dentário), SCAP's (células estaminais da papila dentária) e PDLC's (células estaminais do ligamento periodontal) têm o potencial de se diferenciar em linhagens

mesodérmicas e ectodérmicas sendo exemplos: osteoblastos, condrócitos, tecido nervoso, células da glia, adipócitos, entre outros. (8–10)

Nesta revisão pretende-se examinar com maior incidência o potencial das células estaminais dentárias na neurodiferenciação, neuroproteção e neuroregeneração, conferido devido à sua origem – a crista neural – que lhes permite uma maior facilidade na formação e na diferenciação de neuroesferas. (4,9)

Cada vez mais estudos, *in vitro* e *in vivo*, se assumem como uma prova de validação desse potencial, assumindo evidentemente que estas células podem ser um forte recurso na recuperação e/ou proteção de tecidos neuronais danificados e que não se trata unicamente de uma ilusão.

## 2 Objetivo

Esta dissertação tem como objetivo analisar o estado em que se encontra a área relativa ao uso das células estaminais na neuroregeneração, nomeadamente o uso de células estaminais do tecido dentário. Assim, nesta revisão sistemática foi realizada uma contextualização temática e uma análise de estudos já realizados na pesquisa desta área tão inovadora e especial.

### 3 Materiais e Métodos

Nesta revisão foi realizada uma pesquisa no âmbito do tema “Uso de Células Estaminais Dentárias na Neuroregeneração e Neuroproteção”, onde foram reunidos e analisados artigos existentes no motor de buscar Pubmed, no decorrer do período entre Outubro de 2021 e Abril de 2022. Os artigos resultantes da pesquisa foram triados de acordo com alguns parâmetros da área das células estaminais como: tipos e subtipos de células estaminais de acordo com as suas propriedades e origens, métodos de colheita celular, engenharia celular e as suas aplicações, de destacar as aplicações no sistema/tecido neuronal.

Na pesquisa bibliográfica foi apreciado e empregado o método de pesquisa particularizado das palavras *MeSH*. As palavras *MesH* utilizadas foram “*Dental Pulp*”, “*Neurons*”, “*Stem Cells/metabolism*”, “*Adult Stem Cells*”, “*Cells Differentiation*”, “*Neural Stem Cells*” e “*Neurons*”.

Relativamente aos critérios de inclusão foi considerado o período de admissão dos artigos no motor de pesquisa PubMed, sendo apenas ponderados artigos admitidos há 10 anos ou menos analogamente ao ano 2021. Apenas foram considerados artigos de revisão para contextualização do tema.

Quanto aos critérios de exclusão, foram excluídos artigos cujo resumo ou título não correspondessem aos objetivos.

Foram selecionados na totalidade 111 artigos relativos à pesquisa. Para a tabela de resultados foram considerados 31 artigos de acordo com as palavras Mesh “*Dental Pulp*”, “*Neurons*”, “*Stem Cells/metabolism*”, “*Adult Stem Cells*”, “*Cells Differentiation*”, “*Neural Stem Cells*” e “*Neurons*” de acordo com os critérios de inclusão e exclusão acima descritos.

Relativamente aos artigos utilizados, estes dizem respeito a estudos *in vitro* e *in vivo* utilizados para a tabela de resultados e, os restantes são artigos de revisão e capítulos de livros, utilizados para contextualização do tema.

## 4 Resultados

Um total de 111 artigos foram identificados no PubMed, conforme mostrado na Figura 1. Após a leitura e análise dos títulos e resumos dos artigos científicos, foram selecionados 36 artigos e 3 foram incluídos manualmente a partir de referências. Os restantes 39 estudos foram então selecionados para leitura completa. (Figura 1). Desses artigos, 8 foram excluídos por não fornecerem informações relevantes de acordo com o objetivo da presente revisão sistemática integrativa. Por fim, 31 estudos foram incluídos nesta revisão sistemática integrativa.

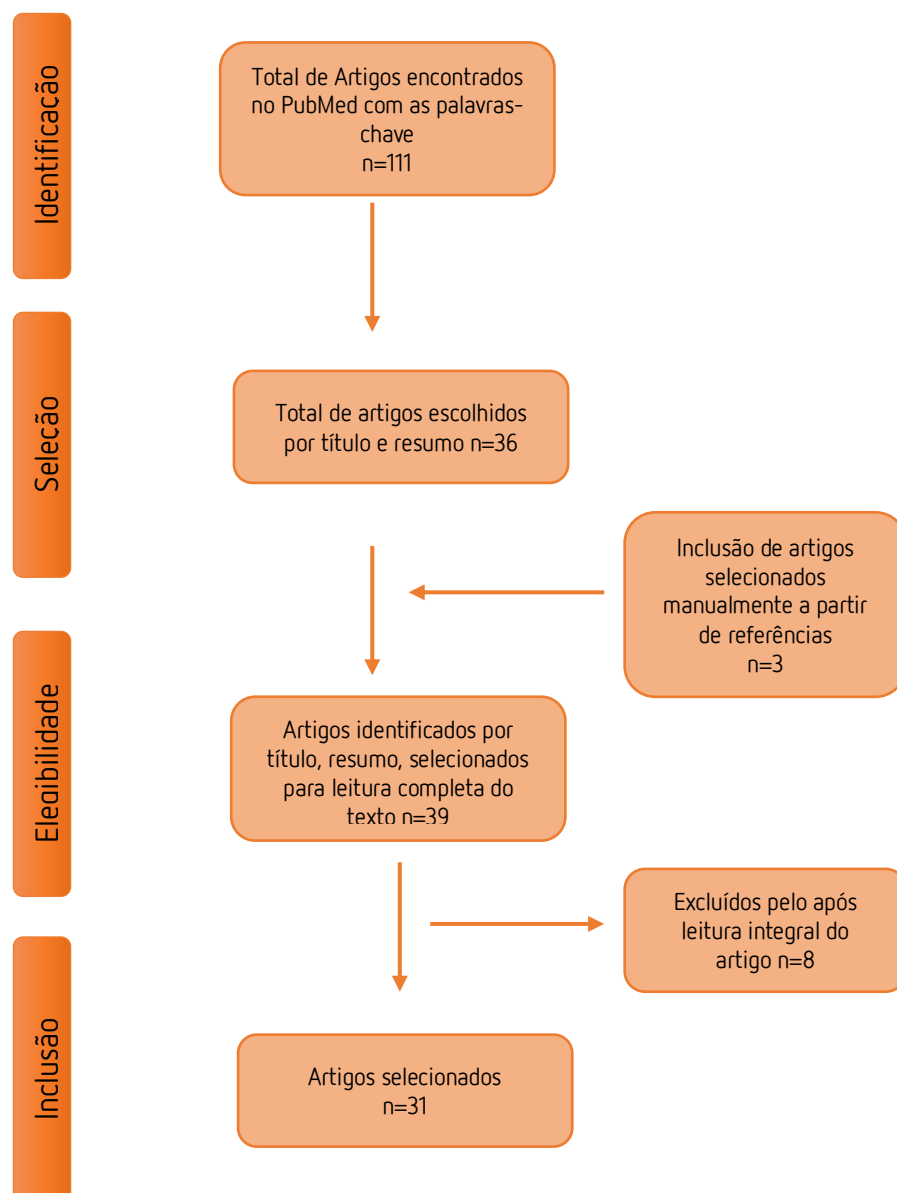


Figura 1. Fluxograma

Nº	Autor/Ano	Tipo	Objetivos	Materiais e Métodos	Resultados	Conclusão
1	Ullah et al. 2017	Estudo <i>in vitro</i>	Descobrir uma fonte de MSC's de tecidos dentários (folículo, papila e polpa) do mesmo dador, que apresente maior potencial de diferenciação neuronal <i>in vitro</i> .	MSC's foram isoladas de tecidos dentários pelo método de digestão enzimática. Todas as MSC's foram examinadas para marcadores pluripotentes através de <i>Western Blot</i> (método em biologia molecular e bioquímica para detetar proteínas numa amostra), marcadores de superfície celular por citometria de fluxo, marcadores de adipócitos e osteócitos e por RT-PCR. As MSC's neuronais diferenciadas foram caracterizadas quanto a marcadores neuronais específicos por RT-PCR e IF. Propriedades neuronais funcionais foram analisadas por eletrofisiologia e expressão de marcadores sinápticos.	Todas as MCS's expressaram Oct4, Sox2 e Nanog e foram positivas para CD44, CD90, CD105 e negativas para CD34 e CD45. Além disso, as MSC's foram diferenciadas com sucesso em adipócitos, osteócitos e transdiferenciadas em células neuronais. As DPSC's apresentaram maior potencial de diferenciação neuronal, em termos de expressão de marcadores neuronais específicos tanto a nível génico quanto proteico, e possuem maior corrente de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> com a expressão de marcadores sinápticos.	Os 3 tipos de MSC's dentárias de um único dador possuem propriedades celulares semelhantes e podem diferenciar-se em células neuronais. No entanto, as DPSC's apresentaram um maior potencial neurogénico do que as DFPC's e SCAP's tendo prioridade em futuras terapias com células-tronco para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos.
2	D. Hsiao et al. 2020	Estudo <i>in vitro</i>	Investigar os efeitos da largura do espaço entre as hastes (GWbS) de <i>scaffolds</i> de ácido polilático impressos em três dimensões (3DP PLAS's) na diferenciação neuronal de DPSC's.	Ambos os 3DP-PLAS com GWbS de 150 mm e 200 mm foram grupos experimentais e o 3DP-PLAS sem hastes de microfilamento foi o grupo controlo. As propriedades dos 3DP-PLASs foram observadas por ângulos de contato com água (WCA), microscópio de força atômica (AFM) e calorímetro de varredura diferencial (DSC). A cultura celular de DPSC's em 3DP-PLASs foi realizada e a citotoxicidade foi analisada com o ensaio <i>Alamar Blue</i> . A diferenciação neuronal de DPSC's em diferentes 3DP-PLASs foi comparada após indução neuronal. As expressões de nestina, MAP2, $\beta$ 3-tubulina e GFAP foram avaliadas com coloração imunocitoquímica.	Não foi observada citotoxicidade entre os <i>scaffolds</i> , embora possam diferir no tamanho dos cristais e nas direções resultantes de diferentes ordens de tempo de resfriamento, superfície de contato e distribuição de temperatura durante o processo de construção. Além disso, as DPSC's podem aderir totalmente ao 3DP-PLAS modificado por álcool ou PLL e demonstrar alteração morfológica	Concluiu-se que 3DP-PLASs com gaps de 150mm podem induzir orientações celulares mais facilmente do que gaps de 200mm. Além disso, 3DP-PLAS parecem melhorar a adesão celular após serem revestidos com PLL ou embebidos em álcool.

