

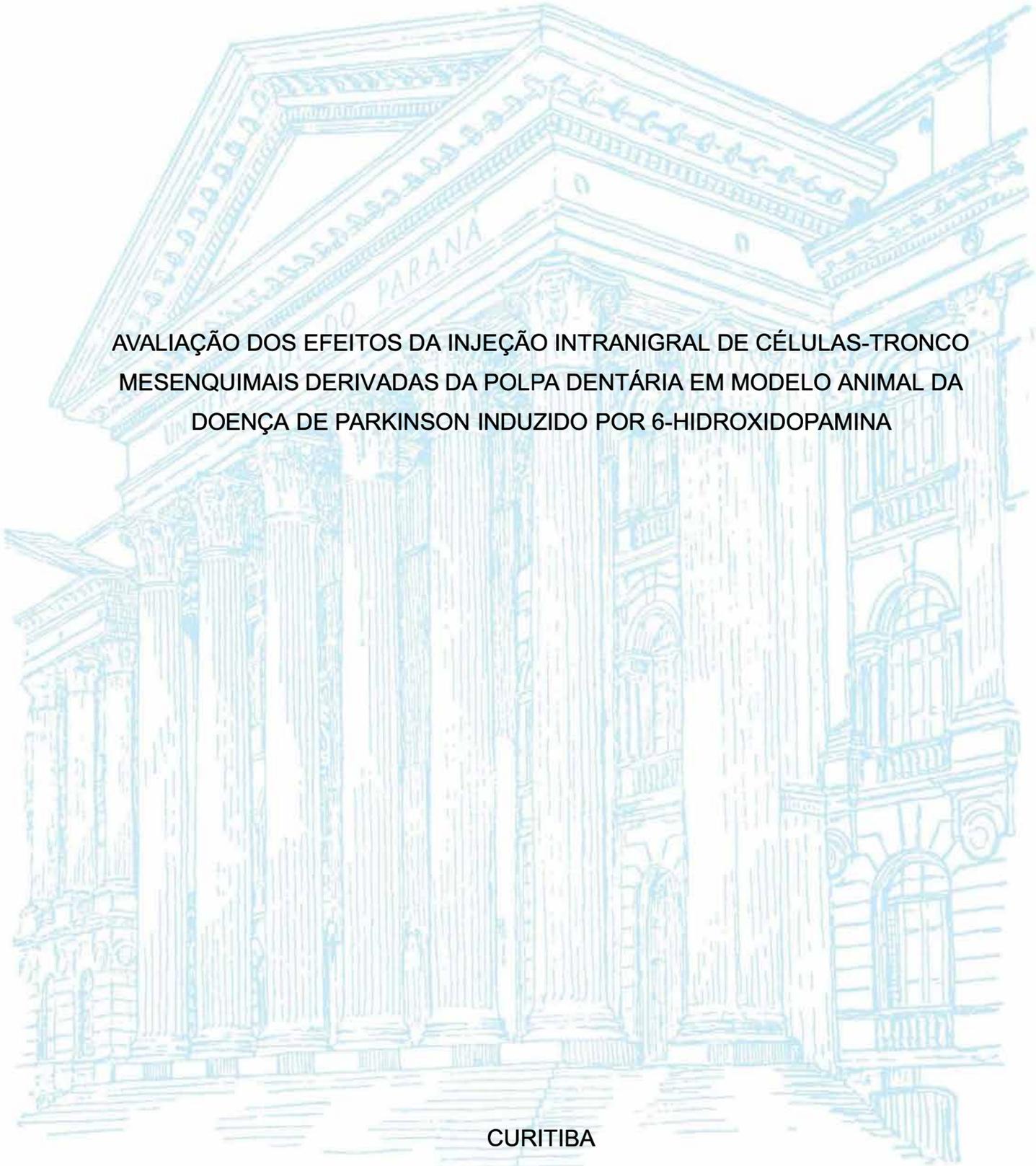
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVELLYN MAYLA DE AZEVEDO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INJEÇÃO INTRANIGRAL DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DA POLPA DENTÁRIA EM MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA

CURITIBA

2022



EVELLYN MAYLA DE AZEVEDO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INJEÇÃO INTRANIGRAL DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DA POLPA DENTÁRIA EM MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo M. S. Lima

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Azevedo, Evellyn Mayla de.

Avaliação dos efeitos da injeção intranigral de células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária em modelo animal da Doença de Parkinson induzido por 6-hidroxiopamina. / Evellyn Mayla de Azevedo. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Marcelo M. S. Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Parkinson, Doença de. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Polpa dentária. 4. Oxidopamina. 5. Comportamento – Avaliação. 6. Dopaminérgicos. I. Título. II. Lima, Marcelo M. S. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA -
40001016072P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EVELLYN MAYLA DE AZEVEDO** intitulada: "**AValiação DOS EFEITOS DA INJEÇÃO INTRANIGRAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA POLPA DENTÁRIA EM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA.**", sob orientação do Prof. Dr. MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

07/10/2022 08:30:55.0

MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/09/2022 13:44:56.0

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/10/2022 07:41:36.0

SILVIO MARQUES ZANATA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Adriano e Adriana, e ao meu irmão Patryck, por todo amor, paciência e principalmente, apoio em todas as etapas desta jornada. Vocês tornam todos os momentos especiais, reduzem as cargas do dia-a-dia e fazem todo esforço valer a pena.

Aos meus amigos, por estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins, suportarem minhas reclamações e delírios sonhadores, por me fazerem rir com os fatos mais bobos da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima, por ter sempre acreditado no meu potencial, confiado nas minhas escolhas e por ter compartilhado seu conhecimento científico, acadêmico e profissional.

Aos meus colegas de laboratório e amigos, Jessica, Lais, Ana Paula e Alex. Obrigada por me ajudarem nos momentos que mais precisei, por me ensinarem todos os pormenores da pesquisa e por sempre estarem abertos a um debate científico.

À minha querida aluna de iniciação científica Ellen, por estar sempre disposta a aprender, ajudar e respeitar os experimentos que realizamos.

Agradeço também aos professores do departamento de fisiologia, às minhas colegas do lab dor, funcionários do biotério e técnicos e demais funcionários do departamento, em especial ao Fabio, por sempre se prontificar a ajudar aqueles que precisam, nas mais diversas situações.

Ao laboratório de Tecnologia celular da PUC-PR e à Leticia, por me aceitarem neste projeto tão cativante.

À CAPES e ao CNPq pelo financiamento e a UFPR, por proporcionar ensino e pesquisa gratuito e de qualidade para todos.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela morte lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc). Nos últimos anos, o uso de células-tronco como potencial estratégia de tratamento para esta doença tem ganhado destaque, mais recentemente, com as células tronco derivadas da polpa dentária (DPSC) sobressaindo-se devido ao seu potencial neurogênico intrínseco, além de fácil obtenção. Entretanto, ainda há grandes lacunas quanto aos mecanismos pelos quais estas células atuam, bem como sua segurança em uma aplicação, *in vivo*. Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos da infusão intranigral das DPSC diferenciadas e não diferenciadas em neurônios, sobre o comportamento motor, sobrevivência celular e expressão de proteínas chave para o sistema dopaminérgico, em um modelo animal da DP induzido por 6-hidroxidopamina. Nossos resultados mostram que as células infundidas se mantiveram vivas durante todo o tempo de duração do experimento, além de promoverem a reversão dos prejuízos motores induzidos pela neurotoxina. Além destes resultados, também observamos haver uma redução da morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc, bem como uma redução dos níveis de GFAP e p-Thr 34 DARPP-32 nesta mesma estrutura e de JUN no corpo estriado (ST). Por fim, também detectamos a ocorrência de aumentos nos níveis protéicos de BDNF e DAT não glicosilado no bulbo olfatório, bem como de p-Thr 75 DARPP-32 no ST dos animais. Em conjunto, nossos resultados sugerem que as DPSC, induzidas e não induzidas à diferenciação neuronal, possuem um potencial neuroprotetor que pode ser explorado como uma possível, e promissora estratégia terapêutica, no contexto da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Célula-tronco da polpa dentária. 6-Hidroxidopamina. Análise comportamental. Sistema dopaminérgico.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by the slow and progressive death of dopaminergic neurons in the Substantia nigra pars compacta (SNpc). In recent years, the use of stem cells as a potential treatment strategy for PD has become prominent. In this context, dental pulp stem cells (DPSC) stand out due to their intrinsic neurogenic potential, in addition to being easy to obtain. However, large gaps regarding the mechanisms by which these cells act, as well as their safety in an *in vivo* application remains. Given that, the present work aims to evaluate the effects of intranigral infusion of neurons differentiated and undifferentiated DPSC, on motor behavior, cell survival, and key proteins for the dopaminergic system expression, in a PD animal model induced by 6-hydroxydopamine. Our results show that the infused cells remained alive during the experiment duration, in addition to promoting the reversal of neurotoxin-induced motor damage. In addition to these results, we also observed a reduction in the dopaminergic neurons death in the SNpc, as well as a reduction in the levels of GFAP and p-Thr 34 DARPP-32 in this same structure, and of JUN in the striatum (ST). Finally, we also detected increases in protein levels of BDNF and non-glycosylated DAT in the olfactory bulb, as well as p-Thr 75 DARPP-32 in the ST of the animals. Taken together, our results suggest that DPSC, induced and not induced to neuronal differentiation, have a neuroprotective potential that can be explored as a possible and promising therapeutic strategy in the context of Parkinson's disease.

Keywords: Parkinson's disease. Dental Pulp Stem Cells. 6-hydroxydopamine. behavioral analysis. Dopaminergic system.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PERDA MACIÇA DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS NA SNPC

FIGURA 2 – HIERARQUIA DAS CÉLULAS-TRONCO

FIGURA 3 – GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTO 1

FIGURA 4 – GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTO 2

FIGURA 5 – REDUÇÃO DE TH-ir NA SNpc 7 E 14 DIAS APÓS A INFUSÃO DE
6-OHDA

FIGURA 6 – EFEITO DA INFUSÃO DAS DPSCs NO COMPORTAMENTO MOTOR

FIGURA 7 – EFEITO DA INFUSÃO DAS DPSCs NA OLFAÇÃO

FIGURA 8 – SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS APÓS INFUSÃO

FIGURA 9 – EFEITO DA INFUSÃO DAS DPSCs NA SOBREVIVÊNCIA DE
NEURÔNIOS TH-ir

FIGURA 10 – CORRELAÇÃO ENTRE TH-ir NA SNpc E ÍNDICE DE LOCOMOÇÃO

FIGURA 11–EXPRESSÃO DE GFAP

FIGURA 12–EXPRESSÃO DE BDNF

FIGURA 13–EXPRESSÃO DE JUN

FIGURA 14–EXPRESSÃO DE DAT GLICOSILADO E NÃO GLICOSILADO

FIGURA 15–EXPRESSÃO DE DARPP-32 p-THR 34 E p-THR 75

LISTA DE SIGLAS

6-OHDA	- 6-hidroxidopamina
AP-1	-Proteína ativadora 1
BDNF	-Fator neurotrófico cerebral
BHE	- barreira hematoencefálica
CDK5	-Quinase dependente de ciclina 5
CT	-Célula-tronco
CTM	-Célula-tronco mesenquimais
DA	- dopamina
DARPP-32	-Fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32 kDA
DAT	- transportador de dopamina
DP	- doença de Parkinson
DPSC	-Célula-tronco da polpa dentária
GFAP	-Proteína ácida fibrilar glial
IHQ	-Imuno histoquímica
IP	-Intraperitoneal
LRRK2	- <i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
MFB	- feixe prosencefálico medial
MPP ⁺	-1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
PKA	-Proteína quinase dependente de AMPc
SNCA	- Alfa sinucleína
SNpc	- substância negra <i>pars compacta</i>
ST	- corpo estriado
TH-ir	-Neurônios Imunorreativos para Tirosina Hidroxilase
TH	-Tirosina Hidroxilase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	DOENÇA DE PARKINSON	18
2.1.1	Epidemiologia	18
2.1.2	Etiologia	19
2.1.3	Fisiopatologia	20
2.1.4	Tratamentos	23
2.1.5	Modelos Animais da Doença de Parkinson	24
2.2	CÉLULAS-TRONCO	26
2.2.1	Células-tronco mesenquimais	28
2.2.2	Células-tronco da polpa dentária	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	COLETA, ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E INDUÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA	31
3.2	ANIMAIS	32
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
3.3.1	Experimento 1	32
3.3.2	Experimento 2	33
3.4	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	34
3.5	TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA	35
3.6	TESTE DE CAMPO ABERTO	36
3.7	TRANSDUÇÃO E LOCALIZAÇÃO DAS DPSC APÓS INFUSÃO	36
3.8	IMUNO-HISTOQUÍMICA	37
3.9	WESTERN BLOT	38
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4	RESULTADOS	40
4.1	EXPERIMENTO 1	40
4.2	EXPERIMENTO 2	42
4.2.1	Análise de sobrevivência celular	42
4.2.2	Campo aberto	43
4.2.3	Teste de discriminação olfatória	44
4.2.4	Imuno-histoquímica	46
4.2.5	Correlação Neurônios dopaminérgicos na SNpc e índice de locomoção	49
4.2.6	Western blot	49
4.2.6.1	GFAP	49

4.2.6.2	BDNF	50
4.2.6.3	JUN	51
4.2.6.4	DAT	52
4.2.6.5	DARPP-32	53
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Caracterizada pela morte pronunciada e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc), a doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente do mundo, afetando entre 2-3% da população com mais de 65 anos e com previsão de crescimento nas próximas décadas, visto o envelhecimento da população (DORSEY *et al.*, 2018; KUMAR; GOYAL; SINGH, 2022; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Embora muitos anos tenham se passado desde a primeira descrição da doença, por James Parkinson, sua etiologia ainda permanece com pontos a serem esclarecidos, principalmente devido a sua complexidade (CABREIRA; MASSANO, 2019; JANKOVIC; TAN, 2020).

Atualmente, os tratamentos da DP se focam majoritariamente no alívio de suas manifestações motoras, evidenciando a necessidade pela busca por alternativas capazes de promover a neuroproteção e/ou neuroregeneração (CABREIRA; MASSANO, 2019). Neste contexto, o uso de células-tronco (CTs) se mostra promissor, já que estas células são capazes de se auto renovar e de dar origem a diferentes tipos celulares, incluindo neurônios (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

As células-tronco da polpa dentária (DPSC) são células-tronco mesenquimais (CTMs) que devido a sua origem embrionária, periféricas ao tubo neural, possuem uma alta taxa de diferenciação neuronal, além de representarem uma fonte de obtenção de fácil acesso cirúrgico e baixo risco ao paciente, já que podem ser obtidas de dentes que seriam descartados (ANITUA; TROYA; ZALDUENDO, 2018; SHARMA *et al.*, 2022; YAMADA *et al.*, 2019).

Desta maneira, considerando a relevância da DP, a necessidade pela busca por novos tratamentos e o potencial terapêutico das DPSC, este trabalho busca avaliar os efeitos da injeção dessas células, diferenciadas e não diferenciadas em linhagem neuronal, em modelo animal da DP induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da injeção intranigral de DPSC, indiferenciadas e diferenciadas em linhagem neuronal, em modelo animal da DP induzido por 6-OHDA.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a extensão da lesão na SNpc gerada pela infusão de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial (MFB);
- Avaliar o impacto da injeção de DPSC, diferenciadas em neurônios ou não, no comportamento motor e na olfação de ratos submetidos a lesão na SNpc.
- Quantificar o efeito da injeção de DPSC, induzidas ou não à diferenciação neuronal, sobre a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos na SNpc frente a lesão por 6-OHDA no MFB.
- Analisar os níveis de expressão de proteínas relacionadas com o sistema dopaminérgico dentro do paradigma de lesão da via nigroestriatal e injeção de DPSC induzidas ou não a diferenciação em neurônios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

2.1.1 Epidemiologia

Descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson e posteriormente designada com seu nome (CABREIRA; MASSANO, 2019), a DP, é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, atrás apenas da doença de Alzheimer (KUMAR; GOYAL; SINGH, 2022).

Sendo caracterizada pela perda pronunciada e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, esta doença surge entre os 50 e os 80 anos de idade, afetando entre 2-3% daqueles com idade superior aos 65 anos (KUMAR; GOYAL; SINGH, 2022). Com o aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento da população, é esperado um aumento significativo no número de casos da DP, podendo chegar ao dobro do relatado atualmente, sendo então o envelhecimento o fator de risco mais importante para o surgimento desta patologia (DORSEY *et al.*, 2018; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020).

Embora ainda ocorra uma escassez de estudos relacionados à epidemiologia da DP no Brasil e uma ausência de números oficiais (BOVOLENTA; FELICIO, 2017), Dorsey et al (2018), relatou uma prevalência de 80-90 casos por 100.000 habitantes, para ambos os sexos, no ano de 2016, um aumento de 16,4% quando comparado aos números de 1990.

Além da idade, o sexo também mostrou-se um fator relevante para a epidemiologia da DP, tendo a doença uma incidência 1,5 a 2,0 vezes maior nos homens quando comparados às mulheres, possivelmente devido a um efeito protetor do estrogênio (KUMAR; GOYAL; SINGH, 2022; ASCHERIO, SCHWARSCHILD, 2016). Outros fatores de risco que devem ser considerados são a exposição a poluentes, como pesticidas, solventes e metais (DORSEY *et al.*, 2018), bem como fatores genéticos, afinal, além das mutações nos genes LRRK2, SNCA, PRKN, PINK1, entre outras, já descritas e associadas com esta doença, cerca de 20% dos pacientes acometidos relata ao menos um familiar em primeiro ou segundo grau também afetado por ela (CABREIRA; MASSANO, 2019).

2.1.2 Etiologia

A contribuição de mutações genéticas e fatores ambientais na patogênese da DP vem sendo discutida na literatura, porém, o envelhecimento ainda se mostra o maior fator de risco para a doença (JANKOVIC; TAN, 2020). Dessa forma, a DP é considerada uma doença multifatorial e, embora diversos avanços tenham sido feitos quanto aos mecanismos envolvidos no surgimento desta, sua etiopatogenia continua determinada como heterogênea (CABREIRA; MASSANO, 2019). Entretanto, estudos demonstram o envolvimento de diferentes mecanismos celulares, como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e do retículo endoplasmático, alterações conformacionais proteicas, alterações na homeostase celular e mutações gênicas. (OBESO *et al.*, 2017).

Embora em sua maioria a DP se apresente como esporádica, entre 5 a 10% dos casos possuem causa monogênica associada (CABREIRA; MASSANO, 2019). Assim como o primeiro gene a ser associado com o surgimento de formas familiares da doença, o SNCA (alfa-sinucleína), outros genes cujas mutações se relacionam com a DP, sejam elas autossômicas dominantes (LRRK2, VPS35, EIF4G1) ou recessivas (PRKN, PINK1, DJ-1) tem como seu produto proteínas diretamente relacionadas com vias afetadas também em casos esporádicos da doença (OBESO *et al.*, 2017). Até 2020, mais de 20 formas de Parkinsonismo monogênico foram descritas e cerca de 100 locus identificados como fatores de risco para DP (JANKOVIC; TAN, 2020).

A disfunção no processamento proteico desempenha um papel importante na patologia da DP, principalmente relacionada a alterações na proteína α -sinucleína que, quando agregada de maneira anormal, acumula-se nos corpos de Lewy e se mostra tóxica para os neurônios dopaminérgicos. Esta agregação, relacionada com alterações na conformação dessa proteína, pode ser influenciada pela presença de espécies reativas de oxigênio, mutações gênicas e sobreexpressão da mesma (JANKOVIC; TAN, 2020).

Estudos demonstram também o papel da disfunção mitocondrial na etiologia da DP, incluindo um ciclo, onde esta disfunção seria capaz de aumentar a agregação de α -sinucleína e vice-versa. Neste contexto, o acúmulo de α -sinucleína no interior da mitocôndria é capaz de gerar a disfunção do complexo I mitocondrial com consequente aumento do estresse oxidativo que, por sua vez, impacta na

agregação da mesma (POEWE *et al.*, 2017). Sua importância também pode ser reforçada pelo uso de modelos animais com toxinas que prejudicam a função mitocondrial, como a rotenona, já que estas são capazes de mimetizar o Parkinsonismo (POEWE *et al.*, 2017).

O estresse oxidativo, seja ele consequência direta ou não da disfunção mitocondrial, vem sendo estudado como um dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DP. Os neurônios dopaminérgicos da SNpc se mostram particularmente vulneráveis ao estresse metabólico e oxidativo, pois possuem não somente altos níveis citosólicos de dopamina (DA) e seus metabólitos, como também níveis intracelulares de cálcio (KALIA; LANG, 2015; POEWE *et al.*, 2017).

