

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

MARIANA MARCZYK SANTOS

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ATAXIA CEREBELAR EM RATOS**

Porto Alegre

2010

MARIANA MARCZYK SANTOS

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELAR EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Medicina e
Ciências da saúde, Área de Concentração
em Neurociências, da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa Dacosta

Porto Alegre

2010

MARIANA MARCZYK SANTOS

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELAR EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da saúde, Área de Concentração em Neurociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovado em 12 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr.

Asdrubal Falavigna

Prof. Dr.

Denise Cantarelli Machado

Prof. Dr.

Jociane de Carvalho Myskiw

A minha mãe, Olenka, que nunca deixou de acreditar em mim e quem dedicou sua vida para construir e esculpir com beleza nossa linda família.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho não seria possível sem a colaboração de pessoas especiais, as quais eu gostaria de exprimir meus mais sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Professor Jaderson Costa da Costa, pela oportunidade de crescimento e pela confiança em mim depositada, pela sabedoria transmitida, entusiasmo pela ciência e pelo exemplo de determinação e coragem.

Ao “professor”, colega e amigo Cristiano Köhler, pela incansável dedicação, atenção e paciência em todas as etapas deste trabalho. Faltam palavras para agradecer o apoio e compreensão. Sua determinação e perfeccionismo aliado à genialidade e indiscutível caráter certamente trilharão um longo e belo caminho. Felizes aqueles que ao seu lado estiverem para aprender e crescer.

Ao admirável professor Martín Cammarota e a todo o seu maravilhoso grupo. Muito obrigada por me acolherem com tanto zelo e cuidado. Por abrirem a porta do seu laboratório e das suas “casas”. Devo a eles a coragem de ir até o final desta jornada. Finalizando esta etapa, sei que cresci profissionalmente e muito além disso, pessoalmente, pelas incontáveis horas que estive entre esse grupo, essa família. Clarice, Ramón, Cristiano, Weber, Júlia, Juliana, Janine, Natália, Andressa, Jociane, Siomara e todos os demais, obrigada pela contribuição a este trabalho e a minha vida, cada um de sua forma. Pelas tarefas ou pelas palavras, pelos ensinamentos ou pelo olhar que conforta, por colorirem meus dias e suavizarem a minha batalha. A conquista é nossa.

Aos colegas do Neurolab, obrigada pela acolhida de todo dia, pelo apoio, pela amizade, pelos “ouvidos” e pelo carinho. Em especial ao meu amigo Samuel, sempre na torcida, a querida Gianina e a serena Bibiana, sempre dispostas a ajudar, pelas dicas da Si De Paula, pela doce companhia da Daniela e pelo sorriso da Carol. Pela força a toda hora da Nelcy, da Zuzete e do Ricardo, pela praticidade e disponibilidade do Daniel e ao meu incansável e sempre alegre parceiro de trabalho Fabiano, obrigada pela colaboração fundamental durante todo experimento deste trabalho.

E finalmente à minha família, meus infinitos agradecimentos, e a quem dedico toda esta conquista. Aos meus queridos e amados irmãos Diogo e Bibiana, pela torcida constante e eterna proteção pela caçula. Ao meu pai, Paulo, minha imagem de vida a seguir. Do afeto e do saber, responsável por toda minha admiração e querer ir sempre além, superando meus limites. À minha mãe, Olenka, a qual melhor não há. Pelas inúmeras vezes que esqueceu-se dela colocando os filhos acima de tudo. Pelos seus incontáveis conselhos, muitos sorrisos, alguns choros e infinitos abraços. Minha aliada na batalha da vida. Valeu. Nós duas sabemos, este trabalho é nosso. Graças ao equilíbrio que esta família me proporciona que, enfim, começo a caminhar com minhas próprias pernas. Muito obrigada por tudo, sem eles, nada disso teria sentido.

Como dizia o poeta e diplomata Vinícius de Moraes:

“Quem já passou por essa vida e não viveu
Pode ser mais, mas sabe menos do que eu
Porque a vida só se dá pra quem se deu
Pra quem amou, pra quem chorou, pra quem sofreu
Ah, quem nunca curtiu uma paixão nunca vai ter nada, não
Não há mal pior do que a descrença
Mesmo o amor que não compensa é melhor do que a solidão
Abre teu braços, meu irmão, deixa cair
Pra que somar, se a gente pode dividir
Eu francamente já não quero nem saber
De quem não vai porque tem medo de sofrer
Ai de quem não rasga o coração, esse não vai ter perdão
Quem nunca curtiu uma paixão, nunca vai ter nada, não”

“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!”

Vinícius de Moraes

RESUMO

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial do transplante de células mononucleares da medula óssea (CMMO) de camundongos reverter o déficit motor em um modelo de ataxia em ratos. Para isto, utilizou-se a cirurgia estereotáxica a fim de infundir ácido ibotênico bilateralmente no núcleo fastigial do cerebelo de ratos Wistar. Nos animais controle, infundiu-se salina ao invés de ácido ibotênico (*sham*) ou submeteu-se alguns animais aos mesmos procedimentos sem nenhuma infusão (*naive*). Três dias após a cirurgia, realizou-se o teste de marcha em cilindro giratório (*rotarod*, em uma versão com velocidade fixa e outra com aceleração progressiva) e o teste de suspensão em fio. Verificou-se que os animais que recebem ácido ibotênico apresentam menor latência de queda no teste do *rotarod* executado com ambos os protocolos, e menor fase de queda no protocolo acelerado, quando comparado aos controles. No quarto dia, os animais lesionados foram designados para um dos seguintes tratamentos, todos pela via venosa: salina, CMMO ou CMMO inativadas. Os animais controle receberam transplante de salina. Realizou-se nova avaliação do comprometimento motor 7 e 14 dias após a cirurgia estereotáxica. Verificou-se que o transplante de CMMO ou CMMO inativadas aumentou a latência e a fase de queda no teste do *rotarod* executado com o protocolo acelerado, bem como a latência de queda no teste executado com o protocolo fixo quando executados 14 dias após a cirurgia, havendo desempenho semelhante aos controles. O grupo com lesão que recebeu transplante de salina não apresentou melhora em nenhum parâmetro e momento dos testes. Não houve diferença no teste de suspensão em fio, em função da lesão ou do transplante. Ao final do experimento, em análise histológica, não se observou diferença no aspecto das lesões entre os grupos que tiveram o núcleo fastigial lesionado. Assim, demonstramos que um xenotransplante de CMMO de camundongos em ratos pode melhorar o desempenho motor em um modelo de ataxia induzido pela lesão excitotóxica bilateral do núcleo fastigial, sem ser possível, entretanto, identificar se tal efeito deve-se à repopulação neuronal e ação trófica das células tronco ou envolve outros mecanismos relacionados com a resposta imunológica do hospedeiro.