					e desempenho de proteína relacionado.	
<b>3</b>	M. Király et al.  2011	Estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Examinar a sobrevivência e integração de DPSC's pré-diferenciadas <i>in vitro</i> em neurónios e <i>in vivo</i> em cérebro não lesado e em cérebro lesado.	<p>DPSC's pré-diferenciadas, marcadas com um corante celular, foram introduzidas no cérebro de rato pós-natal. As DPSC's foram transplantadas para o líquido cefalorraquidiano.</p> <p>A lesão cortical foi induzida através de um selo de metal frio (60°) na calvária- abóbada craniana- sobre o córtex motor do membro anterior. Após 4 semanas, a localização das células foi detetada por microscopia de fluorescência e os marcadores de células neuronais foram estudados por imuno-histoquímica. Para investigar as propriedades eletrofisiológicas de DPSC's foi usado o método da fluorescência em enxertos de cérebro, e a presença de canais de Na+K+ da análise de voltagem por <i>patch clamp</i>-técnica de eletrofisiologia usada para estudar correntes iónicas.</p> <p>Estas DPSC's migraram como células únicas para uma variedade de regiões do cérebro. A maioria das células estava localizada nas zonas progenitoras neuronais do cérebro, a zona subventricular (SVZ), a zona subgranular (SGZ) e a zona subcalosa (SCZ).</p>	<p>A análise imuno-histoquímica revelou que as DPSC's transplantadas expressaram N-tubulina, NF-M, NeuN e GFAP (proteína expressa por várias células do sistema nervoso central, incluindo astrócitos). Além disso, as células exibiram correntes de Na+ dependentes de voltagem (VD) sensíveis a TTX (neurotoxina) e KDR sensíveis a TEA. 4 semanas após a lesão, células marcadas com fluorescência foram detetadas no córtex lesionado. A expressão de marcadores neuroespecíficos foi aumentada em DPSC's encontradas na área das lesões corticais em comparação com as células fluorescentes do cérebro não lesionado. As correntes de sódio VD sensíveis a TTX e KDR sensíveis a TEA aumentaram significativamente em células marcadas da área cortical lesionada.</p>	Neste estudo, foi demonstrado que as células derivadas de DPSC's enxertadas integram-se no cérebro do hospedeiro e mostram propriedades neuronais, não apenas expressando marcadores específicos neuronais, mas também expondo canais de Na+K+ VD. Este estudo revela que DPSC's pré-diferenciadas podem assistir como fontes úteis de neurogênese e gliogênese <i>in vivo</i> , na lesão cerebral.
<b>4</b>	F. Rafiee et al.  2020	Estudo <i>in vitro</i>	Avaliar o potencial da indução de diferenciação neuronal de DPSC's por EGF e bFGF.	<p>DPSC's foram tratados com EGF, bFGF e heparina. A fim de induzir ainda mais a diferenciação neuro-progenitora, esferóides derivados de DPSC também foram incubados em meio sem soro durante 3 dias. As esferas resultantes foram então cultivadas em DMEM com alto teor de glicose e FBS. A morfologia das células e a</p>	<p>As DPSC's tratadas com EGF/bFGF apresentaram um aumento na expressão de Nestina (proteína expressa principalmente nas células nervosas, implicada no crescimento radial do axónio) e SRY (região determinante do sexo-cromossoma Y) – após 72h. A regulação positiva de Nestina e</p>	As DPSC's demonstraram potencial de diferenciação em células semelhantes a neurónios.

				expressão dos marcadores de diferenciação foram analisados por PCR, <i>Western Blot</i> e IF.	SOX2 (fator de transcrição essencial para manter a autorrenovação e pluripotência, de células-tronco embrionárias indiferenciadas, tendo um papel crítico na manutenção de células-tronco embrionárias e neuronais) induzida por fatores de crescimento foi confirmada usando <i>western blotting</i> e IF. As culturas também produziram células semelhantes a neurónios com um aumento nos níveis de transcrição de Nestina, MAP2 (proteína 2 associada a microtúbulos, essencial na neurogênese) e Ngn1 (fator essencial na neurogênese e neurodiferenciação) em comparação com as células mantidas no meio controlo.	
5	Venugopal et al.  2018	Estudo comparativo <i>in vitro</i>	Comparar o potencial neuroprotetor de exossomas (vesículas ligadas à membrana mediadoras da comunicação célula-célula) derivados de MSC's. Os exossomas contêm citocinas, fatores de crescimento, lípidos sinalizadores, e reguladores de mRNA em meio de MSC ou neurónio-MSc contra a excitotoxicidade (processo pelo qual células nervosas são danificadas ou mortas	DPSC's e BM-MSc foram cultivadas em DMEM com FBS, penicilina, estreptomicina e glutamina, sendo mantidas em atmosfera húmida a 37°C e 5% CO <sub>2</sub> .  A cada 48 horas, o meio de cultura foi renovado.  As culturas de DPSC/BM-MSc ao atingir uma confluência de 70%-80% foram subcultivadas de modo a avaliar o potencial neuroprotetor.	Foi demonstrado que a eficácia neuroprotetora de MSC's-exossomas é igualmente eficiente quando comparadas aos meios de condição de MSC, e ao sistema de co-cultura neurónio-MSc. O tratamento de neurónios degenerados do hipocampo com as 3 abordagens baseadas em MSC's pode regular as expressões do fator de crescimento endógeno do hospedeiro e prevenir a apoptose ativando a PI3K-B (via ativadora, de diferenciação e sobrevivência das células B) e Bcl-2 (proteína inibidora da apoptose).	O estudo destaca as possibilidades de tratamento de doenças neurodegenerativas com exossomas de tamanho "nano" em oposição ao transplante de bilhões de células-tronco, que acarretam várias desvantagens.



			por estimulação excessiva por neurotransmissores) induzida por ácido caínico.			
6	Y.-W. Geng et al.  2017	Estudo <i>in vitro</i>	Investigar se o RSV (antioxidante natural) induz a diferenciação neuronal de DPSC's.	As DPSC's foram incubadas por 12h com/sem RSV. As células foram expostas a 2 tratamentos diferentes, o primeiro contendo DMEM/F12, bFGF, b-mercaptoetanol e FBS por 24h, e posteriormente foi substituído por hidroxianisol butilado e dimetilsulfóxido em meio livre de FBS por 6h.  DPSC's de controlo (ctrl-DPSC's) foram incubadas em meio contendo FBS por 24h, seguindo-se de substituição por meio livre de FBS e incubação das células por 6h.	Os resultados de RT-PCR mostraram que as DPSC's tratadas com RSV (RSV-DPSC's) aumentaram significativamente a expressão do marcador neuroprogenitor - Nestina. Quando RSV-DPSC's foram diferenciadas em meio de indução neuronal, elas mostraram uma morfologia semelhante a neurónios. A expressão de Nestina, Musashi e NF-M foi significativamente aumentada.	O tratamento com RSV, juntamente com o uso de meios de indução neuronal, promoveu efetivamente a diferenciação em células neuronais.
7	F. Wang et al.  2017	Estudo <i>in vitro</i>	Investigar os potenciais efeitos terapêuticos das DPSC's em modelo celular de DA (induzido por AO (neurotoxina) à linhagem celular de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, <i>in vitro</i> por 24h.	As células foram co-cultivadas com DPSC's pelo sistema de co-cultura <i>transwell</i> durante 24 h.	A citomorfologia das células tratadas com DPSC's foi restaurada com o re-alongamento das dendrites retraídas. Enquanto isso, o ensaio <i>Cell Counting Kit-8</i> e a coloração mostraram que as DPSC's causaram aumento significativo na viabilidade e diminuição na apoptose das células modelo. A observação da marcação de <i>Dll</i> exibiu dendrites de prolongamento em células tratadas. Além disso, a coloração específica de <i>α-tubulina</i> e <i>F-actina</i> demonstrou neurónios restaurados, com dendrites alongadas, microfilamentos densamente arranjados e fibrilas microtubulares espessadas. Além do mais, <i>Western blotting</i> revelou	Estes resultados indicam que DPSC's podem promover a regeneração de neurónios danificados <i>in vitro</i> em modelo de DA e podem servir como fonte de células útil para o tratamento de DA.

					que a fosforilação da proteína Tau (proteína controladora da dinâmica dos microtúbulos durante a maturação e o crescimento dos neuritos) foi significativamente suprimida pela adição de DPSC's, o que revela um potencial neuroprotetor.	
8	C.-C. Chang et al.  2014	Estudo <i>in vitro</i>	Avaliar a eficácia da indução neuronal dopaminérgica e motora na transdiferenciação de DPSC's em células semelhantes a neurónios.	O isolamento, cultura e identificação de DPSC's foram realizados com análises morfológicas e citometria de fluxo (técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo). O potencial de proliferação de DPSC's foi avaliado com Ensaio XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 2H-tetrazólio-5-carboxanilida). Foram preparados meios para a indução neuronal motora dopaminérgica e espinal. A eficácia da indução foi avaliada pela expressão de marcadores neuronais específicos em DPSC's por imunocitoquímica e RT-PCR.	No ensaio XTT, houve uma diminuição de 2-2,6 vezes nas DPSC's cultivadas em meio indutivo neuronal dopaminérgico ou motor. As proporções de $\beta$ 3-tubulina, GFAP e células positivas para oligodendrócitos foram maiores em DPSC's cultivadas nos meios indutivos em comparação com o controlo. Além disso, as células dopaminérgicas e do neurónio motor espinal derivadas de DPSC's após a indução expressaram uma densidade mais alta de marcadores neuronais do que aqueles antes da indução.	Estudos futuros devem ser realizados para esclarecer se as DPSC's, além de seus efeitos neurotróficos e neuroprotetores, também são capazes de se diferenciar em neurónios totalmente funcionais.
9	N. Nourbakhsh et al.  2011	Estudo <i>in vitro</i>	Investigar o potencial neuronal das SHED's.	SHED's foram recolhidas da polpa dentária decídua e desagregadas por digestão enzimática.  As polpas foram digeridas em colagenase tipo I contendo soro fetal de vitela por 1h a 37°C. As células foram inicialmente cultivadas em MEM. Após 1 dia, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS.  A indução neuronal foi iniciada por plaqueamento em lâminas revestidas com PLL em meio neuro-basal contendo ITS (insulina-transferrina-selénio), e citocinas incluindo bFGF durante 5 dias por bFGF, FGF-8 e SHH ao longo de mais 5 dias. Durante os primeiros 5 dias, o meio foi substituído por metade da quantidade e foi adicionado bFGF. Após a troca de meio no 5º dia, a cultura continuou sem qualquer renovação de meio.	Na avaliação da diferenciação neuronal <i>in vitro</i> das SHED's, foi utilizada uma indução simples por fator de crescimento. A IF e a citometria de fluxo revelaram que as SHED's expressavam nestina e $\beta$ 3-tubulina. Além disso, a intensidade e as percentagens de nestina e $\beta$ 3-tubulina, PSA-NCAM, NeuN, Tau, TH ou GFAP aumentaram após o tratamento. As análises de RT-PCR e <i>Western Blot</i> mostraram que os marcadores neuronais foram fortemente aumentados após a indução.	Os resultados mostram-nos evidências de que as SHED's podem-se diferenciar em células neuronais pela expressão de um conjunto abrangente de genes e proteínas que as definem. SHED's podem ser consideradas como novas candidatas para as terapias de uma ampla variedade de

						neuropatologias e neurotraumatismos.
10	T. Gonmanee et al.  2018	Estudo <i>in vitro</i>	Avaliar a capacidade de diferenciação de DPSC's e SHED's em SGN's (neurónios do gânglio espiral) através da utilização de neurotrofinas.	DPSC's e SHED's foram expostas a neurotrofinas - BDNF, neurotrofina-3 (NT-3) e GDNF. A diferenciação foi identificada por imunocoloração, RT-PCR de marcadores neuronais e quantificação da atividade de Ca <sup>2+</sup> intracelular.	Após 2 semanas de indução, foram observadas alterações morfológicas em DPSC's e SHED's. As células diferenciadas expressaram $\beta$ 3-tubulina, GATA3 e recetor de tropo miosina quinase B, (marcador proteico de neurónios do gânglio espiral). Essas células também mostraram <i>upregulation</i> dos genes que codificam essas proteínas e recetor neurotrófico tirosina quinase 2. Além disso, foram percebidas dinâmicas de Ca <sup>2+</sup> intracelular que refletem a libertação de neurotransmissores.	Foi demonstrado que DPSC's e SHED's podem-se diferenciar em células semelhantes a SGN's.
11	Gnanasegaran et al.  2016	Estudo <i>in vitro</i>	Investigar se as células-tronco da polpa dentária de dentes cariados (DPSC's-CT) se podem diferenciar em células funcionais dopaminérgicas (DAérgicas) e fornecer uma fonte alternativa de células na medicina regenerativa.	DPSC's e DPSC's-CT foram isoladas e expandidas em condições de cultura idênticas e, subsequentemente diferenciadas para células do tipo DAérgicas usando amostras dopaminérgicas pré-definidas. As eficiências dopaminérgicas foram avaliadas tanto a níveis génicos, proteicos e de secretoma (conjunto de proteínas expressas).	A eficiência das DPSC's-CT em se diferenciar em células DAérgicas não foi equivalente à das DPSC's. Isso foi refletido ainda mais nos marcadores nestina, NURR1 e $\beta$ 3-tubulina, uma vez que foram expressos em menor quantidade quando comparados a DPSC's diferenciadas. Além disso, expressões de transcriptomas relacionados à neurogênese revelaram regulação negativa de mais de 50% dos genes em comparação com DPSC's diferenciadas. Entre os genes notáveis estavam aqueles da família de fatores de transcrição (FLNA, MEF2C, NEUROG2), família de vias de sinalização (DLL1, Notch1, TGF- $\beta$ 1), família de neuroindutores (BDNF) e família de comunicação celular (APBB1).	As DPSC's-CT foram capazes de se diferenciar em células do tipo DAérgicas, mas não tão eficientemente quanto as DPSC's.  Como tal, antes do uso na medicina regenerativa, as células-tronco de qualquer fonte devem ser minuciosamente analisadas e comparadas a técnicas referenciais convencionais.