Paralelamente, a neuroinflamação se mostra outro fator importante a ser considerado, pois embora sua presença seja amplamente relatada (KALIA; LANG, 2015; LIMA *et al.*, 2012; MAROGIANNI *et al.*, 2020), ainda há questionamentos quanto ao seu papel na sobrevivência ou morte neuronal, já que embora tanto astrócitos quanto células da micróglia, estejam envolvidos com a depuração de debris extracelulares, quando ativados, podem liberar citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (KALIA; LANG, 2015; MAROGIANNI *et al.*, 2020). Estudos apontam que não apenas a neuroinflamação desempenha um papel no desenvolvimento desta patologia, mas também a inflamação periférica, causada por doenças como diabetes tipo II e doença inflamatórias intestinais, que têm sido associadas com altos riscos de desenvolvimento de DPPD (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Por fim, a inflamação do tecido olfatório ou do intestino, durante a fase prodromica da DP, aparenta estar relacionada com o dobramento incorreto de α -sinucleína, representando um *looping* que contribuiria para o desenvolvimento da doença (POEWE *et al.*, 2017).

2.1.3 Fisiopatologia

Em síntese, a DP é marcada pela morte precoce, progressiva e proeminente de neurônios dopaminérgicos da SNpc, levando à despigmentação ventrolateral desta estrutura, já que estes neurônios são ricos em neuromelanina (Figura 1), (KALIA; LANG, 2015; LIMA *et al.*, 2012), entretanto a presença de inclusões proteicas intracitoplasmáticas, conhecidos como corpos de Lewy, ricos em

α -sinucleína, também é um marcador fisiopatológico da doença (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020).

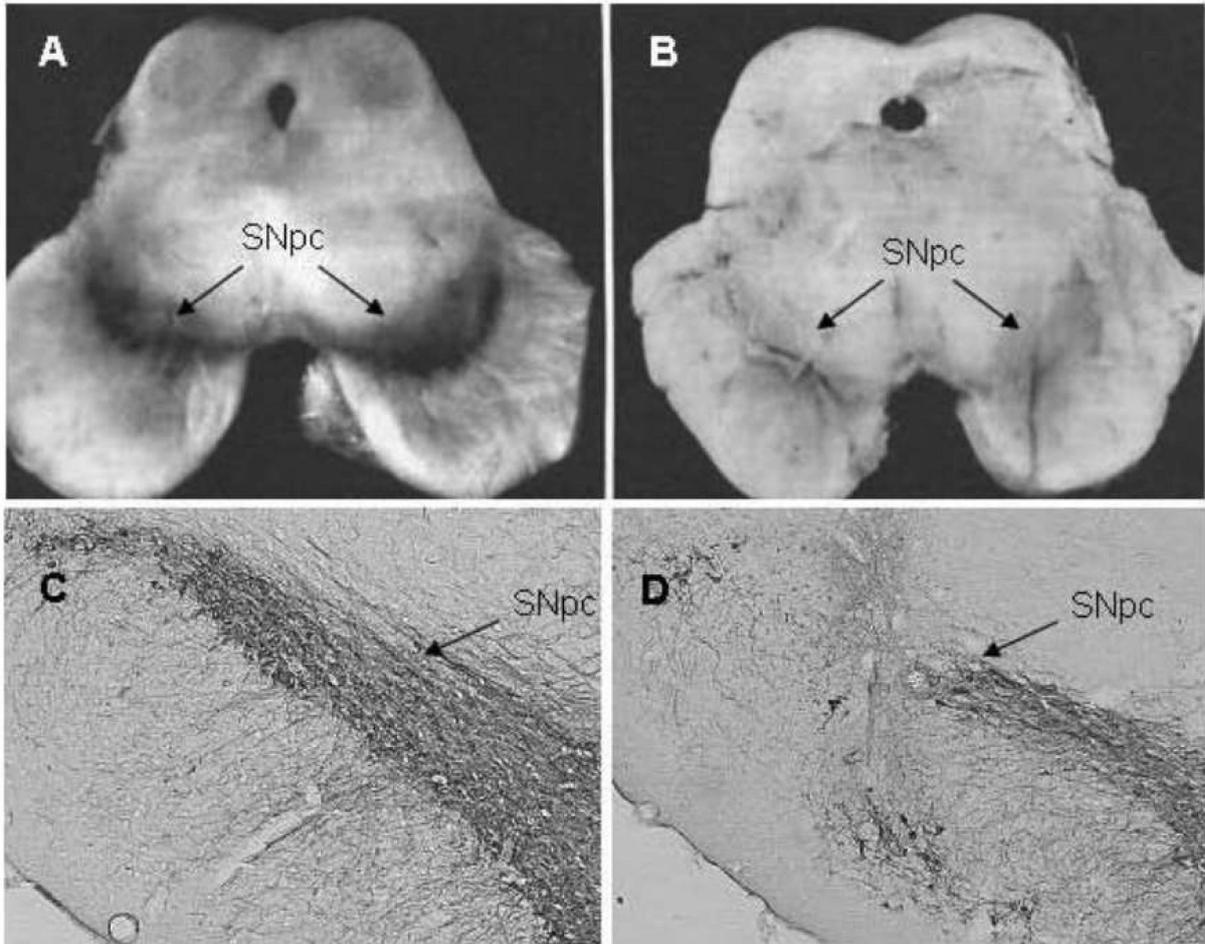


Figura 1. PERDA MACIÇA DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS NA SNPC. Os painéis A e B representam, respectivamente, o mesencéfalo bilateral humano *post mortem* de indivíduos normais e parkinsonianos de. Os painéis C e D demonstram o equivalente unilateral do mesencéfalo de ratos após a infusão de veículo ou MPTP, respectivamente. As setas indicam imunoreatividade à tirosina hidroxilase presente na SNpc. FONTE: Lima et al. (2012)

Localizada no mesencéfalo ventral, a SNpc possui neurônios dopaminérgicos cujos axônios projetam-se para o corpo estriado (ST), esta via, conhecida como via nigro-estriatal, desempenha um papel primordial na execução de atividades motoras. (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019). Usualmente a camada ventrolateral da SNpc é mais afetada pela DP, gerando uma depleção nos níveis de DA no estriado dorsal (KALIA; LANG, 2015). É importante ressaltar que a neurodegeneração e a presença dos corpos de Lewy, presentes na DP, podem se estender, ainda que em menor grau, para outros sistemas, tendo sido relatados em

neurônios noradrenérgicos (locus coeruleus), serotoninérgicos (núcleos da rafe) e colinérgicos (núcleo basal de Meynert), bem como no córtex cerebral e no sistema nervoso autônomo (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019).

Estima-se que seja necessária uma perda de 50-70% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc para que as manifestações motoras da doença se tornem evidentes (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Tais manifestações são consideradas clássicas e incluem bradicinesia, rigidez muscular, tremor em repouso e prejuízos posturais e na marcha (KALIA; LANG, 2015).

A bradicinesia consiste na redução progressiva da velocidade e amplitude de movimentos alternados e repetidos, como por exemplo, o abrir e fechar das mãos (CABREIRA; MASSANO, 2019). Adicionalmente, é possível observar manifestações decorrentes da bradicinesia, como uma redução do movimento corporal espontâneo, hipomímia, hipofonia e micrografia (CABREIRA; MASSANO, 2019; KUMAR; GOYAL; SINGH, 2022). Por outro lado, a rigidez muscular é derivada de um aumento no tônus muscular e, muitas vezes, é denominada rigidez “em roda dentada”, quando se soma ao tremor em repouso (KUMAR; GOYAL; SINGH, 2022). Este último manifesta-se usualmente nas mãos, mas pode surgir em outras regiões, como membros inferiores, língua e mandíbula (OBESO *et al.*, 2017). Por fim, às alterações posturais e em marcha resultam usualmente, em uma postura mais acentuada, com flexão do tronco e marcha lenta, de base estreita e com passos curtos e baixos (CABREIRA; MASSANO, 2019; KALIA; LANG, 2015).

As manifestações não-motoras, por outro lado, têm ganhado um destaque recente, visto que algumas delas tendem a surgir anos antes das manifestações motoras da DP, fazendo parte então da fase prodrômica da doença (JANKOVIC; TAN, 2020). Se fazem presentes nessa fase alterações neuropsiquiátricas, como depressão, ansiedade, apatia e fadiga; distúrbios gastrointestinais que incluem disfagia e constipação; alterações autonômicas, como sudorese, disfunção sexual e hipotensão ortostática; distúrbios do sono, incluindo alterações comportamentais do sono REM (do inglês *rapid eye movement*) com característica atividade hiper motora noturna e sonolência diurna excessiva; e por fim, alterações sensoriais, como alterações visuais e no paladar e hiposmia (CABREIRA; MASSANO, 2019; KALIA; LANG, 2015; LIU, Shu-Ying; CHAN; STOESSL, 2017). A demência, por outro lado, acomete cerca de 30% dos pacientes e tende a surgir em fases avançadas da DP, relacionando-se com a degeneração de estruturas hipocámpais e podendo estar

relacionada com o surgimento de alucinações e psicoses (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019; TOLOSA *et al.*, 2021).

Visando a compreensão da progressão da DP, Braak *et al.* (2003) propuseram um estagiamento da doença, composto por seis fases, que ganhou destaque por acompanhar as manifestações clínicas da doença (KALIA; LANG, 2015). De acordo com a hipótese de Braak, as mudanças patológicas iniciais ocorrem na medula oblonga e no bulbo olfatório (estágios 1 e 2) e correspondem ao surgimento fase prodrômica, em especial do prejuízo autonômico e olfatório. Posteriormente, tais alterações avançam rostralmente para o mesencéfalo e SNpc (estágios 3 e 4), resultando no aparecimento da fase clínica, com a presença de manifestações motoras e do sono. Por fim, há o acometimento de regiões corticais (estágios 5 e 6), resultando em sinais e sintomas mais severos, como a demência e distúrbios emocionais (BRAAK *et al.*, 2003; JANKOVIC; TAN, 2020; KALIA; LANG, 2015).

2.1.4 Tratamentos

Embora muitos anos tenham se passado após a identificação da DP, as atuais intervenções terapêuticas disponíveis ainda são majoritariamente sintomatológicas, não sendo capazes de alterar significativamente sua progressão e visando uma melhora na qualidade de vida do paciente (CABREIRA; MASSANO, 2019). Neste sentido, drogas que estimulam os receptores dopaminérgicos ou aumentam os níveis de DA são as principais escolhas no tratamento dos sintomas motores, que incluem a levodopa, agonistas dopaminérgicos e inibidores da monoamina oxidase, entre outros (KALIA; LANG, 2015).

A levodopa, primeiro fármaco com eficácia demonstrada na DP (CABREIRA; MASSANO, 2019), é frequentemente combinada com carbidopa, um inibidor de descarboxilase ácida, reduzindo seu metabolismo periférico (JANKOVIC; TAN, 2020; RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019). Embora esta ainda seja a intervenção farmacológica mais comum, o uso de levodopa pode ocasionar náuseas, vômitos, hipotensão ortostática, distúrbios do sono e até alucinações (JANKOVIC; TAN, 2020). Tais reações adversas, em conjunto com a falta de evidências na modificação da progressão da doença, fazem com que o momento de início do tratamento com levodopa deva ser individualizado, com uma análise do

risco-benefício por parte de uma equipe multidisciplinar (CABREIRA; MASSANO, 2019).

Visando alternativas para melhora dos sintomas motores, destaca-se a estimulação cerebral profunda na região do núcleo subtalâmico, com eficácia para estágios intermediários ou avançados da doença, principalmente em casos refratários ao tratamento farmacológico (KALIA; LANG, 2015; RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019). Por outro lado, cirurgias ablativas, como a talamotomia ou a palidotomia, visam a remoção de uma região específica do tecido cerebral, considerada hiper-reativa, com redução dos sintomas motores, com o mínimo possível de alterações em outras funções do organismo (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019). Além disso, o uso de terapias físicas, de linguagem ou ocupacional, se mostram estratégias eficientes na melhora da qualidade de vida dos pacientes, facilitando atividades relacionadas com a marcha em estágios mais avançados da DP (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019).

Por fim, novas estratégias, embora ainda em fase de estudos, visam modificar ou retardar o curso do DP. Entre essas, a reposição de células através de transplantes apresenta resultados promissores, porém variáveis. Li et al. (2016) demonstraram, *post-mortem*, a recuperação da inervação dopaminérgica do putamen 24 anos após o transplante de neurônios dopaminérgicos embrionários, com melhora dos sintomas motores durante a vida do paciente. Por outro lado, Kordower et al. (2017) ao relatarem o caso de uma paciente submetida a um transplante similar, evidenciam também a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos derivados do enxerto, porém sem melhora motora significativa. Adicionalmente, o uso de CTs derivadas de tecido embrionário representa questões éticas importantes, evidenciando a necessidade de estudos relacionados com o uso de linhagens celulares alternativas, bem como dos mecanismos envolvidos neste tipo de terapia (JANKOVIC; TAN, 2020).

2.1.5 Modelos Animais da Doença de Parkinson

O desenvolvimento de estratégias neuroregenerativas ou neuroprotetoras com possível uso na DP, ainda é um desafio a ser enfrentado e, neste sentido, os modelos animais da doença se mostram ferramentas importantes, já que são capazes de mimetizar, com certas limitações, as características da doença, podendo

elucidar mecanismos envolvidos e evidenciar possíveis candidatos ao uso clínico (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019).

Como uma estratégia para mimetizar a DP é possível realizar mutações genéticas sítio-específicas, alterações nos níveis de expressão, nocaute ou expressão transgênica de genes relacionados com esta patologia, mimetizando o fenótipo motor e não motor de pacientes. As proteínas alvo para os modelos genéticos da DP incluem as α -sinucleína, LRRK2 (do inglês *leucine-rich repeat kinase 2*) e Parkin. (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019).

Já os modelos baseados em neurotoxinas incluem o uso de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), 6-OHDA e rotenona.

O MPTP ganhou destaque após o ano de 1983, quando diversas pessoas passaram a exibir sintomas característicos da DP após o consumo de um opióide contaminado com esta toxina (LANGSTON *et al.*, 1983). Sendo lipofílico, o MPTP é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e, ao ser oxidado para MPP^+ , é internalizado pelo transportador de dopamina (DAT), sendo então capaz de inibir os complexos mitocondriais I, III e IV, gerando espécies reativas de oxigênio e a consequente morte dos neurônios dopaminérgicos dos núcleos da base (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019; SALARI; BAGHERI, 2019).

Por outro lado, a rotenona é um composto natural, extraído das raízes de certas plantas, que possui uma alta afinidade pelo complexo mitocondrial I, causando sua inibição e consequente morte neuronal após sua administração oral, subcutânea, intravenosa ou intraperitoneal. O uso de rotenona é capaz de gerar modelos da DP que mimetizam os prejuízos motores, alteração na atividade do proteassoma e presença de inclusões neuronais de α -sinucleína (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019; ZENG; GENG; JIA, 2018)

Já a 6-OHDA é um análogo da DA incapaz de cruzar a barreira hematoencefálica e, portanto, deve ser aplicado localmente através de procedimentos estereotáxicos (SALARI; BAGHERI, 2019). Após ser captada nos terminais pré-sinápticos via DAT, esta toxina leva a produção de radicais livres, incluindo peróxido de hidrogênio, com inibição do complexo mitocondrial I, estresse oxidativo e consequente morte neuronal (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019). Adicionalmente, a 6-OHDA também pode inibir o complexo mitocondrial IV, diminuindo o potencial de membrana da mitocôndria e levando a sua disfunção (PINGALE; GUPTA, 2020; ZENG; GENG; JIA, 2018). Sua administração pode ser

feita de forma bi- ou unilateral, diretamente na SNpc, no ST ou no MFB. Neste último, o uso de 6-OHDA resulta em uma perda de fibras dopaminérgicas que partem da SNpc em direção ao ST, promovendo rigidez muscular e déficits cognitivos (ZENG; GENG; JIA, 2018).

2.2 CÉLULAS-TRONCO

CTs podem ser definidas como uma entidade clonal, com capacidade de autorrenovação e multipotente, e desta maneira, serem capazes de diferenciar-se em linhagens celulares específicas (MELTON; COWEN, 2009). A auto-renovação consiste na geração de células filhas que podem ser definidas como fenocópias da célula original, ou seja, após o processo de mitose, ao menos uma das células resultantes possui a capacidade de autorrenovação e diferenciação. Este processo pode ocorrer de forma simétrica, originando duas CTs, ou assimétrica, com uma CT e uma célula já no início do processo de diferenciação como resultado (NIWA, 2009). A diferenciação, por outro lado, consiste na capacidade das CT's em originar células com potencial mais restrito, ou seja, células diferenciadas (MELTON; COWEN, 2009).

É possível classificar as CTs de acordo com o momento do desenvolvido em que se originam e potência (Figura 2). Quanto a origem, é possível ressaltar dois grandes grupos:

- a) As CTs embrionárias são pluripotentes, derivadas do blastocisto, 5-6 dias após a fertilização, possuem como principais características a autorrenovação, diferenciação em múltiplas linhagens *in vitro* e *in vivo*, clonogenicidade, cariótipo normal e alta proliferação *in vitro* (KOLIOS; MOODLEY, 2013; MELTON; COWEN, 2009).
- b) As CTs adultas, são derivadas do tecido adulto e que, por outro lado, possuem como características principais a autorrenovação e de diferenciação limitada, com propriedades mais específicas, sendo definidas pelo tecido no qual se encontram. Embora com potência reduzida, possuem menos problemas quanto a possível rejeição em casos de transplante. Além disso, devido a suas origens, os questionamentos éticos apresentam-se de maneiras muito mais restritas do ponto de vista de suas utilizações (KOLIOS; MOODLEY, 2013; MELTON; COWEN, 2009).

Já a potência, diz respeito ao número de diferentes linhagens que podem originar-se a partir deste grupo de CTs. CT's totipotentes, sendo às células mais indiferenciadas, são capazes de dividir-se e originar em todas as células do organismo, incluindo os tecidos embrionários e extraembrionários, sendo o principal exemplo desta classe o zigoto (KOLIOS; MOODLEY, 2013). Já as CTs pluripotentes, que incluem as CT's embrionárias, retiradas do embrião antes da sua implantação, são capazes de dar origem a células pertencentes aos três folhetos embrionários, ectoderme, endoderme e mesoderme (KOLIOS; MOODLEY, 2013; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019). As CTs multipotentes, por outro lado, possuem um espectro de diferenciação mais estreito, mas ainda capaz de originar células de linhagens não relacionadas, usualmente vindas do mesmo folheto embrionário, são exemplos dessa classe as CTs mesenquimais e hematopoiéticas (VERFAILLIE; CRABBE, 2009). Com potência reduzida, as CTs oligopotentes diferenciam-se em duas ou mais linhagens celulares do mesmo tecido, como a CT mielóide (KOLIOS; MOODLEY, 2013). E por fim, as CTs unipotentes, como os dermatócitos, muitas vezes chamadas de progenitoras, são caracterizadas por um estreito potencial de diferenciação, com capacidade de originar apenas um tipo celular (KOLIOS; MOODLEY, 2013; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

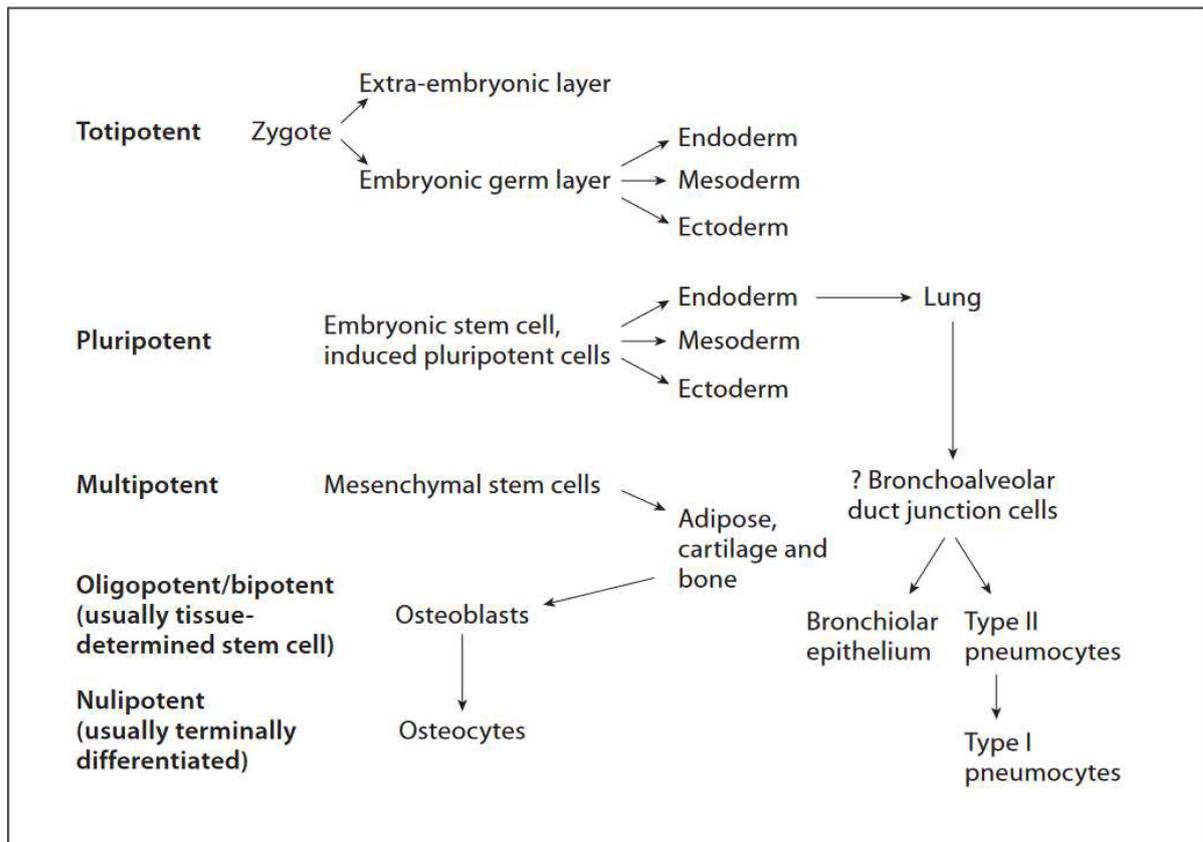


Figura 2. HIERARQUIA DAS CÉLULAS-TRONCO. Células totipotentes formam o tecido embrionário e extraembrionário. Células pluripotentes originam os três folhetos embrionários, enquanto células multipotentes limitam-se a um folheto e oligopotentes a um tecido específico. FONTE: Kolios e Moodley (2013)

2.2.1 Células-tronco mesenquimais

As CTMs são CT's adultas, multipotentes, não-hematopoiéticas que foram isoladas pela primeira vez em 1970 de ossos de porquinho-da-índia (SHARMA *et al.*, 2022). Atualmente as CTMs podem ser isoladas de diversos tecidos, incluindo a medula óssea como principal fonte de obtenção, mas também do fígado, pele, tecido adiposo, pâncreas, placenta, cordão umbilical e polpa dentária (CAPLAN, 2009; SHARMA *et al.*, 2022).