Palavras-chave: cerebelo, ataxia, excitotoxicidade, núcleo fastigial, xenotransplante, células-tronco mononucleares de medula óssea

ABSTRACT

The main aim of this study is to assess the potential therapeutic benefits of a mice bone marrow mononuclear cell (BMMC) transplant into an ataxia model in rats. To do so, we infused ibotenic acid bilaterally into the fastigial cerebellar nuclei of Wistar rats using a stereotaxic procedure. As control animals, we infused saline instead of ibotenic acid (sham group) or submitted some animals to the same procedures without intracerebellar infusions (naive group). Three days after surgery, we conducted the motor assessment using the rotarod test (using both fixed and accelerated speed protocols) and the wire suspension test. In comparison to the control groups, the rats that were given ibotenic acid had shorter latencies to fall in both protocols of the rotarod test, and also a shorter phase in which the fall occurred in the accelerated one. In the fourth day, the lesioned animals were designated to receive one of the following transplants: saline infusion, BMMCs or inactivated BMMCs. Both control groups received a saline infusion. In new motor assessments carried on days 7 and 14 post-surgery, we observed that in the latter the transplant of both BMMCs and inactivated BMMCs increased the phase and latency to fall in the accelerated rotarod test, as well as the latency to fall in the fixed rotarod test, yielding a performance similar to the control groups. The lesioned group that received a saline infusion as a transplant remained with the hindered performance across the later tests. There was no difference in the wire suspension test regarding either the presence or the absence of fastigial lesions or the transplant type. In the end of the experiment, we couldn't visualize any difference between any of the lesioned groups regarding the histological lesions at a histological level in the three lesioned groups. Hence, we demonstrated that a xenotransplant of mouse BMMCs can improve the motor performance in an ataxia model induced with the excitotoxic lesion of the fastigial nucleus of rats. However, it was not possible to assess if that effect involves neuronal repopulation and trophic action of the stem cells or is mediated by mechanisms related to the immunological response of the host.

Key-words: cerebellum, ataxia, excitotoxicity, fastigial nucleus, xenotransplant, mononuclear bone marrow stem cells

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Delineamento experimental.....	24
Figura 2 – Teste do <i>rotarod</i>	29
Figura 3 – Teste de suspensão em fio.	30
Figura 4 – Obtenção de CMMO de camundongos C57BL/6-EGFP	31
Figura 5 – Transplante de CMMO melhora o desempenho de ratos com lesão bilateral do núcleo fastigial no teste do <i>rotarod</i> executado com o protocolo acelerado	37
Figura 6 – Transplante de CMMO melhora o desempenho de ratos com lesão bilateral do núcleo fastigial no teste do <i>rotarod</i> executado com protocolo fixo	37
Figura 7 – Transplante de CMMO não afeta o desempenho de ratos com lesão bilateral do núcleo fastigial no teste de suspensão em fio	38
Figura 8 – Citometria de fluxo para imunofenotipagem das CMMO	38
Figura 9 – Fotomicrografias das lesões do núcleo fastigial por ácido ibotênico 14 dias após transplante de CMMO.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das coordenadas utilizadas na lesão bilateral do núcleo fastigial	27
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA – α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate

Anti-GFP – anticorpo contra proteína verde fluorescente

CD4 – grupamento de diferenciação 4 (marcador da linhagem linfócito T helper)

CD19 – grupamento de diferenciação 19 (marcador da linhagem linfócito B)

CD45 – grupamento de diferenciação 45 (marcador de leucócito/eritrócito não maduro)

CD117 – grupamento de diferenciação 117 (marcador de célula-tronco hematopoiética)

CD34 – grupamento de diferenciação 34 (marcador de célula precursora hematopoiética)

CMMO – células mononucleares da medula óssea.

CTMO – células-tronco da medula óssea

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DC – corrente contínua

DMSO – dimetilsulfóxido

EGFP – proteína verde fluorescente melhorada

GFP – proteína verde fluorescente

IBO-SAL – ácido ibotênico + transplante salina

IBO-CMMO – ácido ibotênico + transplante de células mononucleares da medula óssea

IBO-CMMO-Ins – ácido ibotênico + transplante de células mononucleares da medula óssea inativadas

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IL-10 – interleucina 10

i.p – intraperitoneal

IPB – Instituto de Pesquisas Biomédicas

MTT – diphenyl tetrazolium bromide

MO – medula óssea

NMDA – N-metil D-aspartato

PBS – salina com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4)

PBS-TX - salina com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) + Triton X-100 0,3%

PFA – paraformaldeído

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

rpm – rotações por minuto

Sca-1 – antígeno de superfície 1 (marcador de célula tronco não hematopoiética)

SNC – Sistema Nervoso Central

TH2 – linfócito T helper tipo 2

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	CEREBELO	13
1.1.1	Ataxia Cerebelar	15
1.2	EXCITOTOXICIDADE	16
1.3	CÉLULAS-TRONCO.....	17
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAL E METÓDOS	23
3.1	ANIMAIS.....	23
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
3.3	GRUPOS DE ESTUDO	24
3.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	25
3.4.1	Preparação do ácido ibotênico	25
3.4.2	Cirurgia estereotáxica	26
3.4.3	Manipulação	27
3.4.4	Testes motores	27
3.4.5	Transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO)	31
3.4.6	Histologia	33
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35

4	RESULTADOS	36
4.1	DESEMPENHO MOTOR NO MODELO DE ATAXIA INDUZIDO PELA LESÃO BILATERAL DO NÚCLEO FASTIGIAL DO CEREBELO POR ÁCIDO IBOTÊNICO.....	36
4.2	CITOMETRIA DE FLUXO E FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA PARA TRANSPLANTE.....	36
4.3	EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMMO SOBRE O DESEMPENHO MOTOR DE RATOS COM LESÃO BILATERAL DO NÚCLEO FASTIGIAL	38
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA LESÃO DO NÚCLEO FASTIGIAL APÓS TRANSPLANTE COM CMMO	40
4.5	VERIFICAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE CMMO DO ANIMAL DOADOR NO SITIO DE LESÃO DO ANIMAL RECEPTOR.....	42
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÕES.....	50
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	51
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
9	ANEXOS.....	62
9.1	CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS.....	62
9.2	COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO	63
9.3	ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA A REVISTA “THE CEREBELLUM”.....	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 CEREBELO

O cerebelo representa cerca de um décimo do volume encefálico, possuindo, entretanto, cerca da metade dos seus neurônios e amplas conexões de feixes de fibras nervosas, intrínsecas e extrínsecas. As fibras extrínsecas são componentes essenciais de redes neurais subjacentes às variadas funções cerebrais. O cerebelo encontra-se localizado na fossa craniana posterior e apresenta extensas conexões com outras regiões do encéfalo. Recebe aferências provenientes de praticamente todas as regiões do corpo, inclusive dos fusos musculares e tendões, labirinto e núcleos vestibulares e da formação reticular do tronco. A célula de Purkinje, elemento dominante do processo de informação cerebelar, é responsável pela integração neuronal de todas informações recebidas pelo corpo, controlando os movimentos musculares corporais. Em conjunto formam o único sistema eferente cerebelar, funcionando como moduladora das informações aferentes que chegam ao córtex cerebelar (Apfel e Ésberard, 2002; Sarna e Hawkes, 2003).

