Fabiano Tófoli de Araújo

Análise comparativa de neurônios derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) para avaliar a associação da Doença de Gaucher e Doença de Parkinson.

Comparative analysis of derived neurons from induced pluripotent stem cells (iPSC) to study the Gaucher disease and Parkinson's disease association.

São Paulo

2020

EXEMPLAR CORRIGIDO

O original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP

Fabiano Tófoli de Araújo

Análise comparativa de neurônios derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) para avaliar a associação da Doença de Gaucher e Doença de Parkinson.

Comparative analysis of derived neurons from induced pluripotent stem cells (iPSC) to study the Gaucher disease and Parkinson's disease association.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Genética.

Orientadora: Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi

São Paulo

2020

Tófoli de Araújo, Fabiano

Análise comparativa de neurônios derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) para avaliar a associação da Doença de Gaucher e Doença de Parkinson / Fabiano Tófoli de Araújo ; orientador Lygia da Veiga Pereira -- São Paulo, 2020.

127 f. + anexos

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias (LaNCE) – SP.

1. Doença de Parkinson. 2. Doença de Gaucher. 3. Célula-tronco pluripotente induzida (iPSC). 4. Neurônio dopaminérgico. 5. Hipóxia. I. Pereira, Lygia da Veiga. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias (LaNCE) – SP. III. Título.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi
Orientadora

Dedico este trabalho às mulheres da minha vida: Maria Antonia Tófoli de Araújo,
Luciane Paulo Teixeira (de Tófoli) e Bianca Teixeira de Tófoli

"Imagination is more important than knowledge.
For knowledge is limited, whereas imagination encircles the world."

- Albert Einstein,

Agradecimentos

Como a lista é extensa (foram quase 10 anos) e estou ficando velho, espero que não esteja deixando ninguém de fora. Também há o grande risco de estar trocando o nome de alguém.

Todos os nomes que serão citados foram importantes em uma ou mais etapas deste trabalho, é muito difícil estabelecer um critério para ordenar esta lista. Se fosse possível, colocaria todos em um único parágrafo!!! Muito obrigado!!!!

Prof. dra. Lygia da Veiga Pereira pela oportunidade e por acreditar no meu trabalho sempre fornecendo as melhores condições para o desenvolvimento da pesquisa. Além de sempre estar receptiva para conversar ("Professora posso falar rapidinho?").

Dr. Roberto Rozenberg com o qual iniciei minha carreira científica em 2000 com a doença de Gaucher. Depois de algum tempo acabei "adotando" e dando continuidade ao seu trabalho com o estudo da doença de Gaucher e Parkinson (a culpa de tudo isso é dele).

Dra. Mariana Morato Marques e ma. Lucas Assis Pereira, juntos conseguimos estabelecer o protocolo de reprogramação celular em iPSC e implementar o banco de MNCs do ELSA. Além disso, o Lucas "fiel escudeiro" ajudou na implementação da diferenciação neural (dopaminérgica e serotoninérgica).

Dras. Naja Vergani, Simone Siqueira e Ana Fraga, minhas "madrinhas do cultivo celular". Naja também me ajudou na tentativa de gerar iPSC quando ainda não havia um protocolo definido. Simone com seus ensinamentos no cultivo de células tronco embrionárias, mas também sempre ajudava no início das iPSCs.

Dra. Ana Teresa Semeano, com a caracterização e análises funcionais dos neurônios dopaminérgicos. Muito obrigado pelos seus conhecimentos e dedicação com os experimentos "sem fim". Como eu te disse anteriormente, sem você este projeto não teria sido finalizado.

Rafaela Regina pelos ensaios lisossômicos, mitocondriais e de microscopia eletrônica.

Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha e dr. Gustavo Ribeiro com as análises de bioinformática.

Ao dr. Egberto Reis Barbosa e dra. Susan Chien, parceiros de longa data, colaboradores aguerridos que fizeram a intermediação com os pacientes.

Dr. Henning Ulrich e dra. Denise Petri que aceitaram nossa parceria nos proporcionando um novo entendimento sobre a fisiologia neural, além de suas ideias inovadoras. Também foi com essa parceria que tivemos a oportunidade de fazer a publicação em um livro.

Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari que também acreditou neste projeto contribuindo de forma efetiva com a realização de ensaios fundamentais para este trabalho. Sempre receptiva em esclarecer minhas "dúvidas neurais" auxiliando a interpretar os resultados, além de escutar minhas ideias malucas sobre a diferenciação neural e Parkinson.

Dr. Luis Ernesto Farinha pela ajuda com as técnicas de biologia molecular.

Me. Raquel Serafian e Juliana Borsoi Sant'ana pelas caracterizações com ScoreCard e qRT-PCR. Além disso, a Raquel também ajudou na genotipagem das amostras.

Dra. Yordanka Medina com a geração e caracterização de iPSC controles.

Me. Isabela Gerdes Gyuricza com o envio das amostras para o RNAseq.

Dras. Ágatha Oliveira-Giacomelli e Maria Carolina Bittencourt Gonçalves, pela ajuda na elaboração do capítulo do livro.

Me. Yasmin Rana, por participar do projeto da doença de Parkinson e Gaucher, além da diferenciação neural serotoninérgica.

Ao futuro dr. Rodrigo com a ajuda na análise estatística.

Dr. Stevens Rehen, dra. Bruna Pulsen e dr. Yuri Lages que sempre nos auxiliaram com as iPSC e diferenciações neurais, além das dicas sobre hipóxia. Dra. Sylvie Devalle que nos ajudou com a caracterização das iPSCs para o banco de células tronco de pacientes com doenças neurodegenerativas.

Dra. Aparecida Maria Fontes pela coleta de amostras de pacientes com Gaucher.

Dr. Luis Netto com entusiasmo nos auxiliou a desenhar experimentos relacionados ao estresse oxidativo. Dr. Thiago Alegria pelo ensaio com peróxido de hidrogênio.

Dr. Keith Okamoto no auxílio com a citometria de fluxo.

Dr. Fernando Kok e dra. Silvia Amorim na tentativa de formamos uma colaboração.

Dra. Thaiany Quevedo, pelas dicas de diferenciação neural dopaminérgica.

Dr. Andre Brunoni, com as conversas sobre campo magnético e rTMS.

Dr. Alysson Moutri na tentativa de nos auxiliar com a diferenciação neural.

Dras. Karina Griesi-Oliveira e Kelly Nunes pelas dicas de diferenciação neural.

Aos técnicos Paulo Rogério, Mara Li, Fátima, Maraísa e Helenice por sempre nos ajudarem nas situações mais difíceis e de urgência. Me. Waldir Caldeira pela microscopia. Reiko Uchizono Simomura da secretaria de Neurologia Clínica.

Dr. Linzhao Cheng e Sarah Dowey por confiarem em nosso grupo disponibilizando o protocolo de reprogramação celular em iPSC, além de toda paciência e suporte até conseguirmos realizar a reprogramação com sucesso.

Dr. Mark Tomishima e dra. Faria Zafar, os únicos pesquisadores estrangeiros com experiência na área da diferenciação dopaminérgica que responderam meus e-mails. Muito obrigado pelas dicas.

Dra. Laurence Daheron pelo auxílio com a reprogramação dos linfócitos em iPSC.

Dra. Judith Staerk e dr. Chad Cowan pelas dicas de reprogramação.

Dra. Andrea Balan e dr. Luis Carlos Ferreira de Souza que aceitaram me orientar durante o mestrado, sem eles nada disso seria possível.

Agradeço à FAPESP (2014/25487-3 e 2013/08135-2), Sanofi Genzyme Corporation (Gaucher Generation 2010 grant program - GZ-2011-10731Genzyme), FUSP (projeto 2358) e CNPq/MS/DECIT (Estudo de Doenças Neurodegenerativas - chamada CNPq/MS/DECIT- 24/2014) pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

Lista de abreviaturas e siglas

- aSyn** - Alfa-sinucleína
- BBB** - Barreira hematoencefálica (*blood brain barrier*)
- DA** - Dopamina (*dopamine*)
- DAT** – transportador de dopamina (*dopamine active transporter* - SLC6A3)
- DND** - Diferenciação neural dopaminérgica (*dopaminergic neural differentiation*)
- EB** - Corpo embrióide
- EMF** - Campo magnético externo (*external magnetic Field*)
- EPO** - eritropoietina
- ERAD** - Degradação associada ao retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum-associated degradation*)
- ESC** - Célula-tronco embrionária (*embryonic stem cell*)
- Fe** - Ferro
- GCase** - β -glicosidase ácida ou glicocerebrosidase
- GCer** - Glicosilceramida ou glicocerebrosídeo
- GCsph** - Glicosilesfingosina
- GCspl** - Glicosilesfingolipídeos
- GD** - Doença de Gaucher (*Gaucher disease*)
- HIF** - Fator de transcrição induzido por hipóxia (*Hypoxia-inducible factor*)
- HIF1 α** - Fator de transcrição induzido por hipóxia 1-alfa (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*)
- iDA** - Neurônio dopaminérgico induzido (*induced dopaminergic neuron*)
- iPD** - Doença de Parkinson idiopática
- iPSC** - Célula-tronco pluripotente induzida (*induced pluripotent stem cell*)
- mDAN** - Neurônio dopaminérgico da parte compacta da substância negra do mesencéfalo A9 (*midbrain dopaminergic neuron*)
- PBMNC** - Células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells*)
- PD** - Doença de Parkinson (*Parkinson disease*)
- PDEO** - Doença de Parkinson com início precoce (*early onset*)
- PDLO** - Doença de Parkinson com início tardio (*late onset*)
- RNS** - Espécies reativas de nitrogênio (*reactive nitrogen species*)
- ROS** - Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)
- rTMS** - Estimulação magnética transcraniana repetitiva (*repetitive transcranial magnetic stimulation*)
- SNpc** - Parte compacta da substância negra (*substantia nigra pars compacta*)
- TH** - Tirosina hidroxilase (*tyrosine hydroxylase*)
- VEGF** - Fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*)

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Doenças Neurodegenerativas	1
1.2. Doença de Parkinson	3
1.3. Doença de Parkinson - Neurônios dopaminérgicos	5
1.4. Doença de Parkinson - Riscos	5
1.5. Doença de Parkinson - Genética	6
1.6. Gene <i>GBA</i>	9
1.7. Associação da Doença de Parkinson e Gaucher	10
1.8. Doenças causadas pelo acúmulo de α Syn (Sinucleinopatias)	14
1.9. Doença de Parkinson - Diagnóstico de Tratamento	17
1.10. Modelos de hiPSCs para o estudo da PD	18
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo Principal	19
2.2. Objetivos Específicos	19
2.3. Objetivos Secundários	19
3. Material e métodos	20
3.1. Coleta das amostras	20
3.1.1. Comitê de Ética	20
3.1.2. Amostragem	20
3.1.3. Genotipagem das amostras	21
3.2. Reprogramação das células somáticas do sangue periférico em iPSC..	22
3.2.1. Reprogramação dos eritroblastos em iPSC com plasmídeos episossomais (MOS, MMK e MBX)	22
3.2.2. Reprogramação dos linfócitos em iPSC com Vírus Sendai	25
3.3. Caracterização e verificação de qualidade/integridade das iPSCs	26
3.3.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	26
3.3.2. Análise da integração do Vírus Sendai	27
3.3.3. Análise da integração do plasmídeo episossomal	27
3.3.4. Análise de identidade por microssatélite (STR)	28
3.3.5. Análise de contaminação por micoplasma	28
3.3.6. Análise da integridade genômica por SNP Array	28
3.3.7. Análise da pluripotência por ensaio imunocitoquímico	29

3.3.8. Análise da pluripotência por citometria de fluxo	29
3.3.9. Formação de corpos embrióides (EB)	30
3.3.9.1. Análise da expressão gênica dos EBs por qRT-PCR	30
3.3.9.2. Análise da expressão gênica dos EBs por RT-PCR	31
3.4. Diferenciação neural dopaminérgica (DND)	31
3.5. Diferenciação neural dopaminérgica em hipóxia	34
3.5.1. Diferenciação neural dopaminérgica em normóxia (20% O ₂) sob efeito do campo magnético externo	34
3.6. Caracterização dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo derivados de iPSC (iDA)	35
3.6.1. Caracterização fenotípica dos neurônios dopaminérgicos	36
3.6.1.1. Análise imunocitoquímica dos marcadores de mDAN nos iDA	36
3.6.1.2. Análise por citometria de fluxo dos marcadores de mDAN nos iDA...36	
3.6.1.3. Análise de vesículas ácidas (lisossomos) dos iDA cultivados em: normóxia, hipóxia e sob efeito de campo magnético externo	38
3.6.1.4. Análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) nos iDA cultivados em: normóxia, hipóxia e sob efeito de campo magnético externo	38
3.6.1.5. Análise Estatística	39
3.6.2. Caracterização Funcional dos neurônios dopaminérgicos	39
3.6.2.1. Patch Clamp (whole-cell)	39
3.6.2.2. Ensaio de variação da concentração de cálcio intracelular	40
3.7. Coleta e extração de RNA dos iDA com 35 dias	41
3.8. Sequenciamento do RNA (RNASeq)	41
3.9. Análise Bioinformática e bioestatística	42
3.9.1. Análise de genes expressos diferencialmente nas principais vias metabólicas identificadas	43
3.9.2. Análise de genes diferencialmente expressos em diferentes assinaturas gênicas	43
4. Resultados e Discussão	44
4.1. Coleta das Amostras e processamento do sangue periférico	44
4.1.1. Genotipagem das amostras	44
4.2. Reprogramação das células somáticas do sangue periférico em iPSC...46	

4.3. Caracterização e verificação de qualidade/integridade das linhagens de iPSCs	47
4.3.1. Integração dos vetores (vírus Sendai e plasmídeos episomais)	47
4.3.2. Análise de identidade por microssatélite (STR)	47
4.3.3. Contaminação por micoplasma	48
4.3.4. Análise da integridade genômica (SNP Array)	49
4.3.5. Análise da pluripotência por ensaio imunocitoquímico	49
4.3.6. Citometria de fluxo para marcadores de pluripotência	50
4.3.7. Formação dos corpos embrióides (EBs) e análise da expressão gênica dos 3 folhetos germinativos	51
4.3.7.1. Análise da expressão gênica dos EBs por RT-PCR	51
4.3.7.2. Análise da expressão gênica dos EBs por qPCR (ScoreCard)	52
4.4. Padronização do protocolo diferenciação neural dopaminérgica (DND) de iPSCs	53
4.5. Fatores que influenciam a DND	54
4.5.1. DND em hipóxia	54
4.5.2. DND sob influência de campo magnético externo (EMF)	55
4.5.3. Comparação da DND nas 3 condições de cultivo: normóxia, hipóxia e EMF	56
4.6. Caracterização dos neurônios dopaminérgicos (iDA)	58
4.6.1. Caracterização fenotípica dos neurônios dopaminérgicos	58
4.6.1.1. Análise imunocitoquímica dos iDA	58
4.6.1.2. Citometria de fluxo com iDA (<i>DIV</i> 35)	60
4.6.2. Caracterização Funcional dos neurônios dopaminérgicos	62
4.6.2.1. Patch Clamp (whole-cell)	62
4.6.2.2. Monitoramento da variação da concentração de cálcio intracelular induzida	63
4.6.2.3. Comparação da variação espontânea da concentração de cálcio intracelular entre os grupos	64
4.6.2.4. Efeito das condições de normóxia, hipóxia e EMF na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por iDAs	65
4.6.2.5. Efeito das condições de normóxia, hipóxia e EMF em vesículas ácidas (análise lisossômica) de iDAs	67
4.7. Análise da expressão gênica diferencial de iDA	70

4.7.1. Análise de componentes principais dos iDA em normóxia e hipóxia....	70
4.7.2. Análise das assinaturas gênicas de mDAN maduros e imaturos em iDA.....	72
4.7.3. Análise de vias diferencialmente expressas nos iDA	74
5. Conclusões	79
6. Perspectivas	80
Resumo	82
Abstract	83
Referencias Bibliográficas	84
ANEXOS	99
Anexo I	99
Anexo II	100
Anexo III	101
Anexo IV	102
Anexo V	103
Anexo VI	104
Anexo VII	105
Anexo VIII	106
Anexo IX	107
Anexo X	108
Anexo XI	112
Anexo XII	113
Anexo XIII	114
Anexo XIV	115

1. Introdução

1.1. Doenças Neurodegenerativas

Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde (WHO) a população mundial acima de 60 anos irá dobrar até 2050 (900 milhões – 2 bilhões) (*World Health Organization*). Esse fenômeno ocorre devido ao envelhecimento populacional decorrente dos avanços tecnológicos na área da medicina, melhora na qualidade de vida e oferta/disponibilidade de alimentos. Devido ao aumento da longevidade nos últimos dois séculos as doenças neurodegenerativas se tornam cada vez mais frequentes na terceira idade (Figura 1).

Figura 1: Exemplos de doenças neurodegenerativas comuns que podem surgir durante o envelhecimento (caixas vermelhas = acúmulo da proteína alfa-sinucleína (aSyn) formando Corpos de Lewy (ou LB). (modificado de Bertram & Tanzi, 2005).

O mesmo cenário de envelhecimento populacional dos países desenvolvidos também ocorre no Brasil, onde observa-se a diminuição do número de indivíduos com menos de 30 anos (base da pirâmide) e aumento de indivíduos idosos (com mais de 60 anos - topo da pirâmide) (Figura 2A). Estima-se que em 2035 o número de indivíduos idosos se igualará ao número de jovens (abaixo de 14 anos) (Figura 2B) e que a população idosa brasileira irá dobrar até 2045 (Figura 2C) (IBGE, IPEA).

Figura 2: Estimativas e projeções do envelhecimento populacional brasileiro. A - Transição demográfica no Brasil; **B** - Comparação do número de jovens (0 a 14 anos, linha azul) com o número de idosos (acima de 60 anos, linha laranja) ao longo dos anos (de 2010 a 2060) no Brasil (IE = índice de envelhecimento); **C** - Número de pessoas idosas (%) e expectativa de vida (anos) no Brasil ao longo dos anos (de 1900 a 2060) (IBGE, IPEA).

O Brasil não possui dados estatísticos para doenças neurodegenerativas, mas certamente uma das consequências do envelhecimento populacional será o aumento no número de casos de doenças com início tardio ligadas ao avanço da idade (incluindo neurodegeneração), como é observado em países cuja população já passou por esta transição.

Em um estudo realizado com as 15 principais causas de morte durante o ano de 2004 nos EUA, foram identificadas duas doenças neurodegenerativas, Doença de Alzheimer - AD, e Doença de Parkinson - PD, naquele período. O mesmo estudo realizado nos anos de 2010 e 2016 mostra uma pequena variação entre as posições no ranking, porém, mantiveram-se as mesmas causas de mortes (Miniño *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2018). Em 12 anos (de 2004 a 2016), houve aumento no número de mortes total (indício de aumento populacional) acompanhado pelo aumento dos números de mortes causadas pela AD e PD, mostrando a importância das doenças neurodegenerativas na saúde pública.

O número de pessoas incapacitadas ou mortas pela doença de Parkinson (PD) mais que dobrou de 1990 a 2015, e estima-se dobrar novamente de 2005 a 2030. Projeções para 2040 são de quase 13 bilhões de afetados pela PD no mundo (Figura 3) (Dorsey & Bloem, 2018).

Figura 3: Número estimado e projetado de indivíduos afetados pela doença de Parkinson de 1990 a 2040 (retirado de Dorsey & Bloem, 2018).

Atualmente cerca de 10 milhões de pessoas são afetadas pela PD no mundo. Somente nos EUA no ano de 2014 havia cerca de 1,5 milhões de afetados, 60 mil novos casos diagnosticados/ano, 23 mil mortes/ano, custo de U\$14,5 bilhões/ano no tratamento e com estimativa de dobrar o número de casos da PD até 2040 (www.parkinsonfoundation.org; Medicines in Development for Parkinsons Disease 2014 Report).

1.2. Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (PD - Parkinson Disease, MIM # 168600) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, afetando 2% das pessoas com mais de 65 anos e 5% das pessoas com mais de 85 anos (Barbosa *et al.*, 1997, Schulte & Gasser, 2011). Os sintomas da PD são divididos em 2 grupos: motores e não-motores. Os sintomas motores mais comuns são: tremor, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural (postura curvada). Já entre os sintomas não-motores os mais comuns são: depressão, ansiedade, distúrbios no sono, alterações no olfato, demência, alterações de humor, paranoia, psicose, disfunção do sistema nervoso autônomo e problemas cognitivos. A depressão é o sintoma não-motor mais comum apresentado pelos pacientes, sendo mais frequente e profunda em

pacientes com início precoce da PD (Sami *et al.*, 2004, Andrade *et al.*, 2006, Tolosa *et al.*, 2006; Poewe *et al.*, 2017; Schapira *et al.*, 2017; Balestrino & Schapira, 2018).

A PD pode ser classificada de acordo com a idade ao surgimento dos sintomas:

Classificação:	Início dos sintomas
PD juvenil (PDj)	abaixo de 20 anos
PD início precoce (PDEO - <i>early onset</i>)	entre 21 e 55 anos
PD início tardio (PDLO - <i>late onset</i>)	acima dos 55 anos de idade

O principal marcador neuropatológico da doença é a presença de corpos ou neuritos de Lewy, constituídos por agregados da proteína alfa-sinucleína (aSyn) e que possuem efeito citotóxico para as células neurais, no cérebro dos pacientes acometidos pela doença. Utilizando marcadores neuropatológicos (corpos ou neuritos de Lewy) imunopositivos para a aSyn, a PD pode ser dividida em 6 estágios conforme as estruturas atingidas (Andrade *et al.*, 2006; Poewe *et al.*, 2017):

Estágio	Regiões cerebrais atingidas
1	núcleo motor dorsal, nervos glossofaríngeo e vago
2	núcleos da rafe, núcleo reticular e gigantocelular e do <i>locus ceruleus</i>
3	parte compacta da substância negra do mesencéfalo
4 e 5	regiões proencefálicas do mesocórtex temporal
6	área do neocórtex, pré-motora e motora primária

Portanto, a PD apresenta um conjunto de sintomas que podem ter diferentes níveis de gravidade e iniciar em diferentes estágios da vida dependendo de cada indivíduo (Poewe *et al.*, 2017; Schapira *et al.*, 2017; Balestrino & Schapira, 2018).

Alguns sintomas encontrados na PD também podem ser observados em outras doenças e são coletivamente chamados de parkinsonismo. Este é classificado como: primário ou idiopático (PDi); secundário ou adquirido (fatores ambientais); parkinsonismo hereditário (ou familiar PDf); e degeneração de múltiplos sistemas ou parkinsonismo-plus (inclui atrofia de múltiplos sistemas, paralisia supranuclear progressiva, degeneração corticobasal e demência com corpos de Lewy).

Muitas características como tremor, anormalidades precoces na marcha, instabilidade postural e resposta ao medicamento levodopa (LDOPA) podem ser usadas para diferenciar a PD de outras desordens parkinsonianas. Como não há um teste diagnóstico definitivo, as manifestações clínicas geralmente são usadas pelos médicos como critério para a diferenciação (Hughes *et al.*, 1992, 2001; Jankovic,

2008). Essa sobreposição entre as manifestações clínicas complicam o diagnóstico definitivo da doença, sendo que muitas vezes só é possível após exames *post mortem*.

1.3. Doença de Parkinson - Neurônios dopaminérgicos

A PD está associada à perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo A9 (mDAN) localizados na parte compacta da substância negra (*substantia nigra pars compacta* - SNpc). A PD afeta mais homens do que mulheres, porém, os sintomas no sexo feminino são mais agressivos e a expectativa de vida após o diagnóstico é menor (Poewe *et al.*, 2017). Os mDAN são responsáveis pela produção e direcionamento da dopamina a determinadas regiões do estriado (gânglios basais do putamen e núcleo caudado) que controlam áreas motoras e cognitivas do cérebro (encéfalo). A morte neural dopaminérgica diminui a produção do neurotransmissor dopamina (DOPA), causando a perda do controle cognitivo e motor destas áreas cerebrais e resultando nos sintomas da PD. O sistema dopaminérgico não é exclusivamente afetado, também ocorre comprometimento dos sistemas colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos (Andrade *et al.*, 2006; Gasser, 2007; Davis, 2016; Poewe *et al.*, 2017).

Embora ainda não seja totalmente conhecido porque os mDAN são mais susceptíveis aos efeitos deletérios causados por mutações em genes correlacionados à estas doenças (Pitcairn *et al.*, 2019; Do *et al.*, 2019). Acredita-se que seja devido a fatores moleculares específicos (Brichta & Greengard, 2014) e à peculiaridade desse tipo celular de interagir ativamente com o ferro, diferentemente de outros neurônios. Além disso, esses neurônios possuem axônios longos (até 4,5 m) com inúmeras sinapses (1 - 2,4 milhões/mDAN), alta variação de cálcio intracelular que demanda muita energia, metabolismo da DOPA que pode produzir espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) e diminuir a atividade lisossômica (Poewe *et al.*, 2017, Masato *et al.*, 2019).

1.4. Doença de Parkinson - Riscos

A PD é considerada uma doença multifatorial porque embora a susceptibilidade genética possa ser preponderante para a manifestação dos sintomas, também é influenciada pela idade (envelhecimento), fatores ambientais e

epigenéticos (Davie 2008; Shulman *et al.*, 2011; Davis & Racette, 2016; Lill, 2016; Poewe *et al.*, 2017).

Cerca de 90% dos casos da PD ocorrem de forma desconhecida (idiopática), sendo que o envelhecimento aparentemente é o principal fator de risco para seu desenvolvimento. Entre os fatores ambientais, os mais conhecidos são: exposição ou consumo de pesticidas, traumas cranianos, moradia em zonas rurais e consumo de água de poço, entre outros (Samii *et al.*, 2004; Poewe *et al.*, 2017). Diferentes substâncias foram identificadas como causadoras da doença e têm sido amplamente utilizadas em pesquisas para provocar lesões no sistema nigroestrial em modelos animais e celulares para o estudo da PD, entre elas: pesticidas (rotenona e paraquát) MPTP (metilfeniltetraidropirimidina), neurotoxina 6-OH-dopamina, e lipossacarídeos (LPS).

Também existem fatores ambientais considerados neuroprotetores: prática moderada de exercícios, hábito de fumar, consumo de cafeína, entre outros (Samii *et al.*, 2004; Poewe *et al.*, 2017; Munoz & Fujioka 2018; Stephano *et al.*, 2018). Ou seja, pessoas com estes estilos de vida possuem menor predisposição de desenvolverem a DP.

1.5. Doença de Parkinson - Genética

A PD pode ser classificada em 3 tipos: familiar (PDf) representando entre 5 - 10% dos casos, idiopática (PDi) e esporádica (PDs), sendo que as duas últimas formas representam cerca de 90 a 95% dos casos. As formas familiares da PD têm herança mendeliana autossômica dominante ou recessiva, e a maioria dos genes envolvidos já foram identificados (Tabela 1). Na PD esporádica, a mutação causadora da doença é conhecida mas não é herdada. Já a PD idiopática não possui uma causa conhecida, podendo ser causada por fatores ambientais e/ou genéticos (Tabela 1), muitos deles ainda desconhecidos (Feany, 2004; Samii *et al.*, 2004; Shulman *et al.*, 2011, Domingo *et al.*, 2018; Del Rey *et al.*, 2018, Balestrino & Schapira, 2018).

Tabela 1: Genes associados à Doença de Parkinson, gene *GBA* em destaque (mutações neste gene em homozigose causam a doença de Gaucher) (modificado de Schulte & Gasser, 2011; Del Rey *et al.*, 2018; Toffoli *et al.*, 2020).

Símbolo	Gene	Localização Cromossômica	Proteína com Função	Tipo de herança	Fator de risco relevante para PD esporádica	Início dos sintomas
PARK1/PARK4	<i>SNCA</i>	4q21.3-q22	Desconhecida	AD + risco	Sim	Tardio/Precoce, demência
PARK2	<i>Parkin</i>	6q25-q27	Mitocondrial	AR	Não	Precoce
PARK3	Desconhecido	2p13	?	AD	?	Tardio
PARK5	<i>UCHL1</i>	4p13	Ubiquitina-proteossomo	AD	Não	Tardio
PARK6	<i>PINK1</i>	1p36.12	Mitocondrial	AR	Não	Precoce
PARK7	<i>DJ1</i>	1p36.23	Mitocondrial	AR	Não	Precoce
PARK8	<i>LRRK2</i>	12q12	Lisossômica	AD + risco	Sim	Tardio
PARK9	<i>ATP13 A2</i>	1p36	Lisossômica	AR	Não	Precoce, Síndrome Kufor-Rakeb
PARK11	<i>GIGYF2</i>	2q36-7	Sinalização de IGF-1	AR	Não	Tardio
PARK13	<i>HTRA2</i>	2p13.1	Mitocondrial	AD	Não	Desconhecido
PARK14	<i>PLA2G6</i>	22q13	Homeostase (membrana)	AR	Não	Precoce, Distonia-parkinsoniana
PARK15	<i>FBXO7</i>	22q12-q13	Mitocondrial	AR	Não	Precoce, Síndrome pálido-piramidal
			Ubiquitina- proteossomo			
PARK17	<i>VPS35</i>	16q12	Tráfego vesicular	AD	Não	Tardio
PARK18	<i>EIF4G1</i>	3q27.1	Síntese proteica	AD	Não	Tardio
PARK19	<i>DNAJC6</i>	1p31.3	Endocitose (sinapse)	AR	Não	Precoce
PARK20	<i>SYNJ1</i>	21q22.11	Endocitose (sinapse)	AR	Não	Precoce
PARK21	<i>DNAJC13</i>	3q22.1	Formação vesicular	AD	Não	Tardio
PARK22	<i>CHCHD2</i>	7p11.2	Mitocondrial	AD	Não	Tardio / Início precoce
PARK23	<i>VPS13C</i>	15q22.2	Mitocondrial	AR	Sim	Precoce

AD = autossômica dominante; AR = autossômica recessiva

Mutações nos genes associados à PD podem causar a disfunção de diversas organelas (ex: mitocôndrias e lisossomos), interrompendo o funcionamento normal de diversos processos celulares vitais para a homeostase celular (ex: geração de energia e degradação proteica) (Figura 4). Embora com mecanismos diferentes, todas as mutações compartilham a característica de causar o acúmulo da aSyn, aumentar a produção de ROS e diminuir a atividade lisossômica com comprometimento da autofagia (Sidransky *et al.*, 2009; Schulte and Gasser, 2011; Sassi, 2011; Poewe *et al.*, 2017; Schapira *et al.*, 2017; Domingo *et al.*, 2018; Balestrino & Schapira, 2018; Do *et al.*, 2019; Pitcairn *et al.*, 2019).