12	Sanen et al.  2017	Estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Analisar os efeitos pró-angiogênicos de d-DPSC's, como proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais aprimoradas. E, avaliar desempenho de DPSC's em modelo de rato <i>in vivo</i> de PNL.	As DPSC's foram mantidas em MEM com FBS, L-glutamina, penicilina e estreptomicina. Após a indução, foram cultivadas em DMEM com forskolina, FGFB, PDGF $\alpha$ e heregulina- $\beta$ -1. As células foram então cultivadas em DMEM com penicilina, estreptomicina, L-glutamina, FBS, fator de crescimento epidérmico humano factor e hidrocortisona. Após 24h, as células foram lavadas 3 vezes em PBS e alimentadas com FBS. Após 48h, o meio foi colhido e armazenado a 80°C. Para avaliar o efeito de DPSC's na tubulogênese, foi realizado um ensaio de formação de tubos. 3 campos aleatórios de cada poço foram colhidos e analisados para o n° de pontos de ramificação, comprimento total da rede (células de extremidade a extremidade continuamente unidas) e o n° de estruturas em forma de polígono fechadas. Para avaliar a regeneração neuronal, 3 grupos (7 ratos/grupo) foram incluídos: (A) conduto vazio (18 mm de comprimento com 1,5 mm em cada extremidade para acomodar o coto proximal e distal); (B) duas hastes EngNT_d-DPSC's (15 mm) numa bainha (18 mm); ou (C) um enxerto de nervo de 15 mm retirado de um rato descartado usando asfixia com CO <sub>2</sub> (aloenxerto). Os animais que receberam DPSC's foram imunossuprimidos por injeção subcutânea de ciclosporina A 24h antes da cirurgia e depois diariamente. Após 8 semanas, os animais foram abatidos por asfixia com CO <sub>2</sub> , e os nervos reparados foram excisados e fixados. Subsequentemente, os tecidos foram desidratados utilizando acetona e araldite. Depois foram corados com azul de toluidina e analisados.	8 semanas após o transplante de condutos preenchidos com EngNT contendo DPSC's alinhadas em defeitos do nervo ciático de rato, a análise imuno-histoquímica e ultraestrutural revelou neuritos embutidos, fibras nervosas mielinizadas e vasos sanguíneos ao longo do construto.	Os resultados sugerem que d-DPSC's são capazes de exercer um efeito positivo na regeneração do tecido nervoso <i>in vivo</i> .
----	--------------------------	--	--	--	--	--

13	Majumdar et al.  2014	Estudo <i>in vitro</i>	Testar se os sinais do mesencéfalo podem induzir as DPSC's a se diferenciarem em células dopaminérgicas funcionais.	Após as extrações, o tecido pulpar foi macerado e submetido a digestão enzimática de colagenase por 1h a 37 °C. As células isoladas foram plaqueadas em meio DMEM contendo FBS, penicilina-estreptomicina e incubados a 37°C com 5% de CO2. As células foram transcorridas no momento do ensaio experimental ou na confluência a 85%. As DPSC's foram expostas aos sinais do mesencéfalo através de SHH, FGF8 e bFGF. As DPSC's das passagens 3-7 foram cultivadas em meio de indução suplementado com B27 (preferencial na cultura neuronal) e um <i>cocktail</i> de SHH, FGF8 e bFGF. As células foram expostas 3 dias e mantidas em meio neurobasal com BDNF, por 6 dias. O meio de manutenção foi substituído a cada 3 dias. As células de controlo foram mantidas em meio DPSC normal, com troca de meio a cada 3 dias. Tanto as células de controlo quanto as induzidas foram usadas para avaliação em 3 períodos - 3, 6 e 9 dias.	DPSC's expressaram marcadores neuronais precoces e maduros. Na exposição a estímulos do mesencéfalo, as DPSC's demonstraram uma regulação positiva de fatores de transcrição específicos de neurónios dopaminérgicos, Nurr1, gene regulador do desenvolvimento cerebral (En1- Engrailed 1) e fator transcrição emparelhado ao fator 3 (Pitx3), revelado por RT-PCR. A IF a e citometria de fluxo mostraram expressão aumentada de Map2ab e marcadores neuronais dopaminérgicos TH, En1, Nurr1 e Pitx3, com quase 77% das DPSC's induzidas positivas para TH. Estudos funcionais indicaram que as DPSC's induzidas podem secretar dopamina mediante estimulação com KCl e ATP. Além disso, as DPSC's induzidas apresentaram influxo intracelular de Ca <sup>2+</sup> na presença de KCl, ao contrário das DPSC's de controlo. Influxo de Ca <sup>2+</sup> estimulado por ATP foi observado em DPSC's controlo e induzidas, mas apenas as células induzidas secretaram dopamina.	DPSC's na presença de sinais embrionários do mesencéfalo mostram propensão na diferenciação em células dopaminérgicas funcionais.
14	Kabatas S et al.  2018	Estudo <i>in vivo</i>	Analisar o efeito da aplicação de células-tronco da crista neural da polpa dental humana (hDP-NCSC's) no local de lesão medular (LM), e observar a recuperação	DPSC's foram isoladas. A população experimental de ratos foi dividida em 4 grupos (n= 6). A sua capacidade motora foi avaliada regularmente. Após 4 semanas, os ratos foram sacrificados e as DPSC's presentes nas medulas espinais foram examinadas por IF.	No período pós-lesão precoce, a ultraestrutura de tecido medular foi preservada. A maioria das células que formam a região ependimária ao redor do canal central são DPSC's. Enquanto a matéria cinzenta e branca ao redor da região ependimária era composta por, por exemplo, GFP	Células mesenquimais que expressam células GFP na substância cinzenta e branca ao redor da região ependimária podem indicar potencial de autorrenovação e plasticidade. Assim, o

			funcional após o transplante.		com aparência astrocítica. Os resultados mostraram recuperação motora significativa nas funções dos membros posteriores. No entanto, nenhuma mudança óbvia foi observada nos outros grupos.	transplante de DPSC's pode ser uma estratégia eficaz para melhorar a recuperação funcional após trauma na medula espinal.
15	Stefano Martellucci et al.  2018	Estudo <i>in vitro</i>	Avaliar o isolamento, propagação e expressão de PrPC (expressa sobretudo no sistema nervoso) durante a diferenciação de DPSC's.	A polpa dentária foi removida e cortada em pequenos pedaços, tratada com colagenase IV e cultivada. Para induzir a diferenciação neuronal, as DPSC's foram estimuladas com EGF/bFGF por 2 semanas.	A análise citofluorimétrica mostrou uma expressão precoce de PrPC que aumentou após processo de diferenciação neuronal. A ablação de PrPC por siRNA PrP 8 (silenciador genético) preveniu a diferenciação neuronal induzida por EGF/bFGF.	As DPSC's são um excelente modelo para estudar o processo de diferenciação neuronal de MSC's e subsequentes processos celulares e moleculares. No entanto, é necessário estar constantemente a aprimorar os métodos de isolamento e cultura de modo a obter células cada vez mais eficientes
16	Martens et al.  2014	Estudo <i>in vitro</i>	Avaliar o potencial de DPSC's se diferenciarem em células de Schwann e a sua capacidade funcional de mielinização e suporte de crescimento de neuritos <i>in vitro</i> .	As DPSC's foram isoladas em DMEM com FBS, L-glutamina, penicilina e estreptomicina. Quando 80%-90% de confluência foi alcançada, as células foram subcultivadas. Na passagem 2-3, a diferenciação celular de Schwann foi induzida pela mudança do meio para meio de cultura padrão sem FBS contendo mercaptoetanol (BME) por 24h. Subsequentemente, as células foram incubadas em DMEM com ácido trans-retinóico (RA). Após 72h, o meio padrão suplementado com forskolina, bFGF, de PDGF $\alpha$ e heregulina-b-1 (NRG). As células foram cultivadas neste meio por 2 semanas com trocas de meio a cada 2-3 dias. Ambos DPSC's e d-DPSC's foram cultivados a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO <sub>2</sub> . No isolamento de células de Schwann primárias, estas foram colhidas de ratos <i>d17 Sprague-Dawley</i> pós-natais. Os nervos ciáticos foram dissecados do epineuro, após tratamento com	A diferenciação em células de Schwann foi confirmada a nível morfológico e ultraestrutural com microscopia eletrónica. Além disso, em comparação com DPSC's indiferenciadas, os testes de imuno-histoquímica e ELISA, revelaram aumento da expressão de marcadores gliais e secreção de fatores neurotróficos de DPSC's diferenciadas (d-DPSC's), que promoveram a sobrevivência e o crescimento de neuritos em culturas de gânglios da raiz dorsal bidimensional. Acrescentar, os neuritos foram mielinizados por d-DPSC's num tecido neuronal de	Os resultados fornecem a evidência de que as DPSC's têm a capacidade de diferenciação em células de Schwann e suporte ao crescimento neuronal <i>in vitro</i> , propondo que elas sejam boas candidatas para terapias relativas a doenças periféricas como, por exemplo, a lesão nervosa.

				colagenase tripsina-EDTA. Células de 2 segmentos nervosos foram semeadas com PLL.	hidrogel de colagénio tipo I tridimensional. Esta construção projetada continha colunas de d-DPSC's que apoiaram e guiaram o crescimento de neurito.	
17	Tsuneyuki Mita et al.  2015	Estudo <i>in vivo</i>	Investigar os benefícios terapêuticos em meio condicionado sem soro (MC) derivado de SHED's num modelo de rato com DA.	SHED's foram isoladas e cultivadas, a polpa foi digerida com colagenase tipo I e dispase. Após filtração, foram cultivadas em DMEM. SHED's, BMSC's e fibroblastos de pele humana (Fibros) foram cultivados em DMEM sem soro. Os meios foram coletados após 48h e centrifugados. Os sobrenadantes foram colhidos e designados como SHED-CM, BMSC-CM e Fibro-CM. 24h após a injeção icv (injeção intracerebroventricular) de Ab1-40 (dia 1), os ratos foram anestesiados e divididos em 4 grupos: o SHED-CM, BMSC-CM, Fibro-CM e DMEM (controlo) (n = 10). Amostras de cada CM e de controlo foram administrados por via intranasal 2x/dia do 1º ao 4º dia. A nova análise de reconhecimento de objetos foi realizada nos dias 3 a 5 após a injeção icv de Ab1-40. Este método é usado para medir a disfunção cognitiva em ratos modelos de envelhecimento natural e com DA. O procedimento de reconhecimento consistiu em 3 fases: habituação, aquisição e retenção. Um índice de reconhecimento foi expresso como $(TC \times 100) / (TA + TC)$ , onde TA e TC são os tempos gastos a explorar. Culturas neuronais primárias foram preparadas a partir do córtex de embriões de ratos C57BL/6 em fase embrionária. Resumidamente, fragmentos corticais foram dissociados em células, e foram ressuspensos em meio de cultura de nervos. Neurónios primários foram semeados com PLL. Após 14 dias, os neurónios corticais primários dos ratos foram tratados com glutamato e SHED-CM por 24 h. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio WST e calculada em relação às células não tratadas. Os resultados foram analisados pelos métodos <i>Western Blot</i> , RT-PCR e imunohistoquímica.	A administração intranasal de SHED's resultou numa melhoria da função cognitiva. SHED-CM continha fatores envolvidos em múltiplos mecanismos neuroregenerativos como: neuroproteção, alongamento axonal, neurotransmissão, supressão da inflamação e regulação microglial. Notavelmente, SHED-CM atenuou respostas pró-inflamatórias induzidas por placas $\beta$ -amilóides, e gerou um efeito anti-ambiente inflamatório/regenerador de tecidos, que foi acompanhado pela indução de micróglia inflamatória do tipo M2.	Os dados sugerem que o SHED-CM pode fornecer benefícios terapêuticos para a DA.