Apesar de sua posição estratégica permitir a comparação entre comandos e movimentos efetivamente realizados que lhe atribui a função de centro coordenador dos movimentos, recentemente estudos demonstraram também a participação do cerebelo em funções não motoras, cognitivas e afetivas (Joyal e Meyer, 1996; Bueti *et al.*, 2008; Krienen *et al.*, 2009). Assim, o cerebelo, tradicionalmente considerado como estrutura relacionada ao controle do equilíbrio e do movimento e com um papel específico na aquisição de habilidades motoras, mostra-se envolvido também em funções não motoras, de controle cognitivo, emocional e motivacional. Mesmo assim, sua principal função ainda é de controlar os movimentos e o tônus muscular afim de manter equilíbrio e postura, bem como, de aprendizagem motora (Bloedel, 1987).

O cerebelo divide-se em uma região mediana - o vérmis e duas laterais – os hemisférios cerebelares. Podem ser distinguidos três lobos: flóculo nodular, anterior e

posterior. Apresenta uma região superficial, o córtex cerebelar, subjacente a este a substância branca, e em situação mais profunda, os núcleos do cerebelo.

O córtex cerebelar possui estrutura citoarquitetônica homogênea constituída por três camadas: molecular, das células de Purkinje e granular, com organização em microcircuitos, podendo as diversas regiões serem distinguidas funcionalmente por suas conexões.

A substância branca cerebelar compreende dois conjuntos de fibras, intrínsecas e extrínsecas. As fibras intrínsecas são as relacionadas às conexões intracerebelares. As fibras extrínsecas são as de projeção do cerebelo, aferentes (medula, tronco cerebral e diencefalo) e eferentes (a maioria a partir dos núcleos cerebelares profundos), que constituem os pedúnculos cerebelares, destinados principalmente ao tronco cerebral e diencefalo (Engelhardt e Moreira, 2009).

Os núcleos cerebelares profundos encontram-se incluídos na substância branca e compreendem os núcleos fastigial (medial), interpósito e denteado (laterais) e possuem diferentes projeções que refletem as suas funções na manutenção do equilíbrio, controle dos membros e planejamento de movimento, respectivamente. No homem o núcleo interpósito anterior é denominado de núcleo globoso e o posterior de emboliforme. (Martin, 1996). Os núcleos cerebelares recebem colaterais de fibras pré-cerebelares e do córtex cerebelar (axônio da célula de Purkinje) e enviam projeções para estruturas diversas do encéfalo. O núcleo interpósito fica situada em posição intermediária, recebe aferentes principalmente da região paravermiana e projeta para os núcleos vermelho e outros núcleos do tronco cerebral, além de núcleos talâmicos. O núcleo denteado, o maior dos núcleos cerebelares e mais lateral, recebe aferentes dos hemisférios cerebelares e projeta para o núcleo rubro e outros núcleos talâmicos e do tronco cerebral. O núcleo fastigial, localizado na zona mediana, recebe aferente principalmente do vérmis, onde está conectado bilateralmente, e projeta para os núcleos vestibulares e formação reticular do tronco. Essa zona encontra-se intimamente relacionada com o controle postural e equilíbrio (Crosby *et al.*, 1962, Martin, 1996, Voogd, 2004).

1.1.1 Ataxia Cerebelar

Ataxia do grego *ataxis* quer dizer, sem ordem ou incoordenação. Compõem um grupo heterogêneo de distúrbios neurológicos nas quais as disfunções tipicamente cerebelares formam as principais manifestações (Brusse *et al.*, 2007; Shakkottai e Paulson, 2009). As Ataxias podem ser classificadas em: **ataxias hereditárias** ou **progressivas**, são causadas por uma anormalidade genética e os sintomas costumam se agravar com o passar do tempo. As formas mais comuns são as autossômicas dominantes e recessivas. Já as **ataxias esporádicas** subdividem-se em idiopáticas ou sintomáticas. As ataxias esporádicas idiopáticas caracterizam-se por atrofia do sistema múltiplo de causa desconhecida. As ataxias esporádicas sintomáticas são causadas por malformações ou lesões estruturais podendo ser consequência de infarto cerebelar, neoplasias, trauma craniano, pós-infecção, exposição a certas drogas ou tóxicos ou após uma parada cardíaca ou respiratória. Há outras condições nas quais a ataxia pode aparecer gradualmente que inclui hipotireoidismo, deficiências nutricionais de certas vitaminas tais como vitamina E e B12, anomalia congênita, esclerose múltipla e sífilis (Jain, 1996).

Independente da causa, a ataxia é uma doença caracterizada por incoordenação motora, instabilidade postural, anormalidade da marcha, dismetria, disartria, dificuldade do movimento ocular, tremor e déficit no equilíbrio (Welsh e Harvey, 1992; Rosenberg, 1997; Trouillas *et al.*, 1997; Klockgether e Dichgans, 1997; Grusser-Cornehls e Baurle, 2001). Esta última manifestação clínica é bastante evidente em lesões cerebelares, visto que o estado de equilíbrio resulta de mecanismos complexos onde a participação do cerebelo é essencial (McCormick e Thompson, 1984).

O equilíbrio estático e dinâmico compõem o controle postural que implica no correto posicionamento das partes do corpo em relação ao mundo externo. O equilíbrio estático mantém a estabilidade do corpo sob influência da gravidade. O equilíbrio dinâmico confere ajustamento corporal através das fases do movimento. O controle postural é um processo complexo que envolve diferentes sistemas neurais e estruturas encefálicas (Massion, 1992). Uma das estruturas envolvidas nesse controle é o

cerebelo, que possui um importante papel no controle postural e equilíbrio (Loffe, Chernikova e Ustinova, 2007).

1.2 EXCITOTOXICIDADE

As células de Purkinje são o tipo neuronal mais comumente lesionado em pacientes atáxicos, portanto as células granulares, assim como vários núcleos ligados a outros circuitos cerebelares também são atingidos nos diferentes tipos de ataxia. Além disso, ainda que em muitos casos a morte neuronal cause a ataxia, mesmo advinda de um processo apoptótico, a natureza do fator desencadeante pode variar amplamente, incluindo desde estresse oxidativo até distúrbios relacionados à funcionalidade do proteossoma, excitotoxicidade ou uma combinação destes. (Fernandez e Carro, 2005).

A excitotoxicidade, ativação secundária do sistema glutamatérgico, é o mecanismo pelo qual o glutamato e outros neurotransmissores excitatórios causam lesão celular (Lipton e Rosenberg, 1994). O dano neuronal excitotóxico agudo associado a outras alterações moleculares leva à morte neuronal. A própria despolarização gerada pela excitotoxicidade pode comprometer o controle da permeabilidade da membrana e aumentar ainda mais a presença do glutamato extracelular. O glutamato liga-se tanto a receptores acoplados a canais iônicos de cálcio e sódio, os mais importantes, kainato, NMDA e AMPA, como a receptores acoplados a sistemas de segundo mensageiro, chamados metabotrópicos.