Figura 4: Esquema representativo de um neurônio dopaminérgico e os principais mecanismos celulares afetados pela doença de Parkinson e doença de Gaucher: **A** - Macroautofagia **B** - Autofagia mediada por chaperonas (CMA) **C** - Homeostase mitocondrial; **D** - Tráfego intracelular anterógrado e retrógrado; **E** - Tráfego de vesículas e liberação de neurotransmissores; **F** - Transporte proteico do retículo endoplasmático (ER) ao complexo de Golgi (GA); **G** - Arquitetura nuclear. Abreviaturas: Ca^{2+} = cálcio; $\Delta\Psi$ = potencial de membrana mitocondrial (retirado de Weykopf *et al.*, 2019).

Esta interação entre fatores genéticos e/ou fatores ambientais podem causar uma série de eventos deletérios para os neurônios tais como: acúmulo de aSyn, mitofagia, bloqueio da autofagia, estresse no retículo endoplasmático, estresse oxidativo, excitotoxicidade e fatores gliais inflamatórios que culminam com a morte neural (Andrade *et al.*, 2006; Corti *et al.*, 2011; Saiki *et al.*, 2012; Davis & Racette, 2016; Poewe *et al.*, 2017).

Entre os seis genes identificados como fatores de risco para o desenvolvimento da PD, atualmente o gene *GBA* é considerado o mais relevante. Mutações no *GBA* são consideradas como maior fator genético de risco para o acúmulo de aSyn e o desenvolvimento da PD e outras sinucleinopatias (doenças

causadas pelo acúmulo desta proteína) (Tabela 1) (Sidransky *et al.*, 2009; Sidransky & Lopez, 2012; Sardi *et al.*, 2015; Domingo *et al.*, 2018; Riboldi *et al.*, 2019; Do *et al.*, 2019; Pitcairn *et al.*, 2019).

1.6. Gene *GBA*

O gene *GBA*, localizado na região 1q21, codifica a enzima lisossômica glicocerebrosidase (ou β -glicosidase ácida - GCCase). A GCCase é responsável por degradar dois tipos de glicosíesfingolípídeos: glicosílecramida (ou glicocerebrosídeo - GCer) e glicosíesfingosina (GCsph), produtos oriundos da degradação de membranas celulares (principalmente de hemácias e leucócitos) (Figura 5). Esta reação de catálise ocorre principalmente em macrófagos, que se localizam em grande parte no fígado, baço e medula óssea (Beutler & Grabowski, 1998, 2001; Dvir *et al.*, 2003; Sidransky, 2004; Grabowski, 2008).

Figura 5: Reação de hidrólise da glicosílcramida (GCer) e da glicosíesfingosina (GCsph) pela glicocerebrosidase (GCCase) em glicose e ceramida ou esfingosina (modificado de Do *et al.*, 2019)

Mutações em homozigose no gene *GBA* causam a doença de Gaucher (GD - Gaucher Disease), a principal doença de armazenamento lisossômico, descrita pela primeira vez por Phillipe Charles Ernest Gaucher em 1882. Grandes depósitos de GCer e GCsph não degradados são encontrados principalmente nos lisossomos dos macrófagos de indivíduos com deficiência na GCCase devido à decomposição catalítica lisossômica ser parcial ou nula. Devido à presença do material não digerido nos lisossomos, os macrófagos apresentam tamanho aumentado (conhecidos como células de Gaucher) e curiosamente com prazo de vida muito maior do que um macrófago normal (Beutler & Grabowski, 1998, 2001). O acúmulo lisossômico do GCer também pode afetar a estrutura e função de outras células, tecidos e órgãos. No sistema nervoso central (SNC), este substrato acumulado nas células pode ter

efeitos citotóxicos para os neurônios (Ellinwood *et al.*, 2004; Sidransky, 2004; Sidransky, 2009).

1.7. Associação da Doença de Parkinson e Gaucher

Em 1996 um trabalho descreveu pacientes com a GD e PD simultaneamente (Neudorfer *et al.*, 1996). Trabalhos subsequentes também identificaram que a mutação N3070S no gene *GBA* era mais frequente nos pacientes com a PD/GD (Machaczka *et al.*, 1999; Tayebi *et al.*, 2001; Bembi *et al.*, 2003; Tayebi *et al.*, 2003). Em 2003, uma pesquisa mostrou pela primeira vez a presença de Corpos de Lewy em indivíduos com GD e PD, observando que o início dos sintomas parkinsonianos eram precoces (PDEO - Early-Onset), e sugerindo que a deficiência na GCase poderia predispor à vulnerabilidade ao parkinsonismo (Tayebi *et al.*, 2003). Outros achados sugeriam que as mutações no gene *GBA*, mesmo em indivíduos heterozigotos, poderiam ser um fator de risco hereditário para o desenvolvimento do Parkinson (Hruska *et al.*, 2006).

Durante a primeira década do século XXI, vários trabalhos identificaram pacientes de diferentes populações apresentando ambas as doenças (Machaczka *et al.*, 1999; Perez-Calvo *et al.*, 2000; Tayebi *et al.*, 2001; Várkonyi *et al.*, 2002; Bembi *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003; Spitz *et al.*, 2006), além de heterozigotos para mutações no gene *GBA* apresentando PD (Tayebi *et al.*, 2003; Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Goker-Alpan *et al.*, 2004; Lwin *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2005; Eblan *et al.*, 2005), inclusive na população brasileira (Spitz 2006; Spitz *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2019). Curiosamente, esses pacientes com mutações em *GBA* frequentemente apresentavam início precoce dos sintomas parkinsonianos (entre 40 e 55 anos - Early Onset) do que naqueles sem mutações no gene *GBA* (Sato *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007; Manning-Bog *et al.*, 2009; Mitsue *et al.*, 2009; Goker-Alpan *et al.*, 2008; Sidransky *et al.*, 2009; Sidransky & Lopez, 2012).

A confirmação dessa associação decorreu de um trabalho multicêntrico com a colaboração de 16 centros de pesquisa de 12 países que, analisando 4898 controles, observaram apenas 1% com mutações no gene *GBA*. Já entre os 5.691 pacientes com PD analisados, as mutações N370S e L444P em *GBA* foram identificadas em 3% das amostras, e em laboratórios que sequenciaram completamente o gene *GBA* (1883 amostras), as mutações foram identificadas em

até 7% dos casos com PD (Sidransky *et al.*, 2009). Em 2012, outro estudo foi realizado com 29 centros de pesquisa confirmando a frequência aumentada de mutações no gene *GBA* em pacientes com PD de diferentes populações (Sidransky & Lopez 2012). Desde então, é aceito que a frequência de mutações no gene *GBA* é de 1% na população geral, de 2 a 3% em pacientes com PD (podendo chegar a 7% dependendo da análise), e de 5 a 10% na população Judaica Ashkenazita (Sidransky *et al.*, 2009; Sidransky & Lopez 2012).

Atualmente, é aceito que mutações no gene *GBA* é o fator de risco genético mais comum para a PD multifatorial já identificado (Sidransky *et al.*, 2009; Sardi *et al.*, 2011; Sidransky & Lopez 2012; Schulte & Gasser, 2011; Sardi *et al.*, 2013; Woodard *et al.* 2014; Sardi *et al.*, 2015; Schapira, 2015; Sardi *et al.*, 2015; Mazzulli *et al.*, 2016; Mazzulli *et al.*, 2016a; Aflaki *et al.*, 2016; Aflaki *et al.*, 2017; Gegg & Scharpia, 2018; Balestrino & Schapira 2018; Sardi *et al.*, 2018; Mullin *et al.*, 2019).

Do ponto de vista fenotípico, o início dos sintomas da PD é uma característica que diferencia os pacientes com e sem mutações no gene *GBA*. Indivíduos com mutação neste gene tendem a apresentar início precoce dos sintomas parkinsonianos em torno dos 50-55 anos (Early Onset), especificamente, acúmulo de aSyn e GCer, e presença de Corpos de Lewy com sintomas semelhantes às formas idiopáticas da PD com início precoce (Sidransky *et al.*, 2009; Sidranky & Lopez 2012).

Também foi observado que diferentes regiões do cérebro *post mortem* (inclusive a SNpc) de pacientes com iPD (heterozigotos ou não para mutações no gene *GBA*) apresentavam baixos níveis de atividade enzimática da GCase (Gegg *et al.*, 2012), maior acúmulo de ferro (Chinta & Anderson, 2005; Oakley *et al.*, 2007; Zecca *et al.*, 2008; Double *et al.*, 2010; Gegg *et al.*, 2012; Ayton & Lei, 2014; Powe *et al.*, 2017), menor concentração de neuromelanina (Zecca *et al.*, 2001; Zecca *et al.*, 2003; Zucca *et al.*, 2004; Zecca *et al.*, 2008; Zucca *et al.*, 2017; Poewe *et al.*, 2017; Zucca *et al.*, 2018), dopamina e tirosina hidroxilase (TH) (Brichta & Greengard, 2014; Poewe *et al.*, 2017).

Normalmente, a aSyn é degradada nos lisossomos e não ocorre acúmulo proteico (aSyn ou GCase) ou lipídico (GCer ou GCsph) (Figura 6A1). Em alguns indivíduos com mutação no gene *GBA*, o acúmulo de GCer ocorre mas é insuficiente para induzir a formação de oligômeros tóxicos de aSyn – a atividade catalítica da GCase é suficiente para degradar GCer gerando um baixo acúmulo deste (Figura

6A2). Em outros indivíduos, a mutação no gene *GBA* resulta em grande acúmulo de GCer induzindo as formas oligoméricas da aSyn, fazendo com que se agreguem e formem os corpos de Lewy, desencadeando o processo de neurotoxicidade e morte neural (Figura 6A3) (Mazzulli *et al.*, 2011; Kinghorn, 2011; Sidransky & Lopez, 2012; Schapira, 2015). Também foi demonstrada a interação proteica entre a aSyn e a GCCase (Yap *et al.*, 2013), sugerindo que a aSyn pode atrapalhar o transporte vesicular e direcionamento da GCCase do retículo endoplasmático e complexo de Golgi aos lisossomos, contribuindo para seu acúmulo (Figura 6B) (Mazzulli *et al.*, 2016a).

Figura 6: Esquema representativo da interação da glicocerebrosidase (GCCase) com a α -sinucleína (aSyn): **A1** - GCCase sem mutação no gene *GBA*, lisossomo com funcionamento normal, sem acúmulo de lipídeo (GCer) ou aSyn; **A2** - GCCase com mutação, lisossomo com atividade normal, baixo acúmulo de GCer e aSyn; **A3** - GCCase com mutação, lisossomo com atividade comprometida, alto acúmulo de GCer e aSyn e formação de agregados tóxicos de aSyn (retirado de Sidransky & Lopez 2012); **B** - Interação entre a aSyn e GCCase (retirado de Yap *et al.*, 2013).

Animais transgênicos possuindo mutações nos genes *GBA* e *SNCA* que apresentavam acúmulo de aSyn e GCer nos neurônios foram injetados com adenovírus expressando a GCCase selvagem exógena. A expressão da GCCase exógena mediada pelo adenovírus diminuiu o acúmulo GCer e agregados de a-Syn revertendo o fenótipo celular da doença e melhorando a memória dos modelos (Sardi *et al.*, 2011; 2013). Estes resultados evidenciam que mecanismos enzimáticos do lisossomo contribuem para o desenvolvimento de sinucleopatias em indivíduos com mutações no gene *GBA* (Sardi *et al.*, 2018).

Um trabalho abrangente usando células corticais de um modelo animal com GD e células humanas observou que a perda da função da GCase causa acúmulo da aSyn, que por sua vez diminui a atividade da GCase resultando em neurotoxicidade. Esse trabalho também mostrou que a GCase mutada faz com que a GCer se acumule induzindo a formação de oligômeros de aSyn, de agregados de aSyn e Corpos de Lewy. Estes agregados também podem interferir no transporte da GCase do retículo endoplasmático ao complexo de Golgi, aumentando o acúmulo de GCer e consequentemente de aSyn (Mazzulli *et al.*, 2011) (Figura 7A e B).

Figura 7: Esquema representativo do mecanismo de interação entre o glicocerebrosídeo (GCer) e a a-sinucleína (aSyn). Mutações no gene *GBA* geram elevados níveis de GCer que diminuem a degradação correta da aSyn pelos lisossomos dos neurônios dopaminérgicos. Este mau funcionamento lisossomal, acarreta o acúmulo de aSyn e formação de oligômeros e fibrilas insolúveis que formam os Corpos de Lewy culminando com a morte neural **A** - Formação dos agregados de aSyn insolúveis (retirado de Mazzulli *et al.*, 2011); **B** - Formação do Corpos de Lewy (retirado de Stojkowska *et al.*, 2018). ER = Retículo endoplasmático; Golgi = complexo de Golgi

Esse trabalho mostrou que a aSyn interfere no funcionamento normal da GCase em neurônios e amostras cerebrais de indivíduos com PDi sugerindo que a diminuição nos níveis de GCase contribui para a patogênese de sinucleinopatias esporádicas. Foi então proposto o mecanismo de patogenicidade em que o efeito bidirecional de aSyn e GCase formam um loop de feedback positivo (Mazzulli *et al.*, 2011).

Diferentes hipóteses têm sido propostas para essa associação. As duas mais aceitas são o de ganho de função (tóxico), em que as mutações causam a formação de agregados de aSyn citotóxicos; e o de perda de função, em que mutações

causam disfunção lisossômica ocorrendo acúmulo de lipídeo (GCer) e induzindo a formação de agregados de aSyn (Figura 8A) (Feany, 2004; Wong *et al.*, 2004; Sidransky *et al.*, 2009; Goker-Alpan *et al.*, 2010; Mazzulli *et al.*, 2011; Sidransky & Lopez, 2012).

Figura 8: Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na associação da doença de Parkinson e mutações no gene *GBA*: **A** - Mecanismo de perda de função: loop patogênico de feedback positivo proposto por Mazzulli *et al.* 2011; **B** - Mecanismo de ganho de função: efeito tóxico da aSyn vinculando a GCase mutante à neurotoxicidade aSyn (modificado de Mazzulli *et al.*, 2011; Kinghorn, 2011).

1.8. Doenças causadas pelo acúmulo de aSyn (Sinucleinopatias)

O acúmulo da aSyn também é o principal achado em outras doenças neurodegenerativas como Demência com Corpos de Lewy (ou LBD - *Lewy Body Disease*), demência neurodegenerativa com sintomas parkinsonianos, Doença de Alzheimer (ou AD - *Alzheimer Disease*) com presença de corpos de Lewy (LB - *Lewy Body*) e Atrofia do Sistema Múltiplo (MSA – inclusões de alfa-sinucleína nos oligodendrócitos) (Soto, 2003; Andrade *et al.*, 2006; Schulz-Schaeffer, 2010; Auluck *et al.*, 2010; Nalls *et al.*, 2013). Assim, essas doenças são denominadas sinucleinopatias, doenças causadas pelo acúmulo de aSyn fibrilar, formando agregados proteicos na forma de corpúsculos de inclusão insolúveis citotóxicos, denominados LB ou neuritos de Lewy (LN - *Lewy Neurites*), causando tanto a neurodegeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da parte compacta da

substância negra (*substantia nigra pars compacta* - SNpc) do mesencéfalo quanto de outras áreas do cérebro (Siebert *et al.*, 2014).

Embora o acúmulo de aSyn possa ser considerado uma forma neuroprotetora adotada pelas células, mutações em diversos genes também podem causar o mau funcionamento de diferentes organelas e processos celulares resultando no seu acúmulo (ex: diferentes mutações causadoras da PD, Tabela 1). Estas mutações compartilham a característica de aumentarem o estresse oxidativo celular e induzirem a produção de LB por diferentes mecanismos celulares resultando em toxicidade através de respostas inflamatórias que culminam com a morte neural (Figura 9) (Samii, 2004; Jankovic, 2008; Davis & Racette, 2016; Poewe *et al.*, 2017).

Figura 9: Esquema representativo de um neurônio dopaminérgico, mostrando os diferentes mecanismos celulares afetados por mutações correlacionadas ao acúmulo de aSyn na doença de Parkinson. (modificado de Poewe *et al.*, 2017).

A frequência aumentada de mutações no gene *GBA* também tem sido relatada em pacientes com Demência com Corpos de Lewy (LDB). Portanto, mutações no gene *GBA* também representam um importante fator de risco para o desenvolvimento de sinucleinopatias (Sardi *et al.*, 2015). O mecanismo patobiológico comum entre GD, PD e LBD é que mutações no gene *GBA* causam defeito nos

lisossomos, acumulando tanto GCer quanto aSyn que resulta na formação de Corpos de Lewy (Wong *et al.*, 2004; Goker-Alpan *et al.*, 2006; Bonifati, 2007; Manning-Bog *et al.*, 2009).

Imunofluorescência para anticorpos contra glicocerebrosidase e aSyn em amostras de tecido cerebral (*post mortem*) de pacientes com PD e GD, PD com mutação em heterozigose em *GBA*, e LBD revelou que as proteínas GCase e aSyn se co-localizavam, sugerindo a interação entre elas (Goker-Alpan *et al.*, 2010). Ao longo dos anos, novos achados foram encontrados relacionando a aSyn com mutações no gene *GBA* (Sardi *et al.*, 2015; Pitcairn *et al.*, 2019; Do *et al.*, 2019) (Figura 10).

Figura 10: Esquema dos mecanismos celulares potencialmente envolvidos na formação dos corpos de Lewy pelo acúmulo da a-sinucleína (aSyn) decorrente à baixa atividade catalítica da GCase: **A** - pode gerar mal funcionamento autofágico resultando no aumento dos níveis de aSyn e diminuindo a degradação proteica e mitocondrial (mitofagia); **B** - alteração na composição da membrana lipídica desencadeando o acúmulo da aSyn; **C** - Pode sobrecarregar a via de degradação associada ao retículo endoplasmático (ER) levando ao acúmulo de aSyn e ativação de sinais de estresse do ER; **E** - Pode aumentar a progressão da doença através da propagação da transmissão de célula a célula da aSyn na forma oligomérica; **D** - A ligação da aSyn à GCase pode deslocar sua proteína ativadora (saposina C - SapC) diminuir ainda mais sua atividade catalítica. **Centro:** Modelo hipotético para agregação da aSyn: proteína selvagem (não mutada) pode sofrer dobramento incorreto (alteração conformacional) sob condições patológicas e oligomerizar (tóxica). A forma oligomérica tóxica continua a formar fibrilas amilóides maiores e subsequentes corpos de Lewy. (retirado de Sardi *et al.*, 2015).

Assim, a compreensão da relação entre glicosílesfingolípídeos (GCer e GCsph), GCase e alfa-sinucleína e aumentará o conhecimento dos mecanismos envolvidos na patobiologia da PD e LBD. Eventualmente, esta compreensão pode possibilitar a criação e desenvolvimento de novos tratamentos para essas doenças.

1.9. Doença de Parkinson - Diagnóstico de Tratamento

Geralmente o diagnóstico de Parkinson ocorre quando o paciente já perdeu cerca de 60% ou mais dos neurônios dopaminérgicos (Noyce *et al.*, 2016, Poewe *et al.*, 2017, Schapira *et al.*, 2017). Isso representa um fator limitante para o tratamento da PD, já que as terapias atuais são incapazes de induzir a proliferação neural. Um grande esforço tem sido aplicado para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico (Yazdani *et al.*, 2019) que identifique os pacientes em um estágio precoce em que os tratamentos previnam a morte neural (Poewe *et al.*, 2017).

Atualmente os tratamentos farmacológicos para a PD são apenas paliativos, podendo melhorar tanto os sintomas motores quanto não-motores, mas não prevenindo a progressão da neurodegeneração (Samii, 2004; Poewe *et al.*, 2017) (Figura 11).

Figura 11: Esquema representativo de um neurônio dopaminérgico (amarelo) e um neurônio receptor (verde) e os alvos dos medicamentos (caixas em verde): **A** - Levodopa (LDOPA), precursor da dopamina; **B** - Agonistas dopaminérgicos; **C** - Drogas inibidoras da catecol-orto-metiltransferase (COMT); **D** - Inibidores da MAO-B (enzima monoamina oxidase B que metaboliza a dopamina) que mantém a DOPA na fenda sináptica por mais tempo; **E** - Inibidor de AADC (L-Aminoácido aromático descarboxilase), inibe a síntese de DOPA aumenta a eficiência da conversão LDOPA em DOPA na célula. Abreviaturas: TH = Tirosina hidroxilase; DAT (*dopamine active transporter* - SLC6A3) = Proteína recaptadora de dopamina na fenda sináptica; D1R e D2R = receptores de dopamina; BBB (*Blood Brain Barrier*) = barreira hematoencefálica; *Blood* = sangue; *Brain* = cérebro (retirado de Poewe *et al.*, 2017).

1.10. Modelos de hiPSCs para o estudo da PD

Com o desenvolvimento da técnica de reprogramação de células somáticas humanas em células pluripotentes, chamadas de células pluripotentes induzidas (iPSC - *Induced Pluripotent Stem Cells*), uma série de modelos celulares para doenças com componentes genéticos vêm sendo desenvolvidos (Lai *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2011; Li & Belmonte, 2016; Omole & Fakoya, 2018).

Vários trabalhos relatam o estabelecimento de linhagens hiPSC oriundas de amostras de pacientes o estudo da PD (Park *et al.*, 2008; Saha & Jaenisch, 2009; Kriks *et al.*, 2011) e da GD (Park *et al.*, 2008,). A possibilidade de diferenciar hiPSCs em neurônios dopaminérgicos permitiu o estudo de doenças cerebrais (Machetto *et al.*, 2010; Brennand *et al.*, 2011; Paulsen *et al.*, 2012), incluindo a PD (Soldner *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2011; Kriks *et al.*, 2011; Mazzulli *et al.*, 2011).

Nosso grupo trabalha na caracterização genética de pacientes com GD na população brasileira há 15 anos, tendo analisado as mutações no gene *GBA* em mais de 1000 indivíduos (Rozenberg *et al.*, 2006, 2006a) e realizado a triagem da mutação G377S na cidade de Tabuleiro do Norte, identificando um efeito fundador nesta pequena cidade (Chaves *et al.*, 2011; 2015).

Uma colaboração com o grupo do Dr. Egberto Reis Barbosa (Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) foi estabelecida para estudar a associação entre PD e mutações *GBA*, descrevendo um paciente com a GD e PD (Spitz *et al.*, 2006). Posteriormente, mutações no gene *GBA* foram analisadas em 65 pacientes da PD, identificando dois indivíduos com PD heterozigotos para a mutação L444P (Spitz *et al.*, 2008). Também foi realizada a análise da mutação G2019S no gene *LRRK2* e mutações no gene *GBA* em 100 pacientes com Parkinson idiopático com início tardio para o estabelecimento de sua frequência na população brasileira (Chien *et al.*, 2014).

Com a identificação desses pacientes com PD e mutações em *GBA*, criou-se a possibilidade de se estabelecer modelos *in vitro* para o estudo do papel de *GBA* no desenvolvimento da PD. O objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos de patogenicidade pelos quais mutações no gene *GBA* contribuem para o desenvolvimento da doença de Parkinson.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Principal

Estudar os mecanismos pelos quais mutações no gene *GBA* contribuem para o desenvolvimento da doença de Parkinson.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer linhagens de iPSCs de pacientes com PD com e sem mutações em *GBA*, e controles sem a doença (Tabela 2).

Tabela 2: Grupos fenotípicos e quantidade de amostras por grupo.

	Nº de amostras	Característica da amostra
Grupo 1	3	Controle*
Grupo 2	3	Doença de Parkinson
Grupo 3	2	PD com mutação no gene <i>GBA</i>
	1	PD e GD

* amostras de indivíduos com mais de 60 anos sem doença neurodegenerativa.

- Realizar a diferenciação das iPSCs em neurônios dopaminérgicos A9 da parte compacta da substância negra (*substantia nigra pars compacta*) do mesencéfalo (iDA) em normóxia (20% oxigênio - O₂).

- Analisar a expressão diferencial dos iDA dos diferentes grupos para identificar vias metabólicas alteradas.

2.3. Objetivos secundários

Analisar a expressão diferencial de iDA diferenciados a partir das hiPSCs em hipóxia (5% O₂) e sob efeito de campo magnético externo (EMF - External Magnetic Field) para identificar em qual condição são produzidas células com fenótipo mais similar aos mDAN *in vivo*.

3. Material e métodos

3.1. Coleta das amostras

3.1.1. Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEP-USP) (Protocolo: 112/2010) e para experimentos com animais (Protocolo: 116/2010), pelo conselho Departamental do Depto. de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências (IB) - USP (Ordem Nº: 354-2011, Reunião: 399, Item Nº: 3.2, Data: 02.03.2011), pelo CEP Hemorio (projeto Nº 251/11, Data: 15.03.2011), ao comitê de Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq do Hospital das Clínicas (Nº 0754/11) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), registro Nº 16899, parecer Nº 071/2013, folha de rosto Nº 470021 e registro Nº 25000.069088-2012-57.

Antes das coletas das amostras, o projeto de pesquisa foi explicado aos doadores pelos seus respectivos médicos e todos assinaram e receberam uma cópia do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) aprovado pelos comitês de ética citados acima.

3.1.2. Amostragem

O critério para inclusão e exclusão para GD foi fundamentado no genótipo (através do diagnóstico molecular da DG realizado por nosso laboratório) e pelo fenótipo (através das manifestações clínicas apresentadas pelos doadores e classificados por seus médicos) identificados nos trabalhos Spitz *et al.*, 2006 e 2008. A triagem dos pacientes com PD acompanhados pela Divisão de Distúrbios do Movimento da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo sob supervisão do Dr. Egberto Reis Barbosa e Dra. Susan Chien foi fundamentada no diagnóstico clínico de acordo com o critério do Banco de Cérebro da Sociedade da Doença de Parkinson do Reino Unido (United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank - Hughes *et al.*, 1992; Hughes *et al.*, 2001) identificados no trabalho Chien *et al.*, 2014. Os controles com idade avançada (acima de 60 anos) não apresentavam sintomas da DP, DG ou doença neural. Nenhum dos participantes do estudo possuía origem judaica (esta população representa apenas 0,06% do total da

população brasileira, Spitz *et al.*, 2008). O estudo foi realizado com 9 amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMNC - *peripheral blood mononuclear cells*) coletadas e reprogramadas em iPSC (Tabela 3).

Tabela 3: Características complementares das amostras coletadas.

Amostra	Nome Alternativo	Gênero	Idade	Etnia	Mutação	Tipo de mutação	Doença
MNC 35	PD-GD	Masculino	51	Europeia (Caucasiana)	N370S L444P	c.1226A > G c.1448 T > C	Doença de Gaucher tipo 1 + Doença de Parkinson
MNC 36	PD-GBA1	Masculino	68	Europeia (Caucasiana)	L444P	c.1448 T > C	Doença de Parkinson com mutação no gene <i>GBA</i>
MNC 37	PD-GBA2	Masculino	60	Asiática/Sul Americana (Caucasiana)	L444P E326K	c.1448 T > C c.1093G > A	Doença de Parkinson com mutações no gene <i>GBA</i>
MNC 38	PD1	Feminino	74	Europeia (Caucasiana)	-----	Não detectada	Doença de Parkinson idiopática
MNC 39	PD2	Masculino	70	Africana/ Sul Americana	-----	Não detectada	Doença de Parkinson idiopática
MNC 40	PD3	Masculino	62	Europeia (Caucasiana)	-----	Não detectada	Doença de Parkinson idiopática
MNC 41*	CT1	Feminino	65	Europeia (Caucasiana)	-----	Não detectada	Sadio
MNC 42*	CT2	Feminino	59	Sul Americana/ Europeia	-----	Não detectada	Sadio
MNC 54*	CT3	Feminino	65	Europeia (Caucasiana)	-----	Não detectada	Sadio

* amostra controle: indivíduo com mais de 60 anos de idade sem doença neurodegenerativa

3.1.3. Genotipagem das amostras

Amostras de esfregaço de mucosa bucal foram coletadas e o DNA genômico (gDNA) foi extraído de acordo com o protocolo de Richards *et al.*, 1993. As mutações no gene *GBA* (N370S, L444P, G377S e E326K) foram analisadas por polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) de acordo com Spitz *et al.*, 2008. Também foi analisada a mutação G2019S no gene *LRRK2* (relacionada à doença de Parkinson de mecanismo hereditário autossômico dominante) de acordo com Chien *et al.*, 2014. O gDNA foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com os respectivos primers para cada mutação e o amplicon gerado foi digerido com a respectiva enzima de restrição (Tabela 4). Após a digestão enzimática dos produtos de PCR, os fragmentados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2% - L444P ou 4% - N370S, G377S, E326K e G2019S). Controles negativos e positivos de cada mutação foram aplicados no gel para comparação.