A sociedade internacional de terapia celular define três critérios mínimos para a caracterização das CTMs (DOMINICI *et al.*, 2006). Primeiramente, quando mantidas em condições padrão de cultivo, as CTMs devem se mostrar aderentes ao plástico. Adicionalmente, no mínimo 95% da população deve expressar os antígenos de superfície CD105 (endoglina, uma glicoproteína de membrana tipo I), CD73 (ecto-5'-nucleotidase) e CD90 (Thy-1, envolvida com interações célula-células e

célula-matriz extracelular) medidas por citometria de fluxo (DOMINICI *et al.*, 2006 e LIN *et al.*, 2013). Neste mesmo sentido, no mínimo 98% da população celular não deve ser positiva para os antígenos CD45 (antígeno comum de leucócitos, expresso em todas as células hematopoiéticas nucleadas) (RHEINLÄNDER *et al.*, 2018), CD34 (sialomucina transmembrana envolvida com o processo de adesão), CD14 (marcador de pericito) ou CD11b (integrina associada com adesão de células mieloides) (DENARDO *et al.*, 2021), CD79 α ou CD19 (antígenos marcadores de linfócitos B) e HLA (antígeno leucocitário humano) classe II (UDER *et al.*, 2018). Por fim, as CTMs devem ser capazes de diferenciar-se *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006).

O uso de CTMs vem ganhando destaque nas últimas décadas, já que essas possuem vantagens frente a outras CTs, como menor imunogenicidade, baixo risco de teratoma, além de questionamentos éticos menos extensos. Adicionalmente, CTMs possuem a capacidade de diferenciar-se em tipos celulares não mesenquimais, como células epiteliais, endoteliais e neuronais (GUGLIANDOLO; BRAMANTI; MAZZON, 2017).

2.2.2 Células-tronco da polpa dentária

Embora tradicionalmente as CTMs sejam obtidas da medula óssea, é possível encontrá-las também na polpa dentária, sendo definidas então como DPSC (SHARMA *et al.*, 2022). Identificadas e isoladas pela primeira vez em 2000 por Gronthos e colaboradores (2000) através da digestão enzimática da polpa dentária de terceiros molares, as DPSC destacam-se pela localização perivascular, de fácil acesso cirúrgico, baixo risco ao paciente e custo reduzido, já que podem ser obtidas de dentes que usualmente seriam descartados, dispensando a necessidade de procedimentos cirúrgicos adicionais (ANITUA; TROYA; ZALDUENDO, 2018; ISOBE *et al.*, 2016; YAMADA *et al.*, 2019).

A polpa dentária localiza-se no interior do dente, sendo recoberta pela camada intermediária da dentina e pelo esmalte externo (LUO *et al.*, 2018). É composta por tecido conjuntivo, com a presença de vasos sanguíneos, nervos, células odonto-progenitoras, células imunes e tecido mesenquimal (LUO *et al.*, 2018).

As DPSC são CTs derivadas da ectoderme, que ao migrarem do tubo neural para a região oral, assumem um fenótipo mesenquimal, dessa maneira, são

definidas por alguns autores como ectomesenquimais (ANITUA; TROYA; ZALDUENDO, 2018; SHARMA *et al.*, 2022). Devido à esta origem embrionária privilegiada, as DPSC são capazes de diferenciar-se em células de origem mesenquimal (osteoblastos, condrócitos, adipócitos e miócitos), endodermal (hepatócitos e células endoteliais) e ectodermal (neurônios) (YAMADA *et al.*, 2019).

Neste contexto, as DPSC são boas candidatas a terapia celular aplicada à DP, já que, em condições adequadas, não apenas são capazes de diferenciar-se em neurônios, como o fazem em taxas muito superiores àquelas atingidas por CTMs extraídas da medula óssea (SHARMA *et al.*, 2022). Por fim, as DPSC se mostram capazes de secretar uma série de fatores biológicos envolvidos no crescimento axonal, proliferação e diferenciação celular, sobrevivência e regeneração tecidual, evidenciando seu potencial neurogênico e neuroregenerativo (BARBUTI *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2022). Embora este potencial tenha se demonstrado promissor em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (CHEN, Yong-Ren *et al.*, 2020; GNANASEGARAN; GOVINDASAMY; MANI; *et al.*, 2017; JARMALAVIČIŪTĖ *et al.*, 2015; NESTI *et al.*, 2011; SIMON *et al.*, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018), ainda se fazem necessários estudos sobre os mecanismos pelos quais essas células atuam, bem como informações sobre sua segurança e a definição de protocolos para possíveis ensaios clínicos futuros.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA, ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E INDUÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA

Todas as etapas de coleta, isolamento, caracterização e indução das DPSC foram realizadas nas dependências da PUCPR, através de parceria realizada com o Núcleo de Tecnologia Celular da instituição. O projeto obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (CAAE 28861419.2.0000.0020) e da Universidade Federal do Paraná (CAAE 28861419.2.3001.0102).

Para obtenção das células foram utilizadas cinco amostras de polpa dentária humana, advindas de dentes permanentes. Previamente à coleta, que foi realizada por cirurgião dentista, os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e realizaram enxágue bucal com clorexidina (PerioGard®, Brasil). Os dentes foram então cortados para a exposição da polpa dentária que foi removida com auxílio de lima endodôntica e macerada com bisturi. O macerado derivado foi incubado com solução de colagenase, seguido de filtração e centrifugação. O botão de células foi ressuspensionado e às células resultantes foram cultivadas (37°C; 5% CO₂) em meio Iscove Dulbecco Modificado, suplementado com soro fetal bovino (15%), penicilina e estreptomicina.

Visando a caracterização imunofenotípica das DPSC, foi avaliada a expressão dos marcadores celulares CD29, CD105, CD14, CD73, CD45, CD90, CD19 e CD34, HLA-DR e os marcadores de apoptose e viabilidade Anexina V e 7-Aminoactinomicina D. Para tal, as células foram lavadas com tampão fosfato e incubadas com os anticorpos comerciais correspondentes à marcação de interesse por 30 min em ausência de luz. Posteriormente, após lavagens com o mesmo tampão, as células foram ressuspensionadas e fixadas em solução de formaldeído (1%). Aproximadamente 100.000 células foram submetidas ao citômetro de fluxo FACS Calibur e analisadas por meio do software FlowJo.

Para indução da diferenciação neuronal, após a expansão das DPSC, as células foram replaqueadas em frascos de cultivo previamente recobertos com laminina. Neste momento utilizou-se o meio de cultivo Neurobasal-A suplementado com B-27 e com fatores heregulin- β -1 (PeproTech, USA), glutamina (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (PeproTech, USA).

O procedimento de cultivo (37°C; 5% CO₂) teve duração de 21 dias , com troca do meio realizada duas vezes por semana. A avaliação da diferenciação neuronal foi realizada por imunofluorescência. Para tal, as células foram lavadas com TBS-T: (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20) e bloqueadas com soro de cabra (5% em TBS-T). As amostras foram então incubadas com anticorpo primário anti-βtubulina III (4°C; *over night*) e, após sucessivas lavagens, com anticorpo secundário anti-rato FITC. Após novas lavagens, o núcleo foi corado com DAPI e as lâminas lidas em Microscópio NIKON Eclipse Ni.

3.2 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas, sob aprovação do mesmo (CEUA n° 1372), visando princípios éticos em relação ao uso de animais de experimentação. Para tal foram utilizados ratos Wistar machos, de cerca de 3 meses de idade, pesando entre 280-330g, mantidos em sala com umidade e temperatura controlados (22± 2 ° C), em ciclo claro/escuro de 12/12h, com fornecimento de água e comida *ad libitum*. Toda a manipulação dos animais, testes comportamentais e análise *post mortem* dos tecidos foram realizados no laboratório de neurofisiologia da UFPR.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Experimento 1

O experimento 1 teve como objetivo avaliar a extensão da lesão gerada na SNpc pela injeção de 6-OHDA no MFB dos animais, bem como definir o melhor tempo após a cirurgia para a infusão das DPSC. Para tal, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica no dia 0, quando a neurotoxina foi infundida bilateralmente no MFB. Após 7 e 14 dias, os animais foram eutanasiados e a lesão foi analisada por Imuno histoquímica (IHQ) para tirosina hidroxilase (TH). O delineamento experimental e a divisão dos grupos está representado na figura 3.

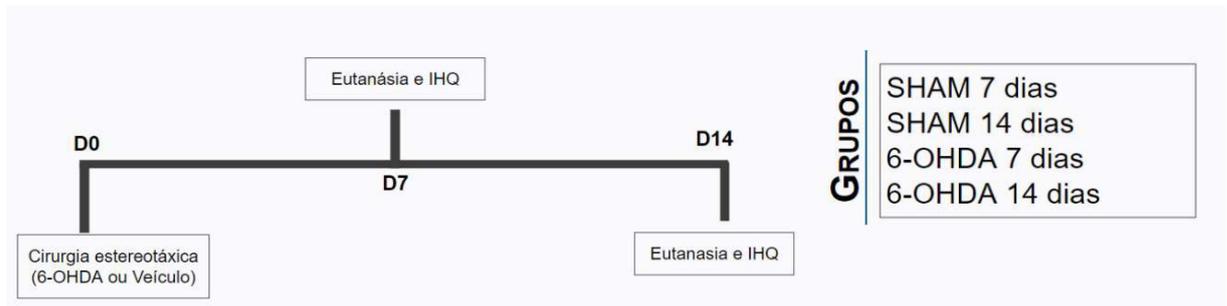


Figura 3. GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTO 1. Após 7 e 14 dias a partir da cirurgia estereotáxica, com infusão de salina ou da neurotoxina 6-OHDA no MFB, os animais foram eutanasiados e a lesão na SNpc foi analisada através de imuno histoquímica (IHQ) para tirosina hidroxilase. FONTE: A Autora (2022).

3.3.2 Experimento 2

Para a realização do experimento 2, no dia -7 os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de 6-OHDA ou solução salina no MFB. Neste mesmo momento foi realizada a fixação da cânula guia na SNpc para posterior infusão das células ou salina.

Seis dias após a cirurgia (dia -1) os animais foram submetidos ao teste de discriminação olfatória. Posteriormente (dia 0), foi realizado o teste de campo aberto e foram infundidas, com auxílio da cânula guia, a suspensão de células não diferenciadas (DPSC), diferenciadas (n-DPSC) ou salina, dando origem a quatro grupos, que são demonstrados na figura abaixo (Figura 4):

1. SHAM
2. 6-OHDA/VEÍCULO
3. 6-OHDA/DPSC
4. 6-OHDA/ n-DPSC

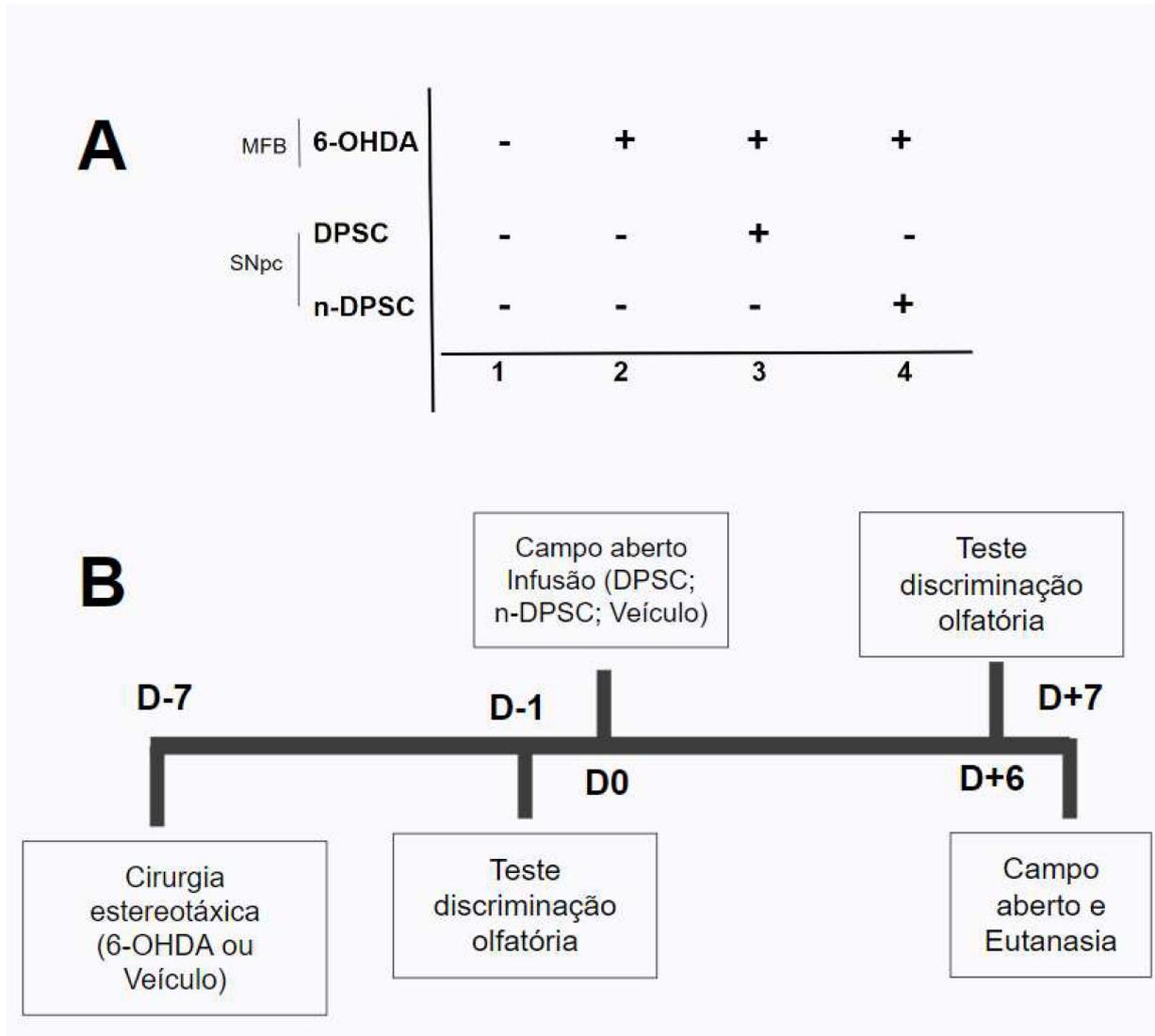


Figura 4. GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTO 2. O painel superior (A) mostra a divisão dos animais em quatro grupos experimentais conforme a infusão de toxina no MFB e das células na SNpc. O delineamento experimental, com duração total de 14 dias, é representado no painel inferior (B). FONTE: A Autora (2022)

Seis dias após a após a infusão na SNpc (dia +6) os animais passaram pelo testes de discriminação olfatória e, no dia seguinte (dia +7), pelo teste de campo aberto e eutanásia.

3.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a realização da cirurgia estereotáxica, os animais foram sedados com xilazina (10mg/kg; Intraperitonealmente- ip) e anestesiados com quetamina (90 mg/kg; ip) e então fixados no estereotáxico. Após a tricotomização do local e incisão

da pele, uma pequena perfuração do crânio foi, permitindo o acesso da agulha. Para a lesão bilateral no MFB as seguintes coordenadas foram utilizadas: (AP)= -2,2 mm; (ML)= \pm 2,0mm; e (DV)= -8,0mm (PAXINOS; WATSON, 2006). A agulha foi então guiada para a região de interesse e a neurotoxina (6-OHDA, 3 μ g; em 1 μ L de solução salina 0,9% NaCl, 0,2% ácido ascórbico) ou veículo (1 μ L de solução salina 0,9% NaCl, 0,2% ácido ascórbico) infundida por bomba eletrônica (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil) em uma taxa de 0,33 μ L/min. Nesta mesma cirurgia também foram implementadas, de forma bilateral, cânulas guia, na SNpc, em ambos os grupos, seguindo as coordenadas: (AP)= -5,0 mm; (ML)= \pm 2,1mm; e (DV)= -8,0mm (PAXINOS; WATSON, 2006). Nestas cânulas, no dia 0, foram infundidas as DPSC, induzidas ou não a diferenciação (100.000 células em 3 μ L de solução salina) ou solução salina (3 μ L), conforme distribuição dos grupos, também na taxa de 0,33 μ L/min.

3.5 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA

Para o teste de discriminação olfatória foi utilizada uma versão modificada por Prediger; Batista e Takahashi (2005) e anteriormente padronizada em nosso laboratório (RODRIGUES *et al.*, 2014). Para tal, os animais foram isolados 48h antes da realização do teste, de forma a gerar um odor familiar (cepilho). Posteriormente, os animais foram colocados, de forma individual, em uma caixa (60 x 40 x 50 cm) preenchida com cepilho, dividida igualmente em dois compartimentos, com livre circulação entre ambos.

Para habituação do animal ao aparato, foi realizada a etapa de treino, onde este é deixado realizar livremente a exploração, durante um período de 2 minutos, com a caixa preenchida apenas com cepilho limpo. Foi realizada então a higienização do aparato, seguida do preenchimento de um compartimento com cepilho limpo (odor não familiar), enquanto o outro compartimento foi preenchido com cepilho derivado do isolamento dos animais (odor familiar). Esta etapa do teste tem duração de 3 minutos, nela o animal é posicionado entre a abertura do aparato e seu tempo de exploração é registrado com o auxílio de uma câmera. Entre cada teste, se faz necessária a troca do papel e do cepilho, evitando alterações comportamentais derivadas à presença do odor de outros animais.

Como controle positivo para prejuízo olfatório, foi incluído um grupo de animais tratados com Zicam[®] Oral Mist intranasal (Matrixx Initiatives, Scottsdale, AZ, EUA), como descrito por Rodrigues, et al. (2014). Para tal, os animais foram sedados com quetamina (90 mg/kg; ip) e xilazina (3 mg/kg; ip) e aproximadamente 30 μ L de Zicam[®] foram lentamente infundidos na cavidade nasal, com auxílio de uma microseringa ligada a uma agulha de calibre 30, conectados por cânula de polietileno. Este processo foi repetido bilateralmente.

3.6 TESTE DE CAMPO ABERTO

O teste de campo aberto foi realizado conforme descrito por Broadhurst (1960) e padronizado por nosso laboratório (KMITA *et al.*, 2019). Para tal os animais foram posicionados no centro de uma arena circular de metal com 1 metro de diâmetro e 50 centímetros de altura e o seu comportamento motor foi gravado através de câmera digital pelo tempo de 5 minutos. Cada animal foi avaliado de forma individual e o aparato limpo com etanol 5% entre cada teste, evitando alterações comportamentais devido a odores deixados pelo sujeito experimental anterior. O tempo de imobilidade (tempo em que o animal não apresenta nenhuma atividade locomotora) e mobilidade dos animais foi analisado de forma manual, em duplicata, tais parâmetros foram utilizados para o cálculo do índice de locomoção (tempo de locomoção - tempo imobilidade x 100).