18	T Osathanon et al.  2014	Estudo comparativo <i>in vitro</i>	Comparar a capacidade de diferenciação DPSC's entre dois protocolos de indução neuronal – indução por meio químico e indução pelo fator de crescimento.	A diferenciação neuronal foi induzida por meio de protocolo químico e de indução do fator de crescimento. A diferenciação foi confirmada pela expressão neurogênica de mRNA e da proteína $\beta$ 3-tubulina, utilizando a RT-PCR e imuno-histoquímica, respetivamente.	A diferenciação neuronal química promoveu alteração morfológica e expressão de $\beta$ 3-tubulina.  No entanto, os níveis de mRNA de SOX2, SOX9 e $\beta$ 3-tubulina não foram diferentes em comparação com o controlo, indicando uma diferenciação defeituosa.  Para a indução com fator de crescimento, foi exibido um processo celular tipo neurito e $\beta$ 3-tubulina. Além disso, o aumento do $Ca^{2+}$ intracelular foi observado após a estimulação com NMDA (aminoácido excitatório agonista do neurotransmissor), implicando a função neuronal. Um aumento na expressão de mRNA, SOX2, SOX9, $\beta$ 3-tubulina, ácido gama-aminobutírico (receptores GABA), expressão da sinalização Notch e HEY1, foi observado	Os dados indicam que o método de indução do fator de crescimento é o protocolo preferencial para diferenciação neuronal de DPSC's.
19	Miura-Yura et al.  2020	Estudo <i>in vivo</i>	Examinar se os fatores secretados por SHED's em meio condicionado (SHED-CM) obtêm efeitos benéficos na polineuropatia diabética em camundongos.	SHED-CM foi colhido 48h após a cultura em DMEM sem soro e separado em 4 frações conforme o peso molecular. Neurónios do gânglio da raiz dorsal de camundongos C57BL/6J foram cultivados com SHED-CM ou DMEM para avaliar o efeito no crescimento de neuritos. Camundongos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, foram injetados com SHED-CM ou DMEM nos membros posteriores 2x/semana em 4 semanas. As funções nervosas periféricas foram avaliadas pelo teste plantar e pelas velocidades de condução nervosa motora e sensitiva. Foram também sujeitos a avaliação: densidades de fibras nervosas intraepidérmicas, razão de número de capilares/fibras musculares, fluxo sanguíneo capilar e morfometria dos nervos surais.	Entre as 4 frações de SHED-CM, só a fração de <6kDa promoveu o crescimento de neuritos de neurónios do gânglio da raiz dorsal. SHED-CM preveniu o declínio nas velocidades de condução nervosa sensorial em comparação com DMEM nos camundongos diabéticos. Embora o SHED-CM não tenha melhorado as densidades de fibras nervosas intraepidérmicas ou a morfometria dos nervos surais, melhorou a relação capilar/fibra muscular e o fluxo sanguíneo capilar.	Os resultados sugeriram que o SHED-CM pode ter um efeito terapêutico na polineuropatia diabética através da promoção do crescimento de neuritos, e o aumento dos capilares pode contribuir para a melhoria da função neuronal.



20	Chun SY, et al.  2016	Estudo <i>in vitro</i>	Investigar o potencial de diferenciação das DPSC's em neurónios dopaminérgicos <i>in vitro</i> como uma fonte de células-tronco autólogas para o tratamento da DP.	Durante 3-4 dias, as DPSC's foram expandidas em meio de células-tronco embrionárias <i>knockout</i> (KO-ES) contendo o fator inibidor de leucemia (LIF) em placas revestidas de gelatina. Posteriormente, o meio foi substituído por meio KO-ES s/LIF para a formação da neuroesfera por 4 dias. A neuroesfera foi transferida para meio ITS e fibronectina, para selecionar células positivas para Nestina durante 6-8 dias. As células foram então cultivadas em meio N-2 contendo FGF, FGF-8b, <i>sonic hedgehog-Ne</i> ácido ascórbico em placas com poli-L-ornitina/fibronectina para expandir as células positivas para Nestina até 2 semanas. Finalmente, as células foram transferidas para meio N-2/ácido ascórbico para permitir a diferenciação neuronal durante 10-15 dias. Os estágios de diferenciação foram confirmados por análises morfológicas, imuno-histoquímica, citometria de fluxo, RT-PCR e ELISA. As expressões de marcadores de células-tronco mesenquimais foram observadas nos estágios iniciais. As expressões dos marcadores neuronais iniciais foram mantidas ao longo dos estágios de diferenciação. Os marcadores neuronais maduros apresentaram expressão aumentada a partir do estágio 3.	No estágio 1 de pré-indução, as DPSC's exibiram uma morfologia plana e semelhante a uma pedra. As neuroesferas foram concebidas no estágio 2. No estágio 3, exibiram uma morfologia fibroblástica. As células expandidas mostraram uma forma progenitora neuronal, com um fusão com processos bipolares ou piramidais. Já no estágio 5, as células exibiram a forma de neurónio dopaminérgico com um corpo celular condensado e retraído, adotando uma aparência radial glial. Nestina e TUJ1, foram notados em todos os estágios. Uma pequena porção de DPSC's expressou GFAP antes e depois da diferenciação, enquanto as células positivas para MBP (marcadores neuronais maduros para oligodendrócitos) destacaram-se a partir do estágio 1. Células positivas para TH (marcador dopaminérgico) foram observadas apenas no estágio 5.	DPSC's têm o potencial de se diferenciar em células neuronais dopaminérgicas em condições experimentais de diferenciação celular, mostrando a sua competência como fonte de células autólogas para o tratamento da doença de Parkinson
21	Abe S et al.  2012	Estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Investigar a existência de células semelhantes a NCSC's (células estaminais da crista neural) na polpa apical do dente em desenvolvimento.	As células derivadas do tecido pulpar apical, sem envolver dentina ou tecido pulpar coronal, foram cultivadas por cultura primária de explantes.	APDC's e CPC's formaram esferas sob condição de cultura de neuroesferas. O nº de APDC's foi superior ao de CPC's. As células esféricas derivadas de APDC's apresentaram capacidade de autorrenovação e expressaram marcadores associados à crista neural (p75, Snail e Slug), nestina e Musashi. As células formadoras de esferas tinham a capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens mesenquimais (osteoblastos,	As APDC's contêm células com características de NCSC's. Dentes em desenvolvimento com ápex imaturo são uma fonte eficiente de células para a regeneração tecidual.

					adipócitos, condrócitos e células musculares lisas) e linhagens neuronais (neurónios) <i>in vitro</i> , e geraram tecidos ósseos ectópicos na borda do <i>scaffold</i> de HA (hidroxiapatita) <i>in vivo</i> .	
22	Mead B et al. 2013	Estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Investigar o potencial terapêutico <i>in vitro</i> de DPSC's implantadas em células ganglionares da retina de ratos adultos axotomizados (RGC's) em modelos de lesão neuronal <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	O meio resultante da colheita de DPSC's foi testado para NGF, BDNF e para a secreção de neurotrofina-3 (NT-3) usando ELISA. DPSC's ou BMSC's foram co-cultivadas com células da retina, com ou sem inibidores de Fc-TrK, em sistema <i>Transwell</i> . Posteriormente, procedeu-se à quantificação de células da retina $\beta$ 3-tubulina sobreviventes e comprimento/nº de neuritos. <i>In vivo</i> , DPSC's ou BMSC's foram transplantadas para o corpo vítreo após esmagamento do nervo ótico. Aos 7, 14 e 21 dias pós-lesão (dpl), a tomografia de coerência ótica (OCT) foi utilizada para medir a espessura da camada de fibras nervosas da retina como medida de atrofia axonal. Aos 21 dpl, o nº de Brn-3a $\beta$ RGC's em secções parasagittais da retina e axónios de proteína-43 $\beta$ associados ao crescimento em secções longitudinais do nervo ótico foram quantificados como medidas de sobrevivência da RGC e regeneração de axónios, respetivamente.	Ambas as famílias celulares de DPSC's e BMSC's secretaram NGF, BDNF e NT-3, no entanto, as DPSC's secretaram em grau significativamente mais alto NGF e BDNF. DPSC's e, em menor grau, BMSC's, promoveram sobrevivência celular significativa e neuritogénese/axogénese de células da retina $\beta$ 3-tubulina <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , onde os efeitos foram abolidos após o bloqueio do recetor TrK.	O transplante de DPSC's promoveu significativamente a sobrevivência de RGC's mediada por neurotrofina e regeneração de axónios após lesão do nervo ótico.
23	Nesti C et al. 2011	Estudo <i>in vitro</i>	Investigar os efeitos neuroprotetores de DPSC's contra MPP+ (neurotoxina) e rotenona (inseticida) em modelo <i>in vitro</i> de DP, utilizando um sistema de co-cultura indireta com culturas de células mesencefálicas.	Culturas mesencefálicas foram sujeitas a MPP+ ou rotenona. Na presença de DPSC's foi observado um efeito protetor significativo em termos de absorção de dopamina estriatal. O efeito protetor das DPSC's nos neurónios também foi confirmado por imuno-histoquímica: um nº aumentado de células TH foi observado em condições de co-cultura em comparação com os controlos, e os neurónios mostraram processos mais longos em comparação com células mesencefálicas cultivadas sem DPSC's.	A co-cultura com DPSC's atenuou significativamente a toxicidade induzida por MPP+ ou rotenona em culturas primárias de neurónios mesencefálicos. Considerando que o contato direto entre os 2 tipos celulares foi evitado, pode-se especular que a neuroproteção pode-se dever a fatores solúveis como BDNF e NGF, secretados pelas DPSC's. Bloqueando BDNF e NGF com anticorpos neutralizantes, o efeito neuroprotetor das DPSC's foi completamente abolido.	As DPSC's assumem-se como possíveis candidatas a estudos sobre terapia celular em doenças neurodegenerativas.

24	Soria et al.  2011	Estudo <i>in vitro</i>	Avaliar o suporte neurotrófico para a sobrevivência e diferenciação de células-tronco de um sistema híbrido <i>in vitro</i> , constituído por um biomaterial polimérico recoberto por um estroma celular da polpa dentária que atua como <i>scaffold</i> .	Foi observado o comportamento do estroma pulpar sobre o biomaterial polimérico à base de acrilato de etilo e copolímero de acrilato de hidróxietil. Para isso, células de terceiros molares humanos foram cultivadas. Após cultura, foi efetuada a quantificação pelo meio ELISA dos fatores neurotróficos gerados pelas células do estroma. Posteriormente, estudou-se a sobrevivência e diferenciação de células-tronco neuronais murinas adultas nos biomateriais poliméricos cobertos por células estromais da polpa dentária.	Os resultados clarificam a capacidade das células da polpa dentária em revestir uniformemente a maior parte da superfície do material e de secretar fatores neurotróficos que se tornam cruciais para uma posterior diferenciação das células-tronco neuronais.	O uso de células estromais cultivadas em biomateriais <i>scaffolding</i> fornece “bombas” neurotróficas que podem sugerir novos critérios para desenvolvimento de terapias no Sistema Nervoso Central
25	Karaöz E et al.  2011	Estudo comparativo <i>in vitro</i>	Comparar as características das BMSC's e das DPSC's analisando vários parâmetros, como: capacidades de proliferação, perfis de expressão gênica, características fenotípicas, ultra-estruturais e de diferenciação.	O tecido pulpar foi digerido em colagenase tipo I, posteriormente as células foram cultivadas em <i>MEM-Eagle</i> com FBS, penicilina e estreptomomicina. Logo foram isoladas conforme a sua adesão. O meio foi atualizado a cada 3 dias para permitir crescimento. As células aderentes cultivadas até 70% de confluência foram definidas como células de passagem zero (P0). Para passagem, as células foram lavadas com solução salina livre de Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> e separadas por incubação com solução de tripsina-EDTA. Um meio foi adicionado para inativar a tripsina. As células foram quantificadas e depois cultivadas. O meio foi substituído a cada 3 dias durante 10 a 14 dias. As BM-MS C's foram isoladas da crista ilíaca, e posteriormente foram diluídas e separadas por centrifugação. As células mononucleares de baixa densidade foram colhidas, lavadas 2 vezes com PBS, e quantificadas. Procedeu-se à incubação durante 3 dias. No 3º dia, os glóbulos vermelhos e outras células não aderentes foram removidos e o meio foi renovado para permitir maior crescimento. Para análise dos resultados foi realizada citometria de fluxo e <i>CellQuest</i> . As análises imuno-citoquímicas foram realizadas usando o método de estreptavidina-peroxidase.	As DPSC's apresentaram um maior desenvolvimento e metabolismo ativo. As características intrínsecas da neuroglia de DPSC's foram demonstradas pela expressão de várias transcrições e proteínas específicas de células-tronco e neurónios. Essas células não se limitam a diferenciar em linhagens adipogénicas, osteogénicas e condrogénicas, mas também compartilham características especiais ao expressar algumas células-tronco neuronais e marcadores epiteliais.	Sob condições definidas, as DPSC's são capazes de se diferenciar em células endoteliais neuronais e vasculares <i>in vitro</i> . A polpa dentária pode fornecer uma fonte alternativa para MSC's humanas, exibindo uma capacidade de diferenciação promissora e além disso, podem ser facilmente isoladas. Futuramente, um promissor uso clínico pode ser desenvolvido para doenças neurodegenerativas.
26	Yalvaç ME et al.  2013	Estudo <i>in vitro</i>	Elaborar uma análise detalhada do secretoma de TGSC's.	As células cerebrais foram expostas a vários materiais tóxicos, incluindo o peptídeo b-amiloide de Alzheimer (b-AP) e 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).	Aquando da co-cultura com TGSC's, a atividade de várias enzimas antioxidantes (catalase, glutatona-s-transferase, glutatona-peroxidase, superóxido-dismutase) foi aumentada e a	Este relatório revela que o secretoma neuroprotetor de TGSC's e o microambiente das células têm um