Tabela 4: Lista dos primers com sua respectiva enzima de restrição para a detecção de mutações no gene *GBA* e para a mutação no gene *LRRK2*.

Genotipagem por FRLP	Mutação	Tamanho do fragmento amplificado	Forward/Reverse primer (5'-3')	Enzima de restrição	Tamanho dos fragmentos após a digestão com as enzimas de restrição	
					Normal	Mutante
Mutações no gene <i>GBA</i> (doença de Gaucher)	N370S	106 pb	GCCTTTGTCCTTACCCTCG/ ACg AAA GTT ACg CAC CCA ATT	<i>Xho</i> I	106	90 pb 16 pb
	L444P	747 pb	ACGAAAGTTACGCACCCAATT/ TTA CCA TCA Agg ATC CTg CTg	<i>Nci</i> I	747 pb	554 pb 193 pb
	<i>GBA</i> Exon 8	301 pb	ACAAATTAGCTGGGTGTGGC/ TAAgCTCAGACTggCCCTgC	Nested PCR		
	E326K		TGTGCAAGGTCCAGGATCAG/ gAggTCTgCTTTgCaggAAg	<i>Bbs</i> I ou <i>Bpi</i> I	272 pb 29 pb	166 pb 135 pb
	G377S	106 pb	GCCTTTGTCCTTACCCTCG/ ACg AAA GTT ACg CAC CCA ATT	<i>Pvu</i> II	106 pb	64 pb 42 pb
Mutação no gene <i>LRRK2</i> (doença de Parkinson)	G2019S	329 pb	TTTTGATGCTTGACATAGTGGAC/ CACATCTgAggTCAgTggTTA TC	<i>Sfe</i> I	228 pb 101 pb	207 pb 101 pb 21 pb

3.2. Reprogramação das células somáticas do sangue periférico em iPSC

3.2.1. Reprogramação dos eritroblastos em iPSC com plasmídeos episomais (MOS, MMK e MBX)

As PBMNCs dos pacientes com a doença de Parkinson idiopática e controles foram isoladas a partir de 16 ml do sangue periférico pela técnica de gradiente do Ficoll (BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate, cat. nº 362761) e criopreservadas em 90% FBS (Thermo Fisher Scientific, USA) e 10% DMSO (Sigma Aldrich) (Dowey *et al.*, 2012).

As amostras de MNCs foram descongeladas durante 1 minuto em banho-maria a 37°C, diluídas em 10 ml de meio de cultura Stem Span SFEM (Stem Cell Technologies, cat. nº 09650) previamente aquecido a 37°C e centrifugadas a 400 *xg* durante 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 ml de meio de cultura MNC específico para eritroblastos composto por: meio StemSpan SFEM acrescido das citocinas: 40 ng/mL IGF-1 100 ng/mL SCF 10 ng/mL IL-3 2U/mL EPO e 1 µM/mL Dexametasona (Tabela 5).

Tabela 5: Citocinas usadas no meio MNC para a cultura e expansão dos eritroblastos.

SCF	Fator de célula tronco	R&D Systems, cat. nº 255-SC
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1	R&D Systems, cat. nº 291-G1
IL-3	Interleucina 3	R&D Systems, cat. nº 203-IL
EPO	Eritropoietina	R&D Systems, cat. nº 287-TC
Dexa	Dexametasona	Sigma-Aldrich, cat. nº D2915

OBS: Reconstituídas conforme instruções do fabricante em Water for Embryo Transfer (Sigma Aldrich cat. nº W1503) ou DMSO Hybri MAX (Sigma-Aldrich, cat.no. D2650.) e quando necessário filtradas (Sterile Syringe Filter PES 0,20 µm, Corning cat nº 431212)

As células foram diluídas em meio MNC na concentração de 2×10^6 cels./ml e transferidas para um poço de uma placa de 6 wells (Corning, cat nº 3516). A placa com a cultura de eritroblastos foi mantida em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ para o crescimento e expansão celular. As trocas do meio de cultura ocorreram a cada 3 dias de intervalo até o 12º dia e a cultura não excedeu o 14º dia (eritroblastos começam a perder o núcleo) (Figura 12). Os eritroblastos foram contados antes de cada troca que foi realizada por meio da centrifugação das células em tubo de 15 ml a 300 xg durante 10 minutos a 20 °C e posteriormente ressuspensas em meio MNC na concentração de 2×10^6 cels./ml (nos dias 3 e 6) ou 1×10^6 cels./ml (nos dias 9 e 12) (Chou *et al.*, 2011; Dowey *et al.*, 2012).

Figura 12: Esquema representativo do cultivo e expansão dos eritroblastos presentes no sangue periférico.

Após a expansão dos eritroblastos (entre o 12º e 14º dia), 2×10^6 células foram transfectadas por nucleoporação com os plasmídeos (Addgene, cat. nº 64121, 64120 e 64122): 4 µg MMK (expressando *cMYC* e *KLF4*), 4 µg MOS (expressando *OCT4* e *SOX2*) e 2 µg MBX (expressando *BCL-XL* humano) usando o kit de

nucleoporação da empresa Lonza para células CD34 (Amaxa[®] Human CD34⁺ Cell Nucleofector[®] Kit, cat n° VPA-1003) (Chou *et al.*, 2015). A nucleoporação foi realizada em um equipamento Nucleofector 2b Device (Lonza, cat. n° AAD-1001S) com a programação T-016 seguindo o manual do fabricante (http://bio.lonza.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Generated/Optimized_Protocol_71.pdf) (Dowey *et al.*, 2012).

Após a nucleoporação as células foram incubadas em suspensão com 1,5 ml de meio MNC + citocinas + 0.25 μ M de butirato de sódio (NaB, Sigma Aldrich, cat. n° 303410) durante 24 horas em incubadora úmida a 37°C, 5% CO₂ e 5% O₂ como descrito em Tofoli *et al.*, 2016. Então as células foram transferidas para placas tratadas com Geltrex (Thermo Fisher Scientific, cat. n° A14133-02) e cultivadas com meio MEF = DMEM (Thermo Fisher Scientific, cat. n° 11965) 10% FBS ES-Cell Qualified (ESQ, Thermo Fisher Scientific, cat. n° 16141-079) + Antibiotic-Antimycotic (Thermo Fisher Scientific, cat. n° 15240-062) + Glutamax ((Thermo Fisher Scientific, cat. n° 35050) + 20 ng/ml bFGF (R&D Systems, cat. n° 233FB) + NaB durante 24 horas.

Após 24 horas o meio MEF foi trocado pelo Essential E8 Medium (Thermo Fisher Scientific, cat. n° A15169-01) acrescido de 0.25 μ M NaB + 20 ng/ml bFGF. Após o aparecimento das primeiras colônias o bFGF foi retirado do meio e um pool de clones (colônias) para cada amostra foi expandido e criopreservado em 90% FBS ES-Cell Qualified, 10% DMSO HybriMax (Sigma-Aldrich, cat n° D2650). A linhagens de iPSC foram descongeladas em placas de 6 poços tratadas com Geltrex em meio de cultura Essential E8 + 10 μ M ROCK inhibitor Y-27632 (Sigma-Aldrich, Stemgent ou Peprotech) por 24 horas (após este período o ROCK inhibitor foi retirado). As passagens foram realizadas usando os agentes de dissociação: Versene cell dissociation reagent (Thermo Fisher Scientific, cat. n° 15040-066), Gentle Cell Dissociation Reagent (Stem Cell Research, cat n° 07174) TrypLE Express Enzyme (1X) no phenol red (Thermo Fisher Scientific, cat n° 12604-013) ou Accutase (BD Biosciences, cat n° 561527) e o cultivo das iPSC com Essential E8 Medium e 10 μ M ROCK inhibitor (Y-27632) durante 24 horas após a passagem. As trocas de meio subsequentes foram realizadas somente com Essential E8 medium (Tófoli *et al.*, 2019). Após a 5ª passagem, o NaB foi retirado do meio de cultura (para não interferir o processo de diferenciação) e as culturas passaram a ser cultivadas em incubadora com a concentração atmosférica de O₂ (20%) (Figura 13).

Figura 13: Esquema representativo da reprogramação de eritroblastos com plasmídeos episomais

3.2.2. Reprogramação dos linfócitos em iPSC com Vírus Sendai

Amostras do sangue periférico (PB - peripheral blood) de 1 paciente com a doença de Parkinson + doença de Gaucher e de 2 pacientes com a doença de Parkinson + mutações no gene *GBA* foram coletadas em 3 tubos de 4 ml do tipo Vacutainer com citrato de sódio (BD Biosciences, cat. nº 369714) e processadas com o gradiente de Ficoll - Paque PREMIUM 1,077 (GE HealthCare, cat. nº 17-5442-02) para isolar as células mononucleares do sangue periférico (PBMNC - mononuclear cells). Após o processamento, as PBMNCs foram diluídas em meio de congelamento (90% de FBS e 10% DMSO) criopreservadas durante 24 horas em freezer -80C e posteriormente acondicionadas em nitrogênio líquido.

As MNCs isoladas destes pacientes foram enviadas ao laboratório Harvard Stem Cell Institute iPS Core Facility (Estados Unidos) aos cuidados da Dra. Laurence Daheron e submetidas ao procedimento de reprogramação dos linfócitos em iPSC usando o sistema de vírus Sendai não integrativo (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Thermo Fisher Scientific, cat nº A16517) como descrito por Daheron & D'Souza, 2008. As colônias foram identificadas pela morfologia (ESC-like morphology), separadas e expandidas em placas de 6 poços tratadas com Matrigel (BD Biosciences, cat nº 354277) ou Geltrex usando os meios de cultura Essential E8 ou mTeSR1 (StemCell Technologies, cat nº 05845). Os criostocks foram feitos usando 90% FBS ESQ e 10% DMSO HybriMax. As amostras de iPSC foram descongeladas em placas de 6 poços tratadas com Geltrex e cultivadas com

meio de cultura E8 essencial acrescido de 10 μ M ROCK inhibitor Y-27632 por 24 horas (após este período o ROCK inhibitor não foi adicionado). As passagens foram realizadas usando os agentes de dissociação: Versene cell dissociation reagent, Gentle Cell Dissociation Reagent, TrypLE Express Enzyme (1X) no phenol red ou Accutase. O cultivo das iPSC foi realizado com Essential E8 medium e 10 μ M ROCK inhibitor (Y-27632) durante 24 horas após a passagem e as trocas de meio subsequentes foram realizadas somente com Essential E8 medium (Tófoli *et al.*, 2019).

3.3. Caracterização e verificação de qualidade/integridade das iPSCs

3.3.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

Os procedimentos de coleta, extração e análise da qualidade do RNA para todas as amostras utilizadas no projeto foram realizados seguindo os mesmos protocolos. Os RNAs das células foram coletados com TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, cat nº 15596-026) e armazenados em freezer -80°C. As extrações foram realizadas com o kit RNeasy extraction Kit (Qiagen, cat nº 74106) e tratamento com DNaseI (Ambion, Thermo Fisher Scientific, cat nº AM2222) seguindo as instruções dos fabricantes. A quantificação e verificação da qualidade (RATIO 260/280 entre 1,9 e 2,0) das amostras foram realizadas com auxílio do equipamento Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Uniscience Corporation) e analisadas com o software NanoDrop 1000 v.3.8.1. A verificação de contaminação dos RNAs por gDNA foi realizada pelo ensaio de amplificação do DNA por PCR com a enzima Taq polimerase (Thermo Fisher Scientific, cat. nº 10342020) e analisadas por eletroforese em gel de agarose 2% (Thermo Fisher Scientific, cat nº 15510-027). Para a síntese do cDNA com a enzima de transcrição reversa (Thermo Fisher Scientific, SuperScript™ III Reverse Transcriptase cat. nº 18080-085) por PCR (RT-PCR), foram feitas reações com RNA (RT⁺) e controles sem a amostra de RNA (RT⁻), também analisadas por eletroforese em gel de agarose 2%. A análise de controle de qualidade para a técnica de qRT-PCR foi realizada com reações sem cDNA (NTC - No Template Control) e controles normalizadores (genes House-Keeping) foram incluídos nas análises.

3.3.2. Análise da integração do Vírus Sendai

A ausência da integração do DNA viral (Sendai) às linhagens de iPSC foi confirmada por RT-PCR seguindo as instruções do fabricante (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming manual). Após a 10ª passagem, o RNA total de cada amostra de iPSC reprogramada com o vírus Sendai foi coletado e extraído conforme descrito no tópico anterior. O RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) para os genes *SeV*, *KOS*, *Klf4* e *c-Myc* (Tabela 6) foi realizado com o kit SuperScript III Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, cat nº 18080-085) e GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega, cat nº M5122) seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 6: Lista dos primers para amplificação dos genes de reprogramação presentes no vírus Sendai.

RT-PCR	Alvos	Forward/Reverse primers (5'-3')	Tamanho
Genes do vírus Sendai	<i>SeV</i>	GGATCACTAGGTGATATCGAGCA/ ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATCA	181 bp
	<i>KOS</i>	ATGCACCGCTACGAC GTGAGCGC/ ACCTTGACAATCCTGATGTGG	528 bp
	<i>KLF4</i>	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC/ AATGTATCGAAGGTGCTC AAG	410 bp
	<i>C-MYC</i>	TAACTGACTAGCAGGCTT GTCG/ TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG	532 bp
House-Keeping Gene	<i>GAPDH</i>	TTCGACAG TCAGCCGCATC/ GACTCCACGACGTACTCAGC	352 bp

3.3.3. Análise da integração do plasmídeo episomal

A ausência da integração do DNA dos vetores episomais (MBX, MOS e MMK) ao gDNA das iPSCs geradas foi confirmada por PCR como descrito por Chou *et al.*, 2011. O gDNA foi extraído das linhagens de iPSC após a 5ª passagem usando o kit QIAamp DNA Mini Kit (50) (Qiagen, cat nº 51304) conforme instruções do fabricante. Primers (Tabela 7) para o gene Epstein–Barr nuclear antigen 1 (*EBNA1*) do vetor pCEP4 (usado como backbone destes vetores) foram usados para amplificação do gene nas amostras de gDNA das iPSCs e dos vetores utilizados para a reprogramação (MBX, MOS e MMK - controles positivos). Após a amplificação do gene *EBNA1* os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Tabela 7: Primers utilizados para amplificação do gene *EBNA1* dos vetores episomais.

PCR	Gene alvo	Forward/Reverse primer (5'-3')	Tamanho do fragmento
Plasmídeo Episomal (MBX, MOS, MMK)	<i>EBNA1</i>	TTTAATACGATTGAGGGCGTCT/ GGTTTGAAGGATGCGATTAAG	244 pb

3.3.4. Análise de identidade por microssatélite (STR)

O gDNA foi extraído a partir do esfregaço da mucosa bucal conforme descrito anteriormente e o DNA das PBMNC e iPSCs usando o kit QIAamp DNA Mini Kit (50) (Qiagen, cat nº 51304) para confirmar a identidade das células reprogramadas (iPSC). A análise da genotipagem de microssatélites (ou sequências curtas repetidas em tandem - STR - *Short Tandem Repeats*) das iPSCs e as PBMNCs (ou mucosa bucal) correspondentes foram realizadas usando 50 ng de gDNA amplificado com a Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific, cat nº 11304-011) e o kit AmpFISTR® Identifier® Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, cat nº A26364) seguindo as instruções do fabricante (Sarafian *et al.*, 2018). Dezesesseis STR loci (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818, FGA) foram amplificados e os fragmentos resultantes foram analisados com o software GeneMapper® (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific).

3.3.5. Análise de contaminação por micoplasma

Os testes para a verificação de contaminação por micoplasma foram feitos pela técnica de amplificação do gDNA por PCR com o kit MycoScope PCR Detection Kit (Genlantis, cat nº MY01100) seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%.

3.3.6. Análise da integridade genômica por SNP Array

A integridade genômica das linhagens de iPSC geradas foram avaliadas pela técnica de cariotipagem por SNP-Array (*Single Nucleotide Polymorphism Array*) pela empresa Life&Brain (Alemanha) usando o gDNA das células indiferenciadas (depois de serem passadas por mais de 10 vezes) submetidas ao HumanOmniExpressExome v1.3 DNA Analysis BeadChip (Illumina). Este método não detecta translocações balanceadas.

3.3.7. Análise da pluripotência por ensaio imunocitoquímico

Culturas de iPSC após a 10ª passagem de todas as amostras foram fixadas com 4% paraformaldeído + 4% sacarose durante 15 minutos em temperatura ambiente (RT - *room temperature*), permeabilizadas com 0,5% Triton X100 durante 10 minutos RT e bloqueadas com 2% BSA + 0,2% Tween-20 (solução bloqueio - SB) durante 30 minutos a 37°C. Os anticorpos primários e secundários (Tabela 8) foram diluídos na SB foi e a incubação com foi 1 hora a 37°C. O núcleo celular foi corado com Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, cat nº H3570) na concentração final de 0,5 µg/ml diluído na SB junto com os anticopos 2^{os}. As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal High Content Imaging InCell Analyzer 2200 (GE Healthcare Life Sciences) e analisadas com o programa ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Tabela 8: Lista de Anticorpos usados para os ensaios de imunofluorescência.

	Anticorpo	Diluição	Fabricante, Nº de cat # e RRID*
Marcadores de pluripotência	Mouse anti-OCT4	1:100	Millipore cat# MAB MAB4401, RRID: AB_2167852
	Mouse anti-SSEA4	1:100	StemGent cat# 09-0006, RRID: AB_1512169
	Rabbit anti-SOX2	1:100	Abcam cat# AB22572, RRID: AB_2341193
	Rabbit anti-SOX1	1:100	Abcam cat# ab22572, RRID:AB_778020
	Mouse anti TRA-1-81	1:100	Stemgent (ReproCell) Cat# 09-0011, RRID:AB_1512171
	Mouse anti-cMYC	1:100	Millipore (Calbiochem) cat# OP10-200UG, RRID:AB_564471
	Rat anti-SSEA3	1:100	Millipore (Chemicon) cat# MAB4303, RRID:AB_177628
	Mouse anti-TRA-1-60	1:100	Stemgent (ReproCell) cat# 09-0010, RRID:AB_1512170
Anticorpos secundários	Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (H + L)	1:500	Thermofisher Scientific Cat# A11001, RRID: AB_2534069
	Alexa Fluor 594 Goat anti-rabbit IgG (H + L)	1:500	Thermofisher Scientific Cat#A12012, RRID: AB_2534079

*RRID: antibodyregistry.org

3.3.8. Análise da pluripotência por citometria de fluxo

As células reprogramadas (iPSC) foram dissociadas com Accutase durante 5 minutos a 37°C e filtradas (filtro com membrana de 0,2 µm). Posteriormente foram fixadas e permeabilizadas com os reagentes do kit BD Cytotfix/Cytoperm kit (BD Pharmingen™, cat nº 554714) e incubadas com anticorpos primários conjugados (OCT3/4-PerCP-Cy5.5, SOX2-Alexa647 e NANOG-PE) (Tabela 9) do kit Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit (BD Biosciences, cat. nº 560589) de acordo com as instruções do fabricante. Cinquenta mil eventos foram adquiridos com o equipamento de citometria de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences)

e os resultados foram analisados com o programa BD Accuri C6 software (BD Biosciences).

Tabela 9: Lista de anticorpos utilizados para o ensaio de citometria de fluxo.

Citometria de Fluxo	Anticorpo	Diluição	Fabricante, N° de cat # e RRID*
Fatores de Pluripotência	Mouse anti-OCT3/4-PerCP-Cy5.5 Conjugated	Especificação do fabricante	BD Biosciences Cat# 560589, Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit, RRID: AB_2722505
	Mouse anti-SOX2-Alexa 647 Conjugated	Especificação do fabricante	BD Biosciences Cat# 560589, Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit, RRID: AB_2722505
	Mouse anti-NANOG-PE Conjugated	Especificação do fabricante	BD Biosciences Cat# 560589, Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit, RRID: AB_2722505

*RRID: antibodyregistry.org

3.3.9. Formação de corpos embrióides (EB)

Para demonstrar a diferenciação espontânea das iPSC *in vitro* nos 3 folhetos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme), as culturas de iPSC cresceram até a confluência de 70-80% e as colônias foram fragmentadas com auxílio de uma ponteira de 200 μ l, tratadas com 2 mg/ml de Dispase II (Thermo Fisher Scientific, cat. n° 17105) e incubadas durante 5 minutos a 37°C. Os fragmentos foram lavados 2x com meio de cultivo basal DMEM F12 (Thermo Fisher Scientific, cat. n° 11320), centrifugados 160 xg durante 2 minutos (RT) e transferidos para placas de 6 poços previamente tratadas com agarose 1% para o cultivo em suspensão com o meio de cultura Essential E8. Após 5 dias os EBs foram transferidos para uma placa de 6 poços tratadas com gelatina 0,1% (StemCell Technologies, cat. n° 07903) e cultivadas por mais 16 dias (total de 21 dias) com o meio de diferenciação (Thermo Fisher Scientific: DMEM cat. n° 11965, 20% FBS ESQ, 2 mM L-glutamax cat. n° 35050, 2 mM MEM-NEAA cat. n° 11140, 0.1 mM β -mercaptoetanol cat. n° 21985, 1% HEPES cat. n° 15630080, 1% Piruvato de Sódio cat. n° 11360070, 1% penicilina-estreptomicina cat. n° 15140) (Tofoli *et al.*, 2016). No 21º dia da diferenciação espontânea, os RNAs das culturas de iPSCs diferenciadas foram coletados e extraídos conforme descrito no tópico 3.3.1.

3.3.9.1. Análise da expressão gênica dos EBs por qRT-PCR

Um μ g de RNA foi usado na reação com a transcriptase reversa usando o kit High Capacity cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, cat. n° 4368814) para a síntese

do cDNA e posteriormente transferido para placas TaqMan[®] hPSC Scorecard™ kit 384 wells (Thermo Fisher Scientific, cat. nº A15872) seguindo as especificações do fabricante. A corrida das amostras foi realizada no equipamento StepOne Plus System (Thermo Fisher Scientific) e o potencial de pluripotência e de diferenciação nos 3 folhetos germinativos foi analisado com o programa TaqMan[®] hPSC Scorecard Analysis Software (Thermo Fischer Scientific) (Tsnakov *et al.*, 2015). Linhagens de iPSC indiferenciadas foram usadas como controle negativo.

3.3.9.2. Análise da expressão gênica dos EBs por RT-PCR

A diferenciação espontânea das iPSC *in vitro* nos 3 folhetos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme) também foi confirmada pela técnica de RT-PCR. Um µg de RNA foi usado para a reação com a transcriptase reversa usando o kit High Capacity cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) e 3 sondas Taqman (Thermo Fisher Scientific) foram usadas para verificar os marcadores de cada um dos folhetos germinativos: nestina (*NES* - ectoderme), desmina (*DES* - mesoderme) e alfa-fetoproteína (*AFP* - endoderme). Outras 2 sondas Taqman (Thermo Fisher Scientific) para os genes endógenos normalizadoras (house-keeping genes) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*HPRT1*) foram utilizados como controles (Tabela 10). Após a amplificação dos genes, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Tabela 10: Lista das sondas TaqMan utilizadas para a análise da expressão de genes representativos a cada um dos 3 folhetos germinativos.

RT-PCR	Genes alvo	Folheto	TaqMan Probes	Tamanho do amplicon
Marcadores de diferenciação	<i>NES</i>	ectoderme	Hs00707120_s1	81 pb
	<i>AFP</i>	endoderme	Hs00173490_m1	82 pb
	<i>DES</i>	mesoderme	Hs01090875_m1	86 pb
Genes House-Keeping	<i>GAPDH</i>	controle endógeno	Hs03929097_g1	58 pb
	<i>HPRT1</i>	controle endógeno	Hs02800695_m1	82 pb

3.4. Diferenciação neural dopaminérgica (DND)

A diferenciação neural dopaminérgica das 9 linhagens de iPSC foi realizada seguindo os protocolos de Kriks *et al.* (2011) e Zhang *et al.* (2014) como descrito em Tofoli *et al.* (2019) (Figura 14, Tabela 11) em 3 condições de cultivo diferentes:

normóxia (20% O₂ ou High O₂), hipóxia (5% O₂ ou Low O₂) e em normóxia sob influência de campo magnético externo (EMF - *External Magnetic Field*). A amostra iPSC-CT1 (utilizada para a padronização e estabelecimento do protocolo de DND) foi diferenciada na condição padrão (normóxia) em todos os ciclos de DND servindo como um controle de qualidade da diferenciação neural.

Figura 14: Esquema do protocolo de diferenciação neural dopaminérgica (DND). A diferenciação neural (setas cinzas, topo) ocorre com a troca do meio de cultura durante os dias (transição verde para laranja, inferior). Barras azuis representam suplementos (citocinas ou pequenas moléculas) adicionados ao meio. No protocolo apresentado, a passagem é feita no 20º dia, embora variações sejam possíveis (retirado de Tofoli *et al.* 2019).

Tabela 11: Concentração das citocinas e pequenas moléculas para a DND (retirado de Tofoli *et al.*, 2019).

	Concentração	Fabricante/número de catálogo
LDN 193189	100 nM	Stem Macs, cat. no. 130-103-925
SB 431542	10 µM	Sigma, cat. no. S4317 ou Tocris Bioscience, cat. no. 1614
SHH C25 II	100 ng/mL	R&D Systems, cat. no. 464-SH-200
FGF8	100 ng/mL	R&D Systems, cat. no. 423-F8-025
Purm	2 µM	StemGent, cat. no. 04-0009
CHIR 99021	3 µM	Millipore, cat. no. 361571
BDNF	20 ng/mL	R&D Systems, cat. no. 248-BD-025
GDNF	20 ng/mL	R&D Systems, cat. no. 212-GD-050
TGFβ3	1 ng/mL	R&D Systems, cat. no. 243-B3-002
cAMP	250 mM	Sigma, cat. no. D0260
AA	200 µM	Sigma-Aldrich, cat. no. 4544
DAPT	10 µM	Tocris, cat. no. 2634/10
ROCK inhibitor (Y27632)	10 µM	Sigma-Aldrich, cat. no. SCM075

Para DND, cada linhagem de iPSC foi dissociada em *single cells* com Tryple (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 12604-013) e plaqueada na concentração de $2,5 - 3 \times 10^6$ céls./cm² em placas tratadas com Geltrex (2x) com meio E8. O meio de cultura foi trocado diariamente até as culturas atingirem a confluência de 80-95% (dia 0 da DND). Então cada poço foi lavado 1x com dPBS (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 14190-144) e foi adicionado o meio KSR: DMEM KO (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 10829-018) + 15% KSR (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 10828) + 1% MEM NEAA (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 11140-050) + 1% Pen/Strep (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 15140-122) + 1% Glutamax (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 35050-061) + 0,1% β -Mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 21985) acrescido das citocinas (Figura 14, Tabela 11).

Após 5 dias de cultivo, o meio KSR foi gradualmente alterado (75, 50 e 25%) pelo meio N2: DMEM F12 (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 11320-033) + 1% suplemento N2 (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 17502-048) + 1% Pen/Strep + 1% Glutamax acrescido das citocinas (Figura 14, Tabela 11).

No 10^o dia, o meio KSR/N2 foi trocado pelo meio B27: meio Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 21103-049) + 2% suplemento B27 (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 17504-044) + 1% Pen/Strep + 1% Glutamax acrescido das citocinas (Figura 14, Tabela 11).

No 20^o dia da DND, as culturas foram transferidas para um novo poço da placa de 12 tratado com GTX (concentração 2x) na concentração de 2×10^5 células/cm². Para a passagem, as culturas de iDA foram previamente tratadas com 10 μ M rock inhibitor durante 30 minutos a 37°C e posteriormente tratadas com Accutase (BD Biosciences, cat.no. 561527.) + 10 μ M rock inhibitor durante 1 hora a 37°C (de dez em dez minutos as placas foram retiradas da incubadora e as culturas resuspensas 6x usando uma ponteira de 1000 μ l sem fazer bolhas).

A reação de dissociação foi inibida adicionando-se 2 ml de meio B27/poço da placa de 12, então as amostras foram coletadas e transferidas para um tubo cônico de 15 ml (gotejar no centro do tubo) e centrifugadas durante 5 min a 200 xg. O meio foi aspirado e foi adicionado 2 mL de meio B27 + 10 μ M ROCK inhibitor e citocinas (Figura 14, Tabela 11) por tubo de 15 ml. Então os precipitados celulares foram suavemente resuspensos neste meio e transferidos para o poço tratado com GTX (2x). Após 24 horas (dia 21) o meio foi trocado por 2 ml de meio B27 + citocinas (sem ROCK inhibitor), as trocas de meio subsequentes foram realizadas a cada 2

dias (dia sim, dia nao) até o 35º dia de diferenciação neural. A diferenciação das iPSC em iDA sob efeito do EMF, teste de diferenciação com nanopartículas de magnetita e caracterizações funcionais (patch clamp, fluxo de Ca, potencial de membrana e produção de ROS) foram realizadas em colaboração com os professores Dr. Alexander Henning Ulrich, Dra. Denise Petri (Laboratório de Neurociências do Instituto de Química da USP) pela aluna Dr. Ana Teresa Silva Semeano, sendo que alguns resultados foram publicados em sua tese de doutorado (Semeano, 2018).