3.7 TRANSDUÇÃO E LOCALIZAÇÃO DAS DPSC APÓS INFUSÃO

Visando a localização das DPSC pós-infusão, frascos de uma amostra de DPSC foram transduzidas e passaram a expressar o gene da luciferase. Para isto, células 293 foram transfectadas com os vetores pMD2.G, pCMV_dr8.91 e pMSCV_Luc2_T2A utilizando Lipofectamina 2000 e foram mantidas durante três dias em cultura. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado, ultracentrifugado por 28000 rpm por 1 hora e 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado. As DPSC foram transduzidas com o sobrenadante contendo as partículas virais e 10 μ g/ μ l de Brometo de Hexadimetrina. O meio utilizado para a transdução das células foi trocado a cada 24 horas durante três dias. Após este período, foi adicionado às culturas puromicina (10nM), para seleção das células, em uma

concentração final de 10mM. Na sequência foi realizado o teste para comprovar que houve a transdução das DPSC e que a puromicina está selecionando as células que expressam a enzima luciferase.

Para a localização das DPSC e n-DPSC alguns animais receberam células-tronco transduzidas que podem ser acompanhadas no equipamento IVIS Lumina II. A expressão da luciferase foi detectada utilizando o sistema de imagem ótica sensível à bioluminescência IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). O campo máximo de captura do equipamento é de 12,7x12,7cm e os animais foram posicionados de modo a se enquadrar nesta área de captura de imagem.

Após a injeção das DPSC induzidas e não induzidas a diferenciação neuronal, os animais receberam anestesia inalatória com isoflurano (~4%), então foi injetado via IP 150mg/kg de D-luciferina. Após 5 minutos os animais foram posicionados na câmara escura e a imagem foi capturada por uma câmera de alta sensibilidade. Os animais foram submetidos a análise nos seguintes momentos: após a infusão das células, um, dois e seis dias após a infusão.

3.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para realização da IHQ para TH, os animais foram profundamente sedados com xilazina (ip; 10mg/kg) e anestesiados com quetamina (ip;90 mg/kg), sendo então perfundidos, intra-cardiacamente, com solução salina, seguida de solução fixadora de paraformaldeído (4% em PBS 0,1M; pH 7,4). Os encéfalos, imediatamente após a remoção do crânio, foram imersos por 48h em solução fixadora (4°C). Posteriormente, os tecidos foram imersos em solução de sacarose (30% em PBS 0,1M) durante 72h e então, congelados a -80°C até o momento das secções. As secções (40µm) das regiões de interesse são realizadas em criostato e posteriormente submetidas a inibição da peroxidase endógena com H₂O₂ (0,3%; 10 min) e bloqueio com soro de cabra (10 % em PBS; pH 7,4; 10 min). Em seguida, são incubadas com anticorpo anti-TH (Chemicon;CA, EUA; 1:500; em PBS; 0,3% triton x-100) *overnight* a 4°C. Após lavagens sucessivas, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-mouse; 1:200; Vector Laboratories, USA; 2h; Temperatura ambiente). Por fim, após novas lavagens, o complexo formado é localizado através do sistema ABC (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories,

EUA), seguido por reação com 3,3-diaminobenzidina com sulfato de níquel visando o aumento do contraste da reação.

3.9 WESTERN BLOT

Para realização de Western blot, os animais serão eutanasiados por decapitação e as estruturas de interesse serão rapidamente dissecadas e armazenadas (-80°C) até processamento, quando foram homogeneizadas com auxílio de sonificador, em tampão de lise (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 1% TX-100) com inibidor de protease (Pierce protease Inhibitor tablets, #A32963, Pierce, EUA) e de fosfatase (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, 78427, Thermo Fisher, EUA) e então centrifugadas (12.000 rpm; 4°C; 10 min). O sobrenadante resultante foi coletado e as proteínas totais presentes, quantificadas pelo método de Bradford. Posteriormente, cerca de 20 µg de proteínas totais foram diluídas em tampão de amostra (5x; 1,6% SDS; 4% 2-Mercaptoetanol; 8% glicerol; 0,0016% azul de bromofenol; 0,125M Tris-HCl) e então separadas por SDS-page. A transferência das proteínas para membrana de PVDF foi realizada utilizando a seguinte fórmula: 3 mA.cm² de membrana/h transferência, resultando em um total de 150 mA, por 1h, por membrana. Posteriormente a membrana foi incubada com solução de bloqueio (BSA 1% em TBS-T, 1h). Após este procedimento, a membrana incubada com anticorpo primário específico (anti-BDNF, Sigma, SAB2108004, 1:2.000; anti-JUN, Sigma, SAB4300305, 1:2000; anti-GFAP, Sigma, SAB4300647, 1:5.000; anti-DAT, Proteintech, #22524-1-ap, 1:2.200; anti-DARPP p-Thr 34, Cell Signaling, 2304, 1:1.000; anti-DARPP p-Thr 75, Cell Signaling, 2301, 1:1.000; e anti-beta actina, Thermo, AM4302, 1:20.000) diluído em BSA 0,5% em TBS-T, *over night* (4°C). Após consecutivas lavagens com TBS-T, a mesma foi incubada com anticorpo secundário conjugado com HRP apropriado (anti-rabbit HRP, Invitrogen, 31460, 1:25.000; anti-mouse HRP, Chemicon, AP126P; 1h; temperatura ambiente). Por fim, após novas lavagens, o complexo antígeno-anticorpo formado foi revelado com o sistema de detecção ECL (SuperSignal West pico, 34580, Thermo, EUA) com detecção pelo equipamento Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Reino Unido). A análise da densitometria das bandas foi realizada com o software ImageJ, em duplicata.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados obtidos foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados com distribuição normal foram analisados através do software GraphPad Prism, por análise de variância (ANOVA) de uma via, com pós-teste de Tukey ou duas vias, com teste *post hoc* de Bonferroni, conforme os fatores analisados, sendo esses: lesão e infusão no teste de campo aberto; lesão e compartimento no teste de discriminação olfatória e, lesão e tempo na IHQ. Por outro lado, quando reprovados no teste de normalidade, os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post hoc* de Dunn, através do mesmo software. Por fim, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r), para verificar relações entre os parâmetros histológicos e comportamentais. Todos os resultados são apresentados em inglês para padronização e valores foram expressos como média \pm S.E.M.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1

A população de neurônios dopaminérgicos TH imunorreativos (TH-ir) na SNpc 7 e 14 dias após a injeção de 6-OHDA no MFB pode ser observada na figura 5. A neurotoxina promoveu uma redução significativa na densidade de neurônios TH-ir em relação ao grupo Sham, sendo de 35% ($P < 0,05$) em 7 dias e 41% ($P < 0,01$) em 14 dias, demonstrando que o protocolo adotado foi eficiente em produzir uma lesão sustentada, desta população de neurônios dopaminérgicos [$F_{\text{lesão}}(1,13) = 27,6900$, $p = 0.002$]. Por outro lado, não houve diferença entre os grupos 6-OHDA em 7 e 14 dias [$F_{\text{tempo}}(1,13) = 0,3624$, $p = 0.5575$], evidenciado desta forma, a irrelevância do fator tempo, portanto, indicando a constância do padrão da lesão, uma vez que tenha sido induzida [$F_{\text{interação}}(1,13) = 0,4553$, $p = 0.5117$]. Assim, o *time point* de 7 dias foi escolhido para a infusão das DPSC nos experimentos seguintes.

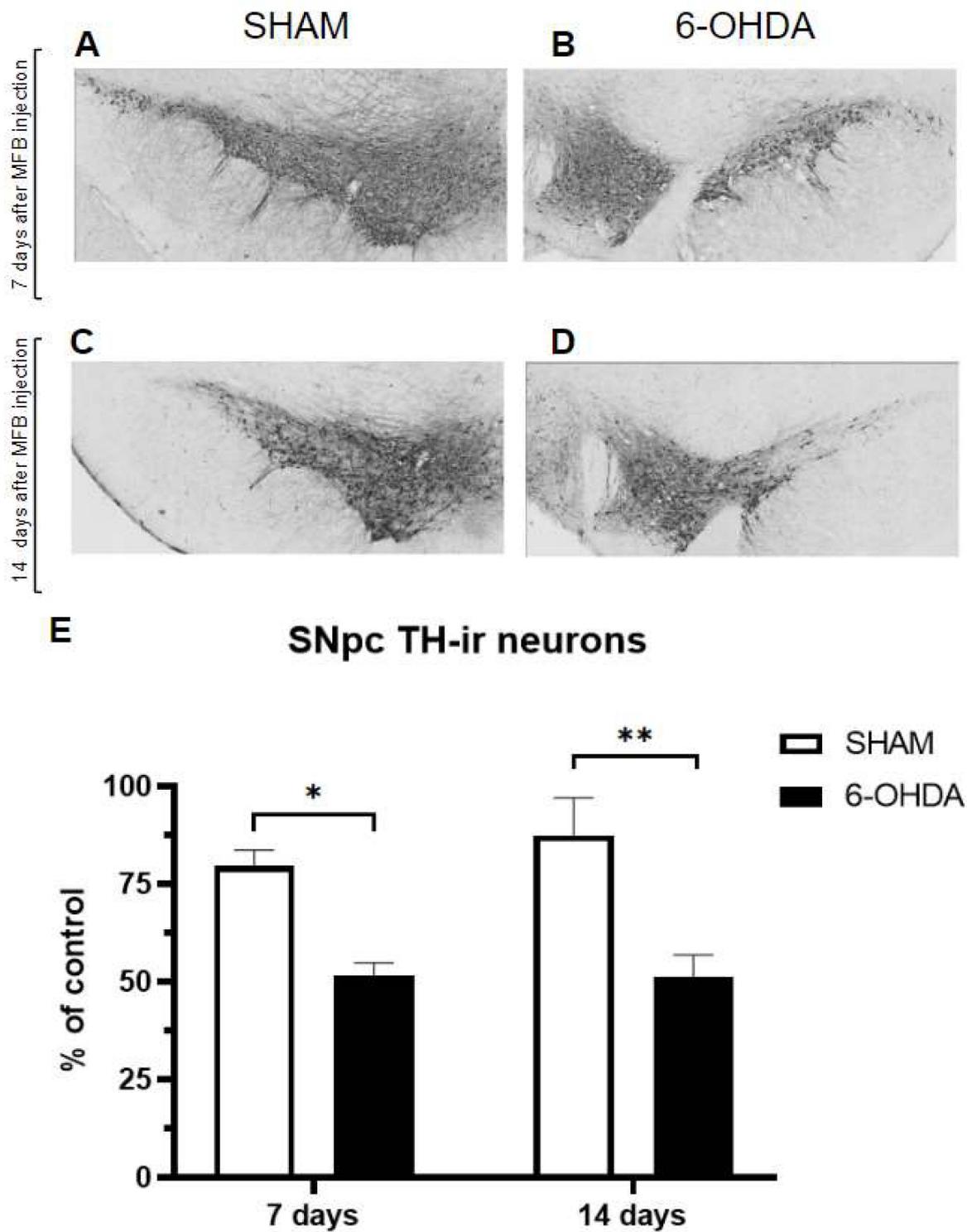


Figura 5. REDUÇÃO DE TH-ir NA SNpc 7 E 14 DIAS APÓS A INFUSÃO DE 6-OHDA. Os painéis A e B mostram imagens representativas da SNpc de animais 7 dias após a infusão de salina e 6-OHDA, respectivamente. Os resultados após 14 dias são representados nos painéis C e D. O painel E mostra a densidade óptica dos neurônios TH-ir para os quatro grupos. n= 4-5; ANOVA de 2 vias e pós-teste de Bonferroni; *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001. FONTE: A Autora (2022)

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 Análise de sobrevivência celular

A sobrevivência das células após a infusão foi analisada através da infusão de uma amostra (n=1) de DPSC previamente transduzidas para expressar a enzima luciferase. Desta maneira foi possível verificar não apenas a localização das células, como também se estas se encontravam metabolicamente ativas. Como esperado, não foi possível observar sinal bioluminescente no grupo Sham e 6-OHDA/veículo, já que estes grupos receberam apenas solução salina no momento da infusão (figura 6). Por outro lado, as células infundidas apresentaram elevados níveis de bioluminescência mesmo seis dias após a lesão, evidenciando que as DPSC e n-DPSC permaneceram viáveis no local de suas infusões.

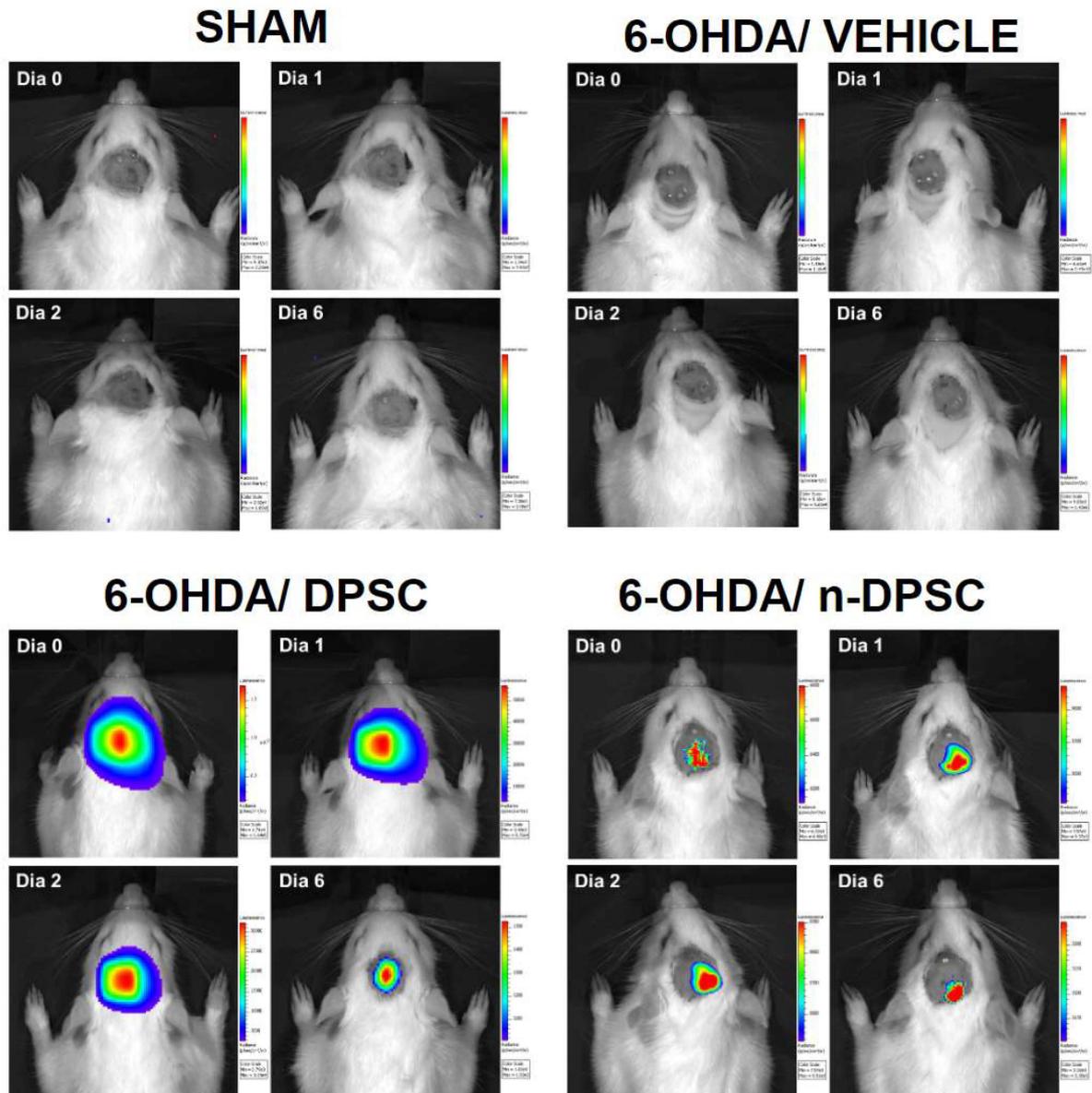


Figura 6. SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS APÓS INFUSÃO. As DPSC induzidas e não induzidas se metabolicamente ativas até 6 dias após a infusão (n=1). FONTE: A Autora (2022)

4.2.2 Campo aberto

A análise do comportamento dos animais foi realizada antes e após a infusão das DPSC e os resultados são apresentados na figura 7. Como esperado, previamente à infusão, todos os grupos tratados com 6-OHDA apresentaram uma redução significativa na porcentagem do índice de locomoção em relação ao grupo Sham ($P < 0,05$) [$F_{\text{lesão}}(3,64)=5,569$; $p=0,0019$]. Após o tratamento com a infusão de células tronco [$F_{\text{infusão}}(1,64)=5,305$; $p=0,0245$], estas reduções foram abolidas nos

grupos 6-OHDA/n-DPSC ($P > 0,9999$) e 6-OHDA/DPSC ($P > 0,9999$). De forma muito relevante, o grupo 6-OHDA/n-DPSC mostrou um aumento significativo ($P < 0,001$) na porcentagem do índice de locomoção, comparado a ele mesmo antes da infusão das células. Desta maneira, é possível perceber que a infusão de DPSC e n-DPSC foi capaz de reverter o prejuízo motor causado por 6-OHDA [$F_{\text{interação}}(3,64)=3,59$; $p=0,0181$].

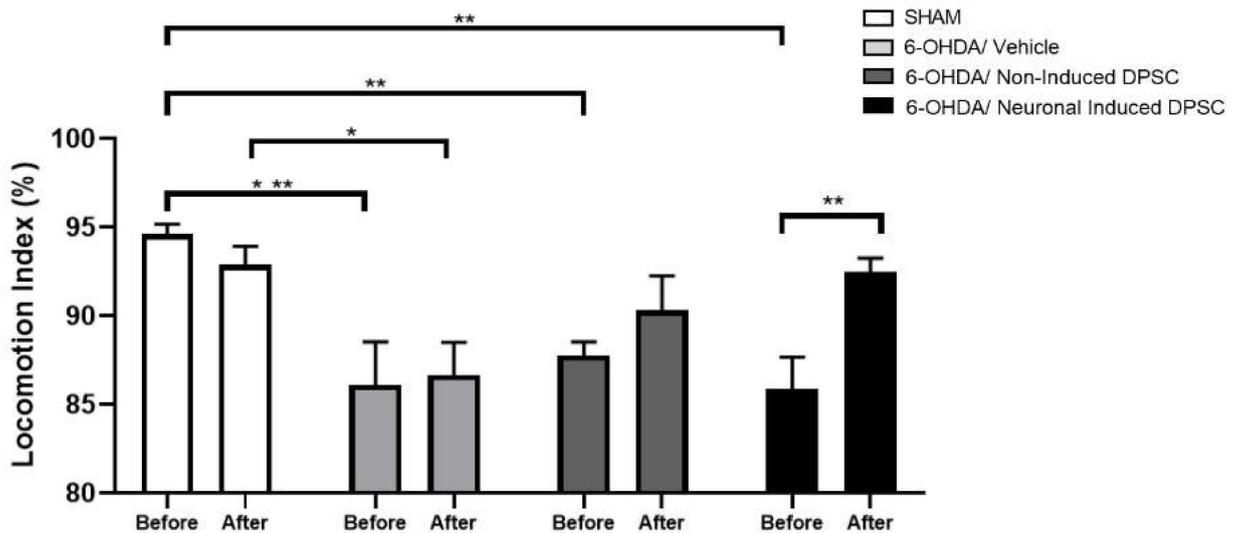


Figura 7. EFEITO DA INFUSÃO DAS DPSC NO COMPORTAMENTO MOTOR. A infusão de DPSC e n-DPSC foi capaz de reverter o prejuízo motor induzido pela toxina 6-OHDA. $n= 11$ n-DPSC e $n=19$ nos demais grupos. ANOVA de 2 vias com medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni; * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. FONTE: A Autora (2022)

4.2.3 Teste de discriminação olfatória

A olfação foi analisada através do teste de discriminação olfatória e os resultados estão apresentados na figura 8. Previamente à infusão das células, como esperado, o grupo Zicam não foi capaz de diferenciar o odor familiar do não familiar ($P > 0,9999$), já que este grupo representa o controle positivo para a anosmia. Ainda que de forma contraintuitiva, tal perfil de exploração foi reproduzido também pelo grupo SHAM ($P = 0,2134$), enquanto todos os grupos que receberam 6-OHDA demonstraram preferência por um dos compartimentos ($P > 0,01$). A análise ANOVA mostrou significância para o fator compartimento [$F_{\text{compartimento}}(1,178) = 36,02$; $p = 0,0024$], mas não para o fator lesão [$F_{\text{lesão}}(4,178) = 0,0026$; $p > 0,9999$], embora haja uma interação significativa entre ambos [$F_{\text{interação}}(4,178) = 4,31$; $p = 0,0024$].

Detectamos que os animais do grupo Sham apresentaram uma preferência de exploração pelo compartimento familiar ($P < 0,05$) [$F_{\text{compartimento}}(1,172) = 54,65$; $p < 0,0001$], ao passo que o grupo tratado com zicam demonstrou o esperado perfil de anosmia ($P = 0,1113$). Além disso, os grupos 6-OHDA/veículo e 6-OHDA/DPSC apresentaram, respectivamente, um aumento significativo ($P < 0,001$) e ($P < 0,001$) de exploração do compartimento com odor familiar. Em contrapartida, o grupo 6-OHDA/n-DPSC não demonstrou uma preferência olfatória por nenhum dos compartimentos ($P = 0,1227$), conforme indicado pelos valores de ANOVA [$F_{\text{lesão}}(4,172) = 0,0028$; $p > 0,9999$] e [$F_{\text{interação}}(4,172) = 1,273$; $p = 0,2827$].