A lesão celular na excitotoxicidade ocorre em dois estágios. Em um primeiro momento ocorre um influxo de sódio com conseqüente edema celular. Em um segundo momento, a abertura dos canais de cálcio de longa duração leva ao acúmulo excessivo de cálcio intracelular. O acúmulo de cálcio, por sua vez, é capaz de promover a ativação de proteases, fosfolipases e óxido nítrico que desencadeia uma série de eventos que culminam com morte celular (Andrade, Paiva *et al.*, 2008). Um dos modelos experimentais utilizados baseia-se no emprego do ácido ibotênico (x-amino-3-hidroxi-5-isoxazolil-acético) que é o princípio ativo do cogumelo *Amanita muscaria*. A vantagem desta neurotoxina é a de provocar lesão excitotóxica celular via receptor

glutamatérgico NMDA sem comprometer os axônios e as vias de passagem (Zinkand, 1992).

O estudo do cerebelo como modelo é bastante conveniente para explorar morte celular em animais, uma das justificativas para isso é porque anormalidades cerebelares são facilmente reconhecidas e diretamente relacionadas às suas manifestações. Como já abordado anteriormente, danos cerebelares manifestam problemas claros de coordenação motora como dificuldade de movimentar as patas, com anormalidade de marcha e postura (Trouillas *et al.*, 1997).

Há poucos estudos descrevendo alterações neuronais no cérebro e cerebelo de ratos adultos jovens. Gonzales-Maciel e colaboradores (1994) encontraram diminuição de células de Purkinje cerebelar em ratos de 45 dias de idade alcoolizados. Estes autores observaram um grande número de células de Purkinje com citoplasma hiper Cromático e sem morfologia celular definida, denotando sinais de degeneração celular.

É importante ressaltar que muito deve ser esclarecido a respeito dos processos envolvidos nestas patologias para que se alcance modelos terapêuticos correspondentes. Portanto, fica claro que o tratamento dessas doenças necessita de uma maior compreensão da fisiopatologia envolvida. Não há ainda tratamento efetivo disponível para a maioria das síndromes atáxicas (Evidente *et al.*, 2000). Pouco progresso se obteve com tratamentos sintomáticos farmacológicos voltados para as manifestações motoras (Botez *et al.*, 1998). Dentro desse panorama, torna-se fundamental que sejam estudadas e disponibilizadas novas alternativas terapêuticas, entre elas a terapia com células-tronco.

1.3 CÉLULAS TRONCO

A terapia celular parte do princípio de restaurar a função de um órgão ou tecido, transplantando novas células para substituir células perdidas por doenças ou que não funcionam adequadamente devido a um defeito genético. O conhecimento de que uma única célula pode dar origem a mais de 200 tipos diversos de células

diferenciadas de tecido adulto não é novo pois constitui a premissa básica da embriologia (revisado por Morrison *et al.*, 1997).

O óvulo fecundado divide-se, dando origem a um pequeno número de células idênticas no início do desenvolvimento embrionário. Com o crescimento do embrião, elas vão se diferenciando, permitindo que os tecidos e órgãos cresçam. Mas, mesmo quando um animal já está completamente desenvolvido, muitos tecidos e células mantêm um processo conhecido como homeostase, onde células que morrem, seja por morte natural ou lesão, precisam ser substituídas. Esta característica notável tem origem filogenética muito antiga, no entanto, a identificação de células com esse potencial em tecidos nos adultos e a sua aplicação terapêutica são muito mais recentes. A capacidade de um embrião em diversificar-se, ou a de que certos tecidos têm de regenerar-se durante a vida, são resultado direto das células-tronco (Fuchs e Segre, 2000).

As células tronco representam uma unidade natural do desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual e constituem um subconjunto de células imaturas, que têm como característica serem indiferenciadas e não-especializadas. Assim, estas células apresentam a capacidade tanto de se auto-regenerar, ou seja, dividir-se e criar outras células tronco, quanto de se diferenciar através de uma determinada via molecular e originar diferentes linhagens celulares (revisado por Morrison *et al.*, 1997).

As células tronco são em geral classificadas como células tronco embrionárias e ou somáticas e “adultas”. As células tronco embrionárias são derivadas do blastocisto e são consideradas pluripotentes, isto é, têm a capacidade de originar células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma. Já as células tronco adultas ou somáticas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados (especializados). Essas células são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (Kaji e Leiden, 2001). Tipicamente, as células tronco geram tipos celulares intermediários antes de se diferenciarem completamente. A célula intermediária é chamada célula precursora ou progenitora. As células precursoras nos tecidos fetal ou adultos são

células parcialmente diferenciadas que se dividem e dão origem a células diferenciadas (revisado por Morrison *et al.*, 1997).

As células tronco “adultas” são melhor denominadas como somáticas por encontrarem-se no interior dos tecidos do corpo (soma). Acreditava-se que estas células teriam opções mais restritas de diferenciação, podendo selecionar um programa de diferenciação dentre apenas poucas vias possíveis, ou seja, já comprometidas com determinada linhagem celular, não seriam pluripotentes à exemplo das embrionárias. Atualmente discute-se até que ponto isso é verdade, já que evidências apontam que estas células poderiam sim, ignorar as restrições de sua linhagem específica, transdiferenciando-se em células com origem germinativa distinta. Exemplos disto são os estudos de Bjornson e colaboradores (1999) que demonstraram que células isoladas a partir do encéfalo de camundongos transgênicos podem se diferenciar em células hematopoiéticas bem como os achados de Mezey e colaboradores (2000), os quais comprovaram que células da medula óssea diferenciam-se em células que expressam marcadores neuronais.

Neste mesmo sentido, muito se tem estudado sobre a plasticidade das células tronco da medula óssea (CTMOs) e sua habilidade em selecionar linhagens atípicas quando colocadas em ambientes não-hematopoiéticos. Por exemplo, quando implantadas no encéfalo de ratos, células da medula óssea humanas não se transdiferenciaram em neurônios, mas perderam algumas de suas características e migraram por vias bem estabelecidas de migração neuronal (Azizi *et al.*, 1998).

Entretanto, os estudos realizados até o momento não excluem totalmente explicações alternativas para a possível plasticidade de células tronco adultas (Frisén, 2002). Assim, o debate continua em aberto (Phinney e Prockop, 2007) quanto às observações de que essas células se transdiferenciam em células de tecidos diferentes daquele a partir do qual foram obtidas.