3.5. Diferenciação neural dopaminérgica em hipóxia

Os experimentos de diferenciação neural em hipóxia com 5% de O₂ (Low O₂) foram realizados em incubadora úmida a 37°C e 5% CO₂ com sistema de controle da concentração de oxigênio. As linhagens de iPSCs foram descongeladas e cultivadas em normóxia (20% O₂) até atingirem a confluência celular (80 a 100%) para o início da diferenciação neural. No dia 0 da DND, as células foram transferidas (2.5 a 3.5 x10⁴ cels./cm²) para a incubadora com 5% O₂ (Low O₂) e permaneceram nesta condição até o 35º dia de cultivo (ou DIV – days *in vitro*) (Studer *et al.*, 2000). As trocas de meio foram realizadas em fluxo laminar (normóxia) sendo que o meio de cultura não foi previamente equilibrado, como descrito por Lages *et al.* (2015).

3.5.1. Diferenciação neural dopaminérgica em normóxia (20% O₂) sob efeito do campo magnético externo

O método de cultura celular influenciado por campo magnético externo (EMF - *external magnetic field*) ou campo magnético estático (SMF - *static magnetic field*) utilizado foi desenvolvido pela aluna Ana Teresa Silva Semeano durante seu doutorado. Este método cria um campo magnético com polos alternados durante o cultivos das iPSCs (Semeano, 2018).

As linhagens de iPSCs foram descongeladas e cultivadas em meio E8 e matriz Geltrex. Após atingirem a confluência celular desejada (de 80 a 100%), as culturas foram dissociadas com Accutase e plaqueadas na concentração de 2.5 a 3.5 x10⁴ cels/cm² para o início da DND (dia 0) cultivadas sob efeito de EMF conforme descrito por Semeano 2018. Para isso, um sistema foi montado para geração do EMF (Figura 15). A geração do EMF foi emitida com pastilhas de

neodímio com 0,35 Tesla (35000 Gauss ou 350 militesla) fixadas em 2 tampas de placas de cultura celular. Em uma tampa o polo norte do ímã foi fixado voltado para a superfície plástica da tampa, enquanto na outra tampa o polo sul. Uma terceira placa (com o cultivo de iPSC) foi colocada entre estas duas placas, sendo que a face norte ficou posicionada na parte inferior e a face sul na parte de superior (Semeano, 2018). O EMF foi mantido durante a diferenciação do dia 0 até o dia 35.

Figura 15: Esquema de montagem do sistema de geração do campo magnético externo (EMF) criando um campo magnético semelhante ao da terra (disposição norte/sul).

3.6. Caracterização dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo derivados de iPSC (iDA)

Durante os experimentos de produção de ROS e Fluxo de Cálcio, após a leitura, foi adicionado Hoechst 33342 (ThermoFisher, cat. nº H3570) nas amostras para marcação das células com as respectivas soluções dos kits. Isso porque o equipamento capta a fluorescência total das células contidas em cada poço, para não haver discrepâncias devido à variação do número de células contidas em diferentes poços, os resultados finais foram normalizados subtraindo-se a fluorescência captada com este corante.

3.6.1. Caracterização fenotípica dos neurônios dopaminérgicos

3.6.1.1. Análise imunocitoquímica dos marcadores de mDAN nos iDA

Os iDA derivados de hiPSCs foram caracterizado com anticorpos específicos para neurônios em geral e neurônios dopaminérgicos (Tabela 12). Os procedimentos dos ensaios de imunocitoquímicos com os iDA foram realizados conforme descrito no tópico 3.3.7.

Tabela 12: Lista dos anticorpos utilizados para a análise imunocitoquímica dos marcadores de mDAN nos iDA.

Imunocitoquímica	Anticorpo	Diluição	Fabricante, N° de cat # e RRID*
Marcadores de células progenitoras neurais	Mouse anti-NESTINA	1:200	Millipore Cat# MAB5326, RRID:AB_2251134
	Mouse anti-VIMENTINA	1:200	Millipore Cat# MAB3400, RRID:AB_94843
	Rabbit anti-SOX2	1:100	Millipore (Chemicon) Cat# AB5603, RRID:AB_2286686)
	Mouse anti-SSEA1	1:100	BD Biosciences Cat# 560142, RRID:AB_1645246)
	Rabbit anti-PAX6	2:100	Abcam Cat# ab154253, RRID: não cadastrado
Marcadores do assoalho da placa neural (Floor Plate)	Goat anti-LM1Xa	1:50	Santa Cruz Cat# sc-54273, RRID:AB_2136830
	Rabbit anti-FOXA2	1:50	Millipore Cat# AB4125, RRID:AB_2104889
	Mouse anti-SOX1	1:200	Abcam Cat# ab22572, RRID:AB_778020
	Rabbit anti LMX1b	1:100	Abcam Cat# ab139736, RRID: não cadastrado
Marcadores de mDAN A9	Rabbit anti-PITX3	1:200	Abcam Cat# ab30734, RRID:AB_2165300
	Mouse anti-NURR1	1:50	Abcam Cat# ab41917, RRID:AB_776887
	Goat anti-GIRK2	1:50	Abcam Cat# ab65096, RRID:AB_1139732
Marcadores de mDAN maduros	Rabbit anti-TH	1:400	Abcam Cat# ab137721, RRID: não cadastrado
	Mouse anti-TUJ1	1:400	Sigma-Aldrich Cat# T8660, RRID:AB_477590
	Mouse anti A-Synuclein	1:50	Abcam Cat# ab78155, RRID:AB_1566784
Anticorpos Secundários	Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (H + L)	1:500	Thermofisher Scientific Cat# A11001, RRID: AB_2534069
	Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11008, RRID:AB_143165
	Alexa Fluor 594 Goat anti-Mouse IgG (H+L)	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11020, RRID:AB_2534087
	Alexa Fluor 594 Goat anti-rabbit IgG (H + L)	1:500	Thermofisher Scientific Cat#A12012, RRID: AB_2534079
	Alexa Fluor 488 Donkey anti-Goat IgG (H+L)	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11055, RRID:AB_2534102
	Alexa Fluor 594 Donkey anti-Goat IgG (H+L)	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11058, RRID:AB_2534105

*RRID: antibodyregistry.org

3.6.1.2. Análise por citometria de fluxo dos marcadores de mDAN nos iDA

Culturas de iDA no dia 35 da DND foram tratadas com Accutase (BD Biosciences) + 10 μ M ROCK inhibitor durante 30 minutos na incubadora a 37°C e o

meio Neurobasal + B27 foi adicionado para inibição da reação. Após a dissociação celular, as amostras foram centrifugadas a 128 xg durante 5 minutos a 4°C e ressuspensas em meio Neurobasal (sem soro) durante 30 minutos para a recuperação da membrana. Em seguida as amostras foram ressuspensas em paraformaldeído 4% e sacarose 4% durante 20 minutos para fixação, lavadas com dPBS (Thermo Fisher Scientific, cat. nº 14190-250) e armazenadas a 4°C. Para a marcação com os anticorpos, as células foram previamente filtradas (100 µm Cell Strainer - Falcon®, cat. nº 352360), incubadas com a solução bloqueio (SB - dPBS + 0,1% Triton X-100 + 2% BSA) e contadas com auxílio do contador automático TC-20 (Bio-Rad). As amostras foram incubadas com anticorpos primários contra a proteína transportadora de dopamina (DAT) e dopamina (DA) diluídos na SB durante 30 minutos a TA, depois de lavadas, foram incubadas com os anticorpos secundários por mais 30 minutos a TA (Tabela 13). Para a marcação nuclear, o Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) na concentração final de 0,5 µg/ml foi adicionado na SB junto com os anticorpos 2^{os}. Controles negativos (iPSC não diferenciada e fibroblasto GM 1662) também submetidas ao mesmo procedimento.

As amostras foram analisadas no citometro de fluxo Attune (Thermo Fisher Scientific), 20.000 eventos foram adquiridos e a análise foi realizada com o programa Flowjo. Foi feita a seleção e quantificação dos neurônios marcados por intensidade de fluorescência e realizados *gates* para selecionar a população neural, excluir *doublets* e de marcação negativa com amostras controle dos anticorpos secundários.

Tabela 13: Lista de anticorpos utilizados para a citometria de fluxo dos iDA.

Citometria de Fluxo	Anticorpo	Diluição	Fabricante, N° de cat # e RRID*
Marcadores de mDAN	Rat anti-DAT	1:100	Abcam Cat# ab5990, RRID:AB_305226
	Rabbit anti-DOPAMINA	1:1000	Abcam Cat# ab6427, RRID:AB_305458
Anticorpos Secundários	Alexa Fluor 647 Chicken anti-Rat IgG (H+L)	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-21472, RRID:AB_2535875
	Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11008, RRID:AB_143165

*RRID: antibodyregistry.org

3.6.1.3. Análise de vesículas ácidas (lisossomos) dos iDA cultivados em: normóxia, hipóxia e sob efeito de campo magnético externo

Neurônios no 35º dia da DND cultivados na concentração de 2×10^5 cels./cm² em discos (CELLview™ Dish with Glass Bottom - Greiner - Bio-One, cat nº 627975) foram incubados com a sonda fluorescente LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (ThermoFisher Scientific, cat. nº L7545) diluída em meio de cultura na concentração de 2 µM a 37°C por 30 minutos. Posteriormente as culturas foram observadas em microscópio confocal, com filtros de excitação de 350 nm (UV) (emissão de 460 nm para cor azul = autofagossomos) e excitação de 488 (emissão de 405 nm para cor amarela = lisossomos ou autofagolisossomos) sendo que a relação vesículas amarelas/azuis é um indicativo de atividade lisossômica. As imagens foram adquiridas e analisadas usando o software ImageJ com o plugin Find Maxima. Os dados foram validados com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). As médias (N = 8 células) foram apresentadas com desvio padrão da média ($\pm$ SEM) e análise de variância ANOVA de uma ou duas vias seguido de pós-teste Tukey ou Bonferroni.

3.6.1.4. Análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) nos IDA cultivados em: normóxia, hipóxia e sob efeito de campo magnético externo.

A quantificação das espécies reativas de oxigênio foi feita de acordo com Flierl *et al.*, 2014. As culturas de iDA no 20 DIV da DND foram dissociadas com Accutase (BD Biosciences) + 10 µM ROCK inhibitor Y-27632 (Sigma-Aldrich) como descrito em Tofoli *et al.*, 2019. Células na concentração de 1×10^5 céls./cm² foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (Greiner Bio-One, cat. nº 655090) tratadas com Geltrex 2x (Thermo Fisher Scientific) e cultivadas por mais 15 dias. No 35º dia da DND, as culturas foram incubadas com 15 µM CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (General Oxidative Stress Indicator - Thermo Fisher Scientific, cat. nº C6827) em meio DMEM-F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) sem phenol red (Thermo Fisher Scientific, cat. nº 21041025) por 30 minutos a 37°C. Os sinais de fluorescência (CM-H₂DCFDA Ex./Em. 495/520 nm) foram adquiridos com o

equipamento FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) e o programa SoftMax Pro software. Três linhagens por grupo fenotípico em 3 condições de DND diferentes (normóxia, hipóxia e EMF) foram analisadas ($n = 4$ /amostra). Controles negativos sem o reagente CM-H₂DCFDA e controles positivos (adição de peróxido de hidrogênio - H₂O₂ 100 mM) também foram feitos. Posteriormente as culturas de iDA foram lavadas 2x e incubadas durante 5 minutos com Hoechst 33342 (1 µg/ml, Thermo Fisher Scientific, cat. nº H3570) em DMEM-F-12 sem *phenol red* e os sinais de fluorescência foram captados (Ex./Em. 350/461). As intensidades relativas de fluorescência foram normalizadas pelos sinais de fluorescência do Hoechst 33342.

3.6.1.5. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software) e as comparações entre os dados experimentais foram feitas com a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni ou análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* Tukey. Os critérios de significância estatística pré-definidos pelo programa foram: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*).

3.6.2. Caracterização Funcional dos neurônios dopaminérgicos

Com a finalidade de avaliar a funcionalidade dos iDA gerados a partir da amostra de iPSC, foram realizados os ensaios de variação da concentração de cálcio intracelular, potencial de membrana e monitoramento das medidas de *current-clamp* pela técnica de *patch clamping whole-cell* (Tófoli *et al.*, 2019).

3.6.2.1. Patch Clamp (whole-cell)

Neurônios dopaminérgicos (iDA) cultivados na concentração 1×10^5 neurônios/cm² em placa de 24 poços com lamínulas de poliestireno (13 mm plastic coverslips Thermo Scientific™ Nunc™ Thermanox™ Coverslips cat. nº 174950) tratada com Geltrex na concentração de 2x foram transferidos para um disco de 3,5 cm previamente preenchido com agarose 2% (formando um poço adaptador) com a solução extracelular (Tabela 14). Células exibindo morfologia neural (com neuritos) foram escolhidas para o ensaio (Woodard *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2017). O eletrodo

para a medição da corrente intracelular foi inserido em uma micropipeta, feita a partir de um capilar de borosilicato confeccionada com a resistência de 4 - 7 MΩ (Kriks *et al.*, 2011), e então preenchido com a solução intracelular. O amplificador Axopatch 200A e software *pClamp* foram utilizados para captar os registros de correntes e de potencial de ação.

Os ensaios de medidas de *current-clamp* com a técnica de *patch clamping whole-cell recording* na configuração de *voltage-clamp* com potencial de retenção de -90 mV e protocolos de despolarização a +30 mV por 50 ms para registros de corrente foram aplicados (Hartfield *et al.*, 2015; Woodard *et al.*, 2014, Tofoli *et al.*, 2019). Posteriormente, protocolos de *current clamp* foram aplicados para registros do potencial de ação, compostos por passo de hiperpolarização com injeção de corrente que permitisse atingir -70 mV de potencial de membrana por 100 ms, seguido de passo de despolarização com injeção de corrente de +0.12 nA. Os registros de corrente foram analisados com software *ClampFit* 10.7 (Semenov, 2018).

Tabela 14: Soluções extracelular e intracelular para o ensaio de *patch clamping whole-cell* (Woodard *et al.*, 2014).

Solução Extracelular (intracellular solution)	Concentração		Solução Intracelular (bath solution)	Concentração
NaCl	119 mM		EGTA	0.6 mM
KCl	5 mM		KCl	10 mM
CaCl ₂	2 mM		CaCl ₂	0.6 mM
MgCl ₂	2 mM		MgCl ₂	5 mM
D-glicose	30 mM		K-gluconato	130 mM
HEPES	20 mM		HEPES	5 mM
Glicina	0.001 mM		Mg-ATP	2 mM
			Li-GTP	0.2 mM
pH	7.3 com KOH		pH	7.1

3.6.2.2. Ensaio de variação da concentração de cálcio intracelular

Variações na concentração de cálcio intracelular e oscilações espontâneas de cálcio foram detectadas por ensaios de fluorescência utilizando o kit FLIPR Calcium 4 Assay Kit (Molecular Devices, cat. nº R8142). Culturas de iDA na concentração de 1×10^5 neurônios/cm² foram realizadas em placa preta de 96 poços com fundo claro (96 well cell culture microplate F bottom, µCLEAR, CELLSTAR - Greiner Bio-One, cat nº 655090) tratada com Geltrex 2x.

No 35º dia da DND o meio de cultura foi trocado por 100 µl de DMEM F12 sem *phenol red* (Thermo Fisher Scientific, cat. nº 21041025) + 100 µl da solução

loading do kit (preparada com o tampão de ensaio na proporção 1:1) e incubadas durante 40 minutos a 37°C. Os sinais de fluorescência (Ex./Em. 485/525 nm e *cut-off* 515 nm) foram adquiridos no equipamento FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) com o programa SoftMax Pro Software (Molecular Devices) configurado com sensibilidade de leitura de 6 e PMT high por um tempo de corrida de 600s e intervalo de leitura de 1.52s. Este ensaio também foi realizado adicionando dopamina à solução do kit para verificar a variação da concentração de cálcio intracelular em resposta aos receptores dopaminérgicos.

Posteriormente as culturas de iDA foram lavadas 2x e incubadas durante 5 minutos com Hoechst 33342 (1µg/ml, Thermo Fisher Scientific, cat. nº H3570) em DMEM-F-12 sem *phenol red* e os sinais de fluorescência foram captados (Ex./Em. 350/461). As intensidades relativas de fluorescência foram normalizadas pelos sinais de fluorescência do Hoechst 33342 e a análise de dados foi baseada na frequência e variação de intensidade de fluorescência das oscilações espontâneas sincronizadas de cálcio.

3.7. Coleta e extração de RNA dos iDA com 35 dias

No 35º dia da diferenciação neural, células contidas em 2 poços da placa de 12 poços foram coletadas separadamente em 1 ml de TRIzol para cada uma das amostras de iDA e armazenadas em freezer -80°C. O RNA foi extraído conforme descrito no tópico 4.3.1. As amostras foram precipitadas com 2 volumes (V) de etanol 100% e 0,1 V de acetato de sódio 3M (NaOAc pH 5.5) e enviadas à empresa MacroGen Inc. (Coreia) para o sequenciamento do RNA.

Como a técnica de sequenciamento de nova geração é extremamente sensível, as amostras de RNA foram extraídas em 2 lotes e enviadas para o sequenciamento em um único lote para diminuir quaisquer variações referentes a algum reagente ou manipulação.

3.8. Sequenciamento do RNA (RNASeq)

O controle de qualidade dos RNA foi realizado com o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer. O RNA total das amostras de iDA derivados das hiPSC foram sequenciados utilizando o equipamento Illumina Novaseq 6000 (150PE) pela empresa MacroGen Inc. (Seul, Coreia). As bibliotecas foram preparadas com o kit

TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) e o kit TrueSeq RNA Access Sample Prep Kit para a amostra iDA-PD3+hipóxia. Foram contados (read account) aproximadamente 50 mil leituras/amostra (~7.5 Gb) e o controle de qualidade das leituras foi feito usando a ferramenta FastQC.

3.9. Análise Bioinformática e bioestatística

O software Sickle foi utilizado para cortar (trim) as leituras que tinham bases com qualidade inferior a 30 ou tamanho menor que 50pb. As leituras foram alinhadas contra o transcriptoma humano, gerado a partir da versão hg19 (Homo_sapiens.GRCh37.75.dna.primary_assembly) e sua anotação fornecida pelo Ensembl, usando o software STAR com as configurações padrão. Transcritos não codificantes, incluindo RNAs longos não codificantes, transcritos antisenso e pseudogenes foram excluídos de análise posterior. A quantificação das leituras foi realizada com o software Salmon em modo de quantificação aparta a utilização do alinhamento gerado pelo programa STAR. Os dados foram importados para o programa R usando a biblioteca tximport. A análise estatística foi realizada/visualizada usando os pacotes DESeq2/pvclust/ggbiplot. Um modelo aditivo, composto de duas variáveis: condição de cultura (normóxia, hipóxia e EMF) e grupos amostrais (Controle, PD e PD^{GBA}) foram utilizadas com três níveis cada.

A identificação de genes diferencialmente expressos de cada uma das variáveis foi controlada para as demais, ou seja, esses efeitos são devidos a mudanças somente na variável desejada e não na outra, usando a comparação entre o modelo aditivo e os dois modelos possíveis reduzidos através de o teste LRT implementado no pacote DESeq2. O valor de p (p-value) foi ajustado para múltiplos testes por meio do programa FDR. O Log2FoldChange (lfc) de cada nível contra os controles foi calculado usando contrastes apropriados para cada variável. Genes diferencialmente expressos foram considerados aqueles que tinham um valor de p ajustado menor que 0,01 e um valor absoluto de CFL maior que 1 em pelo menos uma das comparações.

As análises de bioinformática foram realizadas em colaboração com os Drs. Edroaldo Lummertz da Rocha e Gustavo Ribeiro Fernandes.

3.9.1. Análise de genes expressos diferencialmente nas principais vias metabólicas identificadas

A análise de enriquecimento de conjuntos de genes (GSEA - *Gene Set Enrichment Analysis*) foi realizada através da criação de uma lista de genes classificados usando os conjuntos de genes HALLMARKS com auxílio do programa disponibilizado pelo Broad Institute (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) (Mootha *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2005). Os genes foram organizados em ordem crescente de expressão diferencial utilizando o *log2 Fold Change*. Esta análise calculou a pontuação normalizada de enriquecimento (NES - *Normalized Enrichment Score*), em que NES positivo indica ativação da via e NES negativo indica inibição da via.

3.9.2. Análise de genes diferencialmente expressos em diferentes assinaturas gênicas

Listas de assinaturas gênicas para mDAN imaturos/neurogênese e mDAN maduros foram criadas (Anexo I) com o objetivo de identificar genes específicos diferencialmente expressos entre as amostras de iDA para avaliar a interferência das condições (normóxia, hipóxia e EMF) na diferenciação neural dopaminérgica nos 3 diferentes grupos de amostras: controle, Parkinson e Parkinson com mutação no gene *GBA* (Ctrl, PD e PD^{GBA}, respectivamente) .

As pontuações das expressões gênicas (signature scores) para as assinaturas analisadas foram calculadas utilizando o software CellRouter (<https://www.nature.com/articles/s41467-018-03214-y>), os gráficos foram confeccionados utilizando o mesmo programa (Lummertz da Rocha *et al.*, 2018).

4. Resultados e Discussão

4.1. Coleta das Amostras e processamento do sangue periférico

Nove amostras do sangue periférico foram coletadas e processadas com êxito. Cerca de $0,2$ a 37×10^6 PBMNCs de cada indivíduo foram criopreservada e armazenadas em nitrogênio líquido para reprogramação (Tabela 15).

Tabela 15: Amostras coletadas, reprogramadas em iPSC e diferenciadas em neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (iDA).

Amostra sangue	Fenótipo	Genótipo	Nº de MNC ($\times 10^6$ células)	Tipo de Reprogramação	iPSC	iDA
MNC-PD-GD	PD + GD	N370S/L444P	0,395	Sendai	iPS-PD-GD	iDA-PD-GD
MNC-PD-GBA1	PD + mutação no gene <i>GBA</i>	L444P/ +	0,2875	Sendai	iPS-PD-GBA1	iDA-PD-GBA1
MNC-PD-GBA2	PD + mutação no gene <i>GBA</i>	L444P e E326K	0,2125	Sendai	iPS-PD-GBA2	iDA-PD-GBA2
MNC-PD1	PD (idiopático)	Desconhecido	22,5	Plasmídeo	iPS-PD1	iDA-PD1
MNC-PD2	PD (idiopático)	Desconhecido	17,8	Plasmídeo	iPS-PD2	iDA-PD2
MNC-PD3	PD (idiopático)	Desconhecido	27	Plasmídeo	iPS-PD3	iDA-PD3
MNC-CT1*	Controle	-	20	Plasmídeo	iPS-CT1	iDA-CT1
MNC-CT2*	Controle	-	37	Plasmídeo	iPS-CT2	iDA-CT2
MNC-CT3*	Controle	-	18	Plasmídeo	iPS-CT3	iDA-CT3

* amostra controle: indivíduo com mais de 60 anos de idade sem doença neurodegenerativa

A eficiência do processamento de sangue se mostrou fundamental para o sucesso da reprogramação dos eritroblastos em iPSC. Por isso, as amostras com baixo rendimento durante o processamento do sangue foram reprogramadas a partir de linfócitos, com o sistema de vírus Sendai.

4.1.1. Genotipagem das amostras

A genotipagem por RFLP das mutações no gene *GBA* nas amostras corroborou com os resultados anteriormente analisados nos pacientes com PD e mutações no gene *GBA* (PD^{GBA}) (Spitz *et al.*, 2006; Spitz *et al.*, 2008) (Figura 16A).

Os pacientes com a doença de Parkinson idiopático sem mutações no gene *GBA* (PD) e controles não apresentaram nenhuma das mutações analisadas no gene *GBA* (Figura 16B). Nenhuma das amostras apresentou a mutação G2019S no gene *LRRK2* (Chien *et al.*, 2014) (Figura 16C).

Figura 16: Análise das mutações N370S, L444P, G377S e E326K no gene *GBA* e da mutação G2019S no gene *LRRK2* por eletroforese em gel de agarose 2% e 3%. **A** - Análise das mutações no gene *GBA* nas amostras de pacientes com Parkinson e mutação no gene *GBA* (PD^{GBA}); **B** - Análise das mutações no gene *GBA* nas amostras de pacientes com PD (sem mutações no gene *GBA*) e controles; **C** - Análise da mutação G2019S no gene *LRRK2* em todas as amostras. Os tamanhos dos fragmentos de restrição estão expressos em pares de base (bp) na figura. Controles positivos (heterozigotos = mutação/+) e homozigotos (mutação/mutação) e negativos (+/+) também foram aplicados no gel como referencia (+ = alelo selvagem). Fragmentos em azul = gene não mutado, fragmentos em vermelho = genes mutados e fragmentos em verde = peso molecular (1Kb e 50 bp) (retirado de Tofoli *et al*, 2019a e 2019b).

A genotipagem das amostras PD^{GBA}, além de confirmar os genótipos dos pacientes serviu como uma segunda confirmação para a identidade celular.

4.2. Reprogramação das células somáticas do sangue periférico em iPSC

A partir das PBMNCs, as 9 amostras foram reprogramadas com êxito em linhagens de iPSCs: iPS-PD-GD, iPS-PD-GBA1, iPS-PD-GBA2, iPS-PD1, iPS-PD2, iPS-PD3, iPS-CT1, iPS-CT2 e iPS-CT3. (Figura 17, Tabela 15).

Figura 17: Morfologia das colônias de iPSC após a reprogramação visualizadas em campo claro (barras de escala = 400 μm, aumento de 100x) (Retirado de Tofoli *et al*, 2019a e 2019b).

Todas as reprogramações celulares em iPSC geraram colônias com morfologia semelhantes à células indiferenciadas de colônias de células tronco embrionárias (ESC-like).

4.3. Caracterização e verificação de qualidade/integridade das linhagens de iPSCs

4.3.1. Integração dos vetores (vírus Sendai e plasmídeos episossomais)

A análise da integração dos vetores (vírus Sendai e plasmídeos episossomais) ao DNA das linhagens de iPSC geradas mostraram que não houve integrações desses vetores ao genoma em nenhuma amostra (Figura 18A e B).

Figura 18: Análise da integração dos vetores ao DNA das linhagens de iPSC por eletroforese em gel de agarose 2%. A - Análise de integração viral (Sendai) ao DNA por RT-PCR com primers específicos para os genes virais de reprogramação (*cMYC*, *KLF4*, *KOS* e *SeV*), *GAPDH* foi usado como gene endógeno; **B -** Análise de integração dos plasmídeos (MBX, MMK e KOS) ao DNA por PCR com primer específico para amplificação do gene *EBNA1* presente no plasmídeo pCEP4 que foi utilizado para a confecção dos 3 plasmídeos. Os tamanhos dos fragmentos de restrição estão expressos em pares de base (bp) na figura. Fragmentos em azul e vermelho = genes amplificados e fragmentos em verde = peso molecular (1Kb). CT+ = iPSC na passagem 0 da reprogramação viral (Figura 18A) e 100 ng/plasmídeo (Figura 18B); CT- e Branco = reação de PCR sem amostra de RNA (Figura 18A) ou DNA (Figura 18B) (Retirado de Tofoli *et al*, 2019a e 2019b).

4.3.2. Análise de identidade por microssatélite (STR)

A identidade das amostras foi confirmada pela análise de microssatélite de 16 regiões gênicas (Sarafian *et al.*, 2018). As amostras dos pacientes com PD^{GBA} tiveram os DNA comparados a partir da extração do gDNA de mucosa bucal (MB) e iPSC. Os pacientes com PD e controles tiveram os gDNA extraídos das MNC e

comparados aos das iPSC. Os resultados das análises indicam que não ocorreu troca de amostra (Tabela 16).

Tabela 16: Resultados das análises STR com o programa Gene Mapper mostrando o número das sequencias repetidas encontradas em cada região gênica (Retirado de Tofoli *et al*, 2019a e 2019b).

Marcador	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	AMEL	D5S818	FGA
Cromossomo	8	21	7	5	3	11	13	16	2	19	12	2	18	Sex	5	4
Alelo	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
MB-PD-GD*	13	16	29	32	10	12	12	14	14	15	5.3	5.3	9	11	9	9
iPSC-PD-GD	13	16	29	32	10	12	12	14	14	15	5.3	5.3	9	11	9	9
MB-PD-GBA1*	10	12	29	31.2	9	10	10	11	15	19	7.3	9.3	8	11	10	13
iPSC-PD-GBA1	10	12	29	31.2	9	10	10	11	15	19	7.3	9.3	8	11	10	13
MB-PD-GBA2*	15	15	29	29	10	10	10	12	14	16	6.3	6.3	12	12	10	12
iPSC-PD-GBA2	15	15	29	29	10	10	10	12	14	16	6.3	6.3	12	12	10	12
MNC-PD1	11	13	28	31.2	9	9	12	12	15	16	8	9.3	8	12	11	12
iPSC-PD1	11	13	28	31.2	9	9	12	12	15	16	8	9.3	8	12	11	12
MNC-PD2	13	13	29	31.2	8	10	11	12	15	16	8	9	12	12	11	11
iPSC-PD2	13	13	29	31.2	8	10	11	12	15	16	8	9	12	12	11	11
MNC-PD3	10	14	29	30	9	10	10	12	16	17	6	6	13	13	10	10
iPSC-PD3	10	14	29	30	9	10	10	12	16	17	6	6	13	13	10	10
MNC-CT1	13	15	29	32.2	12	12	10	11	15	15	7	9.3	12	12	12	13
iPSC-CT1	13	15	29	32.2	12	12	10	11	15	15	7	9.3	12	12	12	13
MNC-CT2	14	14	30	32.2	8	9	10	12	14	17	7	9.3	9	9	11	13
iPSC-CT2	14	14	30	32.2	8	9	10	12	14	17	7	9.3	9	9	11	13

* MB = mucosa bucal

4.3.3. Contaminação por micoplasma

A análise de contaminação por micoplasma das linhagens de iPSC por PCR foi negativa para todas as amostras reprogramadas (Figura 19).