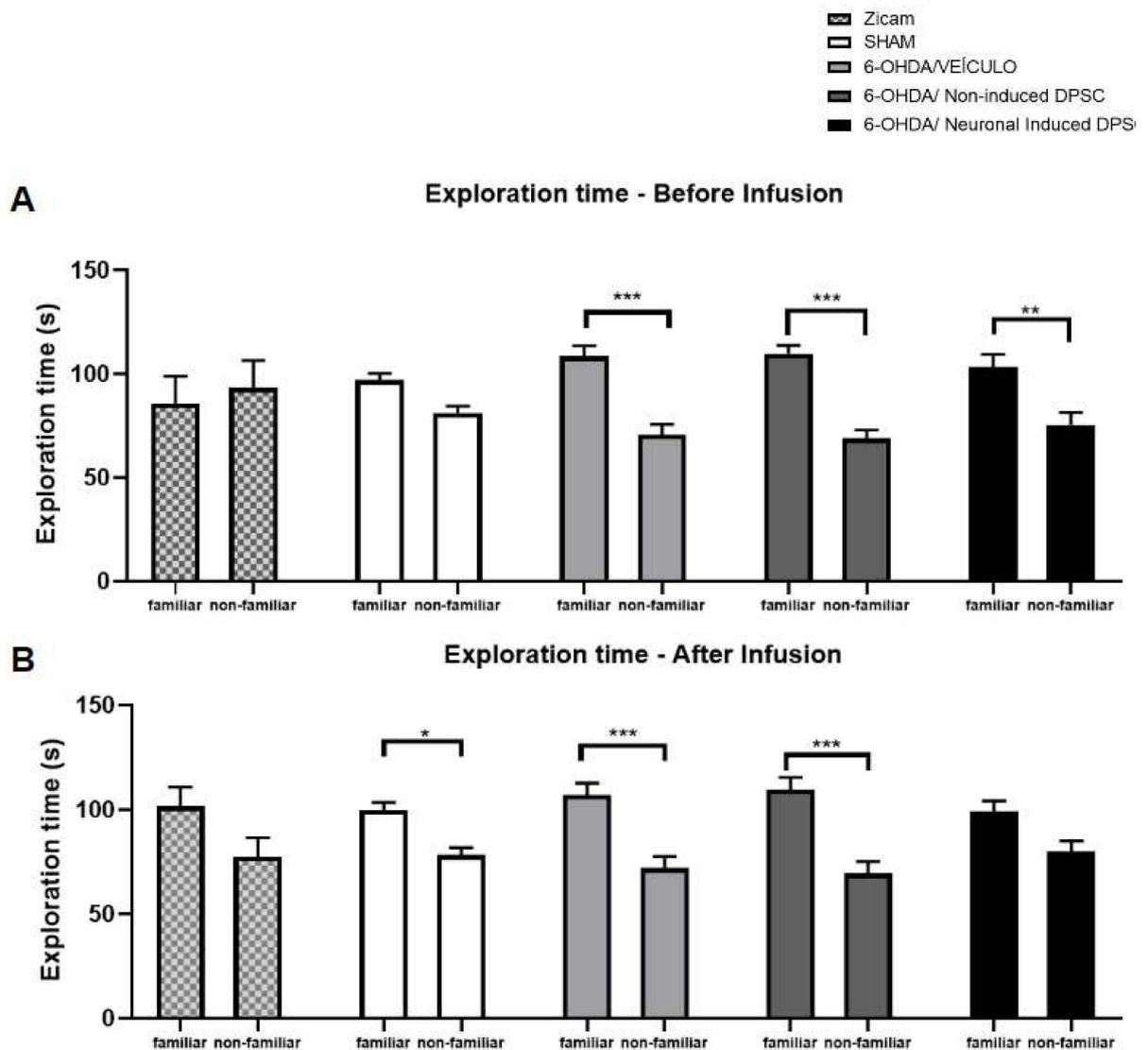


Figura 8. EFEITO DA INFUSÃO DAS DPSC NA OLFAÇÃO. A 6-OHDA não foi capaz de gerar prejuízo olfatório nos animais (A), por outro lado, após a infusão de n-DPSC os animais foram incapazes de diferenciar os odores (B). n= 18-28 por grupo. ANOVA de 2 vias com medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni; *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001. FONTE: A Autora (2022)

4.2.4 Imuno-histoquímica

A IHQ para TH teve como principal objetivo investigar o papel das DPSC sobre a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos na SNPC e os resultados estão sumarizados na figura 9. Como esperado, o grupo sham apresentou os maiores níveis de densidade TH-ir (painel A). Tais níveis foram drasticamente reduzidos ($P < 0,001$) no grupo 6-OHDA/Veículo (painel B). Por outro lado, detectamos um importante aumento significativo na densidade neuronal dopaminérgica dos grupos 6-OHDA/DPSC ($P < 0,01$) e 6-OHDA/n-DPSC ($P < 0,01$),

quando comparados ao grupo 6-OHDA/veículo [$F(3,15)=22,42$; $p < 0,0001$]. Entretanto, é importante salientar que estes aumentos de densidade neuronal foram parciais, à luz da comparação com o grupo sham, que ainda se mostrou como apresentando maior densidade neuronal ($P < 0,01$) e ($P < 0,01$) em comparação à ambos os grupos experimentais.

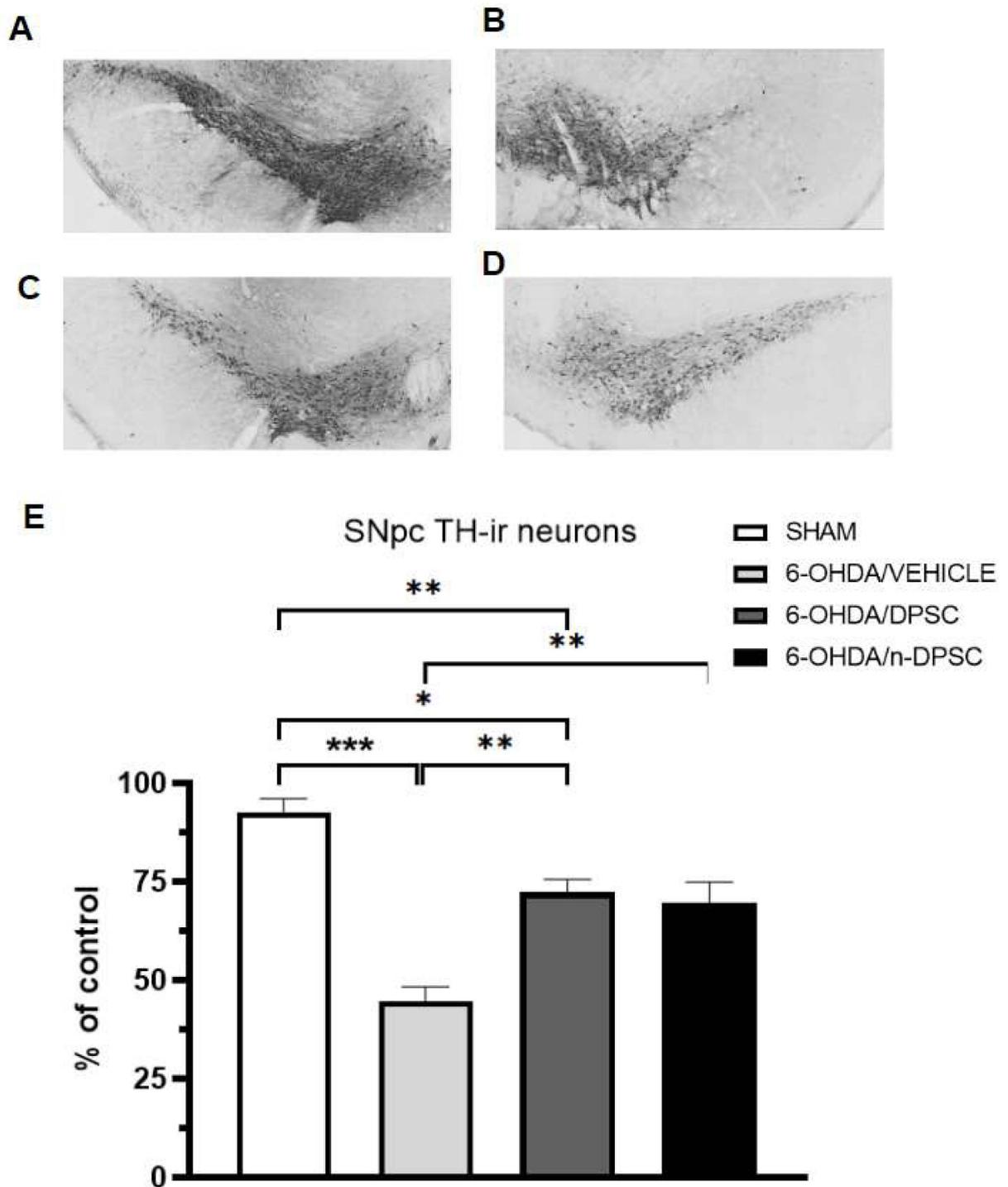


Figura 9. EFEITO DA INFUSÃO DAS DPSC NA SOBREVIVÊNCIA DE NEURÔNIOS TH-ir. A infusão de DPSC e n-DPSC foi capaz de promover a sobrevivência parcial de neurônios TH-ir (painel E) Os painéis A, B, C, D mostram micrografias representativas da SNpc de animais dos grupos sham, 6-OHDA/Veículo, 6-OHDA/ DPSC e 6-OHDA/n-DPSC, respectivamente. n= 4-5 por grupo. ANOVA de 1 via com pós-teste de Tukey.*P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001. FONTE: A Autora (2022)

4.2.5 Correlação Neurônios dopaminérgicos na SNpc e índice de locomoção

Através do teste de correlação de Pearson observou-se uma correlação positiva moderada ($r = 0,62$; $p = 0,006$) entre a densidade de TH-ir na SNpc dos animais e o índice de locomoção pós-infusão dos mesmos (figura 10).

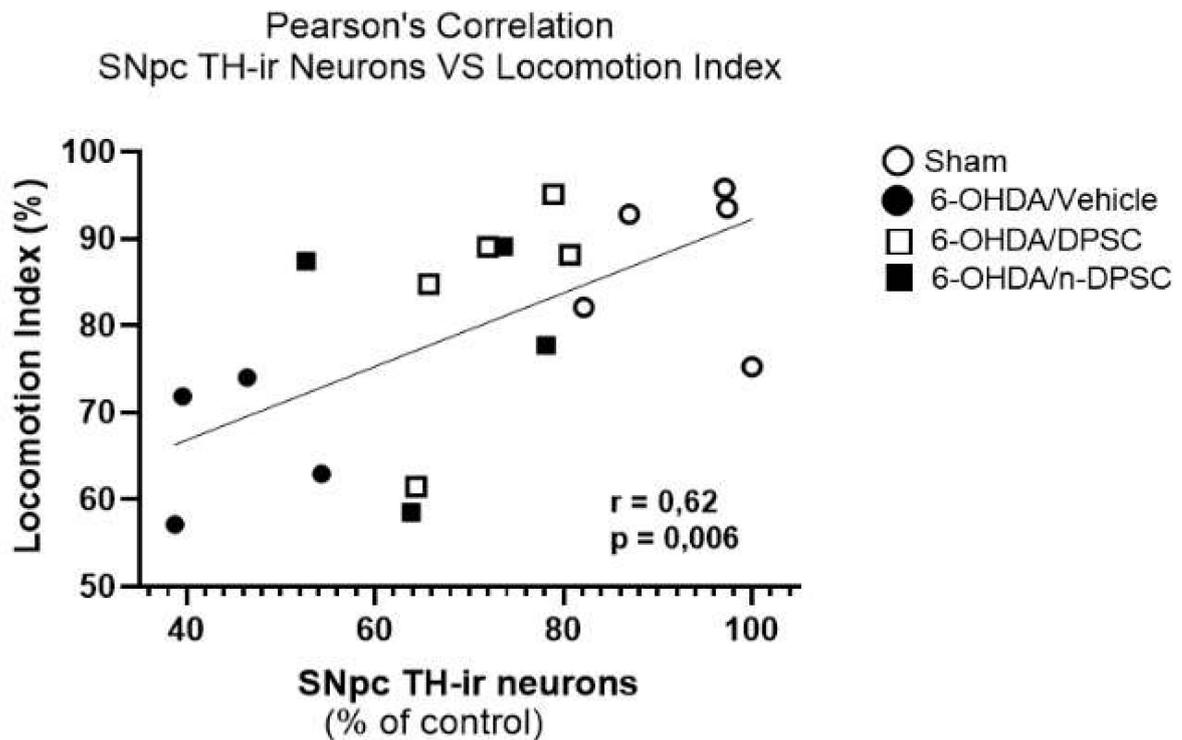


Figura 10. CORRELAÇÃO ENTRE TH-ir NA SNpc E ÍNDICE DE LOCOMOÇÃO. A correlação positiva demonstra que níveis de densidade TH-ir mais elevados correlacionam-se com maiores índices de locomoção. Correlação de Pearson. FONTE: A Autora (2022)

4.2.6 Western blot

4.2.6.1 GFAP

A infusão de 6-OHDA foi capaz de promover um aumento ($P < 0,05$) na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) na SNpc (figura 11, A), mas apenas em relação ao grupo 6-OHDA/n-DPSC [$F(3,23) = 2,973$ $p = 0,0528$]. Por outro lado, ao analisarmos a expressão de GFAP no BO (figura 11, B), detectamos uma elevação ($P < 0,05$) de seus níveis no grupo 6-OHDA/veículo em relação ao grupo SHAM [$F(3,22) = 2,830$ $p = 0,0619$]. Por fim, não foram observadas diferenças significativas

de expressão de GFAP no ST dos diferentes grupos testados (figura 11, C) [F(3,23)=0,8594 $p=0,4761$].

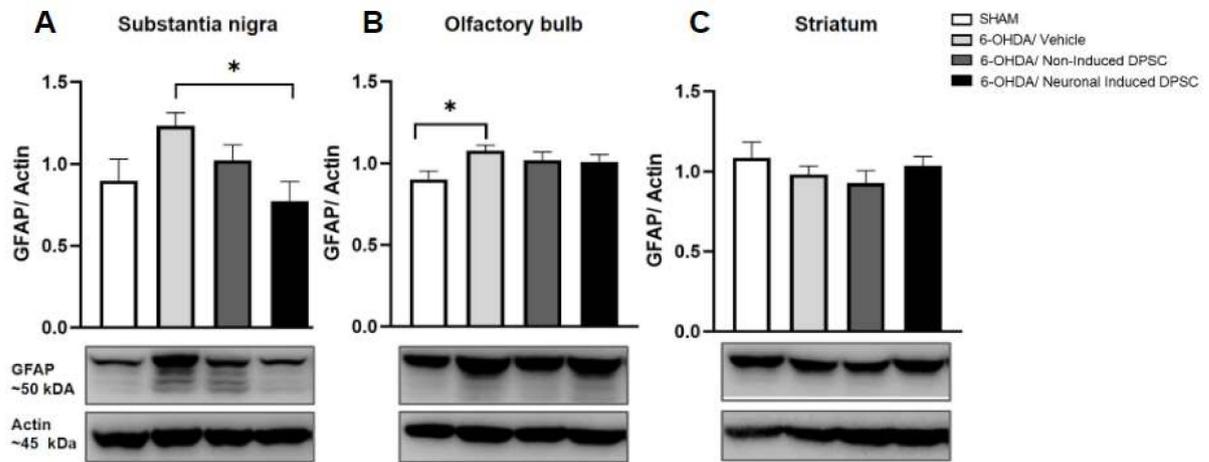


Figura 11. EXPRESSÃO DE GFAP. A injeção de 6-OHDA promoveu o aumento na expressão de GFAP na SNpc (A) e no BO (B) de animais que receberam apenas 6-OHDA e veículo. $n=6-7$ por grupo. ANOVA de 1 via com pós-teste de Tukey. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. FONTE: A Autora (2022)

4.2.6.2 BDNF

Não foram observadas diferenças nos níveis de expressão do fator neurotrófico cerebral (BDNF) na SNpc (figura 12, A) [F(3,24)=0,9718 $p=0,4223$] e no ST (figura 12, C) [F(3,23)=0,4623 $p=0,7113$]. Por outro lado, no BO, observou-se a elevação dos níveis de expressão desta proteína no grupo 6-OHDA/veículo em relação ao grupo sham ($p=0,06$) (figura 12,B), assim como no grupo 6-OHDA/n-DPSC ($P<0,05$) [F(3,21)=4,6350 $p=0,0122$].

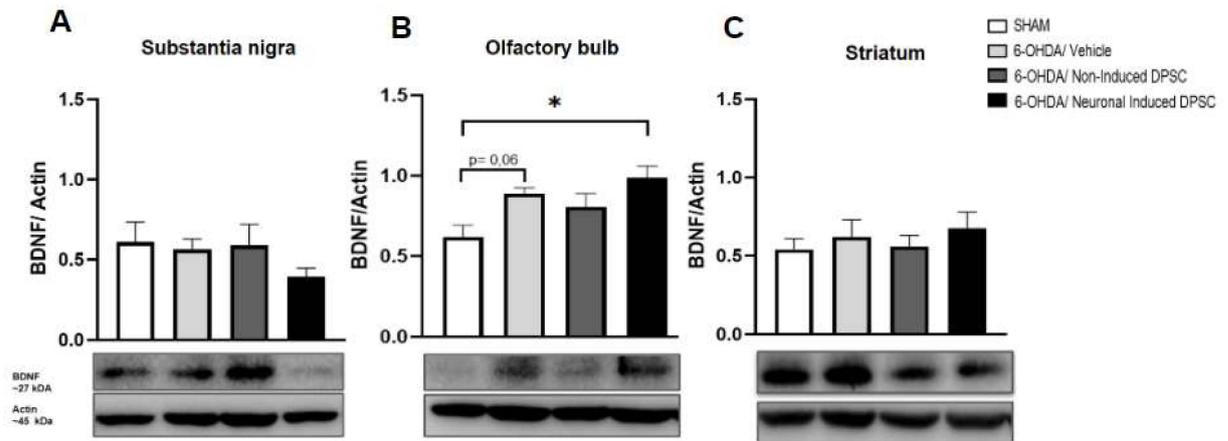


Figura 12. EXPRESSÃO DE BDNF. Aumento significativo nos níveis de expressão de BDNF no BO promovido pela infusão de n-DPSC (B). $n=6-7$ por grupo. ANOVA de 1 via com pós-teste de Tukey. SN: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. FONTE: A Autora (2022)

4.2.6.3 JUN

A infusão de DPSC na SNpc promoveu a redução significativa da expressão de JUN no ST em relação ao grupo sham ($P < 0,05$) [$F(3,21)=3,3180$ $p= 0,0396$] (figura 13, C). Por outro lado, não foi possível observar alterações na expressão dessa proteína na SNpc (figura 13, A) [$F(3,23)=0,5885$ $p= 0,6300$] e no BO (figura 13, B) [$F(3,22)=0,8066$ $p= 0,5037$] dos animais.

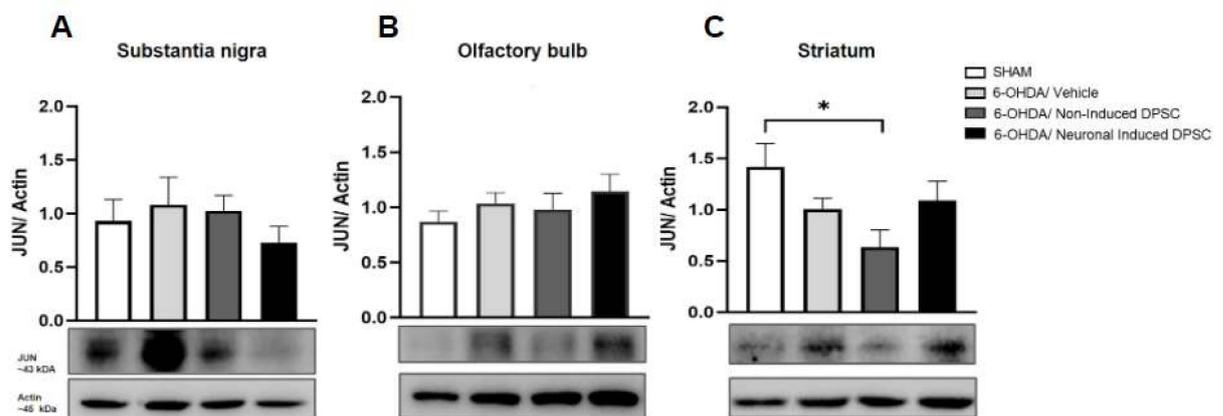


Figura 13. EXPRESSÃO DE JUN. O painel C demonstra um aumento significativo nos níveis de expressão de JUN no corpo estriado dos animais SHAM. $n=6-7$ por grupo. ANOVA de 1 via com pós-teste de Tukey. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. FONTE: A Autora (2022)

4.2.6.4 DAT

A análise dos níveis de DAT foi dividida conforme seu peso molecular e provável modificação pós-traducional de glicosilação. Neste caso, o DAT não glicosilado apresenta-se com peso molecular de aproximadamente 50 kDa, enquanto a forma glicosilada possui cerca de 80 kDa. Adicionalmente, foi realizada a razão entre estas duas formas, visando avaliar a eficiência na recaptação dopaminérgica.