A medula óssea (MO) é uma fonte permanente de células tronco (Korbling e Estrov, 2003). Uma das populações de células da MO, as células tronco hematopoiéticas, é responsável pela formação de todos os tipos de células sangüíneas do corpo. A população de células estromais da MO pode gerar, entre outros, osso e cartilagem (Korbling e Estrov, 2003; Petersen *et al.*, 1999). As células tronco

mesenquimais encontram-se imersas no estroma medular. Recentemente, uma população que se diferencia em células endoteliais foi identificada como sendo originária da medula óssea (Shi *et al.*, 1998). Assim, a MO parece conter três tipos de populações de células tronco: hematopoiéticas, estromais (mesenquimais) e possivelmente progenitoras endoteliais.

Como já mencionado, muito se tem discutido sobre a plasticidade de células tronco adultas, incluindo as células tronco da medula óssea. Por exemplo, já foi demonstrado que células da medula óssea de camundongos podem derivar-se em microglia (Eglitis *et al.*, 1997), e neurônios *in vivo* (Brazelton *et al.* 2000; Mezey *et al.*, 2000). Porém, ainda não se sabe qual subpopulação(ões) da MO foi capaz de expressar este desenvolvimento neuronal. Além disso, a transdiferenciação de células da MO em neurônios no sistema nervoso central foi também demonstrada em seres humanos (Cogle *et al.*, 2004). Parece que a incorporação destas células no tecido nervoso é intensificada frente a um dano tecidual. Ainda, mesmo que estas células não regenerem o tecido lesado por transdiferenciarem-se em determinado tipo celular, é provável que a recuperação de funções cerebrais ou estabilização da doença neurológica ocorra por outros mecanismos biológicos tais como a fusão celular, liberação de fatores tróficos, citocinas ou ativação de células endógenas (Terada *et al.*, 2002).

As vantagens em se estudar células tronco adultas em contraste com as embrionárias incluem a maior facilidade de obtenção das primeiras, sendo que as células-tronco da MO podem ainda ser obtidas em maior quantidade (ideal para aplicação clínica) do que as demais células tronco adultas. Ainda mais, elas podem ser obtidas a partir de uma pequena amostra de MO de um dado paciente, expandidas em cultura, e re-administradas a este mesmo paciente. Assim, seria possível evitar problemas associados com a rejeição imunológica dos tecidos ou células transplantados. Finalmente, existem questões ético-religiosas que envolvem o uso de células tronco embrionárias, que se anulam no caso de uso de células tronco da medula óssea.

Os grandes avanços nas áreas de genética e biologia molecular devem trazer consigo grandes mudanças na medicina. Com a expansão do conhecimento

acerca das células-tronco, e a possibilidade de que elas possam diferenciar-se nos mais diversos tecidos, é natural que haja grande interesse quanto à sua utilização terapêutica, como no tratamento de doenças do sistema nervoso. Muitos grupos têm estudado a alternativa do uso de células-tronco na clínica, estimulados por evidências que apontam recuperação em modelos animais de doenças neurodegenerativas.

Estudos recente demonstraram que o transplante de células tronco melhora a função cerebral em modelos de isquemia cerebral, doença de Huntington e traumatismo raquimedular (Haas *et al.*, 2005; Dunnet e Rosser, 2004; Koda *et al.*, 2005). Kim e colaboradores (2003) observaram melhora dos sintomas parkinsonianos em ratos que receberam células tronco embrionárias neurais, com a geração de neurônios dopaminérgicos que detinham propriedades eletrofisiológicas e bioquímicas semelhantes às células mesencefálicas não-transplantadas. Mais, estudos recentes têm demonstrado a capacidade de diferenciação das CTMO em progenitores celulares com características de células de Schwann, capazes de apoiar a regeneração em nervos ciáticos de ratos lesados após três semanas do transplante (Dezawa *et al.*, 2001). Mimura e colaboradores (2004) demonstraram em ratos adultos com nervos ciáticos seccionados um aumento significativo na velocidade de condução e no índice de escala funcional para nervo ciático no grupo transplantado com células tronco comparado ao grupo controle após seis meses. Células tronco da medula óssea introduzidas no tubo que estabelece a continuidade do coto proximal e distal do nervo ulnar ou mediano de pacientes com secção nervosa total permite melhora funcional mais rápida e eficaz (Braga-Silva *et al.*, 2008). Outros dados indicam que CTMO migram da corrente sanguínea para a área isquêmica e, uma percentagem pequena delas, expressa marcadores neurais. (Azizi *et al.*, 1998; Eglitis *et al.*, 1999; Li e Chopp, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se células mononucleares da medula óssea apresentam potencial terapêutico no restabelecimento da função motora e na repopulação neuronal em um modelo experimental de ataxia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o desempenho motor em um modelo de ataxia induzido pela lesão bilateral do núcleo fastigial do cerebelo por ácido ibotênico.

Avaliar o desempenho motor dos animais com lesão do núcleo fastigial após o transplante das células mononucleares da medula óssea.

Analisar histologicamente a lesão do núcleo fastigial pelo ácido ibotênico.

Identificar a possível repopulação neuronal após o transplante de CMMO.

Verificar a incorporação de CMMO do animal doador no sitio de lesão do animal receptor.

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 ANIMAIS

Para o modelo de ataxia foram utilizados 50 ratos machos, da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300 gramas, com 60 dias de vida, adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos no alojamento do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), em caixas moradias em número de 5 por caixa, com água e comida *ad libitum*. A temperatura do ambiente era mantida entre 22-24 °C e o ciclo claro/escuro era de 12 horas, com as luzes ligadas às 7:00.

Para doação de CMMO foram utilizados 20 camundongos C57BL/6N transgênicos machos e adultos (C57BL/6-EGFP), pesando entre 25 e 30 gramas, provenientes da Fundação Oswaldo Cruz – Bahia. Estes animais expressavam proteína verde fluorescente (*enhanced green fluorescent protein* - EGFP) (Okabe *et al.*, 1997) que serviu como marcador das células transplantadas. Foram mantidos no alojamento do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, sob as mesmas condições citadas acima. As CMMO provenientes dos primeiros 10 animais foram utilizadas diretamente no transplante. As CMMO dos 10 animais restantes foram inativadas (segundo protocolo abaixo) antes de serem transplantadas.

Todos os experimentos foram realizados após aprovação do Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que foi obtida em 09 de março de 2009, conforme ofício 023/09.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A Figura 1 esquematiza o delineamento experimental. O experimento iniciava com a cirurgia estereotáxica (dia zero), seguido de manipulação dos animais nos dois dias consecutivos. No terceiro dia foi realizado o teste basal, onde a eficácia da lesão era avaliada com uma bateria de teste motores. No quarto dia pós-cirurgia, os animais receberam o transplante (salina, CMMO ou CMMO inativas). Os animais foram novamente testados uma ou duas semanas depois de receberem o transplante (Teste 1 e Teste 2, respectivamente). Vinte e quatro horas após a realização do último teste, os animais foram perfundidos transcardialmente com paraformaldeído 4% e seus cerebelos dissecados para posterior análise histológica.