Figura 19: Análise da amplificação do DNA por PCR das iPSC com primers específicos para o DNA de micoplasma, análise por eletroforese em gel de agarose 2%. **A** - Análise de micoplasma das amostras de pacientes com Parkinson + mutação no gene *GBA*; **B** - Análise de micoplasma das amostras de pacientes com Parkinson idiopático e controles. O tamanho dos fragmentos de restrição estão expressos em pares de base (bp) na figura (CT+ = controles positivos (do kit); CT- =

reação sem DNA; fragmentos em vermelho = amplificação do gene do micoplasma; fragmentos em verde = peso molecular (1Kb) (retirado de Tofoli *et al*, 2019a e 2019b).

4.3.4. Análise da integridade genômica (SNP Array)

A integridade dos genomas das linhagens de iPSC foram avaliadas pela técnica de cariotipagem por SNP-Array. Todas as linhagens apresentaram o genoma completo com 46 cromossomos não apresentando nenhuma aberração cromossômica desbalanceada. Note que este procedimento não detecta translocações balanceadas (Figura 20, Anexo II).

Figura 20: Análise do cariótipo por SNP-Array da linhagem iPSC-CT1. Os gráficos acima das ilustrações dos cromossomos representam a frequência alélica (B allele frequency) e a razão alélica (Log R Ratio) (os resultados para o restante das amostras encontra-se no Anexo II) (retirado de Tofoli *et al*, 2019b).

4.3.5. Análise da pluripotência por ensaio imunocitoquímico

Durante os ensaios imunocitoquímicos, todas as linhagens de iPSC geradas apresentaram marcação positiva para anticorpos contra 3 dos principais marcadores de pluripotência: OCT4, SOX2 e SSEA4 (Figura 21 e Anexo III). Também foram

realizados ensaios com anticorpos contra SOX1, TRA-1-81, cMYC, SSEA3 e TRA-1-60 e todas as linhagens também apresentaram marcação positiva (Anexo IV).

Figura 21: Análise de pluripotência por ensaios imunocitoquímicos da linhagem iPSC-CT1 com os anticorpos contra: OCT4 (marcador nuclear), SOX2 (marcador nuclear) e SSEA4 (marcador de membrana). Barras de escala = 75 µm e amplificação de 200x (os resultados para o restante das amostras encontra-se no Anexo III) (retirado de Tofoli *et al*, 2019b).

4.3.6. Citometria de fluxo para marcadores de pluripotência

O ensaio de citometria de fluxo mostrou que todas as linhagens de iPSC geradas apresentaram marcação positiva para anticorpos contra 3 fatores de pluripotência (NANOG, OCT3/4 e SOX2) (Figura 22, Anexo V).

Figura 22: Histograma da caracterização de pluripotência por citometria de fluxo com os anticorpos contra NANOG (A), OCT3/4 (B) e SOX2 (C) para a linhagem iPSC-CT1: Histograma preto representa a célula não marcada (isotipo controle) e vermelho representa o percentual das amostras marcadas positivamente pelos anticorpos (os resultados para o restante das amostras encontra-se no Anexo V) (retirado de Tofoli *et al*, 2019b).

As porcentagens de marcação positiva para estes anticorpos foram acima de 80% para todas as amostras de iPSC reprogramadas, dez por cento acima do que é aceito por bancos de células internacionais (Pamies *et al.*, 2017).

4.3.7. Formação dos corpos embrióides (EBs) e análise da expressão gênica dos 3 folhetos germinativos.

A formação dos EBs foi realizada com sucesso para as 9 amostras de iPSC apresentando o padrão morfológico esperado (Anexo VI).

4.3.7.1. Análise da expressão gênica dos EBs por RT-PCR

O procedimento de RT-PCR com o RNA extraído dos EBs e sondas Taqman para a amplificação de um gene representativo para cada folheto germinativo (*NES*, *AFP* e *DES*) mostrou que a diferenciação espontânea dos EBs foi capaz de gerar células de cada folheto embrionário (Figura 23).

Figura 23: Expressão dos genes representativos de cada folheto germinativo pelos EBs de cada linhagem de iPSC. *NES* = nestina (ectoderme), *DES* = desmina (mesoderme), *AFP* = alfa-fetoproteína (endoderme), *GAPDH* = gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gene endógeno normalizador) e *HPRT1* = hipoxantina fosforibosiltransferase (gene endógeno normalizador). Análise em por eletroforese em gel de agarose 2%. O tamanho dos fragmentos de restrição estão expressos em pares de base (bp) na figura (CT- = reação sem DNA; fragmentos em vermelho = amplificação do gene; fragmentos em verde = peso molecular (1Kb) (Retirado de Tofoli *et al*, 2019a e 2019b).

4.3.7.2. Análise da expressão gênica dos EBs por qPCR (ScoreCard)

Os EBs provenientes das 8 linhagens de iPSC apresentaram baixa pontuação (score) de expressão de genes relacionados à pluripotência e alta pontuação para genes ligados aos 3 folhetos germinativos indicando que são capazes de se diferenciarem em qualquer célula (Tsnakov *et al.*, 2015) (Figura 24, Anexo VII).

Amostra iPSC não diferenciada:

● iPS-PD-GD

Diferenciação espontânea dos EBs das amostras:

● PD-GD ● PD1 ● CT1
 ● PD-GBA1 ● PD2 ● CT2
 ● PD-GBA2 ● PD3

Figura 24: Resultados das pontuações de expressão gênica do crescimento espontâneo dos EBs oriundos de 8 linhagens de iPSC durante 21 dias comparados à expressão gênica da iPS-PD-GD indiferenciada (circulo preto). As pontuações das amostras estão plotadas em *algorithm scores*. O intervalo das pontuações para o conjunto de referência de linhagens indiferenciadas é indicado pela caixa cinza no gráfico.

As pontuações mais baixas para ectoderme e mesoderme podem ser explicada por diversos fatores: 1 - método adotado para a formação dos EBs (principalmente tempo); 2 - qualidade dos EBs; 3 - tempo de diferenciação espontânea dos EBs para a coleta do RNA.

Também foram feitas análises de ScoreCard com o RNA das iPSC indiferenciadas do grupo controle (iPS-CT1, iPS-CT2 e iPS-CT-3) e Parkinson (iPS-

PD1, iPS-PD2 e iPS-PD3) (Anexo VIII) em colaboração com o grupo do Dr. Stevens Rehen da UFRJ.

Todas as amostras apresentaram alta pontuação relacionada à expressão gênica de auto-renovação semelhante ao grupo referencia (ScoreCard), com exceção da amostra iPSC-CT3. Acreditamos que os valores de pontuações usados como corte (*cut-off*) pelo algoritmo do programa ScoreCard é muito restritivo, podendo classificar células pluripotentes como negativas. Além disto, o conjunto de linhagens indiferenciadas de referencia do programa é em sua maioria ESC e não iPSC.

Esta baixa pontuação também pode ser explicada por contaminação da cultura da iPSC-CT3 com colônias diferenciadas durante a coleta do RNA. Uma vez que os marcadores de pluripotência foram confirmados por técnicas de imunocitoquímicas (imunofluorescência e citometria de fluxo) e os EBs provenientes desta linhagem foram capazes em gerar células dos 3 folhetos germinativos.

Resumindo, todos os resultados de caracterização das linhagens de iPSC apresentados estão de acordo com critérios de bancos e repositórios internacionais de ESC e iPSC (Pamies *et al.*, 2017).

4.4. Padronização do protocolo diferenciação neural dopaminérgica (DND) de iPSCs

Alterações no protocolo de diferenciação neural dopaminérgica (DND) (Kriks *et al.*, 2011 e Zhang *et al.*, 2014) foram feitas para que o método fosse efetivo na geração de neurônios dopaminérgicos (iDA - *induced dopaminergic neurons*) em nosso laboratório (Anexos IX e X). Esta padronização permitiu a publicação do protocolo detalhado como um capítulo de livro em que foi descrito desde o descongelamento e cultivo das iPSC até a diferenciação neural dopaminérgica final (Tofoli *et al.*, 2019) .

Os iDA gerados com este protocolo foram caracterizado fenotipicamente (por ensaios imunocitoquímicos e de citometria de fluxo) e funcionalmente (por ensaios de patch clamp whole cell, fluxo de cálcio intracelular e potencial de membrana), indicando que os neurônios gerados a partir das iPSC correspondem à mDAN A9 da SNpc, são ativos e funcionais (conforme será demonstrando nos tópicos seguintes).

4.5. Fatores que influenciam a DND

4.5.1. DND em hipóxia

Atualmente existem mais de 150 protocolos definidos descritos na literatura para a DND de iPSC ou ESC em iDA (Arenas *et al.*, 2015; Marton *et al.*, 2019), e quase todos usam a condição de normóxia ($\pm 20\%$ O₂, concentração atmosférica) para a diferenciação. Embora ainda seja controverso qual é a concentração de O₂ no mesencéfalo, esta condição não é a fisiológica encontrada no cérebro, Estudos adotam que a concentração de O₂ no cérebro seja de 5% ou menos dependendo da profundidade do tecido (Studer *et al.*, 2000; Wagenführ *et al.*, 2016; Hancock *et al.*, 2015).

Um estudo com células-tronco embrionárias de rato (rESC) observou que a DND em hipóxia (3% O₂) promoveu o aumento da expressão de genes ligados aos mDAN (*TH*, *PitX3*, *Nurr1*, *En1* e *FGF8*), eritropoietina (*EPO*) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, indutor de angiogenese) quando comparada a DND em normóxia. Com efeito contrário, a hipóxia diminuiu a porcentagem de neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos. Também foi demonstrado que o uso de EPO em normóxia foi capaz de mimetizar o aumento da expressão de genes relacionados à mDAN promovido pela hipóxia. (Studer *et al.*, 2000). Uma recente revisão bibliográfica mostra como a concentração de O₂ pode alterar o metabolismo e processos celulares (Hancock *et al.*, 2015), inclusive a regulação da eritropoiese.

Em contraste foi observado que a hiperóxia (75% O₂) durante a embriogênese fetal aumentou a expressão de genes ligados a mDAN (*TH* e *Nurr1*) quando comparada a hipóxia (3% O₂) em células precursoras neurais (NPC) de ratos. Por outro lado, as condições de normóxia e hipóxia severa (1% O₂) inibiram a proliferação celular e promoveram a diferenciação celular espontânea. Também foi relatado que este efeito de hipóxia não estava sendo induzido pelo fator de transcrição induzido por hipóxia-1 α (HIF1 α - *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) responsável pela resposta adaptativa inicial das células à variações de oxigênio. Mas possivelmente pela regulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, indutor de angiogênese) que é regulado pelo fator induzido por hipoxia (HIF - *Hypoxia-inducible factor*) (Wagenführ *et al.*, 2016).

Outro trabalho verificou que a diferenciação neural (ND) de células precursoras neurais (NSCs) em hipóxia (3%O₂) provenientes de hESC apresentaram

menor produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequente estresse oxidativo em comparação a DN em normóxia (Lages *et al.*, 2015).

Dezenas de trabalhos utilizando iDA para o estudo da PD, GD ou associação entre estas doenças são publicados anualmente (revisado em Borger *et al.*, 2017; Sonntag *et al.*, 2018; Kusena *et al.*, 2019; Baden *et al.*, 2019; Zunke & Mazzulli, 2019), sendo que muitos deles relatam o aumento da produção de ROS em iDA (Fierel *et al.* 2014, Nguyen *et al.*, 2011, Miller *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2016). A grande pergunta é o quanto a DND em normóxia (condição não fisiológica) altera o fenótipo celular dos iDA.

Por isso, neste trabalho também foi realizada a DND em hipóxia (5%O₂) para avaliar a produção de ROS e o perfil de expressão gênica diferencial de iDA durante a DND em normóxia e hipóxia. Assim poderemos verificar se o aumento de ROS se mantém quando os iDA são gerados em condições mais próximas às fisiológicas.

4.5.2. DND sob influência de campo magnético externo (EMF)

Foram observadas diferenças na DND realizada sob influência do EMF (0,35T) em comparação à DND padrão em normóxia com uma amostra de cada grupo fenotípico. Verificou-se que a influencia do EMF não aumentou o número final de células para a amostra iDA-CT1, mas duplicou o número final de células para as amostras iDA-PD3 e iDA-PD-GD (Tabela 17), indicando que o EMF interfere na DND de iPSC induzindo a proliferação celular.

Tabela 17: Comparação dos rendimentos finais do protocolo de DND em normóxia com a DND sob EMF.

Amostra	Condição	Rendimento final de células no 35º dia (x10 ⁵ céls)
iDA-CT1	normóxia	16
iDA-CT1	EMF	8,5*
iDA-DP3	normóxia	6,2
iDA-DP3	EMF	12
iDA-PD-GD	normóxia	8,2
iDA-PD-GD	EMF	16

* o aumento na proliferação celular gerou grumos muito densos não permitindo realizar uma dissociação celular completa para a contagem.

Diversos trabalhos já reportaram que o EMF (0,2 a 0,5 T) causa a proliferação celular em diferentes tipos de células-tronco (Chuo *et al.*, 2013; Lew *et al.*, 2016; Marędziak *et al.*, 2017). Também há trabalhos mostrando que o EMF pode inibir

(Pacini *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2016) ou não ter nenhum efeito na proliferação celular (Hsu & Chang, 2010).

Outro trabalho utilizando mESC e com nosso modelo de iDA confirmou este caráter de indutor de proliferação do EMF, além de mostrar incrementos na expressão de proteínas relacionadas à mDAN (TH e DAT) (Anexo XI ao XIV) (Semeano, 2018).

Um interessante estudo com o estímulo repetitivo transcraniano magnético (rTMS) em ratos lesionados com 6-OHDA identificou aumento em diversos fatores neurotróficos e marcadores dopaminérgicos: BDNF, GDNF, NGF (*nerve growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor AA*) e TH. Esta terapia foi capaz de reverter tanto os sintomas motores quanto cognitivos neste modelo animal (Lee *et al.*, 2013). Embora o modelo de EMF empregado neste trabalho não mimetize o rTMS, a análise do RNAseq dos iDA poderia ajudar a compreender melhor como funciona o mecanismo da influência do campo magnético nas células.

4.5.3. Comparação da DND nas 3 condições de cultivo: normóxia, hipóxia e EMF

Durante a padronização do protocolo de DND padrão (em normóxia) realizada com a iPSC-CT1, a proliferação dos neurônios progenitores neurais ocorre do dia 0 ao dia 10-15 (Anexo IX). Após este período de crescimento, até o 20º dia, quando é feita a passagem das células, a divisão celular diminui (provavelmente porque os neurônios estão mais maduros) e muitas células se desprendem da matriz abrindo buracos na monocamada por onde começam a crescer projeções de neuritos. Após a passagem no 20º dia, os neurônios estão mais maduros e não foi observado crescimento celular, apenas neurônios que ao morrerem se soltaram da placa. Até o dia 35 foi observado o aumento e crescimento dos neuritos além da formação de uma complexa rede neural nos espaços deixados pelas células que soltaram. Também foi possível notar aglomerados neurais que se conectam por densas fibras por cima de uma fina monocamada de células (Figura 25, Anexos IX e X). A DND em normóxia de todas as amostras seguiu mesmo o padrão morfológico durante os estágios de diferenciação citados acima (Anexos IX e X).

Figura 25: Morfologia dos neurônios dopaminérgicos (iDA-CT1) após a diferenciação neural dopaminérgica (DND) da iPSC-CT1 em 3 diferentes condições de cultivo (normóxia, hipóxia e EMF) nos dias 15, 20 e 35 da DND em campo claro (barras de escala: 1000 μm = aumento 40x; 400 μm = aumento 100x e 200 μm = aumento de 200x) (os resultados para o restante das amostras encontra-se no Anexo X).

As 9 linhagens de iPSC foram diferenciadas em iDA com êxito nas 3 condições de cultura seguindo o protocolo estabelecido (Tofoli *et al.*, 2019). A iPSC-CT1 foi submetida à DND em normóxia nos 4 ciclos de DND, sempre apresentando a mesma morfologia da cultura indicando que não houveram falhas no procedimento.

A DND em hipóxia teve acentuada perda celular quando comparada ao cultivo em normóxia ou EMF. O cultivo de iDA até o dia 20 apresentou alto descolamento celular da matriz aumentando os espaços entre as células deixando a monocamada delgada. Em algumas amostras a perda celular foi tão acentuada (iDA-CT1 e iDA-PD3) quase inviabilizando o experimento (Anexos X e XI). Entre os dias 20 e 35 foi observada diminuição no número de células, aumento do número de neuritos e rede neural (Figura 25, Anexo X). Não sabemos se a condição em hipóxia é ideal para a

DND ou se gera neurônios semelhantes aos encontrados em seu estado fisiológico natural (cérebro) resultando em iDA mais sensíveis ao cultivo *in vitro*.

O cultivo de iDA sob influência do EMF até o 20º dia, apresentou proliferação celular exacerbada fazendo com que formasse uma monocamada espessa ao contrário do que foi observado na DND em normóxia (Anexos X e XI). Do 20º ao 35º dia, o estímulo por EMF continuou induzindo a divisão celular fazendo com que as culturas neurais continuassem crescendo formando uma monocamada tão densa que foi difícil observar a rede neural (neuritos) entre as células (Figura 25, Anexo X).

As contagens de algumas amostras de iDA na condição EMF foi mais baixa do que se esperava, isso porque o alto crescimento celular formou grumos muito densos que mesmo após a dissociação celular com Accutase durante 1 hora não foi capaz de desfazê-los por completo, interferindo diretamente na contagem total de células (Anexo XI).

Embora nenhuma análise qualitativa tenha sido realizada, acreditamos que as sutis diferenças morfológicas entre os iDA observadas entre as amostras seja um efeito ligado à característica de cada linhagem do que uma relação genótipo/fenótipo das doenças. Trabalhos publicados usando o mesmo método de DND estabelecido por Kriks e colaboradores (2011) também não observaram diferenças na morfologia e crescimento entre as diferentes linhagens (Ctrl, PD, PD^{GBA}) durante a diferenciação (Schondorf *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015).

4.6. Caracterização dos neurônios dopaminérgicos (iDA)

4.6.1. Caracterização fenotípica dos neurônios dopaminérgicos

A caracterização dos iDA foi realizada somente com a amostra iDA-CT1 cuja a iPS-CT1 foi utilizada para a padronização do protocolo de diferenciação neural (Tófoli *et al.*, 2019).

4.6.1.1. Análise imunocitoquímica dos iDA

O protocolo estabelecido por nosso grupo gerou neurônios com marcação característica tanto de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo imaturos (anticorpos contra: Nestina, Sox2 e FoxA2) (Figura 26) quanto iDA maduros (anticorpos contra: TH (*tyrosine-hydroxylase*), Nurr1 (*nuclear receptor related 1*

protein); PitX3 (*pituitary homeobox 3*) e Tuj1 (*neuron-specific class III beta-tubulin*) (Figura 27).

Figura 26: Ensaio imunocitoquímico com marcadores de células progenitoras neurais (NPC) do mesencéfalo. Células no 11º dia de diferenciação expressando os marcadores: Nestina, Sox2 e FoxA2. iDA-CT1 diferenciados a partir da iPC-CT1 (retirado de Tofoli *et al*, 2019).

Figura 27: Ensaio imunocitoquímico com marcadores de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, iDA-CT1 no 37º dia de diferenciação expressando marcador neuronal Tuj1 **(A)** e marcadores mDAN: TH **(B)**; Nurr1 **(C)**; e PitX3 **(D)**. Marcadores dopaminérgicos (TH e PitX3) co-localizam com marcador neuronal (Tuj1) **(E)**. mDAN: neurônios dopaminérgicos A9 do mesencéfalo; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole; TH: tirosina-hidroxilase; Nurr1: proteína 1 relacionada ao receptor nuclear; PitX3: homeobox hipofisário 3; Tuj1: beta-tubulina classe III (retirado de Tofoli *et al.*, 2019).

Embora as imagens imunocitoquímicas não tenham sido quantificadas, visualmente todos iDA (100%) expressam os marcadores característicos de mDAN (TH, Tuj1, Nurr1 e PitX3). De fato, este protocolo foi extensamente caracterizado por inúmeros grupos (Kriks *et al.*, 2011; Woodard *et al.*, 2014; Mazzulli *et al.*, 2016) sendo que alguns não observaram contaminação da cultura por outros tipos neurais (ex: astrócitos e neurônios GABAérgicos) (Zhang *et al.*, 2014). A expressão dos marcadores TH, Nurr1, Pitx3 e Tuj1 é suficiente para a caracterização de um neurônio dopaminérgico A9 da parte compacta da substancia negra (SNpc) maduro, local onde os neurônios são afetados na doença de Parkinson (Arenas *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014; Kirkeby *et al.*, 2017; Nolbrant *et al.*, 2017).

4.6.1.2. Citometria de fluxo com iDA (DIV 35)

Análises quantitativas complementares do transportador de dopamina (DAT) e da dopamina (DA) intracelular também foram realizadas nos iDA derivados da iPS-CT1. A análise por citometria de fluxo mostrou que 70% das células obtidas da diferenciação dopaminérgica marcavam positivamente a dopamina intracelular e 54% destes também co-expressavam DAT (Figura 28).

Figura 28: Histograma do ensaio de citometria de fluxo com os anticorpos contra DAT (1:100) e Dopamina (1:1000) na amostra iDA-CT1. Os dados foram tratados utilizando o programa FlowJo selecionando a população de interesse e quantificando o deslocamento na intensidade de fluorescência das amostras face ao controle do anticorpo secundário (gate do anticorpo secundário com marcação abaixo de 1%) (Retirado de Tófoli *et al.*, 2019).

A maioria dos grupos realizam a fenotipagem dos iDA somente por ensaios imunocitoquímicos com anticorpos contra TH e TUJ1, podendo levar a uma interpretação errada da eficiência de diferenciação (Kirkeby *et al.*, 2017; Nolbrant *et al.*, 2017; Kee *et al.*, 2017). Diversos trabalhos também relataram baixa porcentagem de iDA positivos para marcação com TH (20% ou menos), sendo forçados a realizar a purificação destas células (Woodard *et al.*, 2014; Schondorf *et al.*, 2015; Doi *et al.*, 2014; Lehnen *et al.*, 2015). Isso acontece porque embora a TH seja amplamente utilizada para a marcação de iDA, não é específico para este tipo celular podendo ser expresso por outros tipos de neurônios (GABAérgicos ou mDAN A8 e A10).

Os resultados obtidos mostram que os iDA gerados com o protocolo otimizado em nosso laboratório possui alta porcentagem de marcação à dopamina e com DAT (proteína específica de neurônio dopaminérgico) indicando tanto o fenótipo mDAN quanto atividade funcional.

4.6.2. Caracterização Funcional dos neurônios dopaminérgicos

4.6.2.1. Patch Clamp (whole-cell)

O monitoramento de medidas de current-clamp na configuração de whole-cell patch clamp (Figura 29A) em iDA-CT1 demonstrou que os neurônios produzidos pelo protocolo de diferenciação estabelecido em nosso laboratório são ativos e funcionais. A atividade neural dos iDA-CT1 imaturos (com 35 dias, Figura 29B e C) foi comparada à de neurônios mais maduros (59 dias, Figura 29D e E). Em iDA imaturos, picos de disparos espontâneos (sem indução, aplicação de corrente igual a zero) foram observados com menor intensidade e frequência (Figura 29C) do que foi observado em neurônios mais maduros (Figura 29E).

Figura 29: Caracterização eletrofisiológica de iDA com 35 e 59 dias derivados hiPSC-CT1 (iDA-CT1). **(A)** Foto de contraste de fase dos neurônios “clamped” pela pipeta de brosilicato (barra de escala 40 μ m). Resultado do monitoramento (durante 400 ms) da variação induzida gradual do potencial de membrana realizado em um iDA-CT1 com 35 dias **(B)** e (iDA-CT1 com 59 dias **D)** de diferenciação neural. Monitoramento da variação espontânea do potencial de repouso da membrana (PRM) realizado em um iDA-CT1 com 35 dias **(C)** e iDA-CT1 com 59 dias **(E)** de diferenciação neural, respectivamente. Cultivo de 1×10^5 neurônios/cm² em placa de 24 poços com laminula de poliestireno tratada com Geltrex na concentração de 2x (Retirado de Tófoli *et al.*, 2019).

O ensaio de whole-cell patch clamp em resposta ao estímulo realizado em iDA-CT1 com 35 dias evidenciou potenciais de repouso (PR) um pouco mais positivo

(~ -70 mV) quando comparado com neurônios com 59 dias (~ -95 mV). Estes neurônios com PR menor foram capazes de responder ao estímulo fazendo 1 disparo (PA - potencial de ação) (Figura 29B), mas não foram capazes de disparar consecutivos PA como foi observado em iDA com 59 dias (Figura 29D). Provavelmente porque o neurônio menos maduro não hiperpolarizava completamente (potencial de membrana voltar a ficar negativo) com o PM retornando ao PR.

Interessantemente, neurônios com 59 dias que exibiam um PR mais baixo não eram capazes de responder ao estímulo. Isso indica que iDA com 35 dias, mesmo apresentando PR baixos, também são ativos. Ou seja, quando a corrente foi aplicada o iDA foi capaz de despolarizar respondendo ao estímulo disparando um potencial de ação (exibindo uma corrente Na/K).

Estes resultados mostrando que neurônios menos maduros apresentam atividade fisiológica menor do que neurônios mais maduros são semelhantes com o que é descrito na literatura (Zhang *et al.*, 2010; Kriks *et al.*, 2011; Woodard *et al.*, 2014; Hartfield *et al.*, 2014; Aflaki *et al.*, 2016; Grow *et al.*, 2016; Kirkeby *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2017) (Figura 30). Também é um indicativo que os iDA gerados a partir do protocolo de diferenciação neural padronizado no laboratório produzem neurônios ativos e funcionais exibindo picos (potenciais de ação) fortes e sincronizados.

Figura 30: Caracterização funcional da maturação de iDA. Monitoramento por current-clamp nos tempos: 6, 7, 8, 9 e 10 semanas de cultivo. Os neurônios mostram mudanças no potencial de membrana de repouso refletindo sua maturação (6 semanas: ~ -35-40 mV e 10 semanas: ~ -65-70 mV) (modificado de Hartfield *et al.*, 2014).

4.6.2.2. Monitoramento da variação da concentração de cálcio intracelular induzida

A variação de cálcio (Ca^{2+}) intracelular transiente depende essencialmente do influxo de cálcio pela membrana celular neural. Oscilações espontâneas de cálcio

intracelular foram analisadas em iDA-CT1 após 55 dias de diferenciação (Figura 31A) e respostas aumentadas do fluxo de cálcio intracelular foram observadas após estimulação com agonistas do receptor de dopamina (DA) (Figura 31B).

Figura 31: Transientes de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) intracelular livre nos iDA-CT1 no 55º dia de diferenciação. **A** - Curva representativa dos sinais de $[Ca^{2+}]$ oscilatórios espontâneos dos iDA maduros. **B** - Variação da concentração de cálcio intracelular livre evocada por 10 μ M de dopamina injetada no tempo 0. Cultivo de 1×10^5 neurônios/cm² em placa preta de 96 poços (com fundo claro) tratada com Geltrex (2x) (retirado de Tofoli *et al.*, 2019).

Este resultado mostra que os iDA-CT1 foram capazes de responder à dopamina, indicando que receptores glutamatérgicos estão presentes e ativos nos iDA.

4.6.2.3. Comparação da variação espontânea da concentração de cálcio intracelular entre os grupos

As análises da variação de cálcio intracelular espontânea mostraram oscilações espontâneas de cálcio com elevados picos sincronizados para a amostra iDA-CT1, sendo mais um indício de atividade neural e sinalização celular (Figura 16).

Diferenças entre os iDA-CT1, iDA-PD3 e iDA-PD-GD foram observadas. Conforme podemos visualizar na figura 32, as amostras iDA-CT1 apresentaram picos intensos e consecutivos da variação de cálcio intracelular espontânea. Já os iDA-PD3 apresentaram picos menos frequentes e com menor intensidade. A amostra de iDA-PD-GD do paciente com PD e GD não exibiu nenhum pico. Esses resultados podem ser um indicativo de alteração de fenótipo dos iDA das amostras que possuem a doença de Parkinson e Parkinson + Doença de Gaucher, respectivamente.