Na figura 14, painéis A, B e C, são representados os dados referentes à expressão de DAT não glicosilado em que é possível se observar um aumento significativo de sua expressão ($P < 0,05$) no BO (figura 14, painel B) de animais do grupo 6-OHDA/DPSC em relação ao grupo sham [$F(3,21)=3,3630$ $p= 0,0380$]. Não foram observadas diferenças quanto a expressão da forma não-glicosilada na SNpc (figura 14, A) [$F(3,24)=0,1894$ $p= 0,9026$] e ST (figura 14, C) [$F(3,23)=0,3156$ $p=0,8140$] dos animais. Já no painel D, evidencia-se o aumento significativo ($P < 0,05$) de expressão da forma glicosilada na SNpc de animais do grupo 6-OHDA/Veículo quando comparados a todos os outros grupos [$F(3,23)=4,0420$ $p= 0,0191$]. Por outro lado, não foram observadas diferenças na expressão dessa forma no BO (figura 14, E) [$F(3,22)=0,2552$ $p= 0,8568$] e ST (figura 14, F) [$F(3,23)=0,0959$ $p= 0,9615$]. Por fim, embora tenhamos detectado as alterações aqui descritas, não houve diferença estatística, nos grupos testados, quanto a razão DAT glicosilado/não glicosilado [SN: $F(3,23)= 0,7283$ $p= 0,5456$; BO: $F(3,22)=2,4130$ $p= 0,0953$ e ST [$H(4) = 1,45$, $P = 0,6900$], conforme sumarizado nos painéis G, H e I.

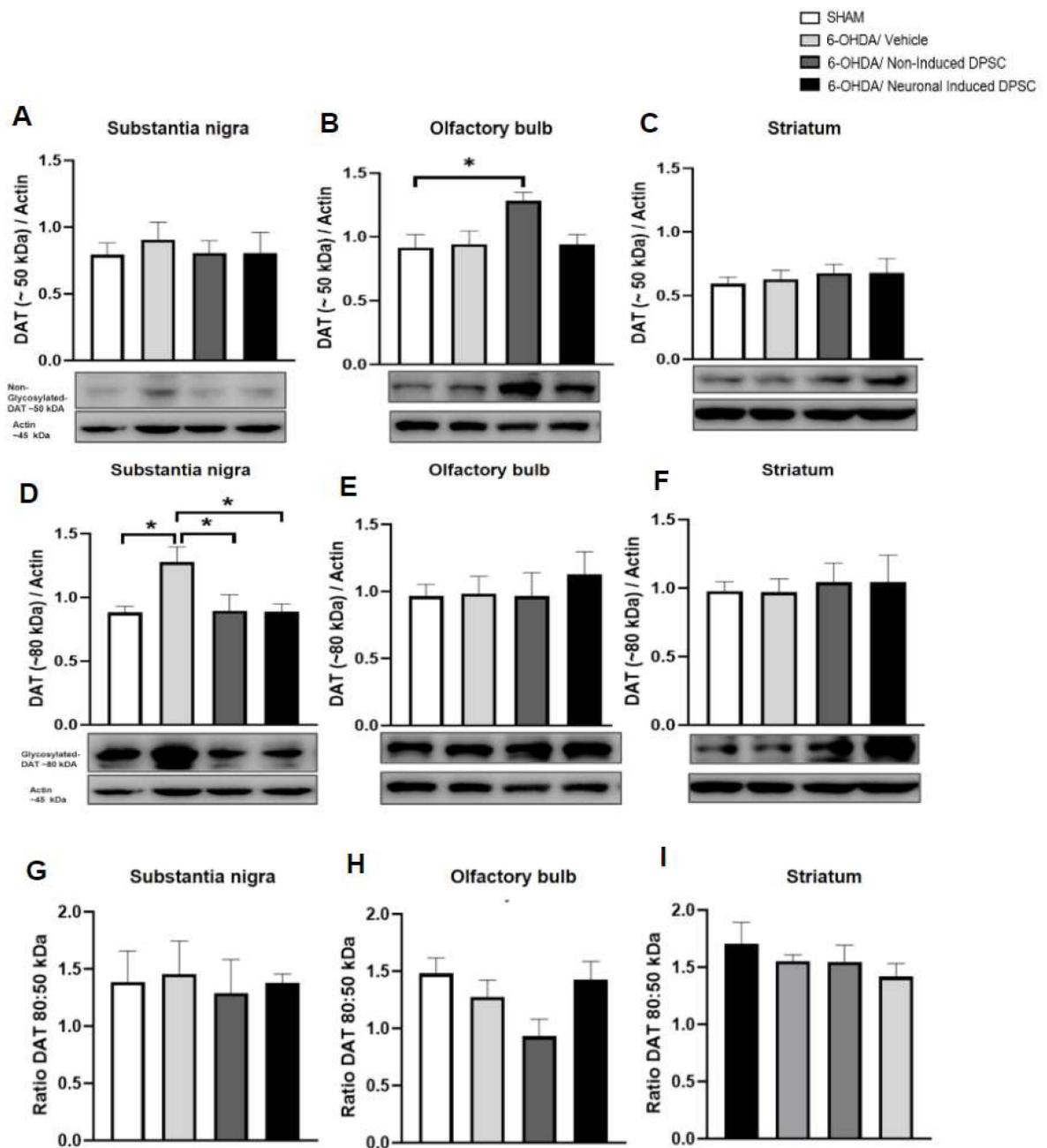


Figura 14. EXPRESSÃO DE DAT GLICOSILADO E NÃO GLICOSILADO. O painel B mostra o aumento nos níveis de expressão de DAT não glicosilado no bulbo olfatório de animais após a infusão de DPSC. No painel D é possível observar o aumento da forma glicosilada na SNpc de animais 6-OHDA/veículo. Não houve diferenças significativas na razão DAT glicosilado : não glicosilado (painéis G, H e I). ANOVA de 1 via com pós-teste de Tukey e Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (Razão DAT 80:50 ST); * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. FONTE: A Autora (2022)

4.2.6.5 DARPP-32

A fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32k Da (DARPP-32) tem sua função alterada conforme seu estado de fosforilação. Na figura 15, painel A, é identificada a ocorrência de uma redução significativa nos níveis de p-Thr 34 DARPP

32 na SNpc de animais do grupo 6-OHDA/n-DPSC em relação aos grupos sham ($P < 0,05$) e 6-OHDA/Veículo ($P < 0,05$), mas não em relação ao grupo 6-OHDA/DPSC [$F(3,24)=4,0700$ $p= 0,0180$]. Não foram observadas diferenças nos níveis de expressão dessa proteína BO (figura 15, B) [$F(3,22)=1,7420$ $p= 0,1876$] e no ST (figura 15, C) [$F(3,23)=1,1670$ $p= 0,3438$] dos animais.

Por outro lado, houve uma redução na forma p-Thr 75 DARPP 32 no ST desse mesmo grupo de animais em relação aos grupos sham ($P < 0,05$), 6-OHDA/Veículo ($P < 0,05$) e 6-OHDA/DPSC ($P < 0,01$) (figura 15, F). Por fim, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão dessa forma na SN (figura 15, D) [SN: $F(3,23)=0,3800$ $p= 0,7663$] e BO (figura 15, E) [$F(3,22)=0,2792$ $p= 0,8398$].

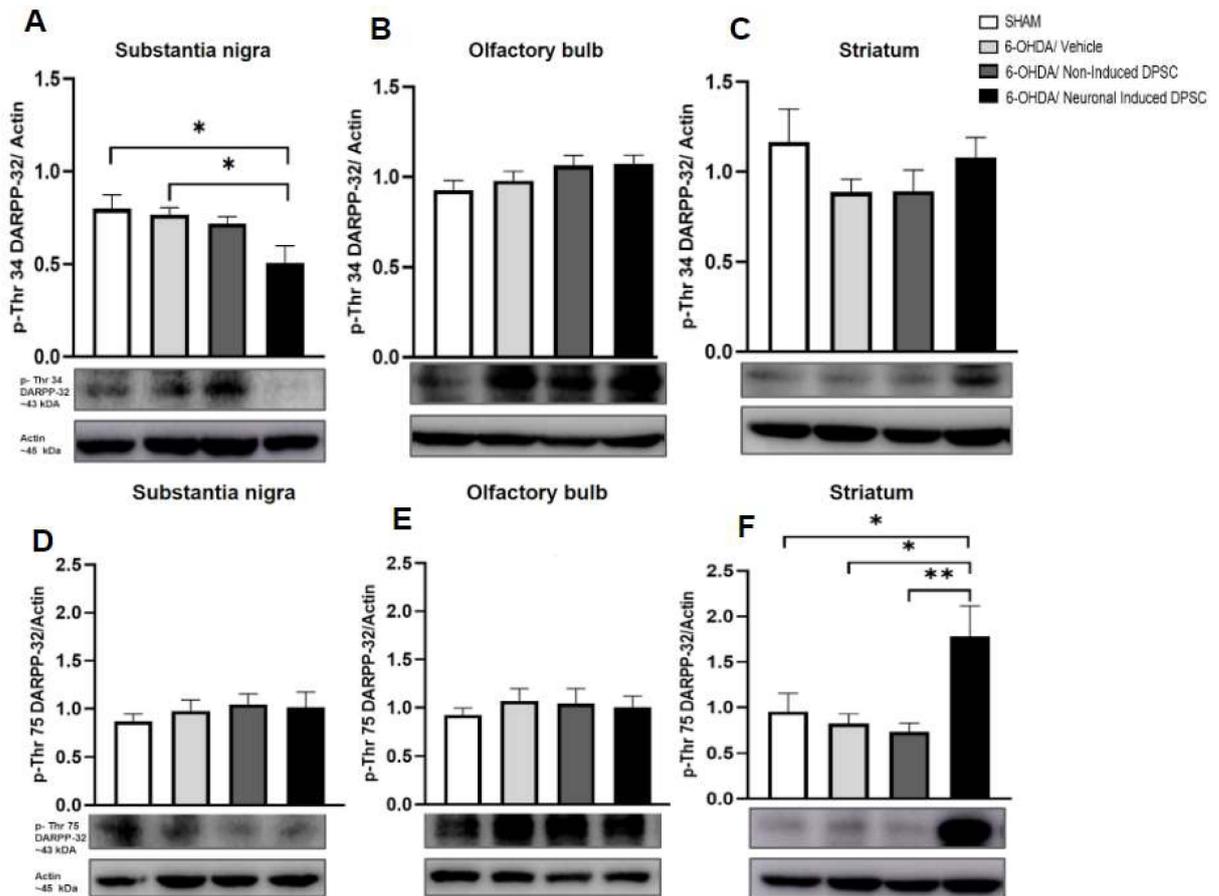


Figura 15. EXPRESSÃO DE DARPP-32 p-THR 34 E p-THR 75. A infusão de n-DPSC foi capaz de promover a redução nos níveis de expressão de DARPP-32 p-Thr 34 na SNpc (A) e aumentar os níveis de DARPP-32 no ST (F). * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. FONTE: A Autora (2022)

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos o uso da neurotoxina 6-OHDA no MFB tem ganhado destaque como modelo animal da DP, sendo capaz de mimetizar manifestações clássicas da doença (ZENG; GENG; JIA, 2018). No presente estudo foi possível observar que, 7 dias após sua infusão no MFB, esta neurotoxina foi capaz de promover a morte de aproximadamente 35% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc em relação ao grupo sham. Esta porcentagem se mostra similar àquela encontrada três semanas após a administração bilateral de 6µg de 6-OHDA feita por Druj et al. (2014), embora neste caso não tenham sido observados prejuízos motores. Em contrapartida, assim como evidenciado em nosso estudo, Ma et al. (2014) observaram este prejuízo 7 dias após a infusão unilateral da toxina.

Os distúrbios não-motores da DP costumam se manifestar anos antes dos sintomas motores (JANKOVIC; TAN, 2020), sendo a olfação talvez a primeira alteração pré-motora a se manifestar (BRAAK *et al.*, 2003). Como já demonstrado por membros de nosso laboratório (ILKIW *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2014), modelos da DP induzidos por 6-OHDA são capazes de mimetizar este prejuízo. Entretanto, no presente trabalho, embora o controle positivo para anosmia (Zicam) tenha se mostrado eficiente, não foi observado prejuízo olfatório decorrente da administração de 6-OHDA, possivelmente ocasionada pelo prejuízo motor apresentado por estes animais ou mesmo por fatores externos à capacidade de discriminação em si. Além do impacto das diferenças interindividuais quanto a preferência pelo compartimento neste tipo de teste, é possível encontrar na literatura uma grande variabilidade quanto ao tempo de habituação precedente ao teste (AURICH *et al.*, 2017; CASTRO *et al.*, 2012; ILKIW *et al.*, 2019; MORAIS *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2014; SINGSAI *et al.*, 2015), podendo afetar diretamente o perfil de exploração dos animais no período de teste. Dessa maneira, se mostra necessária a implementação de adaptações no procedimento adotado, bem como de testes complementares que elucidem a capacidade olfativa dos animais. Apesar disso, outros estudos demonstram que as DPSC são capazes de melhorar este aspecto em modelos animais da doença quando administradas via intranasal (SIMON *et al.*, 2019) e intratecal (GNANASEGARAN; GOVINDASAMY; SIMON; *et al.*, 2017).

As manifestações motoras da DP são consideradas clássicas (KALIA; LANG, 2015) e podem ser mimetizadas através do uso de modelos animais induzidos por neurotoxinas como a 6-OHDA (ZENG; GENG; JIA, 2018). No presente estudo, estas manifestações foram demonstradas através da redução, em relação ao grupo sham, do índice de locomoção dos animais 7 dias após a administração de 6-OHDA. Entretanto, após a infusão das DPSC diferenciadas e não diferenciadas demonstrou-se um impacto positivo no prejuízo motor gerado pela neurotoxina, através da reversão do índice de locomoção para níveis estatisticamente indiferenciáveis do grupo sham. Este potencial de restabelecimento motor foi demonstrado anteriormente na literatura através da infusão das DPSC indiferenciadas em modelo da DP induzido por MPTP (GNANASEGARAN; GOVINDASAMY; SIMON; *et al.*, 2017), n-DPSC e DPSC em modelo unilateral induzido por 6-OHDA (FUJII *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018) e até mesmo pela administração do meio condicionado destas células em modelo induzido por rotenona (CHEN, Yong-Ren *et al.*, 2020).

As manifestações motoras da DP relacionam-se diretamente com a característica morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, tornando-se evidentes quando há uma perda de 50-70% destes (SIMON *et al.*, 2019). No presente trabalho, esta redução nos níveis de neurônios TH-ir na SNpc atingiu níveis próximos a 52 % no grupo 6-OHDA/veículo. Por outro lado, a infusão de DPSC, de forma independente ao seu estado de diferenciação, foi capaz de promover a sobrevivência destes neurônios. Resultado muito próximo ao encontrado por Fujii *et al.* (2015), em que embora as n-DPSC se mostraram mais eficientes na recuperação dos níveis de DA, foram similares às DPSC quanto à recuperação dos neurônios TH-ir. Esta similaridade pode estar relacionada à já relatada possibilidade de diferenciação *in loco*, em neurônios, das células enxertadas, incluindo neurônios dopaminérgicos (ZHANG *et al.*, 2018). Além disso, foi possível detectar uma correlação estatística positiva entre os níveis de TH-ir na SNpc e o índice de locomoção, evidenciando o papel destes neurônios no comportamento motor, resultado similar ao encontrado por (GNANASEGARAN; GOVINDASAMY; SIMON; *et al.*, 2017). Os achados imuno-histoquímicos são corroborados pela análise de sobrevivência celular, que demonstra não só a localização dos enxertos, como também o fato de que estas células se encontram metabolicamente ativas.

Como revisado por Xiao et al. (2017) , Luo et al. (LUO *et al.*, 2018), Yamada et al. (2019) e Sharma et al. (SHARMA *et al.*, 2022) inúmeros são os mecanismos envolvidos na sobrevivência neuronal e melhora dos sintomas motores proporcionados pelas DPSC. Visando identificar alguns destes possíveis mecanismos, a análise da expressão de algumas proteínas relevantes ao funcionamento do sistema dopaminérgico foi realizada.

A neuroinflamação representa uma complexa e dinâmica resposta na etiologia da DP (KALIA; LANG, 2015). Uma resposta clássica a injúrias no sistema nervoso central é a ativação dos astrócitos, que assumem, como mecanismo de defesa, um perfil de hipertrofia e aumento na expressão de filamentos intermediários, como a GFAP (CALÌ *et al.*, 2016; SHAN; LONG; QIU, 2018). Neste trabalho mostrou-se a elevação dos níveis de GFAP não apenas na SNpc de animais que receberam 6-OHDA, como também no BO dos mesmos, sendo superior àquela encontrada nos grupos que receberam as n-DPSC. Em concordância com nossos resultados, outros estudos na literatura também demonstram elevados níveis de astrogliose no bulbo olfatório em modelos animais (FLORES-CUADRADO *et al.*, 2019) e pacientes com DP (FLORES-CUADRADO *et al.*, 2021). Já o papel das CTM na modulação dos níveis de expressão de GFAP também foi evidenciada por Meligy et al. (2019), que ao administrar CTM derivadas de tecido adiposo em modelo da DP induzido por rotenona, demonstrou que essas são capazes de reduzir a expressão desta proteína quando comparada ao grupo veículo. Adicionalmente, Gnanasegaran et al (2017) demonstrou, em um estudo *in vitro*, que a exposição à toxina MPTP leva ao aumento da ativação microglial e consequente aumento de fatores pró-inflamatórios, que são modulados quando em co-cultura com DPSC. Estudos demonstram que a ativação da micróglia costuma preceder a astrogliose (NA *et al.*, 2010), com evidência de ocorrência na SNpc e ST de pacientes com PD (BRAAK; SASTRE; DEL TREDICI, 2007) e em modelos animais (GU *et al.*, 2010). Embora usualmente os astrócitos exerçam funções importantes no suporte metabólico, reparo tecidual e manutenção da permeabilidade da Barreira hematoencefálica e fluxo sanguíneo, (MESSING; BRENNER, 2020; PAJARES *et al.*, 2020) sua morfologia e expressão gênica é alterada quando esses passam pelo processo de ativação, podendo levar a secreção de fatores neurotróficos que promovem a morte de neurônios e oligodendrócitos (PAJARES *et al.*, 2020). Adicionalmente, níveis elevados de diferentes isoformas de GFAP podem ser associados com o

comprometimento da função astrocitária e indução da agregação de proteínas (LIN *et al.*, 2021).

Outro fator relevante a ser considerado é o potencial das DPSC na modulação de fatores neurotróficos. O BDNF é uma neurotrofina crucial para a sobrevivência, sinalização e plasticidade celular, também sendo associada com a função emocional e cognitiva (RANA *et al.*, 2021). Nesti *et al.* (2011), em um estudo *in vitro*, evidenciou o papel do BDNF no efeito neuroprotetor das DPSC, já que o bloqueio deste fator neurotrófico extinguiu tais efeitos. No presente trabalho, observou-se que os maiores níveis de BDNF no BO gerados pela infusão de 6-OHDA, não foram revertidos pela infusão de n-DPSC, mas mantiveram-se reduzidos no grupo 6-OHDA/DPSC. Tais resultados vão em concordância com aqueles encontrados por Deng *et al.* (2021) e podem ser explicados pelo fato de que, ao serem submetidas ao processo de diferenciação, as n-DPSC passam a expressar não somente maiores níveis de BDNF, como também de GDNF e HGF (FUJII *et al.*, 2015). Embora nossos resultados não demonstrem alterações significativas nos níveis dessa proteína na SNpc e ST, outros estudos relatam tanto a elevação de BDNF (LANGLEY *et al.*, 2021), como sua redução (CAMPÊLO *et al.*, 2017; JANAKIRAMAN *et al.*, 2017) no ST, tal discrepância ressalta a necessidade de mais estudos quanto ao papel desta neurotrofina em diferentes estruturas encefálicas relacionadas com a DP .