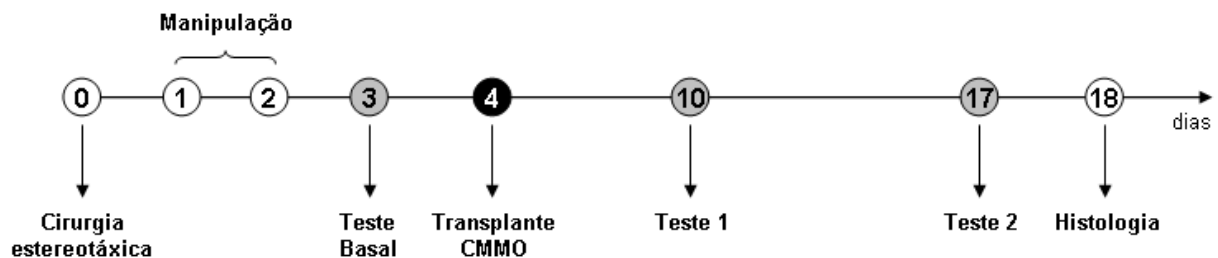


Figura 1 – Delineamento experimental. Os tempos são definidos em dias após a cirurgia estereotáxica. Os círculos preenchidos na cor cinza mostram o momento de realização dos testes motores. O círculo preenchido em preto mostra o momento do transplante de CMMO.

3.3 GRUPOS DE ESTUDO

Foram estabelecidos cinco grupos de estudo:

- **Grupo I – Ácido Ibotênico + Salina (IBO-SAL):** os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica e tiveram o núcleo fastigial lesionado bilateralmente por infusão direta de ácido ibotênico. No quarto dia pós-cirurgia, os animais receberam 200 µL de solução salina via veia da cauda.

- **Grupo II – Ácido Ibotênico + CMMO (IBO-CMMO):** os animais receberam tratamento idêntico ao do grupo I, exceto que no quarto dia pós-cirurgia receberam transplante de CMMO no lugar de salina (200 μ L contendo 10^7 células mononucleares EGFP⁺), via veia da cauda.
- **Grupo III – Ácido Ibotênico + CMMO inativas (IBO-CMMO-In):** os animais receberam tratamento idêntico ao do grupo I, exceto que no quarto dia pós-cirurgia, receberam transplante de CMMO inativadas no lugar de salina (200 μ L contendo 10^7 células mononucleares inativadas EGFP⁺), via veia da cauda.
- **Grupo IV – Controle Sham (lesão simulada):** os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica, mas receberam salina em substituição ao ácido ibotênico, nos mesmos locais e em volumes idênticos ao grupo que teve o núcleo fastigial lesionado. No quarto dia pós-cirurgia, os animais receberam 200 μ L de solução salina via veia da cauda.
- **Grupo V – Controle Naive:** os animais foram apenas anestesiados, colocados no aparelho estereotáxico e o escalpo aberto e imediatamente suturado, não recebendo nenhuma infusão. No quarto dia pós-cirurgia, os animais receberam 200 μ L de solução salina via veia da cauda.

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Preparação do ácido ibotênico

Um miligrama de ácido ibotênico (I2765-1MG, Sigma, EUA) foi diluído em 100 μ L de PBS 0,1 M pH 7,4, para uma concentração final de 10 μ g/ μ L. A droga diluída foi separada em alíquotas de 3 μ L e armazenadas em freezer -20 °C até sua utilização. No momento da infusão, cada alíquota era descongelada e agitada em vórtex por 30 segundos.

3.4.2 Cirurgia estereotáxica

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina (“Francotar”, Virba; ou “Vetanarcol”, König), combinada com xilazina, um sedativo/miorrelaxante/analgésico (“Coopazine”; Coopers), ambos administrados intraperitonealmente (*i.p.*), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente.

Após a fixação dos animais no aparelho estereotáxico (Kopf Instruments, EUA), foi feita uma incisão mediana no escalpo e a fáscia cobrindo o crânio foi afastada, expondo as suturas cranianas. Após limpeza com água oxigenada e a identificação do bregma, infundiu-se bilateralmente no núcleo fastigial 1 μ L/lado de ácido ibotênico 10 μ g/ μ L (grupos IBO-SAL, IBO-CMMO ou IBO-CMMO-In) ou cloreto de sódio 0,9% (grupo *Sham*), distribuído em 4 infusões conforme o esquema listado na Tabela 1. Para a infusão, utilizou-se uma microseringa Hamilton de 10 μ l acoplada por um tubo de polietileno a uma agulha de infusão (25G) fixa no estereotáxico. A agulha era posicionada no ponto de cada infusão, e no local era feita uma pequena trepanação utilizando-se uma broca odontológica. A agulha era baixada até o ponto alvo e o ácido ibotênico ou salina infundidos a uma velocidade constante de 0,1 μ L/min com o auxílio de uma bomba de infusão (KDS2000, KD Scientific). Após o término de cada infusão, a agulha era mantida no lugar por 1-2 minutos, a fim de evitar refluxo de líquido e permitir sua total dispersão pela área. Terminadas todas as infusões, a ferida operatória era limpa e suturada com fio de seda 4.0.

Para os grupos que tiveram o núcleo fastigial lesionado, a cirurgia era considerada bem sucedida quando os animais, após a recuperação anestésica, apresentavam os sinais e sintomas do modelo de ataxia cerebelar segundo a escala de Vera (Vera *et al.*, 2002), onde os animais eram observados por duas horas nos seguintes parâmetros: sem alteração (grau 0); incordenação de patas posteriores (grau 1); marcha prejudicada pelo arrastamento de patas posteriores e queda (grau 2); perda total da postura e em alguns casos os animais rolam (grau 3). Para o presente estudo, considerou-se os animais que manifestavam os sintomas grau 2 e 3, os que não se encaixavam nestes parâmetros eram imediatamente excluídos.

Os animais do grupo controle naive foram apenas anestesiados, colocados no aparelho estereotáxico e o escalpo aberto e imediatamente suturado, sem receber nenhuma infusão.

Tabela 1 – Relação das coordenadas utilizadas na lesão bilateral do núcleo fastigial. Estes valores foram obtidos em estudo piloto tomando como base o atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1986).

Infusão	AP*	LL*	DV*	Volume**
1	-11,9	± 0,9	- 6,6	0,5
2	-11,9	± 1,0	- 6,1	0,2
3	-11,9	± 1,5	- 5,4	0,2
4	-12,1	± 0,6	- 6,0	0,1

AP = anteroposterior; LL = latero-lateral; DV = dorsoventral

* coordenadas em milímetros, em relação ao bregma

** em microlitros

3.4.3 Manipulação

Os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos a duas sessões de manipulação, realizadas 24 e 48 h após a cirurgia. Durante cada sessão, estes foram retirados da caixa moradia e manuseados por 5 minutos com intuito de preparar e acostumar os animais com os procedimentos empregados nos testes motores.