Figura 32: Resultado do ensaio de monitoramento da variação da concentração de cálcio intracelular de 2 culturas neurais no 35º dia da diferenciação das amostras: iDA-CT1, iDA-PD3 e iDA-PD-GD. A variação da fluorescência de cada amostra foi calculada através da média de 2 ensaios: 0,04153 (iDA-CT1), 0,01937 (iDA-PD3) e 0 (iDA-PD-GD). Os números de picos espontâneos de cálcio também foram contabilizados (media de 2 ensaios): 17 picos (iDA-CT1), 4 picos (iDA-PD3) e 0 picos (iDA-PD-GD).

Alterações no fluxo de cálcio já foram reportadas em iDA de pacientes com PD e com GD (Schondorf *et al.*, 2014; Schwab & Ebert, 2015; Michel *et al.*, 2016; Zygogianni *et al.*, 2019).

Embora este ensaio tenha sido realizado somente com uma amostra de cada grupo, os resultados indicam que os iDA sem maturação completa (35 dias de DND) são capazes de reproduzir o fenótipo *in vitro*. Além disto, também sugere que mutações no gene *GBA* em pacientes com PD geram um fenótipo celular funcional (perda de atividade) mais grave do que em pacientes PD sem mutação no gene *GBA*.

4.6.2.4. Efeito das condições de normóxia, hipóxia e EMF na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por iDAs

Foram observadas evidentes variações na produção de ROS intracelular entre as amostras de iDA nas diferentes condições de DND (normóxia, hipóxia e EMF) (Figura 33A). Enquanto em hipóxia os iDA de PD^{GBA} exibiram menor produção

de ROS do que as amostras CT e PD, o contrário foi observado nos iDA cultivados em EMF, onde iDA de PD^{GBA} apresentaram grande produção de ROS.

Figura 33: Produção de espécies reativas de oxigênio em iDA nas 3 condições de DND. **A** - Média das intensidades de fluorescência relativas à produção de ROS apresentadas pelas amostras de iDA nas diferentes condições de DND: normóxia, hipóxia e EMF (barras apresentadas com média $\pm$ DP); **B** - Comparação da variação de intensidade média de cada grupo fenotípico de acordo com a condição de cultura; **C** - Comparação entre os 3 grupos fenotípicos (controles, PD PD^{GBA}) nas 3 condições de cultivo. Análise de variância ANOVA de 1 via seguida de teste *post-hoc* Tukey e apresentados com média Mean $\pm$ SEM. Quatro ensaios independentes foram realizados para cada amostra ($p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*)).

Os grupos amostrais de iDA exibiram variações significativas na produção de ROS nas diferentes condições de DND (Figura 33B). O grupo das amostras

controles (iDA-CT1, iDA-CT2 e iDA-CT3) apresentou maior produção de ROS em hipóxia quando comparado com iDAs produzidos em normóxia ou em EMF (Figura 34 B). Já os iDAs do grupo de pacientes com PD (iDA-PD1, iDA-PD2 e iDA-PD3) mostraram produção de ROS semelhantes em hipóxia e EMF, ambas maiores em relação à condição de normóxia (Figura 33 B). Os maiores efeitos das condições de DND dos iDAs na produção de ROS foram observados no grupo de amostras PD^{GBA} (iDA-PD+GD, iDA-PD+GBA1 e iDA-PD+GBA2), em que a condição de hipóxia diminuiu a produção de ROS, e EMF aumentou significativamente a produção de ROS em relação às duas outras condições (Figura 33 B).

Comparando os grupos de iDA em cada condição de DND, em normóxia o grupo PD^{GBA} apresentou aumento significativo da produção de ROS quando comparado com o controle (Figura 33C). Em hipóxia, a produção de ROS diminuiu significativamente no grupo PD^{GBA} quando comparado com o grupo controle e PD (Figura 33 C). Já o EMF mostrou efeito contrário na amostra PD^{GBA}, aumentando significativamente a produção de ROS quando comparado com os grupos controle e PD (Figura 33 C).

Diversos trabalhos com iDA derivados de hiPSC de pacientes com PD em normóxia observaram o aumento na produção de ROS e consequente estresse oxidativo (Nguyen *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2014; Fielrl *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2016). Nós observamos este aumento de produção de ROS somente no grupo PD^{GBA}, tanto em normóxia quanto em EMF. Os pacientes PD dos trabalhos citados tinham formas Mendelianas de PD, enquanto os PD deste trabalho são idiopáticos. Talvez a presença de uma mutação de efeito mais forte seja necessária para causar o aumento na produção de ROS, como no grupo PD^{GBA}. Curiosamente, em hipóxia os iDA do grupo PD^{GBA} apresentaram diminuição de produção de ROS.

4.6.2.5. Efeito das condições de normóxia, hipóxia e EMF em vesículas ácidas (análise lisossômica) de iDAs

A sonda utilizada para a realização deste experimento (DND-160) é uma molécula que emite fluorescência dependente do pH, sendo inibida em ambientes ácidos. Como a fusão dos autofagossomos aos lisossomos induz a redução do pH intracelular, é possível fazer a contagem de vesículas ácidas (lisossomos ou

autofagolisossomos) e menos ácidas permitindo inferir atividade lisossômica intracelular.

Portanto, quanto maior a barra nos gráficos, maior o número de vesículas ácidas (lisossomos e autofagossomos) demonstrando maior atividade lisossomal. Quanto menor a barra, menor número de vesículas ácidas, menor atividade lisossomal.

O cultivo dos iDA em normóxia mostrou redução de vesículas ácidas nas amostras dos grupos PD e PD^{GBA} quando comparados ao grupo controle, embora a diminuição tenha sido mais acentuada no grupo PD^{GBA} (Figura 34A). Quando comparadas à condição de normóxia, os iDAs diferenciados em hipóxia aumentou a atividade lisossômica nas amostras controles e nos pacientes com PD. O efeito do EMF no cultivo dos iDA comparado à normóxia foi diminuir a atividade lisossômica nos controles, iDA-PD2 e iDA-PD-GBA1, aumentar a atividade nas amostras iDA-PD+GD e iDA-PD3 e se manteve nas amostras iDA-PD1 e iDA-PD-GBA2 (Figura 34A).

A

Figura 34: Análise de vesículas ácidas (lisossomos) durante a DND dos 3 grupos fenotípicos: controle (Ctrl), Parkinson (PD) e PD com mutação no gene GBA (PD^{GBA}) nas 3 condições de cultura (normóxia, hipóxia e EMF). A - Média da razão da contagem de vesículas ácidas/vesículas menos ácidas apresentada por cada uma das amostras de iDA (análise de variância ANOVA de 1 via apresentados com média $\pm$ DP); B - Comparação de cada grupo fenotípico de acordo com a condição de cultura. ; C - Comparação entre os 3 grupos fenotípicos: controles, PD e PD^{GBA} nas diferentes condições de cultivo (normóxia, hipóxia e EMF); Análise de variância ANOVA de 1 via seguido do pós-teste de Tukey e apresentados como média Mean $\pm$ SEM. $p < 0,001$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*). **OBS:** grupo fenotípico PD em hipóxia foi composto somente por 2 amostras porque a DND do iDA-PD3 nesta condição resultou em morte celular e perda da cultura.**

O grupo controle (CT) apresentou maior quantidade de vesículas ácidas em hipóxia e menor sob efeito do EMF quando comparados ao cultivo em normóxia (Figura 34B). O grupo de amostra dos pacientes com Parkinson (PD) também mostraram maior atividade lisossômica em hipóxia, mas não tiveram grandes alterações nas condições de normóxia e EMF que foram semelhantes (Figura 34B). Já o grupo de amostras dos iDA de pacientes PD^{GBA} não mostraram alterações no fluxo autofágico em normóxia e hipóxia, e o cultivo sob efeito do EMF indicou um leve aumento na atividade lisossômica (Figura 34B).

Alterações significativas no aumento do número de vesículas ácidas foram observadas entre os grupos de amostras CTxPD e CTxPD^{GBA} quando cultivados em

normóxia (Figura 34C). No cultivo em hipóxia foi observada diminuição significativa de atividade lisossômica em PD^{GBA} quando comparado com CT e PD (Figura 34C).

O cultivo dos iDA sob efeito do EMF mostrou alteração significativa somente entre os grupos CTxPD (Figura 34C). Esta condição foi a que menos alterou a acidez das vesículas nos iDA indicando que o EMF quase não exerce efeito na atividade lisossômica. Uma hipótese para a condição de DND sob EMF praticamente não alterar a atividade lisossômica nas amostras PD^{GBA} seria de que estas mutações comprometem o lisossomo de forma que o EMF não é capaz de reverter o fenótipo celular dos iDA.

A diminuição de vesículas ácidas nos iDAs de pacientes com PD^{GBA} pode estar relacionada a um fenótipo mais grave quando comparado aos iDA dos pacientes PD. Talvez iDA com mutações no gene *GBA* possuam maior acúmulo lisossômico, elevando o pH desta organela, o que impede a ativação de enzimas lisossômicas. Por sua vez, isso poderia diminuir a degradação proteica, incluindo aSyn (principal constituinte dos corpos de Lewy), aumentando a propensão para o desenvolvimento da PD.

4.7. Análise da expressão gênica diferencial de iDA

Para obter informações sobre os mecanismos moleculares da patogênese causada por mutações no gene *GBA* em amostras de pacientes com PD, foi realizado o sequenciamento do RNA (RNA-seq) dos iDA de todos os grupos fenotípicos em normóxia, hipóxia e sob influencia EMF. Esses dados também foram utilizados para avaliar a influência das condições de DND na geração de iDA mais similares aos mDAN.

A análise da qualidade do RNA (ou RIN - *RNA Integrity Number*) foi $\geq 9,5$ para a maioria das amostras, com exceção das amostras iDA-PD-GBA2+Normóxia, iDA-PD2+Hipóxia e iDA-PD2+EMF que tiveram RIN $\geq 8,7$. Já a amostra iDA-PD3+Hipóxia foi obtido um RIN = 7.1, provavelmente por que não foi obtido RNA com alta concentração, mas com qualidade suficiente para a análise de RNAseq (RIN ≥ 7).

4.7.1. Análise de componentes principais dos iDA em normóxia e hipóxia

A primeira comparação da expressão diferencial gênica realizada foi a análise componentes principais (PCA) utilizando os dados dos 3 grupos amostrais nas condições de normóxia, hipóxia e EMF (Figura 35). Também foram identificados genes diferencialmente expressos entre o controle: PDxPD^{GBA} em cada condição de cultura (P <0,05) (Figura 35).

Figura 35: Análise de componentes principais do RNA-seq nos iDA e mapa térmico (HeatMapp) dos genes diferencialmente expressos diferenciados em: **A** - Normóxia; **B** - Hipóxia; **C** - EMF.

A análise de componentes principais (PCA) não foi capaz de separar PD^{GBA} das amostras de PD nas condições de cultura em normóxia, hipóxia e EMF (Figura 35A, B e C), mas mostrou agrupamento de iDA dos controles em células diferenciadas sob hipóxia (Figura 35B). Este é mais um indicativo de que a condição de normóxia utilizada pela comunidade científica para a diferenciação de iPSC e ESC em iDA poderia estar alterando a expressão gênica e consequentemente alterando o fenótipo celular.

4.7.2. Análise das assinaturas gênicas de mDAN maduros e imaturos em iDA

Diversos trabalhos reportaram que o perfil de expressão genética dos iDA se aproximam ao perfil encontrado em neurônios imaturos do estágio embrionário ao compararem a expressão gênica de iDA (diferenciados em normóxia) à mDAN *post mortem* (embrionário, fetal ou adulto) (Xia *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2015; La mano *et al.*, 2015). Até mesmo o perfil genético de organoides mesencefálicos se encontra em um estado mais maduro do que o observado em iDA diferenciados em monocamada a partir de iPSC ou ESC (Jo *et al.*, 2016).

Os resultados da expressão gênica das amostras de iDA foram comparados entre si adotando assinaturas gênicas para mDAN imaturos e maduros (Anexo I). Os resultados das 9 amostras de iDA (grupos Ctrl, PD e PD^{GBA}) foram reunidos nas 3 condições de DND: normóxia, hipóxia e EMF com o objetivo de verificar qual condição gera iDAs que expressam mais genes relacionados a mDAN maduro (Figura 36).

Figura 36: Análise da expressão das assinaturas gênicas de neurogênese/mDAN imaturos e maduros nas 9 amostras de iDA diferenciados nas 3 condições de cultura (normóxia, hipóxia e EMF).

Os resultados indicam que a DND em hipóxia (5% O₂, condição mais próxima ao estado fisiológico) gera neurônios dopaminérgicos mais maduros do que quando realizado em normóxia (concentração de O₂ atmosférico, condição frequentemente utilizada descrita na literatura).

Este pode ser um fato complicador para as análises de modelagem celular utilizando a técnica de diferenciação celular, porque o fenótipo observado pode não condizer com o estado fisiológico devido à concentração de oxigênio ser mais alta podendo influenciar alterações moleculares. Ainda não foi descrito na literatura se iDA diferenciados em hipóxia exibem o perfil de expressão gênica mais próximo à mDAN *in vivo* (*post mortem*) do que quando diferenciados em normóxia ou sob EMF.

A literatura relata que a condição de hipóxia no cérebro ativa as proteínas HIF que por sua vez estimulam a produção de eritropoietina (EPO), proteínas relacionadas à angiogenese e a vias metabólicas carcinogênicas. A EPO pode atuar como um fator neuroprotetor atuando nas vias PI3K/AKT/mTOR e IL6/JAK induzindo fatores anti-apoptose e neurotróficos (Mammis *et al.*, 2009).

Seria interessante novos estudos comparando o perfil de expressão gênica de outros tipos celulares derivados de hiPSC (ex: cardiomiócitos, hepatócitos, etc...) em

condições de normóxia e hipóxia com o perfil de expressão gênica dos correspondentes celulares *in vivo* a fim de identificar a melhor condição de cultura para cada tipo celular.

4.7.3. Análise de vias diferencialmente expressas nos iDA

Os dados também foram utilizados para realizar a análise de enriquecimento de genes (GSEA - *gene set enrichment analysis*) com o objetivo de calcular as pontuações (*scores*) de enriquecimento normalizados (NES - *normalized enrichment scores*) entre os grupos CtrlxPD e PD^{GBA}xPD derivados em cada condição de diferenciação neural dopaminérgica.

Foram identificadas diferenças significativas de expressão gênica em diferentes vias metabólicas entre as condições de diferenciação neural em normóxia, hipóxia e EMF das amostras quando comparados os grupos amostrais CtrlxPD e PD^{GBA}xPD.(Figura 37).

Figura 37: Análise de enriquecimento de genes (GSEA - *gene set enrichment analysis*) do RNA-seq dos iDA nas condições de normóxia (20% O₂), hipóxia (5% O₂) e sob efeito de EMF. Pontuações de enriquecimento normalizados (NES) entre os grupos amostrais: Parkinson e Controle (PDxCtrl), Parkinson com mutações no gene *GBA* e Parkinson PD^{GBA}xPD sob as diferentes condições de cultivo (normóxia, hipóxia e EMF). NES positivo (laranja e amarelo) indica ativação da via e NES negativo (roxo e azul) indica inibição da via. Retângulos em roxo = principais vias metabólicas alteradas: espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species pathway*); fosforilação oxidativa (*oxidative phosphorylation*), resposta de interferon gama (*interferon gamma response*), resposta de interferon alfa (*interferon alpha response*), resposta inflamatória (*inflammatory response*) e sinalização de IL6/JAK/STAT3 (*IL6/JAK/STAT3 signaling*).

Levando-se em conta todas as condições de cultivo, observou-se maior atividade de vias de resposta a interferon alfa e gama (INF- α e IFN- γ , respectivamente) em iDA de PD versus controles e em iDA de PD^{GBA} versus PD. Isto sugere que estas vias pró-inflamatórias estão relacionadas à PD e que a presença de mutação em *GBA* exalta esse fenótipo. Este resultado condiz com o que é descrito na literatura, onde maior atividade das vias pró-inflamatórias (resposta a INF) já foram descritas em pacientes com a PD (Qian & Flood, 2008; Roodveldt *et al.*, 2013; Ghavami *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Troncoso-Escudero *et al.*, 2018; Draoui *et al.*, 2020; Schwab *et al.*, 2020). Estas vias têm sido alvos de possíveis tratamentos para doenças neurodegenerativas (Wang *et al.*, 2015; Schwab *et al.*, 2020).

Conforme descrito anteriormente, há diferenças referentes ao sexo na PD (Shulman, 2002; Morale *et al.*, 2006; Shulman, 2007; Miller & Cronin-Golomb, 2010). Estudos apontam que este fato esteja ligado aos hormônios femininos estrógeno e progesterona, inclusive há trabalhos que visam tratar a PD com estes hormônios (Saunders-Pullman *et al.*, 1999; Rajsombath *et al.*, 2019; Jarras *et al.*, 2019). Vias relacionadas ao estrógeno foram observadas aumentadas em todos os grupos e condições de DND, indicando que esta via é importante para o desenvolvimento da doença. Porém, este resultado pode estar enviesado devido ao sexo das amostras que compõe cada grupo: Ctrl - 3 mulheres; PD - 2 homens e 1 mulher; PD^{GBA} - 3 homens.

Como os resultados de assinatura gênica para mDAN maduros nos iDA produzidos em hipóxia foram melhores, resolvemos focar a discussão nas vias diferencialmente ativadas nesta condição. Também focamos a discussão em vias que se mostraram diferencialmente expressas quando comparados os grupos PD^{GBA}xPD para encontrar evidências que auxiliem a compreender melhor as consequências de mutação em *GBA* na PD.

A via relacionada à fosforilação oxidativa se mostrou diminuída no grupo PD^{GBA} quando comparada com o PD em hipóxia, enquanto o oposto se observou em normóxia. Este resultado está de acordo com a análise da produção de ROS (Figura 33C). Mais uma vez, como a maioria dos modelos *in vitro* são cultivados em normóxia, talvez por isso seja observada maior produção de ROS em PD. Porém, nossos resultados em hipóxia indicam que exista uma diminuição de produção de ROS em PD, mas somente na presença de mutação em *GBA*.

Além das vias de resposta a $\text{INF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$, as vias relacionadas à resposta inflamatória e de sinalização da interleucina 6 (IL-6) foram observadas aumentadas em PD^{GBA} versus PD na condição de hipóxia. Estas vias pró-inflamatórias também se encontram aumentadas em pacientes com a PD (Qian & Flood, 2008; Roodveldt *et al.*, 2013; Ghavami *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Schwab *et al.*, 2020). Além disso, o aumento da expressão de IL-1 α , IL-6 e TNF α foi observado no cérebro e células do sangue periférico; de iNOS na SN; e de nitrito no fluido cerebral de pacientes com a PD (revisado em Qian & Flood, 2008).

Muitos pesquisadores ainda discutem se realmente a PD não é uma doença de armazenamento lisossômico em que o acúmulo de aSyn e produção de ROS seriam consequências e não a causa da PD (Klein & Mazzulli, 2018; Yeager, 2019). Os resultados obtidos neste trabalho permitem a formulação da hipótese de que a inflamação é o principal fator para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos, e que o acúmulo de aSyn e GCer e aumento na produção de ROS estariam potencializando o processo inflamatório.

Nossos dados indicam que o processo inflamatório pode estar ainda mais exacerbado nos pacientes PD com mutações em *GBA*. O processo degenerativo dos mDAN induz a secreção de $\text{INF}\gamma$, que por sua vez ativa a microglia que estava em repouso. Esta célula quando ativada pela $\text{INF}\gamma$ secreta fatores pro-inflamatórios (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , $\text{IFN-}\gamma$, iNOS, Clq) que induzem a ativação dos astrócitos (A1) causando a morte neural. Além disto, estas células podem produzir ROS, espécies reativas de nitrogênio (NRS) e proteínas do sistema complemento aumentando o processo inflamatório e consequentemente a morte neural (Estes & McAllister, 2014; Herrero *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2019; Delpech *et al.*, 2019; Gill *et al.*, 2019). O acúmulo de GCer nos lisossomos de monócitos (MON) e macrófagos (MAC) faz com que também secretem $\text{INF-}\gamma$ e IL-6 podendo colaborar com o processo inflamatório no cérebro.

Portanto, propomos que mutações no gene *GBA* levem a alterações celulares (acúmulo de lipídeo, GCer, aSyn e ferro) e o recrutamento ao cérebro das células alteradas resulta no aumento na produção de ROS e NRS e acúmulo de ferro já descrito (Regenboog *et al.*, 2016). Este último também pode aumentar a peroxidação lipídica (Choi & Yu, 1994), incrementando a resposta pró-inflamatória e induzindo o aumento da morte neural dopaminérgica, resulta também no incremento da resposta pro-inflamatória ($\text{IFN-}\gamma$ e IL-6). Este processo recruta mais células

alteradas (linfócitos) ao cérebro, atuando como um mecanismo de retro-alimentação (Figura 38). Este processo poderia explicar porquê pacientes da PD com mutações em *GBA* apresentam os sintomas da doença mais precocemente (Sidransky *et al.*, 2009; Sidransky & Lopez, 2012).

5. Conclusões

Neste trabalho, foram geradas linhagens de hiPSCs para a modelagem da PD *in vitro* e a análise do papel de mutações em *GBA* para o desenvolvimento da doença. As linhagens foram diferenciadas em neurônios dopaminérgicos, tipo celular afetado na doença.

Este trabalho mostra a importância da geração de células diferenciadas similares às correspondentes *in vivo* para a modelagem de doenças *in vitro*:

- A condição da concentração de oxigênio no cérebro é de hipóxia e de fato a assinatura gênica para neurônios dopaminérgicos de iDA foi melhor em hipóxia;
- A diferenciação neural dopaminérgica sob campo magnético externo alterou o fenótipo dos iDA, indicando que este modelo pode ser utilizado para o estudo dos efeitos terapêuticos do campo magnético no cérebro.

Os resultados das análises dos iDA em hipóxia revelaram:

- O aumento de resposta inflamatória já descrito em PD está exacerbado em pacientes PD com mutações em *GBA*;
- Ausência de aumento de ROS em PD comparados com controles, e diminuição de ROS em pacientes PD com *GBA*;
- Os resultados levaram à reformulação da hipótese para o papel de mutações em *GBA* no desenvolvimento de PD.

Nossos resultados indicam que possivelmente estes neurônios sejam mais susceptíveis à degeneração devido ao processo inflamatório nessa região do cérebro ser maior, agravado por mutações no gene *GBA*. Os resultados com o RNASeq indicam novos caminhos que podem estar subjacentes à contribuição das mutações no gene *GBA* para o desenvolvimento da PD.

6. Perspectivas

A diferenciação neural de diferentes linhagens de iPSC pode servir como modelo para o estudo da doença de Parkinson e doença de Gaucher abrindo um novo caminho de estudo no Brasil.

Futuramente, seria possível analisar a presença ou ausência do acúmulo de GCer e/ou aSyn nos lisossomos de neurônios dopaminérgicos, assim como o estabelecimento de um modelo que possibilitará o teste de drogas *in vitro* para estas doenças. Além disso, a identificação de um fenótipo celular da PD permitiria o desenvolvimento de ensaios celulares para a triagem de novas moléculas terapêuticas para a doença. Além disso, as iPSC geradas a partir de pacientes com GD também pode ser utilizada para compreender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da neuropatia nos tipos 2 e 3 da GD (seria interessante avaliar a eficiência do rTMS em modelos animais). A identificação dos mecanismos moleculares do envolvimento de mutações no gene *GBA* no desenvolvimento da doença de Parkinson, pode permitir a criação de novas estratégias terapêuticas.

A geração de iDA aliada à de edição de DNA (CRISPR/Cas9) permitiria o desenvolvimento de iDA com mutações causadoras da Demência com corpos de Lewy, um estudo pioneiro porque o diagnóstico dessa doença é realizado *post mortem* o que inviabiliza a criação de iPSC destes pacientes.

O modelo utilizado para a realização da DND sob EMF poderia ser ajustado para mimetizar os protocolos de rTMS para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares destas terapias. Pesquisas com organoides cerebrais serão realizadas no espaço a fim de avaliar como a falta de gravidade afeta a neurogênese, também seria interessante utilizar o modelo DND sob efeito EMF para avaliar a neurogênese em um campo magnético diferente ao da terra.

Semanalmente dezenas de artigos são publicados mostrando a eficiência de novas terapias e a utilização de diferentes substâncias (ex: BDNF, GDNF, chaperonas, pequenas moléculas inibidores rock cinase - ROCK inhibitor, NaB, lítio, vitamina B, C, D, etc...) no tratamento da PD em modelos animais e celulares humanos. Estas pesquisas mostram a capacidade destas substâncias em prevenir o aumento da produção de ROS ou em sua atuação nos processos celulares (ex:

autofagia, mitofagia) que causam a agregação proteica (aSyn e/ou glicocerebrosídeo - GCer) e consequentemente morte neural.

Os avanços em pesquisas com biomarcadores tentam estabelecer um diagnóstico capaz de detectar indivíduos pré-sintomáticos (que apresentarão a PD antes do surgimento dos sintomas e comprometimento neural) permitirá uma melhor avaliação destas técnicas neuroprotetoras.

Resumo

A doença de Parkinson (PD) (PD - Parkinson Disease, MIM # 168600) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por morte de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra do mesencéfalo (mDAN). Pacientes com PD exibem frequência aumentada de mutações no gene *GBA*, que codifica a enzima beta-glicosidase ácida (ou glicocerebrosidase - GCase) deficiente na Doença de Gaucher (GD), indicando uma forte associação entre as duas patologias. Atualmente não se conhece o mecanismo pelo qual mutações em *GBA* aumentam a susceptibilidade à degeneração neuronal. O conhecimento dos mecanismos moleculares desta associação contribuirá para uma maior compreensão das bases fisiopatológicas da neurodegeneração na PD permitindo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nos últimos anos, nosso grupo identificou pacientes com PD portadores de mutações no gene *GBA* e coletou amostras de sangue de 3 diferentes grupos fenotípicos: pacientes com PD sem mutação no gene *GBA* (PD), pacientes com PD e mutação no gene *GBA* (PD^{GBA}: 2 heterozigotos e 1 homozigoto recessivo apresentando GD) e controles sadios (Ctrl). Aqui, descrevemos o uso de hiPSCs derivadas destes pacientes para a análise do papel de *GBA* na PD. As linhagens foram diferenciadas em neurônios dopaminérgicos A9 do mesencéfalo (iDA), principal tipo celular acometido pela PD, em 3 condições de cultivo: normóxia, hipóxia e em normóxia sob estímulo de campo magnético externo (EMF). As análises de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) revelou diminuição da produção de ROS e de atividade lisossômica em células de pacientes PD com mutação em *GBA* quando comparados com células de controles e de pacientes PD em hipóxia. Os resultados de análise de RNAseq indicam que a assinatura gênica para neurônios mDAN maduros foi maior na condição de hipóxia. Também foram observadas diferenças significativas no perfil de expressão gênica relacionados a diferentes vias metabólicas, revelando um papel exacerbado de respostas inflamatórias em pacientes PD com mutações em *GBA*. Propomos que a deficiência de atividade lisossômica causada por *GBA* cria um ciclo de inflamação exacerbando desse fenômeno já descrito na PD.

Abstract

Parkinson's disease (PD) (PD - Parkinson Disease, MIM # 168600) is a neurodegenerative disease characterized by the death of dopaminergic neurons from *substantia nigra pars compacta* in the midbrain (mDAN). PD patients exhibit increased frequency of mutations in the *GBA* gene, which encodes the enzyme glucocerebrosidase (GCase) deficient in Gaucher Disease (GD), indicating a strong association between the two pathologies. Currently, the mechanism by which *GBA* mutations increase neuronal degeneration susceptibility is unknown. Knowledge of the molecular mechanisms of this association will contribute to a better understanding of the pathophysiological bases of neurodegeneration in PD, allowing the development of new therapeutic strategies. In the last years, our group has identified PD patients with mutations in *GBA* gene and collected blood samples from 3 different phenotypic groups: PD patients without a *GBA* gene mutation (PD), PD patients plus *GBA* gene mutation (PD^{GBA}: 2 heterozygotes and 1 recessive homozygote presenting GD) and healthy controls (Ctrl). Here, we describe the use of hiPSCs derived from these patients to analyze the role of *GBA* in PD. The cell lineages were differentiated into dopaminergic neurons A9 of the midbrain (iDA), the main cell type affected by PD, in 3 culture conditions: normoxia, hypoxia and in normoxia under external magnetic field (EMF) stimulation. The production analysis of reactive oxygen species (ROS) revealed a decrease in ROS production and lysosomal activity in cells of PD patients with *GBA* mutation when compared to control cells and PD patients in hypoxia. The results of RNAseq analysis indicate that the gene signature for mature mDAN neurons was greater in the condition of hypoxia. Significant differences were also observed in the gene expression profile related to different metabolic pathways, revealing an exacerbated role of inflammatory responses in PD patients with *GBA* mutations. We propose that the deficiency of lysosomal activity caused by *GBA* creates a cycle of inflammation exacerbating this phenomenon already described in PD.

Referencias Bibliográficas

AFLAKI, E., BORGER, D. K., MOAVEN, N., *et al.* "A new glucocerebrosidase chaperone reduces α -synuclein and glycolipid levels in iPSC-derived dopaminergic neurons from patients with Gaucher disease and parkinsonism", Journal of Neuroscience, 2016. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0636-16.2016.

AFLAKI, E., WESTBROEK, W., SIDRANSKY, E. The Complicated Relationship between Gaucher Disease and Parkinsonism: Insights from a Rare Disease. Neuron. [S.l: s.n.], 2017.