Por outro lado, a proteína JUN, é um proto-oncogene, parte da superfamília da proteína ativadora 1 (AP-1). O complexo AP-1 atua diretamente na transcrição proteica e, usualmente, é formado por homodímeros das proteínas da família JUN ou heterodímeros JUN-FOS (PAPAVASSILIOU; MUSTI, 2020). Quando formados, estes dímeros estão envolvidos nos processos de proliferação, diferenciação, migração, inflamação e apoptose. Entretanto, suas funções exatas podem variar conforme seus estados de modificação pós-traducional e formação do dímero (PAPAVASSILIOU; MUSTI, 2020; TSIAMBAS *et al.*, 2020). Nossos resultados demonstram uma redução significativa nos níveis de JUN no ST dos animais após a infusão de DPSC. Tal resultado se mostra promissor, visto que estudos prévios demonstram uma elevação na expressão de JUN em neurônios dopaminérgicos pigmentados em tecido *post mortem* de pacientes com PD (HUNOT *et al.*, 2004), sugerindo seu possível envolvimento com a patogênese da doença. Adicionalmente, evidências demonstram que a ativação desta proteína através da sua fosforilação, está relacionada com a morte neuronal em modelos da doença de Alzheimer

(OKAZAWA; ESTUS, 2002) e da DP induzido por MPTP (HU *et al.*, 2019) e 6-OHDA (CHEN, X. Y. *et al.*, 2007). Por outro lado, YUAN *et al.*, (2009) relata que a proteína JUN pode ter papéis opostos na mediação da morte neuronal conforme sua composição dimérica. Neste contexto, a indução da apoptose neuronal estaria envolvida com uma elevação nos níveis do heterodímero c-JUN/ATF2 e uma redução da expressão de c-FOS (YUAN *et al.*, 2009). Dessa maneira, uma análise mais aprofundada, incluindo outros componentes do complexo AP-1, bem como seu estado de fosforilação, seria fundamental para elucidar o papel das DPSC na expressão destas proteínas.

Por fim, a análise das proteínas DAT e DARPP-32 é capaz de evidenciar alguns aspectos da influência da infusão das DPSC na atividade dopaminérgica. A proteína de membrana DAT atua como modulador dos níveis de DA através do seu transporte do espaço extracelular para o interior do neurônio (JAYARAMAYYA *et al.*, 2020). O seu estado de glicosilação é capaz de alterar a estabilidade do transportador na membrana, bem como na eficiência da recaptação de DA. A remoção dos sítios de glicosilação impacta diretamente no peso molecular do DAT, resultando em uma proteína de aproximadamente 50 kDa, contra aproximadamente 80 kDa da proteína glicosilada (LI *et al.*, 2004). Embora estudos relatem uma depleção nos níveis de DAT associados com a DP (BRÜCKE; BRÜCKE, 2022; IKEDA *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2020; PALERMO; CERAVOLO, 2019), no presente trabalho observou-se uma elevação nos níveis de expressão de DAT glicosilado na SN decorrente da administração da neurotoxina 6-OHDA. Tal aumento dos níveis de glicosilação pode ser relacionado com um mecanismo compensatório, visando uma reciclagem da DA disponível, possivelmente reduzida devido à morte dos neurônios dopaminérgicos da região, um padrão já previamente relatado na literatura por Churchill *et al.* (2017), Sconce *et al.* (2015) e Xu *et al.* (2019).

Por outro lado, nossos resultados também demonstram uma elevação dos níveis de DAT não glicosilado no BO dos animais após a infusão das DPSC. Tillerson *et al.* (2006) demonstra que o nocaute desses transportadores é suficiente para gerar distúrbios olfatórios em camundongos, visto que o bulbo olfatório, em sua camada glomerular, possui uma população de neurônios dopaminérgicos conhecidos como interneurônios, que são responsáveis por desempenhar uma ação inibitória sobre os neurônios receptores olfatórios e células mitrales e tufoas (BRUNERT; ROTHERMEL, 2021; MUNDIÑANO *et al.*, 2011). Em modelos animais

da DP, estes neurônios encontram-se elevados e possivelmente, envolvidos com os distúrbios olfatórios encontrados na doença (ILKIW *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2014), porém ainda são necessários estudos aprofundando o papel da glicosilação de DAT no contexto da DP.

Por outro lado, a infusão de n-DPSC proporcionou alterações significativas na expressão da proteína DARPP-32. Esta proteína desempenha um papel dual na sinalização dopaminérgica, variando conforme seu estado de fosforilação. (NISHI *et al.*, 2000). Enquanto desempenha seu papel através de receptores D1, a DA promove a ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e a cascata mediada por esta. Entre outros pontos importantes, a PKA é capaz de promover a fosforilação da Treonina 34 presente na proteína DARPP-32, que então atua como um potente inibidor da fosfatase 1, prevenindo a desfosforilação de proteínas envolvidas na cascata de sinalização da PKA e amplificando seus efeitos. De forma antagônica, a DARPP-32 pode ser fosforilada na treonina 75 pela quinase dependente de ciclina 5 (CDK5). Quando isto ocorre, a DARPP-32 passa a ter efeitos inibitórios na cascata gerada pela PKA (GIRAULT; GREENGARD, 2004; NISHI *et al.*, 2000; WALAAS *et al.*, 2011). Aqui encontramos uma redução de p-Thr 34 DARPP-32 na SNpc e um aumento de p-Thr 75 DARPP-23 no ST de animais submetidos a infusão de n-DPSC. Em conjunto, estes resultados podem ser relacionados com redução da atividade excitatória da SNpc e um aumento da inibição da atividade estriatal. Estudos demonstram uma grande capacidade adaptativa nos níveis de fosforilação desta proteína frente a injúrias, com elevação nos níveis de p-Thr 75 DARPP-32 no ST após o uso de neurotoxinas como a 6-OHDA (YUSTE *et al.*, 2012) e o MPTP (YABUKI *et al.*, 2014) e frente a depleção dos níveis de dopamina (BROWN; DEUTCH; COLBRAN, 2005), porém com alterações variáveis quanto aos níveis de p-Thr 34 DARPP-32 e níveis totais de DARPP-32. Dessa forma, os resultados aqui encontrados podem representar uma resposta adaptativa do sistema dopaminérgico frente a infusão das DPSC diferenciadas em neurônios. Embora esta adaptação não tenha impactado no resgate do prejuízo motor induzido pela neurotoxina ou na recuperação dos níveis TH-ir na SNpc deste grupo, ainda se faz necessária uma melhor exploração dos demais componentes envolvidos nesta cascata de sinalização, visando explorar melhor esse possível ponto limitante do uso das DPSC.

Em síntese, nossos dados demonstram que a infusão de DPSC, mas não de n-DPSC em modelo animal da DP é capaz de evitar o prejuízo olfatório, enquanto ambas, independente do seu estado de diferenciação, promovem melhorias no déficit motor dos animais, bem como a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos na SNpc e podem impactar na expressão de diversas proteínas envolvidas no metabolismo dessas células.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo buscou avaliar os efeitos da infusão de células-tronco derivadas da polpa dentária, induzidas e não induzidas à diferenciação em neurônios, em modelo animal da DP induzido por 6-OHDA. Primeiramente, observou-se que a infusão de 6-OHDA no MFB é capaz de promover uma lesão retrógrada com morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc que se mantém estável 7 e 14 dias após sua indução. Também foi possível observar que o modelo animal utilizado foi capaz de mimetizar as clássicas manifestações motoras da DP, porém não produziu prejuízo olfatório nos animais. Adicionalmente, observa-se que a intervenção com DPSC se mostrou eficiente na redução dos prejuízos motores induzidos pela toxina, com uma sobrevivência do enxerto ao longo dos dias e redução parcial da morte dos neurônios TH-ir na SNpc, com uma correlação positiva entre estes dois parâmetros. Além disso, as DPSC mostraram-se capazes de interferir na expressão de diversas proteínas relacionadas com a sinalização dopaminérgica, sobrevivência, plasticidade e regeneração celular.

Por fim, em estudos futuros, espera-se investigar com mais detalhes os mecanismos moleculares por quais as DPSC exercem seus efeitos, analisar o impacto destas células diretamente nos níveis de dopamina e testar novas estratégias de administração destas, visando uma maior possibilidade de uso clínico futuro.

REFERÊNCIAS

- ANITUA, E.; TROYA, M.; ZALDUENDO, M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. **Cytotherapy**, v. 20, n. 4, p. 479–498, abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.12.011>.
- AURICH, M. F.; RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S.; NOSEDA, A. C. D.; CUNHA, F. D. W.; LIMA, M. M. S. Olfactory impairment is related to REM sleep deprivation in rotenone model of Parkinson's disease. **Sleep Science**, v. 10, n. 1, p. 47–54, 2017. DOI 10.5935/1984-0063.20170008. Disponível em: <http://www.sleepscience.org.br/details/405/en-US/olfactory-impairment-is-related-to-em-sleep-deprivation-in-rotenone-model-of-parkinson-s-disease>. Acesso em: 18 ago. 2022.
- BARBUTI, P. A.; BARKER, R. A.; BRUNDIN, P.; PRZEDBORSKI, S.; PAPA, S. M.; KALIA, L. V.; MOCHIZUKI, H.; MDS SCIENTIFIC ISSUES COMMITTEE. Recent Advances in the Development of Stem-Cell-Derived Dopaminergic Neuronal Transplant Therapies for Parkinson's Disease. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 36, n. 8, p. 1772–1780, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.28628>. Acesso em: 18 ago. 2022.
- BOVOLENTA, T. M.; FELICIO, A. C. How do demographic transitions and public health policies affect patients with Parkinson's disease in Brazil? **Clinical Interventions in Aging**, v. 12, p. 197–205, 25 jan. 2017. DOI 10.2147/CIA.S123029. Disponível em: <https://www.dovepress.com/how-do-demographic-transitions-and-public-health-policies-affect-patients-peer-reviewed-fulltext-article-CIA>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- BRAAK, H.; SASTRE, M.; DEL TREDICI, K. Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 3, p. 231–241, set. 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0244-3>>. Acesso em: 18 ago. 2022.
- BRAAK, H.; TREDICI, K. D.; RÜB, U.; DE VOS, R. A. I.; JANSEN STEUR, E. N. H.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 1 mar. 2003. DOI 10.1016/S0197-4580(02)00065-9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458002000659>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics. **Experiments in personality, psychogenetics and psychopharmacology**, v. 1, p. 3–102, 1960. Disponível em: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Experiments%20in%20psychogenetics&pages=3-102&publication_year=1960&author=Broadhurst%20CP.%20L. Acesso em: 12 jul. 2022.
- BROWN, A. M.; DEUTCH, A. Y.; COLBRAN, R. J. Dopamine depletion alters phosphorylation of striatal proteins in a model of Parkinsonism. **The European journal of neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 247–256, jul. 2005. DOI 10.1111/j.1460-9568.2005.04190.x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4819997/>. Acesso em: 23 ago. 2022.

BRÜCKE, T.; BRÜCKE, C. Dopamine transporter (DAT) imaging in Parkinson's disease and related disorders. **Journal of Neural Transmission**, v. 129, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00702-021-02452-7>. Acesso em: 22 ago. 2022.

BRUNERT, D.; ROTHERMEL, M. Extrinsic neuromodulation in the rodent olfactory bulb. **Cell and tissue research**, v. 383, n. 1, jan. 2021. DOI 10.1007/s00441-020-03365-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33355709/>. Acesso em: 29 jun. 2022.

CABREIRA, V.; MASSANO, J. Parkinson's Disease: Clinical Review and Update. **Acta Médica Portuguesa**, v. 32, n. 10, p. 661–670, 1 out. 2019. DOI 10.20344/amp.11978. Disponível em: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/11978>. Acesso em: 10 jun. 2022.

CALÌ, C.; BAGHABRA, J.; BOGES, D. J.; HOLST, G. R.; KRESHUK, A.; HAMPRECHT, F. A.; SRINIVASAN, M.; LEHVÄSLAIHO, H.; MAGISTRETTI, P. J. Three-dimensional immersive virtual reality for studying cellular compartments in 3D models from EM preparations of neural tissues. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 524, n. 1, p. 23–38, 1 jan. 2016. <https://doi.org/10.1002/cne.23852>.

CAMPÊLO, C. L. C.; SANTOS, J. R.; SILVA, A. F.; DIERSCHNABEL, A. L.; PONTES, A.; CAVALCANTE, J. S.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H. Exposure to an enriched environment facilitates motor recovery and prevents short-term memory impairment and reduction of striatal BDNF in a progressive pharmacological model of parkinsonism in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 328, p. 138–148, 15 jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.028>. Acesso em: 18 ago. 2022.

CAPLAN, A. I. Chapter 29 - Mesenchymal Stem Cells. *In*: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.; MELTON, D.; PEDERSEN, R.; THOMAS, E. D.; THOMSON, J.; WILMUT, I. (orgs.). **Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 243–248. DOI 10.1016/B978-0-12-374729-7.00029-9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123747297000299>. Acesso em: 21 jun. 2022.

CASTRO, A. A.; GHISONI, K.; LATINI, A.; QUEVEDO, J.; TASCA, C. I.; PREDIGER, R. D. S. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 1, p. 208–215, 1 abr. 2012. DOI 10.1016/j.bbr.2012.01.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432812000356>. Acesso em: 18 ago. 2022.

CHEN, X. Y.; LI, J.; QI, W. Q.; SHEN, S. H. Experimental change on dopaminergic neurons in striatum of Parkinson disease rats. **Histology and Histopathology**, v. 22, n. 10, p. 1085–1090, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.14670/HH-22.1085>. Acesso em: 18 ago. 2022.

CHEN, Y.-R.; LAI, P.-L.; CHIEN, Y.; LEE, P.-H.; LAI, Y.-H.; MA, H.-I.; SHIAU, C.-Y.; WANG, K.-C. Improvement of Impaired Motor Functions by Human Dental Exfoliated Deciduous Teeth Stem Cell-Derived Factors in a Rat Model of Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. E3807, 27 maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21113807>. Acesso em: 18 ago. 2022.

CHURCHILL, M. J.; PFLIBSEN, L.; SCONCE, M. D.; MOORE, C.; KIM, K.; MESHUL, C. K. Exercise in an animal model of Parkinson's disease: Motor recovery but not restoration of the nigrostriatal pathway. **Neuroscience**, v. 359, p. 224–247, 17 set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.031>. Acesso em: 18 ago. 2022.

DENG, I.; CORRIGAN, F.; GARG, S.; ZHOU, X.-F.; BOBROVSKAYA, L. Further Characterization of Intrastratial Lipopolysaccharide Model of Parkinson's Disease in C57BL/6 Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7380, 9 jul. 2021. DOI 10.3390/ijms22147380. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8304722/>. Acesso em: 19 ago. 2022.

DENARDO, D. G., GALKIN, A., DUPONT, J., ZHOU, L., & BENDELL, J GB1275, a first-in-class CD11b modulator: rationale for immunotherapeutic combinations in solid tumors. **Journal for immunotherapy of cancer**, v.9, n.8, 2021. Acesso em: 11 out 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003005>>

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, 2006. DOI 10.1080/14653240600855905. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16923606/>. Acesso em: 21 jun. 2022.

DORSEY, E. R.; ELBAZ, A.; NICHOLS, E.; ABBASI, N.; ABD-ALLAH, F.; ABDELALIM, A.; ADSUAR, J. C.; ANSHA, M. G.; BRAYNE, C.; CHOI, J.-Y. J.; COLLADO-MATEO, D.; DAHODWALA, N.; DO, H. P.; EDESSA, D.; ENDRES, M.; FERESHTEHNEJAD, S.-M.; FOREMAN, K. J.; GANKPE, F. G.; GUPTA, R.; ... MURRAY, C. J. L. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 939–953, 1 nov. 2018. DOI 10.1016/S1474-4422(18)30295-3. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanneur/article/PIIS1474-4422\(18\)30295-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanneur/article/PIIS1474-4422(18)30295-3/fulltext). Acesso em: 14 jun. 2022.

FLORES-CUADRADO, A.; SAIZ-SANCHEZ, D.; MOHEDANO-MORIANO, A.; LAMAS-CENJOR, E.; LEON-OLMO, V.; MARTINEZ-MARCOS, A.; UBEDA-BAÑÓN, I. Astroglial and sexually dimorphic neurodegeneration and microglial in the olfactory bulb in Parkinson's disease. **NPJ Parkinson's Disease**, v. 7, p. 11, 21 jan. 2021. DOI 10.1038/s41531-020-00154-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7820595/>. Acesso em: 19 ago. 2022.

FLORES-CUADRADO, A.; SAIZ-SANCHEZ, D.; MOHEDANO-MORIANO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; UBEDA-BAÑÓN, I. Neurodegeneration and contralateral α -synuclein induction after intracerebral α -synuclein injections in the anterior olfactory nucleus of a Parkinson's disease A53T mouse model. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 7, p. 56, 15 abr. 2019. DOI 10.1186/s40478-019-0713-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463651/>. Acesso em: 19 ago. 2022.

FUJII, H.; MATSUBARA, K.; SAKAI, K.; ITO, M.; OHNO, K.; UEDA, M.; YAMAMOTO, A. Dopaminergic differentiation of stem cells from human deciduous teeth and their therapeutic benefits for Parkinsonian rats. **Brain Research**, v. 1613, p. 59–72, 10 jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.001>. Acesso em: 18 ago. 2022.

GIRAULT, J.-A.; GREENGARD, P. The Neurobiology of Dopamine Signaling. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 5, p. 641–644, 1 maio 2004. DOI 10.1001/archneur.61.5.641. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archneur.61.5.641>. Acesso em: 29 jun. 2022.

GNANASEGARAN, N.; GOVINDASAMY, V.; MANI, V.; ABU KASIM, N. H. Neuroimmunomodulatory properties of DPSCs in an in vitro model of Parkinson's disease. **IUBMB life**, v. 69, n. 9, p. 689–699, set. 2017. Disponível em : <https://doi.org/10.1002/iub.1655>. Acesso em: 18 ago. 2022.

GNANASEGARAN, N.; GOVINDASAMY, V.; SIMON, C.; GAN, Q. F.; VINCENT-CHONG, V. K.; MANI, V.; KRISHNAN SELVARAJAN, K.; SUBRAMANIAM, V.; MUSA, S.; ABU KASIM, N. H. Effect of dental pulp stem cells in MPTP-induced old-aged mice model. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 6, p. 403–414, 2017. DOI 10.1111/eci.12753. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/eci.12753>. Acesso em: 28 jun. 2022.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625–13630, 5 dez. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>. Acesso em: 20 ago. 2022.

GU, X.-L.; LONG, C.-X.; SUN, L.; XIE, C.; LIN, X.; CAI, H. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T α -synuclein causes neurodegeneration in mice. **Molecular Brain**, v. 3, n. 1, p. 12, 21 abr. 2010. DOI 10.1186/1756-6606-3-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-12>. Acesso em: 29 jun. 2022.

GUGLIANDOLO, A.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Mesenchymal stem cell therapy in Parkinson's disease animal models. **Current Research in Translational Medicine**, v. 65, n. 2, p. 51–60, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.10.007>. Acesso em: 10 ago. 2022.

HU, K.; HUANG, Q.; LIU, C.; LI, Y.; LIU, Y.; WANG, H.; LI, M.; MA, S. c-Jun/Bim Upregulation in Dopaminergic Neurons Promotes Neurodegeneration in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 399, p. 117–124, 10 fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.026>. Acesso em: 18 jun. 2022.

HUNOT, S.; VILA, M.; TEISMANN, P.; DAVIS, R. J.; HIRSCH, E. C.; PRZEDBORSKI, S.; RAKIC, P.; FLAVELL, R. A. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, n. 2, p. 665–670, 13 jan. 2004. DOI 10.1073/pnas.0307453101. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC327205/>. Acesso em: 22 ago. 2022.

IKEDA, K.; EBINA, J.; KAWABE, K.; IWASAKI, Y. Dopamine Transporter Imaging in Parkinson Disease: Progressive Changes and Therapeutic Modification after Anti-parkinsonian Medications. **Internal Medicine**, v. 58, n. 12, p. 1665–1672, 15 jun. 2019. DOI 10.2169/internalmedicine.2489-18. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6630131/>. Acesso em: 22 jun. 2022.

ILKIW, J.; KMITA, L.; TARGA, A.; DUARTE NOSEDA, A. C.; SOARES RODRIGUES, L.; DORIEUX, F.; FAGOTTI, J.; SANTOS, P.; LIMA, M. Dopaminergic Lesion in the Olfactory Bulb Restores Olfaction and Induces Depressive-Like Behaviors in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 56, 1 fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1134-5>. Acesso em: 18 mai. 2022.

ISOBE, Y.; KOYAMA, N.; NAKAO, K.; OSAWA, K.; IKENO, M.; YAMANAKA, S.; OKUBO, Y.; FUJIMURA, K.; BESSHO, K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 1, p. 124–131, 1 jan. 2016. DOI 10.1016/j.ijom.2015.06.022. Disponível em: [https://www.ijoms.com/article/S0901-5027\(15\)00256-8/fulltext](https://www.ijoms.com/article/S0901-5027(15)00256-8/fulltext). Acesso em: 21 jun. 2022.

JANAKIRAMAN, U.; MANIVASAGAM, T.; JUSTIN THENMOZHI, A.; DHANALAKSHMI, C.; ESSA, M. M.; SONG, B.-J.; GUILLEMIN, G. J. Chronic mild stress augments MPTP induced neurotoxicity in a murine model of Parkinson's disease. **Physiology & Behavior**, v. 173, p. 132–143, 1 maio 2017. DOI 10.1016/j.physbeh.2017.01.046. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938416308642>. Acesso em: 29 jun. 2022.