					morte/apoptose neuronal foi subsequentemente reduzida. A composição dos materiais bioativos secretados é influenciada por vários fatores pré-existentes, como a privação de oxigénio, glicose e a idade das células.	impacto mútuo e dinâmico um no outro.
27	Taghipour et al.  2012	Estudo <i>in vivo</i>	Avaliar o potencial das SHED's e iSHED's (SHED's induzidas neuronalmente) na recuperação funcional quando transplantadas num modelo de lesão de medula espinal de rato (SCI).	7 dias após produção da SCI nos ratos, estes foram distribuídos em 4 grupos: 1 controlo s/tratamento, 1 transplantado que recebeu apenas a injeção de PBS, 1 c/ SHED's e 1 c/ iSHED's. As células foram colhidas por tratamento com tripsina e, após lavagem com PBS, as suspensões celulares foram injetadas nas lesões medulares. Posteriormente, uma amostra foi corada para avaliação de viabilidade. Finalmente, os animais feridos receberam gentamicina e solução de <i>Ringer</i> com lactato, mantidos numa almofada de aquecimento até o despertar, e alojados em gaiolas. 2 dias antes do transplante, todos receberam diariamente injeções de ciclosporina-A para prevenir a rejeição celular. A recuperação comportamental foi avaliada usando uma escala locomotora. O desempenho de acordo com a tarefa comportamental foi realizado 3 dias antes da lesão, antes do transplante, e continuou uma vez por semana por mais 5 semanas após o transplante.	Após transplante, observou-se uma recuperação funcional significativa em ambos os grupos pelo teste funcional locomotor. Também foi observado que os animais que receberam iSHED estavam em melhor estado em comparação com o grupo SHED. A avaliação da IF 5 semanas após o transplante mostrou diferenciação neuronal, diferenciação glial e proliferação limitada em ambos os grupos. No entanto, a proteína básica de mielina e sulfato de condroitina proteoglicano NG2— marcadores de oligodendrócitos - estavam aumentados e a GFAP - marcador de astrócitos - estava diminuído no grupo iSHED em comparação com o grupo SHED.	Os resultados demonstraram que o transplante de SHED ou dos seus derivados pode ser um candidato adequado para o tratamento de SCI, bem como de outras doenças neuronais degenerativas.
28	Bueno C et al.  2019	Estudo <i>in vitro</i>	Examinar a sequência de eventos biológicos durante a diferenciação neuronal PDLSC's.	O PDL foi digerido com colagenase-I e dispase-II $\alpha$ -MEM. Derivados do PDL de diferentes indivíduos foram agrupados para obter suspensões de células únicas. As células foram centrifugadas e o sedimento foi ressuspenso em $\alpha$ -MEM suplementado. Usamos $\mu$ -Dish 35 mm, <i>High Grid-500</i> para imagens de células vivas. Para a diferenciação neuronal, as células foram cultivadas meio de <i>Eagle</i> modificado suplementado com bFGF, EGF, glicose, suplemento de N2, l-glutamina e penicilina-estreptomicina. As células na passagem 3-4 foram deixadas para adesão às placas durante a noite. O meio foi	Foi demonstrado que as células semelhantes a neurónios derivadas de PDLSC's exibem uma sequência de desenvolvimento morfológico altamente semelhante às relatadas anteriormente em culturas neuronais primárias derivadas de cérebros de roedores. Observou-se que a proliferação celular não está presente através da neurogênese de PDLSC's. Além disso, entendeu-	Os resultados fornecem evidências de que é possível diferenciar PDLSC's em células semelhantes a neurónios e sugerem a possibilidade de que a sequência de eventos da célula-tronco para o neurónio não requer necessariamente a

				removido no dia seguinte e o meio de indução neuronal foi adicionado diretamente às células. Os meios de indução neuronal foram substituídos a cada 3 dias até ao fim do estudo (2 semanas). Foi efetuada análise utilizando <i>Western Blotting</i> e imuno-histoquímica.	se que o movimento dos micronúcleos e a lobulação transitória dos núcleos celulares são coincidentes com a neurogênese <i>in vitro</i> . A análise morfológica também revela que nichos neurogênicos no cérebro de camundongo adulto contêm células com formas nucleares muito semelhantes às observadas durante a neurogênese <i>in vitro</i> de PDLSC's.	divisão celular da célula-tronco.
29	Fortino et al. 2014	Estudo <i>in vitro</i>	Avaliar se as PDLSC's podem ou não ser induzidas em células semelhantes a neurónios usando um método simples e curto.	PDLSC's foram induzidas neuronalmente usando uma combinação de EGF e BFGF.	As alterações morfológicas foram evidentes tanto na microscopia de luz como na microscopia eletrónica de varredura (MEV). Um aumento significativo na expressão de $\beta$ -tubulina e nestina, juntamente com coloração imuno-histoquímica positiva para GFAP, demonstrou sucesso em induzir tanto a diferenciação neuronal quanto fenótipos gliais. A coloração positiva para sinaptofisina demonstrou conexões neuronais e registos eletrofisiológicos indicaram que, quando submetidas ao clampeamento de células inteiras, as células tratadas exibiram correntes internas conduzidas através dos canais de $Na^+$ VD.	Os resultados indicam o sucesso na indução de PDLSC's em células neuronais. A facilidade de obtenção e expansão, a sua origem na crista neural embriológica e a falta de implicações éticas no uso destas células, fazem das PDLSC's uma fonte atraente para uso em medicina neurorregenerativa.
30	Gonmanee et al. 2019	Estudo <i>in vivo</i>	Avaliar a capacidade de diferenciação de DPSC's e SHED's em células neuronais para substituição de SGN degenerados na perda auditiva neurossensorial.	DPSC's e SHED's foram induzidas em células precursoras neuronais (NPC) e co-cultivadas num corte auditivo de tronco cerebral (ABS) englobando o núcleo coclear pelo método de <i>Stoppini</i> .	Foram observados marcadores específicos para SGN, TrkB e Gata3, em comparação com a monocultura. As células também expressaram altamente a proteína da vesícula sináptica (SV2A) e exibiram oscilações de $Ca^{2+}$ intracelular.	Os resultados exibiram a possibilidade de usar DPSC's e SHED's como terapia autóloga na perda auditiva neurossensorial.

31	Zi-Bing Hu et al.  2022	Estudo <i>in vitro</i>	Investigar os efeitos estimuladores do PRP (plasma rico em plaquetas) na diferenciação neuronal e na anti-apoptose de DPSC's na medula espinal lesionada.	40 ratos foram divididos em 4 grupos: 1 de tratamento duplo (DPSC's e PRP), 2 de tratamento único (DPSC's ou PRP) e 1 simulado (recebeu solução salina normal). Foi avaliada a função motora da medula espinal. A viabilidade celular e a diferenciação de DPSC's nas medulas espinhais danificadas e a apoptose das células neuronais foram analisadas.	As análises de padrão de crescimento, marcadores de superfície celular e ciclo celular revelaram que as DPSC's têm um alto grau de potencial de diferenciação multidirecional e podem ser induzidas em neurónios <i>in vitro</i> .  O tratamento DPSC's/PRP e o tratamento DPSC's/ou PRP melhorou significativamente a função motora em comparação com o grupo simulado. A apoptose das células neuronais foi significativamente maior no grupo simulado em comparação com qualquer um dos outros grupos. O tratamento duplo resultou na menor taxa apoptótica entre os grupos analisados.	As DPSC's apresentaram potencial de diferenciação e são capazes de se transformar em células neuronais tanto <i>in vitro</i> quanto <i>in vivo</i> . Exibiram uma inibição significativamente aumentada da apoptose neuronal e recuperação da função motora da medula espinal após o tratamento duplo com DPSC's e PRP em comparação com os grupos de tratamento único.
----	-------------------------------	------------------------	---	--	--	---

Legenda da tabela. C/ - com; S/ - sem

## 5 Discussão

### 5.1. Células Estaminais: Uma Odisseia da Ciência

As células estaminais, designadas também por células-tronco ou células-mãe, são células indiferenciadas do corpo humano, ou seja, não têm nenhuma função específica, mas têm o potencial de se diferenciar em várias morfologias e exercer diferentes funções em diversas linhagens celulares. Estas células podem ser encontradas em várias fontes, assim como: sangue periférico, cordão umbilical, pele, tecido dentário e medula óssea. (11)

Têm vantagens que as distingue de todos os outros subtipos celulares, como: multidiferenciação (capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares), plasticidade (capacidade da célula originar diferentes tipos de tecidos) e autorregeneração (capacidade de divisão e criação de outras células-tronco, também apelidadas de células-filha) (1,2). As células-tronco podem ser classificadas de acordo com dois critérios - natureza e potencial de diferenciação.

Quanto à sua natureza podem ser divididas em: células-tronco adultas e células-tronco embrionárias. De acordo com o seu potencial de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas em: oligopotente/unipotente, totipotentes, multipotentes e pluripotentes. (12,13)

O isolamento, estudo e preservação destas células é um fator fundamental nas óticas da medicina regenerativa, uma vez que o usufruto das mesmas é capaz de gerar terapêuticas em diferentes condições, incluindo: lesão da medula espinal, fratura óssea, doenças autoimunes, artrite reumatoide, defeitos hematopoiéticos, preservação da fertilidade, diabetes, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, entre outras. (8,14)

## 5.1.1 Tipos de Células Estaminais

### 5.1.1.1 Células Unipotentes

Células-tronco de origem pós-natal definidas como tipo celular que possui aptidão de se diferenciar numa única linhagem celular. (12,13)

### 5.1.1.2 Células Totipotentes

A totipotência é a classificação que detém o maior potencial de diferenciação e permite que as células formem estruturas embrionárias e extra-embrionárias. Estas células encontram-se nos embriões ou blastómeros nas primeiras fases de divisão, isto é, 1-3 dias após fertilização do oócito. (12,13)

São capazes de se dividir e diferenciar em todas células, ou seja, são competentes em originar um organismo completo.