3.4.4 Testes motores

Os testes empregados foram o teste de locomoção forçada em cilindro giratório (*Rotarod test*), utilizado com dois protocolos distintos, e o teste de suspensão em fio (*Wire suspension test*). Foram realizadas 3 sessões de testes, nos dias 3, 10 e 17 pós-cirurgia. O teste Basal (dia 3) era realizado no dia precedendo o transplante. O

Teste 1 era realizado uma semana após o teste Basal (dia 10), e o Teste 2 uma semana depois do Teste 1 (dia 17).

3.4.4.1 Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (*Rotarod test*)

O *rotarod* é um teste utilizado para avaliar coordenação motora e equilíbrio. É um dos testes mais utilizados para medir função motora nos roedores por ser considerado um dos mais sensíveis para isto. Neste trabalho foi empregado um aparelho automatizado (EFF 411, Insight, Brasil), instalado em uma sala fechada e mantida à temperatura de aproximadamente 24 °C. Consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do chão, e que é mantido em rotação através de um motor DC. A caixa é dividida em 4 baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente (Figura 2). Para o teste, cada animal era colocado sobre o cilindro já em movimento, e media-se o tempo que o mesmo conseguia se equilibrar até cair (latência). Na queda, o cronômetro que verificava o tempo de equilíbrio era automaticamente parado, já que o equipamento possui um sistema instalado no chão de cada baia que detecta o impacto da queda. A velocidade de rotação do cilindro era ajustada conforme cada protocolo empregado:

- **Protocolo acelerado:** os animais eram colocados sobre o cilindro mantido a uma velocidade constante de 5 rpm e habituados por aproximadamente 1 minuto. Sendo assim, se o animal caísse, o mesmo era recolocado sobre o cilindro. Passado o período de habituação, iniciava-se o teste propriamente dito, onde a velocidade do cilindro aumentava gradativamente de maneira automática (fase 1-2: 16 rpm; fase 3-4: 20 rpm; fase 5-6: 25 rpm; fase 7-8: 28 rpm; fase 9-10: 37 rpm). O aparelho possui um indicador luminoso que mostra a evolução das fases. A transição entre todas levava 6 minutos. Após atingir a velocidade máxima, o animal era mantido no cilindro por mais um minuto, quando então o teste era encerrado. Assim, o tempo máximo de permanência no cilindro era de 7 minutos por trial. Cada sessão de teste

consistia em 4 *trials*, separados por intervalos de 15 minutos entre eles. Em cada sessão, calculou-se a média da latência de queda e a média da fase em que esta ocorreu nos 4 *trials*.

- **Protocolo constante:** os animais eram colocados sobre o cilindro mantido a uma velocidade constante de 20 rpm pelo tempo máximo de 2 minutos. Neste protocolo não era realizado a habituação dos animais ao equipamento, já que o protocolo acelerado já havia sido previamente realizado. Cada sessão de teste consistia em 4 *trials*, separados por intervalos de 15 minutos entre eles. O parâmetro avaliado em cada sessão foi a média da latência de queda do animal nos 4 *trials*.

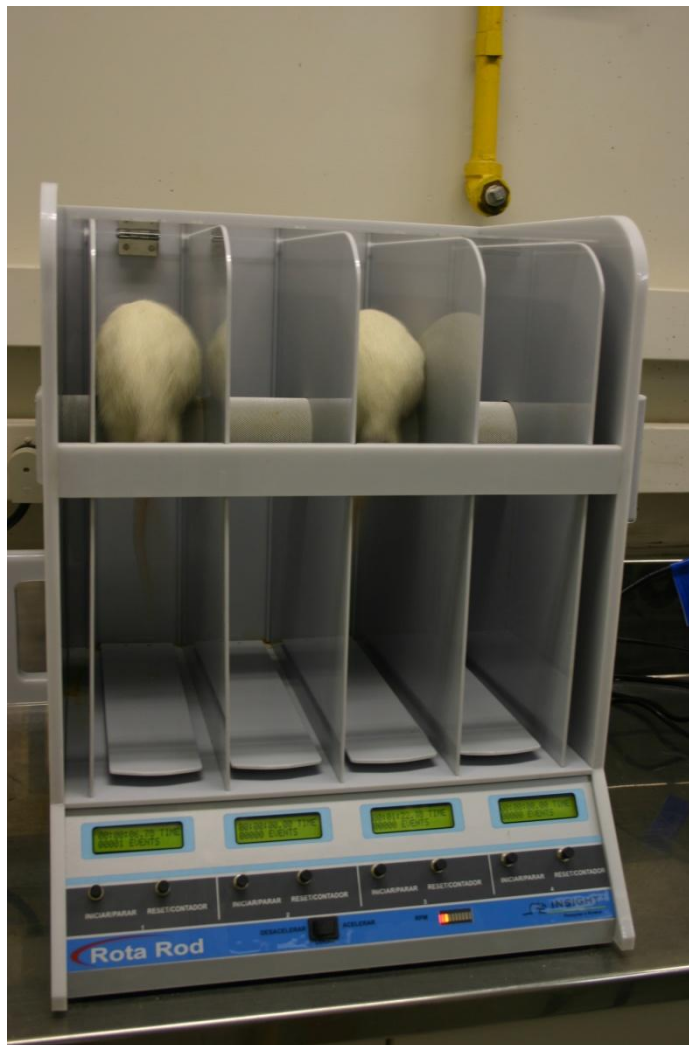


Figura 2 – Teste do *rotarod*.

3.4.4.2 Teste de suspensão em fio (*Wire suspension test*)

Este teste permite detectar anormalidades neuromusculares através da avaliação da capacidade do animal em sustentar seu próprio corpo, o que requer força muscular. Foi incluído para verificar se algum prejuízo de marcha fosse devido a uma diminuição de força muscular, o que seria provável caso a lesão atingisse os núcleos interpósito e denteado. O aparelho utilizado consiste em um fio de cobre de 2mm de diâmetro, suspenso horizontalmente entre duas barras de madeira com 80cm de altura, dispostas perpendicularmente ao chão e a 80cm de distância uma da outra. O chão é forrado por uma espuma de 10cm de espessura com finalidade de amortecer a queda do animal, evitando assim, lesões ou estresse do mesmo. O equipamento foi mantido em uma sala fechada, com boa iluminação e temperatura mantida em aproximadamente 24 °C (Figura 3).

Para o teste, o animal era conduzido pelo avaliador até o fio, para que pudesse colocar as patas dianteiras no mesmo. Media-se o tempo total que o animal permanecia suspenso no fio, com o auxílio de um cronômetro manual, sendo que o tempo máximo de duração do teste era de 60 segundos. O cronômetro era parado imediatamente após a queda do animal e o tempo de permanência (latência) registrado. Em cada sessão de teste eram realizados 2 *trials*, separados por um intervalo de 15 minutos. Para cada sessão, registrava-se a média das latências de queda nos 2 *trials*.



Figura 3 – Teste de suspensão em fio.