AHARON-PERETZ, J., ROSENBAUM, H., GERSHONI-BARUCH, R. "Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews", New England Journal of Medicine, 2004. DOI: 10.1056/NEJMoa033277.

AMARAL, de Melo C.E. *et al.* GBA mutations p.N370S and p.L444P are associated with Parkinson's disease in patients from Northern Brazil. Arq. Neuro-Psiquiatr., São Paulo , v. 77, n. 2, p. 73-79, Feb. 2019

ANDRADE L.A.F, BARBOSA E.R., CARDOSO F. TEIVE H.A.G. Doença de Parkinson: estratégias atuais de tratamento / Parkinson's disease: current treatment strategies. São Paulo; Segmento Farma; 211 p., 2006.

ARENAS, E., DENHAM, M., VILLAESCUSA, J. C. "How to make a midbrain dopaminergic neuron", Development, 2015. DOI: 10.1242/dev.097394.

AULUCK, P. K., CARAVEO, G., LINDQUIST, S. " α -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease", Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2010. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113313.

AYTON, S., LEI, P. Nigral iron elevation is an invariable feature of Parkinson's disease and is a sufficient cause of neurodegeneration. BioMed Research International. [S.l: s.n.], 2014

BADEN, P., YU, C., DELEIDI, M. Insights into GBA Parkinson's disease pathology and therapy with induced pluripotent stem cell model systems. Neurobiology of Disease. [S.l: s.n.], 2019

BALESTRINO, R., SCHAPIRA, A. H. V. Glucocerebrosidase and Parkinson Disease: Molecular, Clinical, and Therapeutic Implications. Neuroscientist. [S.l: s.n.], 2018.

BARBOSA, E. R., LIMONGI, J. C. P., CUMMINGS, J. L. "Parkinson's disease", Psychiatric Clinics of North America, 1997. DOI: 10.1016/S0193-953X(05)70344-0.

BEMBI, B., MARSALA, S. Z., SIDRANSKY, E., *et al.* "Gaucher's disease with Parkinson's disease: Clinical and pathological aspects", Neurology, 2003. DOI: 10.1212/01.WNL.0000072482.70963.D7.

BERTRAM, L., TANZI, R. E. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. Journal of Clinical Investigation. [S.l: s.n.], 2005.

BEUTLER E., GRABOWSKI G.A. Glucosylceramide Lipidoses: Gaucher Disease. In: Scriver CR, Beaudet al, Sly WS, Vale DV, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed., New York: McGraw-Hill: 2641-2670, 1995.

BEUTLER E., GRABOWSKI G.A. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al., eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, NY: McGraw-Hill;:3635–3668, 2001.

BODEA, G. O., BLAESS, S. Establishing diversity in the dopaminergic system. FEBS Letters. [S.l: s.n.]. , 2015.

BONIFATI, V. "Genetics of parkinsonism", Parkinsonism and Related Disorders, 2007. DOI: 10.1016/S1353-8020(08)70008-7.

ç

BRENNAND, K. J., SIMONE, A., JOU, J., *et al.* "Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells", Nature, 2011. DOI: 10.1038/nature09915.

BRICHTA, L., GREENGARD, P. "Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: An update", Frontiers in Neuroanatomy, 2014. DOI: 10.3389/fnana.2014.00152.

CHAVES, R. G., COELHO, J. C., MICHELIN-TIRELLI, K., *et al.* "Successful screening for Gaucher disease in a high-prevalence population in tabuleiro do norte (Northeastern Brazil): A cross-sectional study", Journal of Inherited Metabolic Disease, 2011. DOI: 10.1007/8904_2011_19.

CHAVES, R. G., DA VEIGA PEREIRA, L., DE ARAÚJO, F. T., *et al.* "Consanguinity and founder effect for Gaucher disease mutation G377S in a population from Tabuleiro do Norte, Northeastern Brazil", Clinical Genetics, 2015. DOI: 10.1111/cge.12515.

CHIEN, H. F., FIGUEIREDO, T. R., HOLLAENDER, M. A., *et al.* "Frequency of the LRRK2 G2019S mutation in late-onset sporadic patients with Parkinson's disease.", Arquivos de neuro-psiquiatria, v. 72, n. 5, p. 356–359, maio 2014.

CHINTA, S. J., ANDERSEN, J. K. Dopaminergic neurons. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. [S.l: s.n.]. , 2005.

CHOI, J. H., KIM, D. W., YU, B. P. "Modulation of age-related alterations of iron, ferritin, and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes", Journal of Nutrition, Health and Aging, 1998.

CHOU, B.-K., GU, H., GAO, Y., *et al.* "A facile method to establish human induced pluripotent stem cells from adult blood cells under feeder-free and xeno-free culture conditions: a clinically compliant approach.", Stem cells translational medicine, v. 4, n. 4, p. 320–332, abr. 2015. DOI: 10.5966/sctm.2014-0214.

CHOU, B.-K., MALI, P., HUANG, X., *et al.* "Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures.", Cell research, v. 21, n. 3, p. 518–529, mar. 2011. DOI: 10.1038/cr.2011.12.

CHUNG, S. Y., KISHINEVSKY, S., MAZZULLI, J. R., *et al.* "Parkin and PINK1 Patient iPSC-Derived Midbrain Dopamine Neurons Exhibit Mitochondrial Dysfunction and α -Synuclein Accumulation", Stem Cell Reports, 2016. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.08.012.

CHUO W., MA T., SAITO T., SUGITA Y., MAEDA H. A Preliminary Study of the Effect of Static Magnetic Field Acting on Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells during Osteogenic Differentiation In Vitro 2013;22:227-32.

CLARK, L. N., ROSS, B. M., WANG, Y., *et al.* "Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease", *Neurology*, 2007. DOI: 10.1212/01.wnl.0000276989.17578.02.

CLARK, L. N., NICOLAI, A., AFRIDI, S., *et al.* "Pilot association study of the β -glucocerebrosidase N370S allele and Parkinson's disease in subjects of Jewish ethnicity", *Movement Disorders*, 2005. DOI: 10.1002/mds.20320.

CORTI, O., LESAGE, S., BRICE, A. "What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease", *Physiological Reviews*, 2011. DOI: 10.1152/physrev.00022.2010.

DAHHERON, L., D'SOUZA, S., "Blood - SeV derived fibroblast generated iPSCs". Cambridge (MA), [s.n.], 2008. . DOI: 10.3824/stembook.1.54.1.

DAVIE, C. A. A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull*, 86, 109-27, 2008.

DAVIS, A. A., RACETTE, B. Parkinson disease and cognitive impairment: Five new things. *Neurology: Clinical Practice*. [S.l: s.n.], 2016.

DE MELO AMARAL, C. E., LOPES, P. F., FERREIRA, J. C. C., *et al.* "GBA mutations p.n370s and p.l444p are associated with parkinson's disease in patients from northern Brazil", *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 2019. DOI: 10.1590/0004-282x20190006.

DEL REY, N. L. G., QUIROGA-VARELA, A., GARBAYO, E., *et al.* Advances in parkinson's disease: 200 years later. *Frontiers in Neuroanatomy*. [S.l: s.n.], 2018.

DELPECH, J. C., HERRON, S., BOTROS, M. B., *et al.* Neuroimmune Crosstalk through Extracellular Vesicles in Health and Disease. *Trends in Neurosciences*. [S.l: s.n.], 2019.

DO, J., MCKINNEY, C., SHARMA, P., *et al.* Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Molecular Neurodegeneration*. [S.l: s.n.], 2019.

DOI, D., SAMATA, B., KATSUKAWA, M., *et al.* "Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation", *Stem Cell Reports*, 2014. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.01.013.

DOMINGO, A., KLEIN, C., "Genetics of Parkinson disease". *Handbook of Clinical Neurology*, [S.l: s.n.], 2018. . DOI: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00014-2.

DORSEY, E. R., BLOEM, B. R. The Parkinson pandemic - A call to action. *JAMA Neurology*. [S.l: s.n.], 2018.

DOUBLE K.L., TODD G., DUMA S.R. Pathophysiology of transcranial sonography signal changes in the human substantia Nigra. vol. 90. Elsevier Inc.; 2010.

DOWEY, S. N., HUANG, X., CHOU, B.-K., *et al.* "Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression.", *Nature protocols*, v. 7, n. 11, p. 2013–2021, nov. 2012. DOI: 10.1038/nprot.2012.121.

DRAOUI A., EL HIBA O., AIMRANE A., EL KHIAT A., GAMRANI H.. Parkinson's disease: From bench to bedside. *Rev Neurol (Paris)*. 2020 Jan 9. pii: S0035-3787(19)30913-0. doi: 10.1016/j.neurol.2019.11.002. [Epub ahead of print]

DVIR, H., HAREL, M., MCCARTHY, A. A., *et al.* "X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease", *EMBO Reports*, 2003. DOI: 10.1038/sj.embor.embor873.

EBLAN M.J., WALKER J.M., SIDRANSKY E. The glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 2005 Feb 17;352(7):728-31; author reply 728-31.

ELLINWOOD, N. M., VITE, C. H., HASKINS, M. E. Gene therapy for lysosomal storage diseases: The lessons and promise of animal models. *Journal of Gene Medicine*. [S.l: s.n.], 2004

ESTES, M. L., MCALLISTER, A. K. "Alterations in immune cells and mediators in the brain: It's Not always neuroinflammation!", *Brain Pathology*, 2014. DOI: 10.1111/bpa.12198.

FEANY M. B. New genetic insights into Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351: 1937-1940, 2004.

FLIERL, A., OLIVEIRA, L. M. A., FALOMIR-LOCKHART, L. J., *et al.* "Higher vulnerability and stress sensitivity of neuronal precursor cells carrying an alpha-synuclein gene triplication", *PLoS ONE*, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0112413.

GASSER, T. "Update on the genetics of Parkinson's disease". 2007. *Anais [...]* [S.l: s.n.], 2007. DOI: 10.1002/mds.21676.

GEGG, M. E., BURKE, D., HEALES, S. J. R., *et al.* "Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains", *Annals of Neurology*, 2012. DOI: 10.1002/ana.23614.

GEGG, M. E., SCHAPIRA, A. H. V. The role of glucocerebrosidase in Parkinson disease pathogenesis. *FEBS Journal*. [S.l: s.n.], 2018.

GHAVAMI, S., SHOJAEI, S., YEGANEH, B., *et al.* Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*. [S.l: s.n.], 2014.

GILL E.L., KOELMEL J.P., MEKE L., YOST R.A., GARRETT T.J., OKUN M.S., FLORES C., VEDAM-MAI V. Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry Metabolomics and Lipidomics Study of Stool from Transgenic Parkinson's Disease Mice Following Immunotherapy. *J Proteome Res*. 2020 Jan 3;19(1):424-431. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00605. Epub 2019 Nov 22.

GOKER-ALPAN, O., GIASSON, B. I., EBLAN, M. J., *et al.* "Glucocerebrosidase mutations are an important risk factor for Lewy body disorders", *Neurology*, 2006. DOI: 10.1212/01.wnl.0000230215.41296.18.

GOKER-ALPAN, O., SCHIFFMANN, R., LAMARCA, M. E., *et al.* "Parkinsonism among Gaucher disease carriers", *Journal of Medical Genetics*, 2004. DOI: 10.1136/jmg.2004.024455.

GOKER-ALPAN, O., LOPEZ, G., VITHAYATHIL, J., *et al.* "The spectrum of Parkinsonian manifestations associated with glucocerebrosidase mutations", *Archives of Neurology*, 2008. DOI: 10.1001/archneur.65.10.1353.

GOKER-ALPAN, O., STUBBLEFIELD, B. K., GIASSON, B. I., *et al.* "Glucocerebrosidase is present in α -synuclein inclusions in Lewy body disorders", *Acta Neuropathologica*, 2010. DOI: 10.1007/s00401-010-0741-7.

GRABOWSKI, G. A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *The Lancet*. [S.l: s.n.], 2008.

GROW, D. A., MCCARREY, J. R., NAVARA, C. S. Advantages of nonhuman primates as preclinical models for evaluating stem cell-based therapies for Parkinson's disease. *Stem Cell Research*. [S.l: s.n.], 2016.

CHIEN H.F., FIGUEIREDO T.R., HOLLAENDER M.A., TOFOLI F., TAKADA L.T., PEREIRA L.DA V., BARBOSA E.R. Frequency of the LRRK2 G2019S mutation in late-onset sporadic patients with Parkinson's disease. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0004-282X20140019>.

HANCOCK, R. L., DUNNE, K., WALPORT, L. J., *et al.* Epigenetic regulation by histone demethylases in hypoxia. *Epigenomics*. [S.l: s.n.], 2015.

HARTFIELD, E. M., YAMASAKI-MANN, M., RIBEIRO FERNANDES, H. J., *et al.* "Physiological characterisation of human iPS-derived dopaminergic neurons", *PLoS ONE*, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0087388.

HERRERO, M. T., ESTRADA, C., MAATOUK, L., *et al.* Inflammation in Parkinson's disease: Role of glucocorticoids. *Frontiers in Neuroanatomy*. [S.l: s.n.], 2015.

HRUSKA, K., GOKER-ALPAN, O., SIDRANSKY, E. Gaucher disease and the synucleinopathies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. [S.l: s.n.], 2006.

HSU S., CHANG J.C. The static magnetic field accelerates the osteogenic differentiation and mineralization of dental pulp cells. *Cytotechnology* 2010;62:143–55.

HUGHES A.J., DANIEL S.E., KILFORD L., LEES A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:181–4, 1992;

HUGHES A.J., DANIEL S.E., LEES A.J. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology* 57:1497–9, 2001.

HUSSEIN, S. M. I., NAGY, K., NAGY, A. "Human induced pluripotent stem cells: The past, present, and future", *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2011. DOI: 10.1038/clpt.2011.37.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. [S.l: s.n.], 2008.

JARRAS, H., BOURQUE, M., POIRIER, A. A., *et al.* "Neuroprotection and immunomodulation of progesterone in the gut of a mouse model of Parkinson's disease", *Journal of Neuroendocrinology*, 2019. DOI: 10.1111/jne.12782.

JO, J., XIAO, Y., SUN, A. X., *et al.* "Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons", *Cell Stem Cell*, 2016. DOI: 10.1016/j.stem.2016.07.005.

KEE, N., VOLAKAKIS, N., KIRKEBY, A., *et al.* "Single-Cell Analysis Reveals a Close Relationship between Differentiating Dopamine and Subthalamic Nucleus Neuronal Lineages", *Cell Stem Cell*, 2017. DOI: 10.1016/j.stem.2016.10.003.

KINGHORN, K. J. Pathological looping in the synucleinopathies: Investigating the link between Parkinson's disease and Gaucher disease. *DMM Disease Models and Mechanisms*. [S.l: s.n.], 2011.

KIRKEBY, A., NOLBRANT, S., TIKLOVA, K., *et al.* "Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease", *Cell Stem Cell*, 2017. DOI: 10.1016/j.stem.2016.09.004.

KLEIN, A. D., MAZZULLI, J. R. "Is Parkinson's disease a lysosomal disorder?", *Brain*, 2018. DOI: 10.1093/brain/awy147.

KRIKS, S., SHIM, J. W., PIAO, J., *et al.* "Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease", *Nature*, 2011. DOI: 10.1038/nature10648.

KUSENA, J. W. T., THOMAS, R. J., MCCALL, M. J., *et al.* From protocol to product: Ventral midbrain dopaminergic neuron differentiation for the treatment of Parkinson's disease. *Regenerative Medicine*. [S.l: s.n.], 2019.

LA MANNO, G., GYLLBORG, D., CODELUPPI, S., *et al.* "Molecular Diversity of Midbrain Development in Mouse, Human, and Stem Cells", *Cell*, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.027.

LAGES, Y. M., NASCIMENTO, J. M., LEMOS, G. A., *et al.* "Low oxygen alters mitochondrial function and response to oxidative stress in human neural progenitor cells", *PeerJ*, 2015. DOI: 10.7717/peerj.1486.

LAI, M. I., WENDY-YEO, W. Y., RAMASAMY, R., *et al.* "Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2011. DOI: 10.1007/s10815-011-9552-6.

LEE, J. Y., KIM, S. H., KO, A. R., *et al.* "Therapeutic effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in an animal model of Parkinson's disease", *Brain Research*, 2013. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.08.051.

LEE, Y., LEE, S., CHANG, S. C., *et al.* Significant roles of neuroinflammation in Parkinson's disease: therapeutic targets for PD prevention. *Archives of Pharmacal Research*. [S.l: s.n.], 2019.

LEHNEN, D., BARRAL, S., CARDOSO, T., *et al.* "IAP-Based Cell Sorting Results in Homogeneous Transplantable Dopaminergic Precursor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells", *Stem Cell Reports*, 2017. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.08.016.

LEW W.Z., HUANG Y.C., HUANG K.Y., LIN C.T., TSAI M.T., HUANG H.M. Static magnetic fields enhance dental pulp stem cell proliferation by activating the p38 mitogen-activated protein kinase pathway as its putative mechanism. *J Tissue Eng Regen Med* 2016; 12:19–29.

LI, M., ZOU, Y., LU, Q., *et al.* "Efficient derivation of dopaminergic neurons from SOX1- floor plate cells under defined culture conditions", *Journal of Biomedical Science*, 2016. DOI: 10.1186/s12929-016-0251-6.

LI, M., BELMONTE, J. C. I. Looking to the future following 10 years of induced pluripotent stem cell technologies. *Nature Protocols*. [S.l: s.n.], 2016.

LILL, C. M. Genetics of Parkinson's disease. Molecular and Cellular Probes. [S.l: s.n.]. , 2016.

LIN, L., GÖKE, J., CUKUROGLU, E., *et al.* "Molecular Features Underlying Neurodegeneration Identified through In Vitro Modeling of Genetically Diverse Parkinson's Disease Patients", Cell Reports, 2016. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.05.022.

LUMMERTZ DA ROCHA, E., ROWE, R. G., LUNDIN, V., *et al.* "Reconstruction of complex single-cell trajectories using CellRouter", Nature Communications, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-03214-y.

LWIN, A., ORVISKY, E., GOKER-ALPAN, O., *et al.* "Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism", Molecular Genetics and Metabolism, 2004. DOI: 10.1016/j.ymgme.2003.11.004.

MACHACZKA, M., RUCINSKA, M., SKOTNICKI, A. B., *et al.* "Parkinson's syndrome preceding clinical manifestation of Gaucher's disease", American Journal of Hematology, 1999. DOI: 10.1002/(sici)1096-8652(199907)61:3<216::aid-ajh12>3.3.co;2-2.

MAMMIS, A., MCINTOSH, T. K., MANIKER, A. H. "Erythropoietin as a neuroprotective agent in traumatic brain injury. Review", Surgical Neurology, 2009. DOI: 10.1016/j.surneu.2008.02.040.

MANNING-BOĞ, A. B., SCHÜLE, B., LANGSTON, J. W. "Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: A biological link between Gaucher disease and parkinsonism", NeuroToxicology, 2009. DOI: 10.1016/j.neuro.2009.06.009.

MARCHETTO, M. C. N., CARROMEU, C., ACAB, A., *et al.* "A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells", Cell, 2010. DOI: 10.1016/j.cell.2010.10.016.

MARĘDZIAK M., TOMASZEWSKI K., POLINCEUSZ P., LEWANDOWSKI D., MARYCZ K. Static magnetic field enhances the viability and proliferation rate of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells potentially through activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) pathway. Electromagn Biol Med 2017;36:45–54.

MARTON, R. M., IOANNIDIS, J. P. A. "A Comprehensive Analysis of Protocols for Deriving Dopaminergic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells", Stem Cells Translational Medicine, 2019. DOI: 10.1002/sctm.18-0088.

MASATO, A., PLOTEGHER, N., BOASSA, D., *et al.* Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. Molecular Neurodegeneration. [S.l: s.n.]. , 2019.

MAZZULLI, J. R., XU, Y. H., SUN, Y., *et al.* "Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies", Cell, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.001.

MAZZULLI, J. R., ZUNKE, F., ISACSON, O., *et al.* " α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1520335113.

MAZZULLI, J. R., ZUNKE, F., TSUNEMI, T., *et al.* "Activation of β -glucocerebrosidase reduces pathological α -synuclein and restores lysosomal function in Parkinson's patient

midbrain neurons", *Journal of Neuroscience*, 2016. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0628-16.2016.

Medicines in Development for Parkinsons Disease 2014 Report - PhRMA - [www.phrma.org <http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/2014-parkinsons-report.pdf>](http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/2014-parkinsons-report.pdf). Acessado em 31/01/2020.

MICHEL, P. P., HIRSCH, E. C., HUNOT, S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*. [S.l: s.n.]. , 2016.

MILLER, I. N., CRONIN-GOLOMB, A. Gender differences in Parkinson's disease: Clinical characteristics and cognition. *Movement Disorders*. [S.l: s.n.]. , 2010.

MILLER, J. D., GANAT, Y. M., KISHINEVSKY, S., *et al.* "Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging", *Cell Stem Cell*, 2013. DOI: 10.1016/j.stem.2013.11.006.

MINIÑO, A. M., HERON, M. P., SMITH, B. L. "Deaths: preliminary data for 2004.", *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*, 2006.

MITSUI, J., MIZUTA, I., TOYODA, A., *et al.* "Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease", *Archives of Neurology*, 2009. DOI: 10.1001/archneurol.2009.72.

MOOTHA, V. K., LINDGREN, C. M., ERIKSSON, K. F., *et al.* "PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes", *Nature Genetics*, 2003. DOI: 10.1038/ng1180.

MORALE, M. C., SERRA, P. A., L'EPISCOPO, F., *et al.* "Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: Glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration", *Neuroscience*, 2006. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.07.060.

MULLIN, S., HUGHES, D., MEHTA, A., *et al.* Neurological effects of glucocerebrosidase gene mutations. *European Journal of Neurology*. [S.l: s.n.]. , 2019.

MUNOZ, D. G., FUJIOKA, S. "Caffeine and Parkinson disease: A possible diagnostic and pathogenic breakthrough.", *Neurology*, 2018. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004898.

MURPHY, S. L., XU, J., KOCHANNEK, K. D. "Deaths: final data for 2010.", *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*, 2013.

NALLS M.A., DURAN R., LOPEZ G., ET AL. A MULTICENTER STUDY OF GLUCOCEREBROSIDASE MUTATIONS IN DEMENTIA WITH LEWY BODIES. *JAMA NEUROLOGY*. 2013;70(6):727-735.

NEUDORFER, O., GILADI, N., ELSTEIN, D., *et al.* "Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease", *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 1996. DOI: 10.1093/qjmed/89.9.691.

NGUYEN, H. N., BYERS, B., CORD, B., *et al.* "LRRK2 mutant iPSC-derived da neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress", *Cell Stem Cell*, 2011. DOI: 10.1016/j.stem.2011.01.013.

NOLBRANT, S., HEUER, A., PARMAR, M., *et al.* "Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for in vitro maturation and intracerebral transplantation", *Nature Protocols*, 2017. DOI: 10.1038/nprot.2017.078.

NOYCE, A. J., LEES, A. J., SCHRAG, A. E. The prediagnostic phase of Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. [S.l: s.n.], 2016.

OAKLEY, A. E., COLLINGWOOD, J. F., DOBSON, J., *et al.* "Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease", *Neurology*, 2007. DOI: 10.1212/01.wnl.0000262033.01945.9a.

OMOLE, A. E., FAKOYA, A. O. J. "Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: Historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications", *PeerJ*, 2018. DOI: 10.7717/peerj.4370.

PACINI S., GULISANO M., PERUZZI B., SGAMBATI E., GHERI G., BRYK S.G., *et al.* Effects of 0.2 T static magnetic field on human skin fibroblasts. *Cancer Detect Prev* 2003;27:327–32.

PAMIES, D., BAL-PRICE, A., SIMEONOV, A., *et al.* "Good cell culture practice for stem cells & stem-cell-derived models". 2017. *Anais [...]* [S.l: s.n.], 2017. DOI: 10.14573/altex.1607121.

PARK, C. H., MINN, Y. K., LEE, J. Y., *et al.* "In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons", *Journal of Neurochemistry*, 2005. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.03006.x.

PARK, I. H., ARORA, N., HUO, H., *et al.* "Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells", *Cell*, 2008. DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.041.

PARK, J. K., ORVISKY, E., TAYEBI, N., *et al.* "Myoclonic epilepsy in Gaucher disease: Genotype-phenotype insights from a rare patient subgroup", *Pediatric Research*, 2003. DOI: 10.1203/01.PDR.0000049515.79882.94.

PAULSEN, B. da S., MACIEL, R. de M., GALINA, A., *et al.* "Altered oxygen metabolism associated to neurogenesis of induced pluripotent stem cells derived from a schizophrenic patient", *Cell Transplantation*, 2012. DOI: 10.3727/096368911X600957.

PÉREZ CALVO J.I., GIRALDO CASTELLANO P. [Treatment of type 1 Gaucher's disease. Still a long way to go]. *Med Clin (Barc)*. 2000 May 27;114(20):774-6.

PITCAIRN, C., WANI, W. Y., MAZZULLI, J. R. Dysregulation of the autophagic-lysosomal pathway in Gaucher and Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. [S.l: s.n.], 2019.

POEWE, W., SEPPI, K., TANNER, C. M., *et al.* "Parkinson disease", *Nature Reviews Disease Primers*, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.13.

QI, Y., ZHANG, X. J., RENIER, N., *et al.* "Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells", *Nature Biotechnology*, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3777.

QIAN, L., FLOOD, P. M. Microglial cells and Parkinson's disease. *Immunologic Research*. [S.l: s.n.], 2008.

RAJSOMBATH, M. M., NAM, A. Y., ERICSSON, M., *et al.* "Female Sex and Brain-Selective Estrogen Benefit α -Synuclein Tetramerization and the PD-like Motor Syndrome in 3K

Transgenic Mice", *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2019. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0313-19.2019.

REGENBOOG, M., VAN KUILENBURG, A. B. P., VERHEIJ, J., *et al.* Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher disease: Potential pathophysiological implications. *Blood Reviews*. [S.l: s.n.], 2016.

RIBOLDI, G. M., DI FONZO, A. B. "GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches", *Cells*, 2019. DOI: 10.3390/cells8040364.

Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, Parad RB, Witt D, Klinger KW. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet* 2: 159-163, 1993.

ROODVELDT, C., LABRADOR-GARRIDO, A., GONZALEZ-REY, E., *et al.* "Preconditioning of microglia by α -synuclein strongly affects the response induced by toll-like receptor (TLR) stimulation", *PLoS ONE*, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0079160.

ROZENBERG, R., FOX, D. C., SOBREIRA, E., *et al.* "Detection of 12 new mutations in Gaucher disease Brazilian patients", *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2006. DOI: 10.1016/j.bcmd.2006.09.004.

ROZENBERG, R., ARAÚJO, F. T., FOX, D. C., *et al.* "High frequency of mutation G377S in Brazilian type 3 Gaucher disease patients", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2006. DOI: 10.1590/S0100-879X2006000900004.

SAHA, K., JAENISCH, R. Technical Challenges in Using Human Induced Pluripotent Stem Cells to Model Disease. *Cell Stem Cell*. [S.l: s.n.], 2009.

SAIKI, S., SATO, S., HATTORI, N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: Update. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. [S.l: s.n.], 2012.

SAMII, A., NUTT, J. G., RANSOM, B. R. "Parkinson's disease". 2004. *Anais [...]* [S.l: s.n.], 2004. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16305-8.

SARAFIAN, R., MORATO-MARQUES, M., BORSOI, J., *et al.* "Monitoring cell line identity in collections of human induced pluripotent stem cells", *Stem Cell Research*, 2018. DOI: 10.1016/j.scr.2018.01.030.

SARDI, S. P., CEDARBAUM, J. M., BRUNDIN, P. Targeted Therapies for Parkinson's Disease: From Genetics to the Clinic. *Movement Disorders*. [S.l: s.n.], 2018.

SARDI, S. P., CHENG, S. H., SHIHABUDDIN, L. S. Gaucher-related synucleinopathies: The examination of sporadic neurodegeneration from a rare (disease) angle. *Progress in Neurobiology*. [S.l: s.n.], 2015.

SARDI, S. P., CLARKE, J., KINNECOM, C., *et al.* "CNS expression of glucocerebrosidase corrects α -synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1108197108.

SARDI, S. P., CLARKE, J., VIEL, C., *et al.* "Augmenting CNS glucocerebrosidase activity as a therapeutic strategy for parkinsonism and other Gaucher-related synucleinopathies", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1220464110.

SASSI C. Genetics of Parkinson Disease. Submitted: November 8th 2010 Reviewed: August 22nd 2011 Published: October 12th 2011. DOI: 10.5772/20390.

SATO, C., MORGAN, A., LANG, A. E., *et al.* "Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease", *Movement Disorders*, 2005. DOI: 10.1002/mds.20319.

SAUNDERS-PULLMAN, R., GORDON-ELLIOTT, J., PARIDES, M., *et al.* "The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease", *Neurology*, 1999. DOI: 10.1212/wnl.52.7.1417.

SCHAPIRA, A. H. V. Glucocerebrosidase and Parkinson disease: Recent advances. *Molecular and Cellular Neuroscience*. [S.l: s.n.], 2015.

SCHAPIRA, A. H. V., CHAUDHURI, K. R., JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*. [S.l: s.n.], 2017.