Após 4 dias, a massa celular interna do blastocisto passa a ser pluripotente. (12,13)

### 5.1.1.3 Células Pluripotentes

As células-tronco pluripotentes especializam-se essencialmente em MSC's, e quando cultivadas *in vivo* e expostas a determinadas condições, são capazes de se diferenciar em todos os tipos de tecidos, exceto os extra-embrionários, como a placenta. (12,13)

### 5.1.1.4 Células Multipotentes

De origem pós-natal, estas células são um fator indispensável no sistema de desenvolvimento, cicatrização de tecidos e defesa, sendo capazes de se diferenciar em quase todos os tecidos humanos, excluindo a placenta e anexos embrionários, ou seja, a partir, aproximadamente do 4º dia de vida, fase considerada de blastocisto. Em adultos, no



entanto, os principais órgãos que as detêm são a medula óssea, a polpa dentária e tecido adiposo. (12,13)

#### **5.1.1.5 Células Pluripotentes Induzidas**

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's) são derivadas da camada epiblastica de embriões implantados. Começando em células completamente pluripotentes, como ESC's e iPSC's, e terminando em representantes com menos potência – células multi, oligo ou unipotentes. Estas células são germinadas através da estimulação por moléculas sinalizadoras extracelulares apropriadas, para se diferenciar em praticamente qualquer tipo celular encontrado no corpo. (15)

A sua cultura e utilização são muito prometedoras para a medicina regenerativa presente e futura. (12,13,16)

#### **5.1.1.6 Células Estaminais Embrionárias**

Exclusivas da massa celular interna dos embriões humanos são classificadas como totipotentes ou pluripotentes, dado o seu sublime poder de diferenciação. Estes embriões, inviáveis para a implantação, podem ser encontrados nas clínicas de fertilização *in vitro* ou podem ser gerados através da clonagem para fins terapêuticos. (15)

Estas células são capazes de formar as três camadas germinativas embrionárias – ectoderme, endoderme e mesoderme. (12,13,15)

#### **5.1.1.7 Células Estaminais Adultas**

São células extraídas dos diversos tecidos adultos humanos, tais como: medula óssea, sangue, fígado, cordão umbilical, placenta, sistema nervoso, tecido dentário, entre outros. Crê-se que têm uma habilidade de diferenciação mais escassa que as células-tronco

embrionárias, no entanto, estudos recentes mostraram evidências que estas células também conquistam o potencial de originar as três camadas germinativas. (12,13)

### 5.1.2 Benefícios das Células Estaminais

As células-tronco adultas apresentam inúmeros benefícios que as distinguem das demais. Uma das vantagens destas células é que podem ser usadas como transplante autólogo, ou seja, pode ser feita a colheita celular dum tecido de um indivíduo, proceder-se à diferenciação pretendida e implantar o enxerto nesse mesmo paciente. (6,13)

Com esta particularidade, evita-se a rejeição imunológica das células-tronco pelo organismo, que irá ser, concomitantemente dador e recetor.(6,13)

Além disso, as células estaminais têm como especial característica a sua propriedade trófica. As MSC's expressam fatores de crescimento e citocinas, que produzem proteínas mitogénicas, como TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , fator de crescimento de hepatócitos, EGF, fator de crescimento de fibroblastos básico e IGF-1 para aumentar a divisão de fibroblastos, células epiteliais e endoteliais.(6,13)

Para acrescentar às suas aptidões, este tipo celular produz também proteínas anti-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , que possuem mecanismos de resposta imunológica.(13)

É importante ressaltar ainda a capacidade antiapoptótica revelada pelas células-tronco, através da produção de IGF-1 e IL-6 que regula a Akt (proteína quinase B) e fator nuclear kappa-cadeia-potenciador de células B ativadas. (13)

No que diz respeito às células estaminais do tecido dentário destacam-se nas vantagens tais como: a fácil e indolor recolha, a grande oferta de tecido (seja por exodontias por motivos ortodônticos, mudança de dentição ou outras razões justificativas) e a fuga às questões éticas o que leva este tecido a ser preferencial na área.(6,13)

### 5.1.3 Riscos e Malefícios das Células Estaminais

Como já foi mencionado, as células estaminais convencionais apresentam como grande desvantagem as questões éticas, às quais as células estaminais dentárias conseguem contornar. Ainda assim, existe também o tema relativo ao financiamento das pesquisas, que leva a comunidade científica a questionar se os orçamentos destinados à saúde devem ser mais dirigidos a cuidados médicos ou à pesquisa de um tema ainda imaturo, como é o caso.(17)

Existe ainda um grande efeito adverso a ser ultrapassado na área da pesquisa de células estaminais – o potencial carcinogénico que, enquanto por ultrapassar, impede a evolução para testes em humanos.(6,7)

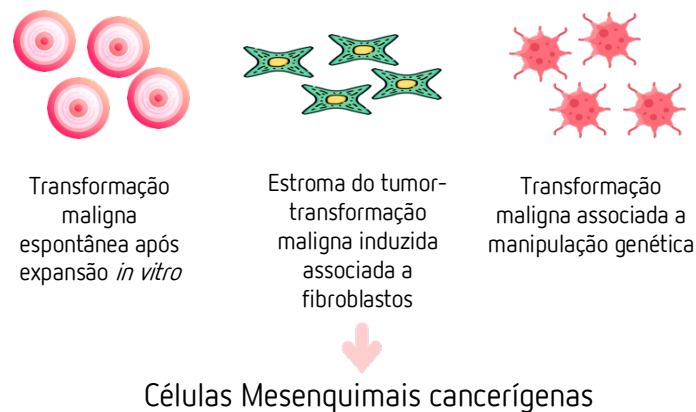


Figura 2. Transformação maligna das células mesenquimais

Ou seja, apesar das inúmeras e especiais vantagens destas células, elas vêm também acompanhadas destas desvantagens e malefícios, particularmente no que respeita ao envolvimento direto e indireto na carcinogénese. Objetivamente, o papel destas células nos tumores pode ser repartido em: (A) Envolvimento indireto via efeito modulador tumoral das MSC's e (B) Envolvimento direto via transformação maligna das próprias MSC's. (7)

Estudos apoiaram que as MSC's podem suprimir o crescimento do tumor, discordantemente outros defendem que as MSC's podem contribuir na proteção tumoral

por meio de efeito antiapoptótico (já acima mencionado), desenvolvimento tumoral, metástase e resistência a drogas. Embora muitos tenham demonstrado uma habilidade

antiproliferativa exercida por MSC's, a retrogressão deve-se a essa mesma habilidade ser muitas vezes escoltada por um efeito antiapoptótico. (7)

A transformação maligna de MSC's pode ocorrer nos diferentes cenários: (A) durante a expansão *in vitro* de MSC's, (B) interação MSC/estroma tumoral e (C) manipulação genética de MSC's.

Quanto à expansão celular *in vitro*, a cultura maciça leva à suscetibilidade das MSC's à transformação maligna. No entanto, com o uso do tecido dentário como fonte consegue-se alcançar um método capaz de contornar esta necessidade de cultura em exagero, uma vez que a oferta celular é maior e a recolha mais fácil.

Relativamente à interação MSC/estroma tumoral, o efeito *homing* permite que as MSC's migrem em direção ao estroma tumoral, o que promove a interação MSC's/células tumorais e conseqüentemente a metástase. (7)

A manipulação a nível genético de MSC's tem como principal visão a imortalização destas células para culturas e manutenção de longo prazo, mas é necessário ter noção que tais manipulações acarretam riscos – ou o transgene pode ser tumorigénico ou a inserção de transgenes causa rutura no genoma de MSC e leva à transformação maligna. Estas manipulações genéticas assumem-se como fator de aumento do potencial oncogénico, pois as MSC's tendem a acumular instabilidade cromossômica durante culturas de longo prazo.

É importante ainda mencionar a propriedade supressora sob o sistema imunológico que, pode ser encarada como uma vantagem (no caso de pacientes com distúrbios imunológicos) mas também como uma desvantagem pois, num sistema imunológico já suprimido pode promover e propiciar um ambiente mais favorável ao desenvolvimento do tumor. (7)

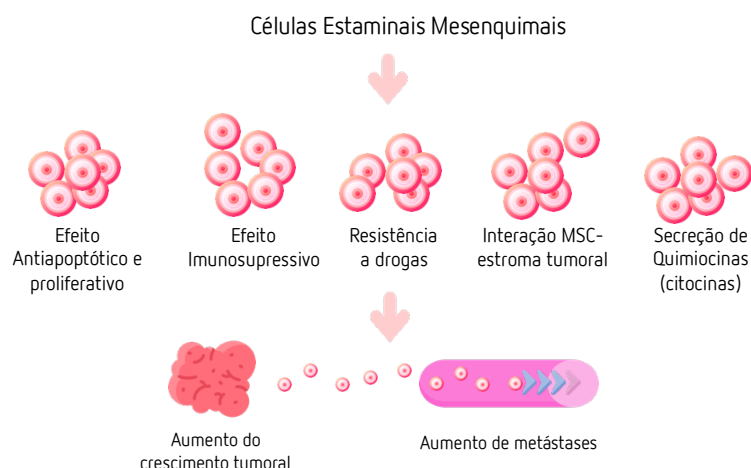


Figura 3. Malefícios das células mesenquimais

## 5.2 Células Estaminais do Tecido Dentário

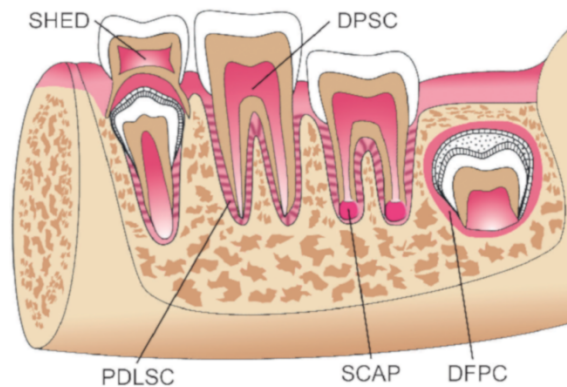


Figura 4. Tipos de células estaminais dentárias

### 5.2.1 DPSC's – Células Estaminais da Polpa Dentária

As células-tronco da polpa dentária humana têm como origem a crista neural, que resulta da interação da ectoderme com a placa neural. Estas células, já no tubo neural, migram para a cavidade oral e sofrem diferenciação, passando a denominar-se de células mesenquimais. As qualidades tão peculiares e especiais das DPSC's devem-se ao facto dessas células estarem sem contacto com estímulos externos, uma vez que apresenta a dentina mineralizada como seu próprio *bunker*. Estas células são dotadas de grandes capacidades de multidiferenciação, plasticidade, autorregeneração e clonagem. (13,18)

Estudos *in vitro* já validaram a hipótese destas células se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, odontoblastos, células neuronais e miócitos. (1)

As células estaminais pulparexpressam marcadores mesenquimais - CD13, CD29, CD44 e CD146; estaminais - OCT3/4, NANOG e SSEA4; e marcadores neuronais específicos -  $\beta 3$ -tubulina, S100, Nestina, Sinaptofisina. (3–5,8,19–25)

Por todas essas razões, as DPSC's representam um candidato crescente para terapias de reparo tecidual e, em particular, para neuroregeneração e neuroproteção. (26)

### 5.2.2 SHED's – Células Estaminais do Dente Decíduo Esfoliado

Após isolamento das DPSC's, novas células estaminais dentárias foram pesquisadas, sendo, deste modo, obtidas as células-tronco multipotentes da polpa de dentes decíduos esfoliados, denominadas SHED's. Estas células expressam Stro-1 e CD146 - dois marcadores mesenquimais iniciais também presentes nas superfícies celulares de MSC's e DPSC's. (26)

Estudos *in vitro* mostraram que SHED's são capazes de se diferenciar em células de linhagens osteogénicas, adipogénicas, miogénicas, condrogénicas e neurogénicas.