JANKOVIC, J.; TAN, E. K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 91, n. 8, seç. 2020 Hindsight, p. 795–808, 1 ago. 2020. DOI 10.1136/jnnp-2019-322338. Disponível em: <https://jnnp.bmj.com/content/91/8/795>. Acesso em: 14 jun. 2022.

JARMALAVIČIŪTĖ, A.; TUNAITIS, V.; PIVORAITĖ, U.; VENALIS, A.; PIVORIŪNAS, A. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. **Cytotherapy**, v. 17, n. 7, p. 932–939, jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.07.013>.

JAYARAMAYYA, K.; IYER, M.; VENKATESAN, D.; BALASUBRAMANIAN, V.; NARAYANASAMY, A.; SUBRAMANIAM, M. D.; CHO, S. G.; VELLINGIRI, B. Unraveling correlative roles of dopamine transporter (DAT) and Parkin in Parkinson's disease (PD) - A road to discovery? **Brain Research Bulletin**, v. 157, p. 169–179, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.02.001>.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 29 ago. 2015. DOI 10.1016/S0140-6736(14)61393-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673614613933>. Acesso em: 14 jun. 2022.

KMITA, L. C.; ILKIW, J. L.; RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D.; NOSEDA, A. C. D.; DOS-SANTOS, P.; FAGOTTI, J.; TRINDADE, E. S.; LIMA, M. M. Absence of a synergic nigral proapoptotic effect triggered by REM sleep deprivation in the rotenone model of Parkinson's disease. **Sleep Science**, v. 12, n. 3, p. 196–202, 2019. DOI 10.5935/1984-0063.20190078. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6932851/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

KOLIOS, G.; MOODLEY, Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. **Respiration**, v. 85, n. 1, p. 3–10, 2013. DOI 10.1159/000345615. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/345615>. Acesso em: 22 jun. 2022.

KORDOWER, J. H.; GOETZ, C. G.; CHU, Y.; HALLIDAY, G. M.; NICHOLSON, D. A.; MUSIAL, T. F.; MARMION, D. J.; STOESSL, A. J.; SOSSI, V.; FREEMAN, T. B.; OLANOW, C. W. Robust graft survival and normalized dopaminergic innervation do not obligate recovery in a Parkinson disease patient. **Annals of Neurology**, v. 81, n. 1, p. 46–57, 2017. DOI 10.1002/ana.24820. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.24820>. Acesso em: 20 jun. 2022.

KUMAR, S.; GOYAL, L.; SINGH, S. Tremor and Rigidity in Patients with Parkinson's Disease: Emphasis on Epidemiology, Pathophysiology and Contributing Factors. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 21, n. 7, p. 596–609, 2022. DOI 10.2174/1871527320666211006142100. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/118344>. Acesso em: 14 jun. 2022.

LANGLEY, M. R.; GHASIAS, S.; PALANISAMY, B. N.; AY, M.; JIN, H.; ANANTHARAM, V.; KANTHASAMY, A.; KANTHASAMY, A. G. Characterization of nonmotor behavioral impairments and their neurochemical mechanisms in the MitoPark mouse model of progressive neurodegeneration in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 341, p. 113716, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113716>. Acesso em: 18 jul. 2022.

LANGSTON, J. W.; BALLARD, P.; TETRUD, J. W.; IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 219, n. 4587, p. 979–980, 25 fev. 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.6823561>. Acesso em: 03 ago. 2022.

LI, L.-B.; CHEN, N.; RAMAMOORTHY, S.; CHI, L.; CUI, X.-N.; WANG, L. C.; REITH, M. E. A. The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 21012–21020, 14 maio 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M311972200>. Acesso em: 01 ago. 2022.

- LI, W.; ENGLUND, E.; WIDNER, H.; MATTSSON, B.; VAN WESTEN, D.; LÄTT, J.; REHNCRONA, S.; BRUNDIN, P.; BJÖRKLUND, A.; LINDVALL, O.; LI, J.-Y. Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 23, p. 6544–6549, 7 jun. 2016. DOI 10.1073/pnas.1605245113. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1605245113>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- LIMA, M. M. S.; MARTINS, E. F.; DELATTRE, A. M.; PROENCA, M. B.; MORI, M. A.; CARABELLI, B.; FERRAZ, A. C. Motor and non-motor features of Parkinson's disease - a review of clinical and experimental studies. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 11, n. 4, p. 439–449, 1 jun. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/187152712800792893>. Acesso em: 18 ago. 2022.
- LIN, C. S., XIN, Z. C., DAI, J., & LUE, T. F.. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. **Histology and histopathology**, v.28, n.9, p.1109–1116, 2013. Acesso em: 10 out 2022 Disponível em: <<https://doi.org/10.14670/HH-28.1109>>
- LIN, N.-H.; YANG, A.-W.; CHANG, C.-H.; PERNG, M.-D. Elevated GFAP isoform expression promotes protein aggregation and compromises astrocyte function. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 35, n. 5, p. e21614, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.202100087R>. Acesso em: 03 ago. 2022.
- LIU, R.; UMBACH, D. M.; TRÖSTER, A. I.; HUANG, X.; CHEN, H. Non-motor symptoms and striatal dopamine transporter binding in early Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 72, p. 23–30, mar. 2020. DOI 10.1016/j.parkreldis.2020.02.001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7222918/>. Acesso em: 22 ago. 2022.
- LIU, S.-Y.; CHAN, P.; STOESSL, A. J. The underlying mechanism of prodromal PD: insights from the parasympathetic nervous system and the olfactory system. **Translational Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 4, 20 fev. 2017. DOI 10.1186/s40035-017-0074-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0074-8>. Acesso em: 15 jun. 2022.
- LUO, L.; HE, Y.; WANG, X.; KEY, B.; LEE, B. H.; LI, H.; YE, Q. Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 1731289, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/1731289>. Acesso em: 18 ago. 2022.
- MAROGIANNI, C.; SOKRATOUS, M.; DARDIOTIS, E.; HADJIGEORGIOU, G. M.; BOGDANOS, D.; XIROMERISIOU, G. Neurodegeneration and Inflammation—An Interesting Interplay in Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8421, jan. 2020. DOI 10.3390/ijms21228421. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8421>. Acesso em: 14 jun. 2022.

MELIGY, F. Y.; ELGAMAL, D. A.; ABD ALLAH, E. S. H.; IDRIS, N. K.; GHANDOUR, N. M.; BAYOUMY, E. M. R.; KHALIL, A. S. A.; EL FIKY, M. M.; ELKHASHAB, M. Testing alternatives: the use of adipose-derived mesenchymal stem cells to slow neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 6, p. 5841–5858, dez. 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s11033-019-05018-9>. Acesso em: 18 ago. 2022.

MELTON, D. A.; COWEN, C. "Stemness": Definitions, Criteria, and Standards. *In*: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.; MELTON, D.; PEDERSEN, R.; THOMAS, E. D.; THOMSON, J.; WILMUT, I. (orgs.). **Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p. xxiii–xxix. DOI

10.1016/B978-0-12-374729-7.00083-4. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123747297000834>. Acesso em: 21 jun. 2022.

MESSING, A.; BRENNER, M. GFAP at 50. **ASN neuro**, v. 12, p.

1759091420949680, dez. 2020. Disponível

em:<https://doi.org/10.1177/1759091420949680>. Acesso em: 18 jun. 2022.

MORAIS, L. H.; HARA, D. B.; BICCA, M. A.; POLI, A.; TAKAHASHI, R. N. Early signs of colonic inflammation, intestinal dysfunction, and olfactory impairments in the rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. **Behavioural Pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 199–210, 1 abr. 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000389>. Acesso em: 02 ago. 2022.

MUNDIÑANO, I.-C.; CABALLERO, M.-C.; ORDÓÑEZ, C.; HERNANDEZ, M.;

DICAUDO, C.; MARCILLA, I.; ERRO, M.-E.; TUÑÓN, M.-T.; LUQUIN, M.-R.

Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. **Acta Neuropathologica**, v. 122, n. 1, p. 61–74, jul. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0830-2>. Acesso em: 10 ago. 2022.

NA, S. J.; DILELLA, A. G.; LIS, E. V.; JONES, K.; LEVINE, D. M.; STONE, D. J.;

HESS, J. F. Molecular profiling of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's

disease. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 5, p. 761–772, maio 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0133-3>. Acesso em: 18 ago. 2022.

NESTI, C.; PARDINI, C.; BARACHINI, S.; D'ALESSANDRO, D.; SICILIANO, G.;

MURRI, L.; PETRINI, M.; VAGLINI, F. Human dental pulp stem cells protect mouse

dopaminergic neurons against MPP+ or rotenone. **Brain Research**, v. 1367, p.

94–102, 7 jan. 2011. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.042>.

Acesso em: 01 ago. 2022.

NISHI, A.; BIBB, J. A.; SNYDER, G. L.; HIGASHI, H.; NAIRN, A. C.; GREENGARD,

P. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. **Proceedings**

of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, n.

23, p. 12840–12845, 7 nov. 2000. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18851/>. Acesso em: 29 jun. 2022.

NIWA, H. Chapter 8 - Mechanisms of Stem Cell Self-renewal. *In*: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.; MELTON, D.; PEDERSEN, R.; THOMAS, E. D.; THOMSON, J.; WILMUT, I. (orgs.). **Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 73–80. DOI 10.1016/B978-0-12-374729-7.00008-1. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123747297000081>. Acesso em: 21 jun. 2022.

OBESO, J. a.; STAMELOU, M.; GOETZ, C. g.; POEWE, W.; LANG, A. e.; WEINTRAUB, D.; BURN, D.; HALLIDAY, G. m.; BEZARD, E.; PRZEDBORSKI, S.; LEHERICY, S.; BROOKS, D. j.; ROTHWELL, J. c.; HALLETT, M.; DELONG, M. r.; MARRAS, C.; TANNER, C. m.; ROSS, G. w.; LANGSTON, J. w.; ... STOESSL, A. j. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement Disorders**, v. 32, n. 9, p. 1264–1310, 2017. DOI 10.1002/mds.27115. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mds.27115>. Acesso em: 15 jun. 2022.

OKAZAWA, H.; ESTUS, S. The JNK/c-Jun cascade and Alzheimer's disease. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®**, v. 17, n. 2, p. 79–88, 1 mar. 2002. DOI 10.1177/153331750201700209. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/153331750201700209>. Acesso em: 21 ago. 2022.

PAJARES, M.; I. ROJO, A.; MANDA, G.; BOSCA, L.; CUADRADO, A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1687, jul. 2020. DOI 10.3390/cells9071687. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/7/1687>. Acesso em: 16 jun. 2022.

PALERMO, G.; CERAVOLO, R. Molecular Imaging of the Dopamine Transporter. **Cells**, v. 8, n. 8, p. E872, 10 ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells8080872>. Acesso em: 18 jun. 2022.

PAPAVASSILIOU, A. G.; MUSTI, A. M. The Multifaceted Output of c-Jun Biological Activity: Focus at the Junction of CD8 T Cell Activation and Exhaustion. **Cells**, v. 9, n. 11, p. E2470, 13 nov. 2020. Disponível em : <https://doi.org/10.3390/cells9112470>. Acesso em: 18 ago. 2022.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 6. ed. [S. l.: s. n.], 2006. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-374121-9>. Acesso em: 23 jun. 2022.

PINGALE, T.; GUPTA, G. L. Classic and evolving animal models in Parkinson's disease. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 199, p. 173060, 1 dez. 2020. DOI 10.1016/j.pbb.2020.173060. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305720303828>. Acesso em: 16 jun. 2022.

POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; HALLIDAY, G. M.; BRUNDIN, P.; VOLKMANN, J.; SCHRAG, A.-E.; LANG, A. E. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 23 mar. 2017. DOI 10.1038/nrdp.2017.13. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201713>. Acesso em: 15 jun. 2022.

- PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 6, p. 957–964, jun. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.012>. Acesso em: 11 jun. 2022.
- RANA, T.; BEHL, T.; SEHGAL, A.; SRIVASTAVA, P.; BUNGAU, S. Unfolding the Role of BDNF as a Biomarker for Treatment of Depression. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n. 10, p. 2008–2021, 1 out. 2021. DOI 10.1007/s12031-020-01754-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01754-x>. Acesso em: 29 jun. 2022.
- RAZA, C.; ANJUM, R.; SHAKEEL, N. ul A. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. **Life Sciences**, v. 226, p. 77–90, 1 jun. 2019. DOI 10.1016/j.lfs.2019.03.057. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002432051930222X>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- RHEINLÄNDER, A., SCHRAVEN, B., & BOMMHARDT, U. CD45 in human physiology and clinical medicine. **Immunology letters**, v.196,p. 22–32. 2018 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>> Acesso em: 11 out 2022.
- RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S.; NOSEDA, A. C. D.; AURICH, M. F.; DA CUNHA, C.; LIMA, M. M. S. Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00383>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- SALARI, S.; BAGHERI, M. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. **Physiological Research**, v. 68, n. 1, p. 17–24, 6 mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.33549/physiolres.933895>. Acesso em: 18 ago. 2022.
- SCONCE, M. D.; CHURCHILL, M. J.; GREENE, R. E.; MESHUL, C. K. Intervention with exercise restores motor deficits but not nigrostriatal loss in a progressive MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 299, p. 156–174, 23 jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.069>. Acesso em: 18 ago. 2022.
- SHAN, F.; LONG, Y.; QIU, W. Autoimmune Glial Fibrillary Acidic Protein Astrocytopathy: A Review of the Literature. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02802>. Acesso em: 29 jun. 2022.
- SHARMA, Y.; SHOBHA, K.; SUNDEEP, M.; PINNELLI, V. B.; PARVEEN, S.; DHANUSHKODI, A. Neural Basis of Dental Pulp Stem Cells and its Potential Application in Parkinson's Disease. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 21, n. 1, p. 62–76, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1871527320666210311122921>. Acesso em: 18 ago. 2022.

SIMON, C.; GAN, Q. F.; KATHIVALOO, P.; MOHAMAD, N. A.; DHAMODHARAN, J.; KRISHNAN, A.; SENGODAN, B.; PALANIMUTHU, V. R.; MARIMUTHU, K.; RAJANDAS, H.; RAVICHANDRAN, M.; PARIMANNAN, S. Deciduous DPSCs Ameliorate MPTP-Mediated Neurotoxicity, Sensorimotor Coordination and Olfactory Function in Parkinsonian Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. E568, 29 jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20030568>. Acesso em: 10 ago. 2022.

SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1–12, 1 fev. 2020. DOI 10.1016/j.cger.2019.08.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749069019300631>. Acesso em: 14 jun. 2022.

SINGSAI, K.; AKARAVICHIAN, T.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; SATTAYASAI, J. Protective Effects of *Streblus asper* Leaf Extract on H₂O₂-Induced ROS in SK-N-SH Cells and MPTP-Induced Parkinson's Disease-Like Symptoms in C57BL/6 Mouse. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. e970354, 21 dez. 2015. DOI 10.1155/2015/970354. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/970354/>. Acesso em: 18 ago. 2022.

TEIXEIRA, F. G.; CARVALHO, M. M.; PANCHALINGAM, K. M.; RODRIGUES, A. J.; MENDES-PINHEIRO, B.; ANJO, S.; MANADAS, B.; BEHIE, L. A.; SOUSA, N.; SALGADO, A. J. Impact of the Secretome of Human Mesenchymal Stem Cells on Brain Structure and Animal Behavior in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 2, p. 634–646, fev. 2017. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0071>.

THE EPIDEMIOLOGY OF PARKINSON'S DISEASE: RISK FACTORS AND PREVENTION. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 12, p. 1257–1272, 1 nov. 2016. DOI 10.1016/S1474-4422(16)30230-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442216302307>. Acesso em: 14 jun. 2022.

TILLERSON, J. L.; CAUDLE, W. M.; PARENT, J. M.; GONG, C.; SCHALLERT, T.; MILLER, G. W. Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. **Behavioural Brain Research**, v. 172, n. 1, p. 97–105, 15 set. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.04.025>. Acesso em: 11 jun. 2022.

TOLOSA, E.; GARRIDO, A.; SCHOLZ, S. W.; POEWE, W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 20, n. 5, p. 385–397, 1 maio 2021. DOI 10.1016/S1474-4422(21)00030-2. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442221000302>. Acesso em: 14 jun. 2022.

TSIAMBAS, E.; MASTRONIKOLIS, N.; P FOTIADES, P.; KYRODIMOS, E.; CHRYSOVERGIS, A.; PAPANIKOLAOU, V.; MASTRONIKOLIS, S.; PESCHOS, D.; ROUKAS, D.; RAGOS, V. c-Jun/c-Fos complex in laryngeal squamous cell carcinoma. **Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 25, n. 2, p. 618–620, abr. 2020. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/32521843>. Acesso em: 14 jun. 2022.

UDER, C., BRÜCKNER, S., WINKLER, S., TAUTENHAHN, H. M., & CHRIST, B.. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v.93,n.1,p.32–49, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23239>> Acesso em 08 ou 2022.

VERFAILLIE, C. M.; CRABBE, A. Chapter 28 - Multipotent Adult Progenitor Cells. *In*: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.; MELTON, D.; PEDERSEN, R.; THOMAS, E. D.; THOMSON, J.; WILMUT, I. (orgs.). **Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 233–241. DOI 10.1016/B978-0-12-374729-7.00028-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123747297000287>. Acesso em: 21 jun. 2022.

WALAAS, S. I.; HEMMING, H. C.; GREENGARD, P.; NAIRN, A. C. Beyond the dopamine receptor: regulation and roles of serine/threonine protein phosphatases. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 5, p. 50, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00050>. Acesso em: 14 jun. 2022.

XIAO, L.; IDE, R.; SAIKI, C.; KUMAZAWA, Y.; OKAMURA, H. Human Dental Pulp Cells Differentiate toward Neuronal Cells and Promote Neuroregeneration in Adult Organotypic Hippocampal Slices In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. E1745, 11 ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18081745>. Acesso em: 14 jun. 2022.

XU, M.; BOHLEN, J. K.; MOORE, C.; NIPPER, M. A.; FINN, D. A.; JONES, C. E.; LIM, M. M.; MESHUL, C. K. Effects of sleep disruption on stress, nigrostriatal markers, and behavior in a chronic/progressive MPTP male mouse model of Parkinsonism. **Journal of neuroscience research**, v. 97, n. 12, p. 1706–1719, dez. 2019. DOI 10.1002/jnr.24520. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6801095/>. Acesso em: 22 ago. 2022.

YABUKI, Y.; OHIZUMI, Y.; YOKOSUKA, A.; MIMAKI, Y.; FUKUNAGA, K. Nobiletin treatment improves motor and cognitive deficits seen in MPTP-induced Parkinson model mice. **Neuroscience**, v. 259, p. 126–141, 14 fev. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.051>. Acesso em: 14 jun. 2022.

YAMADA, Y.; NAKAMURA-YAMADA, S.; KUSANO, K.; BABA, S. Clinical Potential and Current Progress of Dental Pulp Stem Cells for Various Systemic Diseases in Regenerative Medicine: A Concise Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. E1132, 6 mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20051132>. Acesso em: 14 jun. 2022.

YUAN, Z.; GONG, S.; LUO, J.; ZHENG, Z.; SONG, B.; MA, S.; GUO, J.; HU, C.; THIEL, G.; VINSON, C.; HU, C.-D.; WANG, Y.; LI, M. Opposing roles for ATF2 and c-Fos in c-Jun-mediated neuronal apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 9, p. 2431–2442, maio 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.01344-08>. Acesso em: 14 jun. 2022.

YUSTE, J. E.; ECHEVERRY, M. B.; ROS-BERNAL, F.; GOMEZ, A.; ROS, C. M.; CAMPUZANO, C. M.; FERNANDEZ-VILLALBA, E.; HERRERO, M. T. 7-Nitroindazole down-regulates dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 7, p. 1258–1267, dez. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.031>. Acesso em: 14 jun. 2022.

ZAKRZEWSKI, W.; DOBRZYŃSKI, M.; SZYMONOWICZ, M.; RYBAK, Z. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, p. 68, 26 fev. 2019. DOI 10.1186/s13287-019-1165-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6390367/>. Acesso em: 22 jun. 2022.

ZENG, X.-S.; GENG, W.-S.; JIA, J.-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN neuro**, v. 10, p. 1759091418777438, dez. 2018. Disponível em : <https://doi.org/10.1177/1759091418777438>. Acesso em: 22 jun. 2022

ZHANG, N.; LU, X.; WU, S.; LI, X.; DUAN, J.; CHEN, C.; WANG, W.; SONG, H.; TONG, J.; LI, S.; LIU, Y.; KANG, X.; WANG, X.; HAN, F. Intrastratial transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth reduces motor defects in Parkinsonian rats. **Cytotherapy**, v. 20, n. 5, p. 670–686, maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.02.371>. Acesso em: 22 jun. 2022