SCHÖNDORF, D. C., AURELI, M., MCALLISTER, F. E., *et al.* "iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis", *Nature Communications*, 2014. DOI: 10.1038/ncomms5028.

SCHULTE, C., GASSER, T. Genetic basis of Parkinson's disease: Inheritance, penetrance, and expression. *Application of Clinical Genetics*. [S.l: s.n.], 2011.

SCHULZ-SCHAEFFER, W. J. The synaptic pathology of α -synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathologica*. [S.l: s.n.], 2010.

SCHWAB, A. J., EBERT, A. D. "Neurite Aggregation and Calcium Dysfunction in iPSC-Derived Sensory Neurons with Parkinson's Disease-Related LRRK2 G2019S Mutation", *Stem Cell Reports*, 2015. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.11.004.

SCHWAB A.D. 1, THURSTON M.J., MACHHI J., OLSON K.E., NAMMINGA K.L., GENDELMAN H.E., MOSLEY R.L. Immunotherapy for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* Volume 137, April 2020, 104760 <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104760>

SEMEANO, A.T.S. Efeitos do campo magnético na diferenciação neuronal e mecanismos iônicos envolvidos. 2018. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

SHULMAN, J.M., DE JAGER, P. L. & FEANY, M. B. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 6, 193-222, 2011.

SHULMAN, L. M. "Is there a connection between estrogen and Parkinson's disease?", *Parkinsonism and Related Disorders*, 2002. DOI: 10.1016/S1353-8020(02)00014-7.

SHULMAN, L. M. "Gender differences in Parkinson's disease", *Gender Medicine*, 2007. DOI: 10.1016/S1550-8579(07)80003-9.

SIDRANSKY, E. Gaucher disease: Complexity in a "simple" disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*. [S.l: s.n.], 2004.

SIDRANSKY, E., LOPEZ, G. "The link between the GBA gene and parkinsonism", *The Lancet Neurology*, 2012. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70190-4.

SIDRANSKY, E., NALLS, M. A., AASLY, J. O., *et al.* "Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease", *New England Journal of Medicine*, 2009. DOI: 10.1056/NEJMoa0901281.

SIEBERT M., SIDRANSKY E., WESTBROEK W. Glucocerebrosidase is shaking up the synucleinopathies. *Brain*. 2014;137(5):1304-22.

SOLDNER, F., HOCKEMEYER, D., BEARD, C., *et al.* "Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors", *Cell*, 2009. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.013.

SONNTAG, K. C., SONG, B., LEE, N., *et al.* Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects. *Progress in Neurobiology*. [S.l: s.n.], 2018.

SOTO, C. "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases", *Nature Reviews Neuroscience*, 2003. DOI: 10.1038/nnr1007.

SPITZ, M., ROZENBERG, R., SILVEIRA, P. A. A., *et al.* Parkinsonism in type 1 Gaucher's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. England, [s.n.], maio 2006

SPITZ, M. "Mutações da glicocerebrosidase em pacientes com doença de Parkinson", Tese de doutoramento na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

SPITZ, M., ROZENBERG, R., DA VEIGA PEREIRA, L., *et al.* "Association between Parkinson's disease and glucocerebrosidase mutations in Brazil", *Parkinsonism and Related Disorders*, 2008. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2007.06.010.

STEPHANO, F., NOLTE, S., HOFFMANN, J., *et al.* "Impaired Wnt signaling in dopamine containing neurons is associated with pathogenesis in a rotenone triggered *Drosophila* Parkinson's disease model", *Scientific Reports*, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-20836-w.

STOJKOVSKA, I., KRAINIC, D., MAZZULLI, J. R. "Molecular mechanisms of alpha-synuclein and GBA1 in Parkinson's disease.", *Cell and tissue research*, v. 373, n. 1, p. 51–60, jul. 2018. DOI: 10.1007/s00441-017-2704-y.

STUDER, L., CSETE, M., LEE, S. H., *et al.* "Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen", *Journal of Neuroscience*, 2000. DOI: 10.1523/jneurosci.20-19-07377.2000. .

SUBRAMANIAN, A., TAMAYO, P., MOOTHA, V. K., *et al.* "Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0506580102.

SUN, Y., FLORER, J., MAYHEW, C. N., *et al.* "Properties of neurons derived from induced pluripotent stem cells of Gaucher disease type 2 patient fibroblasts: Potential role in neuropathology", *PLoS ONE*, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0118771.

TOLOSA E., WENNING G., POEWE W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006 Jan;5(1):75-86.

TAYEBI, N., CALLAHAN, M., MADIKE, V., *et al.* "Gaucher disease and parkinsonism: A phenotypic and genotypic characterization", *Molecular Genetics and Metabolism*, 2001. DOI: 10.1006/mgme.2001.3201.

TAYEBI, N., WALKER, J., STUBBLEFIELD, B., *et al.* "Gaucher disease with parkinsonian manifestations: Does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism?", *Molecular Genetics and Metabolism*, 2003. DOI: 10.1016/S1096-7192(03)00071-4.

TOFFOLI M., VIEIRA SRL., SCHAPIRA AHV. Genetic causes of PD: A pathway to disease modification. *Neuropharmacology*. 2020 Feb 29;170:108022. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.108022.

TOFOLI, F. A., CHIEN, H. F., BARBOSA, E. R., *et al.* "Generation of three human induced pluripotent stem cell (hiPSC) lines derived from one Gaucher disease patient with Parkinson's disease and two unrelated Parkinson's disease patients with GBA mutations", *Stem Cell Research*, 2019. DOI: 10.1016/j.scr.2019.101519.

TOFOLI, F. A., DASSO, M., MORATO-MARQUES, M., *et al.* "Increasing the Genetic Admixture of Available Lines of Human Pluripotent Stem Cells", *Scientific Reports*, 2016. DOI: 10.1038/srep34699.

TOFOLI, F. A., SEMEANO, A. T. S., OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á., *et al.*, "Midbrain dopaminergic neurons differentiated from human-induced pluripotent stem cells". *Methods in Molecular Biology*, [S.l: s.n.], 2019. . DOI: 10.1007/978-1-4939-9007-8_8.

TOFOLI, F. de A., CHIEN, H. F., BARBOSA, E. R., *et al.* "Generation of 5 hiPSC lines derived from three unrelated idiopathic Parkinson disease patients and two unrelated healthy control individuals", *Stem Cell Research*, 2019. DOI: 10.1016/j.scr.2019.101640.

TOLOSA, E., WENNING, G., POEWE, W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurology*. [S.l: s.n.], 2006.

TRONCOSO-ESCUADERO, P., PARRA, A., NASSIF, M., *et al.* Outside in: Unraveling the role of neuroinflammation in the progression of Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*. [S.l: s.n.], 2018 TSANKOV, A. M., AKOPIAN, V., POP, R., *et al.* "A qPCR ScoreCard quantifies the differentiation potential of human pluripotent stem cells", *Nature Biotechnology*, 2015. DOI: 10.1038/nbt.3387.

VÁRKONYI, J., SIMON, Z., SOÓS, K., *et al.* "Gaucher disease type I complicated with Parkinson's syndrome", *Haematologia*, 2002. DOI: 10.1163/15685590260461084.

WAGENFÜHR, L., MEYER, A. K., MARRONE, L., *et al.* "Oxygen Tension Within the Neurogenic Niche Regulates Dopaminergic Neurogenesis in the Developing Midbrain", *Stem Cells and Development*, 2016. DOI: 10.1089/scd.2015.0214.

WANG J., XIANG B., DENG J., FREED D.H., ARORA R.C., TIAN G.. Inhibition of Viability, Proliferation, Cytokines Secretion, Surface Antigen Expression, and Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells by Seven-Day Exposure to 0.5 T Static Magnetic Fields. *Stem Cells Int* 2016;2016.

WANG, Q., LIU, Y., ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration*. [S.l: s.n.], 2015

WEYKOPF B., HAUPT S., JUNGVERDORBEN J., *et al.* Induced pluripotent stem cell-based modeling of mutant LRRK2-associated Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2019 Feb;49(4):561-589. doi: 10.1111/ejn.14345.

WONG K., SIDRANSKY E., VERMA A., *et al.* Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 82: 192-207, 2004.

WOODARD, C. M., CAMPOS, B. A., KUO, S. H., *et al.* "IPSC-derived dopamine neurons reveal differences between monozygotic twins discordant for parkinson's disease", *Cell Reports*, 2014. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.10.023.

World Health Organization. Ageing and health. 5 February, 2018. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs404/en/>>. Acessado em 31/01/2020.

XIA, N., ZHANG, P., FANG, F., *et al.* "Transcriptional comparison of human induced and primary midbrain dopaminergic neurons", *Scientific Reports*, 2016. DOI: 10.1038/srep20270.

XU, J., MURPHY, S. L., KOCHANKE, K. D., *et al.* "Deaths: Final Data for 2016", *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*, 2018.

YAEGER, A. Is It Time to Rethink Parkinson's Pathology? October 1, 2019. Disponível em: <https://www.the-scientist.com/features/is-it-time-to-rethink-parkinsons-pathology-66449?utm_campaign=TS_DAILY%20NEWSLETTER_2019&utm_source=hs_email&utm_medium=email&utm_content=78609854&_hsenc=p2ANqtz-9l66mqJ_aptnzwmkE-zDKpO_5Cnrf7BDpDwsmY6xbfXQr4lWmR3y5nx-grU6rtlBJCsNFX5kjX4nfOTrXQh4orqPBM9A&_hsmi=78609854>. Acessado em 31/01/2020.

YAP, T. L., VELAYATI, A., SIDRANSKY, E., *et al.* "Membrane-bound α -synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity", *Molecular Genetics and Metabolism*, 2013. DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.11.010.

YAZDANI, S., MARIOSI, D., HAMMAR, N., *et al.* "Peripheral immune biomarkers and neurodegenerative diseases: A prospective cohort study with 20 years of follow-up", *Annals of Neurology*, 2019. DOI: 10.1002/ana.25614.

ZECCA, L., TAMPELLINI, D., GERLACH, M., *et al.* Substantia nigra neuromelanin: Structure, synthesis, and molecular behaviour. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*. [S.l: s.n.], 2001.

ZECCA, L., CASELLA, L., ALBERTINI, A., *et al.* "Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease", *Journal of Neurochemistry*, 2008. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05541.x.

ZECCA, L., ZUCCA, F. A., WILMS, H., *et al.* Neuromelanin of the substantia nigra: A neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends in Neurosciences*. [S.l: s.n.], 2003.

ZHANG, P., XIA, N., REIJO PERA, R. A. "Directed dopaminergic neuron differentiation from human pluripotent stem cells", *Journal of Visualized Experiments*, 2014. DOI: 10.3791/51737.

ZHANG, X. Q., ZHANG, S. C. "Differentiation of neural precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells.", *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2010. DOI: 10.1007/978-1-60761-369-5_19.

ZUCCA, F. A., GIAVERI, G., GALLORINI, M., *et al.* The neuromelanin of human substantia nigra: Physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Research*. [S.l: s.n.], 2004.

ZUCCA, F. A., SEGURA-AGUILAR, J., FERRARI, E., *et al.* Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. [S.l: s.n.], 2017.

ZUCCA, F. A., VANNA, R., CUPAIOLI, F. A., *et al.* "Neuromelanin organelles are specialized autolysosomes that accumulate undegraded proteins and lipids in aging human brain and are likely involved in Parkinson's disease", *npj Parkinson's Disease*, 2018. DOI: 10.1038/s41531-018-0050-8.

ZUNKE, F., MAZZULLI, J. R. Modeling neuronopathic storage diseases with patient-derived culture systems. *Neurobiology of Disease*. [S.l: s.n.], 2019.

ZYGOGIANNI, O., ANTONIOU, N., KALOMOIRI, M., *et al.* "In Vivo Phenotyping of Familial Parkinson's Disease with Human Induced Pluripotent Stem Cells: A Proof-of-Concept Study", *Neurochemical Research*, 2019. DOI: 10.1007/s11064-019-02781-w.

ANEXOS

ANEXO I - Assinaturas Gênicas

Tabela 18: Assinatura gênica para neurogênese e mDAN imaturos.

Símbolo do gene	Nome do gene (nome alternativo)	Referencias
FOXA2 (TCF-3B ou HNF-3B)	forkhead box protein A2 (FOXA2) ou transcription factor 3B (TCF-3B) ou Hepatocyte nuclear factor 3-beta (HNF-3B)	Zhang et al., 2014; Bodea & Blaess, 2015; Arenas et al., 2015; Xia et al., 2016; La Manno et al., 2016; Kee et al., 2017; Kirkeby et al., 2017; Marton et al., 2019
LMX1A	LIM homeobox transcription factor 1, alpha	Zhang et al., 2014; Bodea & Blaess, 2015; Arenas et al., 2015; Xia et al., 2016; Jo et al., 2016; Kee et al., 2017; Kirkeby et al., 2017; Marton et al., 2019
WNT1	Wnt Family Member 1or Proto-oncogene protein	Xia et al., 2016
SOX1	SRY-box transcription factor 1	Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
LMX1B	LIM Homeobox Transcription Factor 1 Beta	Bodea & Blaess, 2015; Arenas et al., 2015; Xia et al., 2016; Jo et al., 2016; Kee et al., 2017; Kirkeby et al., 2017; Marton et al., 2019
SLC18A1 (VMAT1)	Solute Carrier Family 18 Member ou Vesicular monoamine transporter 1 ou chromaffin granule amine transporter (CGAT)	
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor ou Astrocyte-Derived Trophic Factor	Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor ou Neurotrophin	Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
CORIN	Serine Peptidase ou atrial natriuretic peptide-converting enzyme	Zhang et al., 2014; Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
HOXA2	Homeobox A2or Homeobox protein Hox-A2	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
PAX6	Paired box protein 6 ou aniridia type II protein (AN2) ou oculorhombin	Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
ASCL1 (MASH1)	Achaete-scute homolog 1 ou mammalian achaete scute homolog-1	Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
NGN2 (NEUROG2)	Neurogenin-2	Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
WNT5A	Wnt Family Member 5A	Arenas et al., 2015; Jo et al., 2016; Marton et al., 2019
SOX6	SRY-Box Transcription Factor 6	Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
MAP2 (MTAP2)	Microtubule-associated protein 2	Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019; Jo et al., 2015
RBFOX3 (NEUN)	RNA Binding Fox-1 Homolog 3 or neuronal nuclei	Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
TUBB3 (TUJ1)	Tubulin Beta 3 Class III ou Neuron-specific Class III β -tubulin	Xia et al., 2016
FOXA1	Forkhead box protein A1	Bodea & Blaess, 2015; Xia et al., 2016; La Manno et al., 2016; Kee et al., 2017; Kirkeby et al., 2017
FOXP1	Forkhead Box P1	Kee et al., 2017; Kirkeby et al., 2017
FOXP2	Forkhead Box P2	Xia et al., 2016; Kee et al., 2017; Kirkeby et al., 2017
MSX1	Msh Homeobox 1	Kee et al., 2017; Kirkeby et al., 2017
DLK1	Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1ou Protein delta homolog 1	Xia et al., 2016
DRD2	Dopamine receptor D2	Xia et al., 2016
Pitx2	Paired Like Homeodomain 2	Xia et al., 2016; Kee et al., 2017

Nomenclatura gênica consultada no site: www.genecards.org

Tabela 19: Assinatura gênica para neurônios dopaminérgicos A9 maduros da SNpc do mesencéfalo.

Símbolo do gene	Nome do gene (nome alternativo)	Referencias
PAX8	Paired-box gene 8	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
CNPY1	Canopy FGF Signaling Regulator 1	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
EN1 (HME)	Engrailed (En) 1 homeobox gene	Xia et al., 2016; Arenas et al., 2015; Bodea & Blaess, 2015; La Manno et al., 2016; Jo et al., 2016; Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017; Kee et al., 2017; Marton et al., 2019
TH (TY3H)	Tyrosine hydroxylase	Xia et al., 2016; Arenas et al., 2015; Bodea & Blaess, 2015; Jo et al., 2016; La Manno et al., 2016; Kee et al., 2017; Marton et al., 2019
SLC6A3 (DAT)	Solute Carrier Family 6 Member 3 ou dopamine active transporter	Xia et al., 2016; Bodea & Blaess, 2015; Arenas et al., 2015; Marton et al., 2019
PITX3	Pituitary homeobox 3	Xia et al., 2016; Arenas et al., 2015; Bodea & Blaess, 2015; Kee et al., 2017; Marton et al., 2019
KCNJ6 (GIRK2)	G protein-activated inward rectifier potassium channel 2	Xia et al., 2016; Arenas et al., 2015; Bodea & Blaess, 2015; Jo et al., 2016; Marton et al., 2019
NR4A2 (NURR1)	Nuclear receptor related 1 protein	Xia et al., 2016; La Manno et al., 2016; Jo et al., 2016; Kee et al., 2017; Kirkeby et al., 2017
OTX2	Orthodenticle homeobox 2	Zhang et al., 2014; Arenas et al., 2015; Xia et al., 2016; Bodea & Blaess, 2015; Marton et al., 2019
ETV5	ETS Variant Transcription Factor 5	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
SPRY1 (SPY1)	Sprouty RTK Signaling Antagonist 1	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
SLC18A2 (VMAT2)	Vesicular monoamine transporter 2	Arenas et al., 2015; Bodea & Blaess, 2015; Xia et al., 2016; La Manno et al., 2016; Marton et al., 2019
FGF8	Fibroblast growth factor 8	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
OTX1	Orthodenticle homeobox 1	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
DDC (5-HT ou AADC ou AAAD)	DOPA decarboxylase	Arenas et al., 2015; Bodea & Blaess, 2015; Xia et al., 2016; Jo et al., 2016; La Manno et al., 2016
SLC6A2 (NET)	Solute Carrier Family 6 Member 2 (Norepinephrine transporter)	Xia et al., 2016
ALDH1A1 (RALDH1)	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	Bodea & Blaess, 2015; Jo et al., 2016; Arenas et al., 2015; Jo et al., 2016; Xia et al., 2016; La Manno et al., 2016
MYTL1	Myelin transcription factor 1 like	Xia et al., 2016
ASCL1	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1	Xia et al., 2016
CDKN1C (CDN1C)	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C	Arenas et al., 2015
CALB (CALB1)	Calbindin 1	Bodea & Blaess, 2015; Jo et al., 2016; Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
EN2 (HME2)	Engrailed Homeobox 2	Bodea & Blaess, 2015; Jo et al., 2016; Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
PAX5	Paired Box 5	Xia et al., 2016; Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
SP5	Sp5 Transcription Factor	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
ETV4	ETS Variant Transcription Factor 4	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
TLE4	TLE Family Member 4, Transcriptional Corepressor	Kirkeby et al., 2017; Nolbrant et al., 2017
RET	Ret Proto-Oncogene	Arenas et al., 2015
PBX1	PBX Homeobox 1	La Manno et al., 2016; Kee et al., 2016; Kirkeby et al., 2017
KLHL1	Kelch Like Family Member 1	La Manno et al., 2016
GFRA1	GDNF Family Receptor Alpha 1	La Manno et al., 2016

ANEXO II

Figura 39: Análise do cariótipo por SNP-Array das linhagens de iPSC: os gráficos acima das ilustrações dos cromossomos representam a frequência alélica (B allele frequency) e a razão alélica (Log R Ratio) (Retirado de Tofoli *et al*, 2019a e 2019b).

ANEXO III

Figura 40: Análise de pluripotência por ensaios imunocitoquímicos das 9 linhagens de iPSC com os anticorpos contra: OCT4 (marcador nuclear), SOX2 (marcador nuclear) e SSEA4 (marcador de membrana). Barras de escala = 75 µm e amplificação de 200x (Retirado de Tofoli *et al*, 2019a e 2019b).

ANEXO IV

Figura 41: Análise de pluripotência por ensaios imunocitoquímicos das 9 linhagens de iPSC com os anticorpos contra: SOX1 (marcador nuclear), TRA-1-81 (marcador de membrana), cMYC (marcador nuclear), SSEA3 (marcador de membrana) e TRA-1-60 (marcador de membrana). Barras de escala = 75 μm e amplificação de 200x.

ANEXO V

Figura 42: Histogramas da caracterização de pluripotência por citometria de fluxo com os anticorpos contra NANOG (A), OCT3/4 (B) e SOX2 (C): Histograma preto representa a célula não marcada (isotipo controle) e vermelho representa o percentual das amostras positivas marcadas pelos anticorpos (Retirado de Tofoli *et al*, 2019a e 2019b).

ANEXO VI

Figura 43: Visualização dos corpos embrióides em campo claro: **A** - Morfologia dos EBs cultivados em suspensão no 5º dia de diferenciação. **B** - Morfologia das culturas dos EBs no 21º dia da diferenciação aderidos à matriz (gelatina) com crescimento espontâneo nos 3 folhetos germinativos (barras de escala: 1000 µm = aumento 40x; 400 µm = aumento de 100x).

ANEXO VII

Figura 44: Resultados complementares da análise da expressão gênica oriundas do crescimento espontâneo dos EBs derivados das linhagens de iPSC. **A** - As pontuações são uma comparação estatística do perfil das amostras com o do conjunto de linhagens referência indiferenciadas. **B** - Mapa de calor (Heat Map), as cores indicam o "fold change" na expressão do gene indicado em relação ao conjunto referência de linhagens celulares indiferenciadas.

ANEXO VIII

Figura 45: Resultados da análise da expressão gênica das linhagens de iPSC. **Esquerda:** Resumo do nível de expressão gênica que confirma a pluripotência ou indica o viés da camada germinativa da amostra. **Direita:** Mapa de calor (Heat Map): As cores indicam o "fold change" na expressão do gene indicado em relação ao conjunto referência de linhagens celulares indiferenciadas do programa.

ANEXO IX

Figura 46: A morfologia celular muda durante o progresso da diferenciação neural dopaminérgica (DND) de iPSC em neuronios dopaminérgicos (iDA). (A, B, C) cultura de hiPSC submetida ao protocolo de DND exibindo alterações morfológicas entre 0 e 36 dias *in vitro* (concentração de $\sim 2 \times 10^5$ células/cm² durante a passagem no 20º dia; (D) iDA no 36º dia de diferenciação quando passado (20º) dia em baixa concentração; (E) Grupos de iDA se soltando da matriz (Geltrex 2x) entre os dia 8-13 da diferenciação *in vitro* (modificado de Tofoli *et al*, 2019).

ANEXO X

Figura 47: Morfologia dos neurônios dopaminérgicos (iDA-PD-GD, iDA-PD-GBA1, iDA-PD-GBA2 iDA-PD1, iDA-PD2, iDA-PD3, iDA-CT2 e iDA-CT3) diferenciados a partir de iPSC após a diferenciação neural dopaminérgica (DND) nas 3 diferentes condições de cultivo (normóxia, hipóxia e EMF) nos dias 15, 20 e 35 da DND em campo claro (barras de escala: 1000 μm = aumento 40x; 400 μm = aumento 100x e 200 μm = aumento de 200x).

Figura 47: Morfologia dos neurônios dopaminérgicos (iDA-PD-GD, iDA-PD-GBA1, iDA-PD-GBA2 iDA-PD1, iDA-PD2, iDA-PD3, iDA-CT2 e iDA-CT3) diferenciados a partir de iPSC após a diferenciação neural dopaminérgica (DND) nas 3 diferentes condições de cultivo (normóxia, hipóxia e EMF) nos dias 15, 20 e 35 da DND em campo claro (barras de escala: 1000 μm = aumento 40x; 400 μm = aumento 100x e 200 μm = aumento de 200x).

Figura 47: Morfologia dos neurônios dopaminérgicos (iDA-PD-GD, iDA-PD-GBA1, iDA-PD-GBA2 iDA-PD1, iDA-PD2, iDA-PD3, iDA-CT2 e iDA-CT3) diferenciados a partir de iPSC após a diferenciação neural dopaminérgica (DND) nas 3 diferentes condições de cultivo (normóxia, hipóxia e EMF) nos dias 15, 20 e 35 da DND em campo claro (barras de escala: 1000 μm = aumento 40x; 400 μm = aumento 100x e 200 μm = aumento de 200x).

Figura 47: Morfologia dos neurônios dopaminérgicos (iDA-PD-GD, iDA-PD-GBA1, iDA-PD-GBA2 iDA-PD1, iDA-PD2, iDA-PD3, iDA-CT2 e iDA-CT3) diferenciados a partir de iPSC após a diferenciação neural dopaminérgica (DND) nas 3 diferentes condições de cultivo (normóxia, hipóxia e EMF) nos dias 15, 20 e 35 da DND em campo claro (barras de escala: 1000 μm = aumento 40x; 400 μm = aumento 100x e 200 μm = aumento de 200x).

ANEXO XI

Tabela 20: Contagem celular dos iDA no 20 e 35º dia da DND.

Amostra	Etapas da DND	Condição da DND	Contagem no 20º dia ($\times 10^5$) (câmara Neubauer)	Contagem por poço 35º dia ($\times 10^5$) (contagem TC 20)
iDA-PD-GD	14	High	22,9	3,6
iDA-PD-GD	17.1	Low	15,5	2,2
iDA-PD-GD	17.1	EMF	37	2,4
iDA-PD-GBA1	15	High	28,7	6,75
iDA-PD-GBA1	15	Low	18,4	4,2
iDA-PD-GBA1	15	EMF	18,7	11
iDA-PD-GBA2	17.1	High	45,3	4,7
iDA-PD-GBA2	17.1	Low	39	1,1
iDA-PD-GBA2	17.1	EMF	22,8	5
iDA-PD1	16	High	26,7	4
iDA-PD1	16	Low	8,4	3,2
iDA-PD1	16	EMF	20,7	11,5
iDA-PD2	15	High	20,5	1,8
iDA-PD2	15	Low	9,25	2,5
iDA-PD2	15	EMF	17,5	1,5
iDA-PD3	14	High	15,3	16,8
iDA-PD3	17.2	Low	5,7	morreram
iDA-PD3	17.2	EMF	11,75	1,75
iDA-CT1	14	High	22,9	3,2
iDA-CT1	14	Low	13,3	3,2
iDA-CT1	14	EMF	22,5	7,5
iDA-CT2	15	High	21	15
iDA-CT2	15	Low	7,9	2,3
iDA-CT2	15	EMF	20	15,5
iDA-CT3	16	High	20,5	3,7
iDA-CT3	16	Low	10,4	2,5
iDA-CT3	16	EMF	16,75	7,5

Passagem da iPSC no dia 0 da DND = $2,5 \times 10^4$ céls./cm² ($\sim 9,5 \times 10^4$ céls./poço da placa de 12).

Passagem mDAN no 20º dia da DND = 2×10^5 céls./cm² ($\sim 7,6 \times 10^5$ céls./poço da placa de 12).

ANEXO XII

Figura 48: Influência do campo magnético externo (EMF) e da presença de nanopartículas de magnetita (MNPs) na proliferação e morfologia de neurônios dopaminérgicos diferenciados a partir de iPSC (iDA) durante a diferenciação neural dopaminérgica (DND) das amostras: controle (iDA-CT1), paciente com a Doença de Parkinson (iDA-PD3) e paciente com a doença de Parkinson e Gaucher (iDA-PD-GD) diferenciadas nas condições: normóxia (ausência de estímulo magnético), normóxia na presença de EMF (0,35 T) e em normóxia na presença de MNPs (0.5%). **A** - durante 20 dias; **B** - durante 25 dias; **C** - durante 35 dias (barra de escala de 100 μ m) (modificado de Semeano, 2018).

ANEXO XIII

Figura 49: Influência da presença do campo magnético externo (EMF) e nanopartículas de magnetita (MNPs) na proliferação e morfologia de neurônios dopaminérgicos diferenciados a partir de iPSC (iDA) durante a diferenciação neural dopaminérgica (DND). Cultura de células iDA-PD3 diferenciadas nas condições de normóxia (ausência de estímulo magnético) ou na presença de EMF (0,35 T) **A** - durante 20 dias (barra de escala de 400 μ m), **B** - Após a passagem, as células foram cultivadas por mais 15 dias em normóxia, EMF e 0.5% MNPs (barra de escala de 100 μ m) (modificado de Semeano, 2018).

Figura 50: Efeito do campo magnético externo (EMF) e nanopartículas de magnetita (MNPs) na proliferação de neurônios dopaminérgicos (iDA) diferenciados a partir de iPSC. Cultura de iDA de uma amostra de paciente com a doença de Parkinson (iDA-PD3) diferenciada nas condições de: normóxia, EMF e presença de MNPs (0,5%) marcadas com anticorpo Ki-67 (intensidade em escala cinza) após 35 dias de diferenciação neural dopaminérgica (DND) (modificado de Semeano, 2018).

ANEXO XIV

Figura 51: Influencia do campo magnético externo (EMF) e nanopartículas de magnetita (MNPs) na morfologia e fenótipo de neurônios dopaminérgicos (iDA) diferenciados a partir da iPSC-PD3 (paciente com a doença Parkinson) marcada no 35º dia da diferenciação neural dopaminérgica (DND) com anticorpos contra: **A** - TH (tirosina hidroxilase) e TUJ1 (βIII-tubulina); **B** - MAP2; **C** - DA (dopamina). Os núcleos celulares corados com DAPI. Nos painéis A e B, as imagens da direita (barra de calibração de 50µm) são um aumento da área selecionada das figuras à esquerda. Imagens de imunofluorescência obtidas por *TissueFax*, acoplado ao software *StrataQuest Analysis* da *TissueGnostics*, para posterior análise quantitativa de citometria de tecido. (barra de calibração de 100µm) (modificado de Semeano, 2018).