Adicionalmente, estas células exibiram alguns marcadores progenitores neuronais, como nestina e o marcador glial proteico GFAP.(26)

### 5.2.3 PDLSC's – Células Estaminais do Ligamento Periodontal

As PDLSC's exibem propriedades imunossupressoras mediadas pela liberação de fator solúvel e são capazes de manter as suas características de MSC após transplante *in vivo*, que destaca o seu possível uso em terapia celular e neurogênese (26–28)

### 5.2.4 SCAP's – Células Estaminais da Papila Apical

As células estaminais da papila apical foram veneradas como a linhagem com maior taxa de proliferação e propensão à diferenciação osteogénica e odontogénica (como demonstrado pela expressão de CD24 na superfície celular). No entanto, vários estudos mencionaram a capacidade de diferenciação adipogénica e neurogénica destas células. De facto, sob condições de cultura padrão, as SCAP's exprimem marcadores neuronais (nestina,  $\beta$ 3-tubulina e GFAP) e, após estimulação, concebem marcadores neuronais adicionais - como NeuN, neurofilamentos de cadeia média, enolase específica de neurónio e marcadores gliais CNPase. Além do mais, foi indicado que, quando semeadas em *scaffold* sintético, e transplantadas em camundongos imunocomprometidos, são aptas de regenerar tecido pulpar vascularizado e estruturas minerais semelhantes a dentina. (26)

### 5.2.5 DFPC's – Células Estaminais do Folículo Dentário

O folículo dentário, sendo um tecido conjuntivo derivado de ecto-mesênquima, apresenta células estaminais dotadas da capacidade de multidiferenciação (osteoblastos, adipócitos e células neuronais). (26)

## 5.3 Isolamento e Cultura Celular

A fim de se isolarem as células estaminais dentárias, é necessário conhecer ao pormenor os métodos de isolamento destas células para posterior cultura. Primeiramente, é feita a recolha das células dos diferentes tecidos dentários, e posteriormente as mesmas serão sujeitas ao isolamento. (13)

Hoje, as células estaminais podem ser detetadas e isoladas com base na filtragem de uma população celular heterogénea seguindo uma das seguintes técnicas: (18,29)

- Marcação imunocitoquímica
- Separação de células ativadas por fluorescência, num sistema designado por *fluorescent antibody cell sorting* (FACS);
- Seleção imunomagnética, designado por *magnetic antibody cell sorting* (MACS);
- Digestão Enzimática
- Explante

### 5.3.1 Marcação imunocitoquímica

Técnica que permite detetar e localizar antigénios, presentes em células ou tecidos, recorrendo a anticorpos (anticorpo primário e secundário). Geralmente o primeiro anticorpo, anticorpo primário, particular para o antigénio que se pretende identificar, não é marcado. (19,30,31)

O segundo anticorpo, anticorpo secundário, é marcado e conduzido à molécula da imunoglobulina em que foi produzido o primeiro anticorpo. (19,30,31)

### 5.3.2 Separação de células ativadas por fluorescência (FACS)

A citometria de fluxo por ativação fluorescente permite separar misturas heterogéneas, célula a célula, através da dispersão de luz fluorescente e singular de cada célula, num processo célere e eficaz que possibilita não apenas desvincular fisicamente as



células estaminais, mas também quantificá-las. Os anticorpos marcados com corantes fluorescentes são ligados às células em suspensões mistas. (30)

Essas células são posteriormente classificadas com base na fluorescência e dispersão de luz.(32)

A separação de células ativadas por fluorescência constitui uma técnica padrão para purificação de sub-populações celulares (a partir de uma suspensão) apresentando-se, hoje em dia, como um método fundamental para definir e separar discriminadamente estas populações celulares. os anticorpos marcados com corantes fluorescentes são ligados às células em suspensões mistas. No entanto apresenta como desvantagens o equipamento dispendioso e um rendimento limitado (cerca de 107 células/hora).(32)

### **5.3.3 Seleção imunomagnética (MACS)**

Após incubação com anticorpos primários específicos dos antigénios de superfície das células em questão, são utilizados anticorpos secundários conjugados com partículas magnéticas. Posteriormente, as células em suspensão são sujeitas a um campo magnético que irá funcionar como um filtro.

De um modo geral, a MACS representa um método tecnicamente simples, pouco dispendioso e com capacidade para separar um grande número de subpopulações celulares (cerca de 1011 células/hora), apresentando-se assim como uma metodologia prática para a seleção de linhas celulares específicas. Contudo, o grau de purificação neste método não é muito satisfatório (cerca de 75%) e existe a inquietação da interferência causada pelas esferas magnéticas na população celular. (32)

### 5.3.4 Método da Digestão Enzimática

Neste método, após feita a colheita, as frações tecidulares são incubadas numa solução enzimática (como por exemplo: solução da enzima colagenase/dispase) por um determinado a determinadas condições ambiente (habitualmente 1hora a 37°C).

Posteriormente, a solução é submetida a centrifugação e filtragem, obtendo-se assim uma suspensão celular. (8,30)

### 5.3.5 Método do Explante

Seguidamente colhidas, as amostras tecidulares são igualmente repartidas em placas. Após 48h–72h, essas frações associam-se à superfície plástica da placa e as células ficam aptas para crescimento e desenvolvimento no meio. (30)

As circunstâncias de cultura variam largamente para cada espécie celular. O meio artificial em que as células são cultivadas usualmente tem por base uma placa de cultura (geralmente de plástico) que consiste num substrato/meio que fornece os nutrientes essenciais (aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais), fatores de crescimento, gases (como por exemplo, oxigénio) e controlo o físico-químico (pH, pressão osmótica, temperatura).

As células que necessitam de uma acoplagem para crescimento e dependem de ancoragem podem ser cultivadas fixas a um substrato sólido ou semissólido, chamadas de cultura aderente ou monocamadas. Já as células que não carecem de fixação podem ser cultivadas num meio flutuante, são assim denominadas de cultura em suspensão.(15)

Além disso, as culturas de células são habitualmente provisionadas como culturas puras, consistindo somente numa única linhagem, explicado pelo facto dessas células já terem sido submetidas a isolamento.

Ou seja, diferenciando-se de ambientes nativos onde está presente uma diversidade de microrganismos.(15)

## 5.4 Indução neuronal

Para iniciar a indução neuronal das DPSC's existem duas opções de protocolo – método de indução química e método de indução por fator de crescimento.

### 5.4.1 Método de Indução Química

O seguinte protocolo é utilizado para exemplo desde método de indução, no entanto, os meios e suas respectivas composições podem ser alterados conforme o estudo e objetivos:

Na diferenciação/indução neuronal induzida quimicamente, as células são semeadas na placa de cultura e após atingir 80% de confluência, são submetidas a pré-tratamento com b-mercaptoetanol em DMEM suplementado com FBS. De ressaltar que as células foram expostas ao b-mercaptoetanol na concentração de 3 e 200IM de hidroxianisol butilado por mais 24h em DMEM sem soro.(24)

Neste método, o b-mercaptoetanol promove alteração morfológica das DPSC's. As células apresentaram uma extensão celular fina e longa semelhante a neurito com corpo celular refletivo após exposição ao b-mercaptoetanol. As células resultantes da diferenciação expressaram  $\beta$ 3-tubulina, através da imunocitoquímica. Pelo contrário, a expressão da proteína  $\beta$ 3-tubulina não foi encontrada no controlo. É importante mencionar que, a expressão de mRNA de marcadores neurogênicos (SOX2, SOX9 e  $\beta$ 3-tubulina) não foi alterada em células tratadas com  $\beta$ -mercaptoetanol em comparação com o controlo. (24)

Destes resultados pode concluir-se que o método de indução por produtos químicos gerou uma diferenciação neuronal falso-positiva, uma vez que falhou em promover a

regulação positiva da expressão de mRNA neuronal. (24) No entanto, conseguiu atingir uma mudança citoesquelética.

Uma possível explicação para o falhanço deste método é a potencial toxicidade dos químicos utilizados, que poderia promover encurtamento celular e variação citoesquelética, mas não uma transformação autêntica na informação genética celular direcionada à linhagem neurogênica.

#### **5.4.2 Método de Indução por Fator de Crescimento.**

O seguinte protocolo é utilizado para exemplo desde método de indução. No entanto, os meios e suas respectivas composições podem ser alterados conforme o estudo e objetivos:

As células são semeadas em placas mantidas num meio neurobasal que (por exemplo, contendo: suplemento B27, L-glutamina, penicilina, estreptomicina e anfotericina B (meio neuro-indutivo), suplementado com FGF básico e EGF). Posteriormente, as esferas celulares formadas são dissociadas numa suspensão de células por pipetagem repetida. São então re-semeadas em placas compostas por colágeno tipo IV em meio de neuroindução suplementado com ácido retinóico. (24)

Este protocolo assumiu-se assim como protocolo preferencial na neuroindução, pois conseguiu combater o resultado falso-positivo apresentado pelo método químico e ainda sugeriu uma potencial função neuronal.(24)

## 6 Neuroproteção

Por outro lado, *Venugopal et al* exibiu no seu estudo *in vitro* um indício de neuroproteção, através da prevenção da apoptose através da via PI3K-3 – via ativadora da sobrevivência de células B (cujas principais funções são a produção de anticorpos) - e da presença de Bcl-2 (proteína inibidora da apoptose). (33) Esta diminuição apoptótica foi também observada por *Yalvaç et al* e *Zi-Bing et al*. (34,35).

*F. Wang et al.* contribuiu também para a defesa desta propriedade, contudo, através da descoberta de outro mecanismo de proteção. Neste estudo, a fosforilação da proteína *Tau* foi suprimida pela adição de DPSC's – a proteína *Tau* controla a dinâmica dos microtúbulos durante a maturação e crescimento dos neuritos, sendo a maior proteína do citoesqueleto. A hiperfosforilação desta proteína pode afetar funções biológicas e morfológicas dos neurónios, logo ao suprimi-la existe um mecanismo de neuroproteção. (36) Além disso também foi observada *in vitro* a secreção de fatores neurotróficos de DPSC's diferenciadas que permitiram o crescimento de neuritos e a sobrevivência celular, por *Martens* em 2014. (37) O potencial de neuroproteção foi igualmente observado *in vitro* quando a co-cultura com DPSC's diminuiu a toxicidade induzida por MPP+ ou rotenona em culturas de neurónios mesencefálicos. (38)

Foi tal-qualmente observada *in vitro* a capacidade de DPSC's induzidas neuronalmente de secreção de dopamina mediante estimulação com KCl e ATP. Estas células induzidas também apresentaram influxo intracelular de Ca<sup>2+</sup> na presença de KCl – característica da transmissão sináptica. Foi juntamente notado um aumento da absorção de dopamina estriatal, diminuída em doenças causadas por degeneração neuronal, como é exemplo a DA. (3,38)

*Tsuneyuki Mita et al* (39) demonstrou *in vivo* em modelo de rato com DA que a administração intranasal de SHED's têm a habilidade de gerar um ambiente anti-inflamatório de tecidos que foi acompanhado pela indução de micróglia inflamatória do tipo

M2 (responsável pelo reparo tecidual). Esta administração também resultou numa melhoria da função cognitiva, o que sugere um bom efeito terapêutico destas células na DA.

Por outro lado, foram examinados *in vivo* os efeitos terapêuticos das SHED's na polineuropatia diabética – complicação da diabetes caracterizada pela degeneração progressiva dos nervos - em camundongos. Após terapia, estas células promoveram o crescimento de neuritos e preveniu o declínio da velocidade da condução nervosa sensorial quando comparada com o efeito terapêutico de outro grupo celular. (40) Outros estudos validaram igualmente a secreção significativa de fatores neurotróficos e supressão da reação inflamatória. (34,38,39,41,42)

## 7 Neuroregeneração

Em vários estudos, as DPSC's destacaram-se de outros tipos de células estaminais provando ser mais eficientes na expressão de marcadores específicos neuronais e, também possuindo maior corrente de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> com a expressão de marcadores sinápticos (que indicam possível atividade neuronal). (8–10,39,43) Essa atividade neuronal foi igualmente indicada pela sensibilidade das correntes de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem face à tetrodotoxina, que se trata de uma neurotoxina. (5)

Estudos *in vitro*, além de identificar marcadores neuronais nas DPSC's, também alcançaram nas suas culturas células semelhantes a neurónios assim como células da glia (44), o que indica potencial de neurodiferenciação.

*Chun Sy et al.*, atingiu na sua pesquisa células expandidas com um esqueleto progenitor neural – células em forma de fuso com processos bipolares ou piramidais. Essas células, posteriormente exibiram a forma de neurónio dopaminérgico com um corpo celular condensado e retraído. Assim DPSC's mostraram mais uma vez o seu potencial de neurodiferenciação, neste caso, apresentando-se como fonte de esperança no transplante de células autólogas para tratamento da Doença de Parkinson.

Quanto à neuroregeneração, *F. Wang et al.* alcançou fortes evidências *in vitro*, como o re-alongamento de dendrites retraídas e formação de novas dendrites quando os neurónios eram sujeitos a tratamento com DPSC's. Além disso, noutro estudo também foram observadas neuritos embutidos e fibras nervosas mielinizadas.(45).

Foi notado também o alongamento axonal num diferente estudo. (39) Por outro lado, estudos revelaram condições *in vitro* e *in vivo* que indicavam que o transplante de DPSC's promoveu neuritogénese e axogénese que permitiram a regeneração de axónios após lesão do nervo ótico. (24,38,42).

Além disso, outra pesquisa observou através do movimento de micronúcleos e lobulação transitória dos núcleos celulares, características que sugerem equitativamente a neurogénese. (27) A anatomia astrocítica conjuntamente foi observada noutro estudo, validando mais uma vez a neuroregeneração (2).

Diferentes estudos identificaram também alterações nas dinâmicas intracelulares de cálcio que sugerem a libertação de neurotransmissores.(22,24)

Outro aspeto muito importante dentro do potencial destas células foram os dados obtidos de recuperação motora após transplante das mesmas em lesões na medula espinal, nas quais os animais apresentaram melhorias significativas na sua locomoção. (2,44) Também foram observadas conexões neuronais e registos eletrofisiológicos confirmando correntes internas de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem. (38,46) De acrescentar que foi percebida noutro estudo a presença de secreção de NGF. (38)

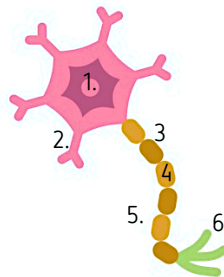


Figura 4. Citomorfologia Neuronal: 1. Núcleo Celular 2. Dendrite 3. Bainha de mielina 4. Axónio 5. Célula de Schwann 6. Terminais do axónio



## 8. Conclusão

Os resultados analisados nesta revisão foram sobretudo examinados quanto aos seguintes parâmetros: expressão de marcadores neuronais específicos e/ou neuroprogenitores (3–5,8,19–25), diferenças nas voltagens das correntes responsáveis pela comunicação nervosa (8), fatores envolvidos na neurogênese, prevenção de atividade apoptótica e atividade anti-inflamatória (que sugere a neuroproteção), alterações no citoesqueleto celular, indicadores de neuroregeneração e de atividade funcional locomotora.

Com estes resultados, foi possível concluir o seguinte acerca das células estaminais dentárias que:

- São superiores às células estaminais convencionais uma vez que apresentam uma fuga às questões éticas e uma recolha e oferta facilitadas, no entanto partilham desvantagens
- Já revelaram fatores relevantes envolvidos tanto na neuroregeneração, como na neuroproteção e neurodiferenciação
- Têm 2 capacidades interessantes: anti-inflamatória e antiapoptótica

Porém, o uso de células estaminais dentárias em doenças neurodegenerativas ainda é um tema imaturo. Todavia, estudos têm revelado cada vez mais confirmações da existência de um enorme potencial na utilização destas células como terapia para lesões nervosas.

## 9. Referências Bibliográficas

1. Ullah I, Park JM, Kang YH, Byun JH, Kim DG, Kim JH, et al. Transplantation of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells or Differentiated Neuronal Cells from Human Dental Pulp-Derived Stem Cells Identically Enhances Regeneration of the Injured Peripheral Nerve. *Stem Cells Dev.* 2017 Sep 1;26(17):1247–57.
2. Kabatas S, Demir CS, Civelek E, Yilmaz I, Kircelli A, Yilmaz C, et al. Neuronal regeneration in injured rat spinal cord after human dental pulp derived neural crest stem cell transplantation. *Bratislava Medical Journal.* 2018;119(3):143–51.
3. Kanafi M, Majumdar D, Bhonde R, Gupta P, Datta I. Midbrain cues dictate differentiation of human dental pulp stem cells towards functional dopaminergic neurons. *J Cell Physiol.* 2014;229(10):1369–77.
4. Rafiee F, Pourteymourfard-Tabrizi Z, Mahmoudian-Sani MR, Mehri-Ghahfarrokhi A, Soltani A, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into neuron-like cells. *International Journal of Neuroscience.* 2020 Feb 1;130(2):107–16.
5. Király M, Kádár K, Horváthy DB, Nardai P, Rác GZ, Lacza Z, et al. Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochem Int.* 2011 Sep;59(3):371–81.
6. Leventhal A, Chen G, Negro A, Boehm M. The benefits and risks of stem cell technology. *Oral Dis.* 2012 Apr;18(3):217–22.
7. Wong RSY. Mesenchymal stem cells: Angels or demons? Vol. 2011, *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011.
8. Ullah I, Subbarao RB, Kim EJ, Bharti D, Jang SJ, Park JS, et al. In vitro comparative analysis of human dental stem cells from a single donor and its neuronal differentiation potential evaluated by electrophysiology. *Life Sci.* 2016 Jun 1;154:39–51.
9. Abe S, Hamada K, Miura M, Yamaguchi S. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell Biol Int.* 2012 Oct 1;36(10):927–36.
10. Karaöz E, Demircan PC, Saflam Ö, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2011 Oct;136(4):455–73.
11. Gonmanee T, Sritanaudomchai H, Vongsavan K, Faisaikarm T, Songsaad A, White KL, et al. Neuronal differentiation of dental pulp stem cells from human permanent and deciduous teeth following coculture with rat auditory brainstem slices. *Anatomical Record.* 2020 Nov 1;303(11):2931–46.
12. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. Vol. 10, *Stem Cell Research and Therapy.* BioMed Central Ltd.; 2019.
13. Sobhani A, Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. Vol. 55, *Acta Med Iran.* 2017.
14. Martellucci S, Manganelli V, Santacroce C, Santilli F, Piccoli L, Sorice M, et al. Role of Prion protein-EGFR multimolecular complex during neuronal



- differentiation of human dental pulp-derived stem cells. *Prion*. 2018 Mar 4;12(2):117–26.
15. Alberts B. *Biologia Molecular da Célula*.
  16. Mothe AJ, Tator CH. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. Vol. 122, *Journal of Clinical Investigation*. 2012. p. 3824–34.
  17. King N, Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2014;
  18. Tirino V, Paino F, de Rosa A, Papaccio G. Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. *Methods in Molecular Biology*. 2012;879:443–63.
  19. Hsiao D, Hsu SH, Chen RS, Chen MH. Characterization of designed directional polylactic acid 3D scaffolds for neural differentiation of human dental pulp stem cells. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2020 Jan 1;119(1P2):268–75.
  20. Geng YW, Zhang Z, Liu MY, Hu WP. Differentiation of human dental pulp stem cells into neuronal by resveratrol. *Cell Biol Int*. 2017 Dec 1;41(12):1391–8.
  21. Chang CC, Chang KC, Tsai SJ, Chang HH, Lin CP. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2014 Dec 1;113(12):956–65.
  22. Gonmanee T, Thonabulsombat C, Vongsavan K, Sritanaudomchai H. Differentiation of stem cells from human deciduous and permanent teeth into spiral ganglion neuron-like cells. *Arch Oral Biol*. 2018 Apr 1;88:34–41.
  23. Gnanasegaran N, Govindasamy V, Abu Kasim NH. Differentiation of stem cells derived from carious teeth into dopaminergic-like cells. *Int Endod J*. 2016 Oct 1;49(10):937–49.
  24. Osathanon T, Sawangmake C, Nowwarote N, Pavasant P. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. *Oral Dis*. 2014;20(4):352–8.
  25. Chun SY, Soker S, Jang YJ, Kwon TG, Yoo ES. Differentiation of human dental pulp stem cells into dopaminergic neuron-Like cells in vitro. *J Korean Med Sci*. 2016;31(2):171–7.
  26. Bonaventura G, Incontro S, Iemmolo R, la Cognata V, Barbagallo I, Costanzo E, et al. Dental mesenchymal stem cells and neuro-regeneration: a focus on spinal cord injury. Vol. 379, *Cell and Tissue Research*. Springer; 2020. p. 421–8.
  27. Bueno C, Martínez-Morga M, Martínez S. Non-proliferative neurogenesis in human periodontal ligament stem cells. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
  28. Lei M, Li K, Li B, Gao LN, Chen FM, Jin Y. Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials*. 2014;35(24):6332–43.
  29. Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;698:107–21.
  30. Hilkens P, Driesen RB, Wolfs E, Gervois P, Vanganswinkel T, Ratajczak J, et al. Cryopreservation and banking of dental stem cells. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2016. p. 199–235.
  31. Gervois P, Struys T, Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Politis C, et al. Neurogenic maturation of human dental pulp stem cells following neurosphere



- generation induces morphological and electrophysiological characteristics of functional neurons. *Stem Cells Dev.* 2015 Feb 1;24(3):296–311.
32. Zhu B, Murthy SK. Stem cell separation technologies. Vol. 2, *Current Opinion in Chemical Engineering.* Elsevier Ltd; 2013. p. 3–7.
  33. Venugopal C, K S, Rai KS, Pinnelli VB, Kutty BM, Dhanushkodi A. Neuroprotection by Human Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells: From Billions to Nano. *Curr Gene Ther.* 2018 Sep 13;18(5):307–23.
  34. Yalvaç ME, Yarat A, Mercan D, Rizvanov AA, Palotás A, Şahin F. Characterization of the secretome of human tooth germ stem cells (hTGSCs) reveals neuro-protection by fine-tuning micro-environment. *Brain Behav Immun.* 2013;32:122–30.
  35. Hu ZB, Chen HC, Wei B, Zhang ZM, Wu SK, Sun JC, et al. Platelet rich plasma enhanced neuro-regeneration of human dental pulp stem cells in vitro and in rat spinal cord. *Ann Transl Med.* 2022 May;10(10):584–584.
  36. Wang F, Jia Y, Liu J, Zhai J, Cao N, Yue W, et al. Dental pulp stem cells promote regeneration of damaged neuron cells on the cellular model of Alzheimer’s disease. *Cell Biol Int.* 2017 Jun 1;41(6):639–50.
  37. Martens W, Sanen K, Georgiou M, Struys T, Bronckaers A, Ameloot M, et al. Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. *FASEB Journal.* 2014;28(4):1634–43.
  38. Nesti C, Pardini C, Barachini S, D’Alessandro D, Siciliano G, Murri L, et al. Human dental pulp stem cells protect mouse dopaminergic neurons against MPP+ or rotenone. *Brain Res.* 2011 Jan 7;1367:94–102.
  39. Mita T, Furukawa-Hibi Y, Takeuchi H, Hattori H, Yamada K, Hibi H, et al. Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Behavioural Brain Research.* 2015 Oct 5;293:189–97.
  40. Miura-Yura E, Tsunekawa S, Naruse K, Nakamura N, Motegi M, Nakai-Shimoda H, et al. Secreted factors from cultured dental pulp stem cells promoted neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons and ameliorated neural functions in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Diabetes Investig.* 2020 Jan 1;11(1):28–38.
  41. Soria JM, Sancho-Tello M, Esparza MAG, Mirabet V, Bagan JV, Monleón M, et al. Biomaterials coated by dental pulp cells as substrate for neural stem cell differentiation. *J Biomed Mater Res A.* 2011;97 A(1):85–92.
  42. Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Oct 22;54(12):7544–56.
  43. Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z, Karbalaie K, Mousavi S, Talebi A, et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *International Journal of Developmental Biology.* 2011;55(2):189–95.
  44. Taghipour Z, Karbalaie K, Kiani A, Niapour A, Bahramian H, Nasr-Esfahani MH, et al. Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model. *Stem Cells Dev.* 2012 Jul 1;21(10):1794–802.



**CESPU**

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

45. Sanen K, Martens W, Georgiou M, Ameloot M, Lambrechts I, Phillips J. Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair? *J Tissue Eng Regen Med.* 2017 Dec 1;11(12):3362–72.
46. Fortino VR, Chen RS, Pelaez D, Cheung HS. Neurogenesis of neural crest-derived periodontal ligament stem cells by EGF and bFGF. *J Cell Physiol.* 2014 Apr;229(4):479–88.