3.4.5 Transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO)

3.4.5.1 Preparação das CMMO

Os camundongos C57BL/6-EGFP foram anestesiados com xilazina e ketamina. Após, os animais foram dissecados, isolaram-se os ossos longos (úmero, fêmur e tíbia). As epífises foram cortadas, possibilitando a lavagem das cavidades ósseas. O aspirado de MO coletado foi então processado entre etapas de suspensão e centrifugação. A camada de células mononucleares foi separada por gradiente de ficoll-paque 1077 e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Por fim, separaram-se alíquotas de 200 μL contendo 10^7 células mononucleares EGFP⁺ (Figura 4).



Figura 4 – Obtenção de CMMO de camundongos C57BL/6-EGFP. Animais são anestesiados e dissecados, isolam-se os ossos longos, e procede-se a lavagem das cavidades ósseas. O material coletado é processado em centrifugações e ressuspensões. Por fim, a camada de células mononucleares é obtida por gradiente de ficoll, e as células são contadas em câmara de Neubauer e aliqüotadas.

3.4.5.2 Citometria de fluxo e fenotipagem

Uma das alíquotas foi avaliada com os seguintes anticorpos: CD19, CD45, CD19/CD45, CD117, Sca-1, CD117/Sca-1, CD34, diluídos na concentração de um 1:10 em PBS.

Após incubação a 5° C no escuro por pelo menos 15 minutos, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com 1 ml de paraformaldeído 4% (em PBS), para análise. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA). Os dados obtidos correspondem a pelo menos 50.000 eventos.

3.4.5.3 Inativação das CMMO

Para preparação das células inativadas, os procedimentos de obtenção e tratamentos foram idênticos aos da preparação das células tronco de medula óssea, como descrito acima. Porém, após a separação da fração mononuclear do sangue da medula óssea, as células foram fixadas com fomaldeído 10% e sua viabilidade foi medida pelo teste MTT através da incubação com 3-(4,5-dimethyldiazonol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) e dimetilsulfóxido (DMSO) por 4 horas. Em seguida, foi realizada leitura a 570 nm em leitor de ELISA e o estado funcional das células mostrou-se inferior a 95%.

3.4.5.4 Injeção das CMMO na veia caudal do rato

O animal era imobilizado em um contensor pouco maior que sua estrutura e apenas a cauda era externalizada. Esta era fixada na mesa com micropore e limpa com solução de álcool 70%. Após visualização macroscópica de uma das veias da cauda, era injetado um volume de 200/ μ L contendo 10^7 células mononucleares EGFP⁺ com

uma seringa (BD Ultra-Fine 0,5 mL). Logo após o transplante, os animais eram devolvidos para sua caixa moradia.

3.4.6 Histologia

3.4.6.1 Perfusão e fixação

Os animais foram anestesiados por procedimento idêntico ao adotado para a cirurgia estereotáxica, e, logo após, realizou-se a toracotomia e a exposição do coração. No ventrículo esquerdo injetou-se heparina (0,1 mL/100 g de peso corporal) para evitar coagulação sanguínea e, em seguida, realizou-se uma incisão para a fixação de uma cânula conectada a uma bomba peristáltica (Gilson). No átrio direito foi realizada uma incisão para permitir extravasamento do líquido perfundido. Inicialmente foram perfundidos 150 mL de solução salina 0,9% e, posteriormente, 300ml de solução fixadora de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4). Em seguida, os encéfalos foram cuidadosamente retirados, o cerebelo dissecado e pós-fixado em PFA 4% por 48 horas. Após, o material foi crioprotégido em soluções de sacarose de concentrações crescentes (10%, 20% e 30%), em um período de 72 horas. Encerrada a crioproteção, o material foi congelado em nitrogênio líquido e isopentano, e armazenado a -80 °C.

3.4.6.2 Corte e obtenção das lâminas

Os encéfalos foram transferidos para o criostato (Shandon), cuja temperatura da câmara era mantida a -20 °C. Após o tempo de equilíbrio de temperatura das amostras (30 minutos), o cerebelo foi emblocado com Tissue-Tek (Sakura) e fixado no pedestal do criostato. Foram efetuados cortes coronais com 20 µm de espessura e as fatias foram sobrepostas em lâminas histológicas previamente limpas e tratadas com

uma solução de Poli-L-lisina. As fatias foram coletadas alternadamente para coloração por Nissl e para identificação de células EGFP⁺ por imunofluorescência.

3.4.6.3 Coloração por Nissl

Para verificar o local das lesões por ácido ibotênico, uma de cada duas fatias foram coletadas, secadas a 45 °C e coradas utilizando-se a técnica de Nissl: hidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100%, 80%, 70%; uma mergulhada em cada) e finalmente em água destilada (uma mergulhada), coradas em uma solução de violeta de cresila 0,1% (1X por 1 min), diferenciadas em água destilada (uma mergulhada), desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 100%; uma mergulhada em cada) e clareadas em xilol até o momento da montagem. Por fim, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá. As lâminas foram analisadas qualitativamente com um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital (Olympus BX40), e imagens foram adquiridas com o *software* de análise de imagens Image-Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

3.4.6.4 Imunofluorescência para identificação de células EGFP⁺

Para identificar se o tecido regenerado foi proveniente das células da medula óssea do animal doador e não de células residentes do animal receptor, foi realizada imunofluorescência para identificação de células EGFP⁺. Uma de cada duas fatias foram coletadas e secadas a 45°C. Em seguida, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS (0,1 M, pH 7,4), acrescido de 0,3% de Triton X-100 (PBS-TX). Após, foi feito o bloqueio com soro normal de cabra 3%, diluído em PBS-TX, por 30 minutos, através de incubação em câmara úmida mantida em temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo anti-GFP conjugado a fluoresceína (1:50, SC-9996, Santa Cruz), em câmara úmida mantida a 4 °C. No dia seguinte, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS, e, logo em seguida, as lâminas foram montadas em

VectaShield com DAPI. As imagens foram analisadas em um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE 2000-S.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise do efeito da lesão do núcleo fastigial sobre o desempenho motor imediatamente após a cirurgia foi empregada a ANOVA, com teste post-hoc de Dunnet. Para avaliar o efeito do transplante de CMMO sobre o desempenho motor foi empregada a ANOVA de duas vias com medidas repetidas utilizando-se como fator a sessão de teste (Basal, Teste 1 ou Teste 2) e o grupo experimental (IBO-SAL, IBO-CMMO, IBO-CMMO-In, Sham ou Naive), com teste post-hoc de Bonferroni para identificar associações significativas. O nível de significância adotado nas análises foi 5%. As análises e gráficos foram elaborados com o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

4 RESULTADOS

4.1 DESEMPENHO MOTOR NO MODELO DE ATAXIA INDUZIDO PELA LESÃO BILATERAL DO NÚCLEO FASTIGIAL DO CEREBELO POR ÁCIDO IBOTÊNICO

Os animais que receberam infusões de ácido ibotênico no núcleo fastigial apresentam menor tempo de equilíbrio no *rotarod* tanto no protocolo acelerado ($F_{4,38} = 13,75$; $p < 0,001$; Figura 5A) quanto no protocolo fixo ($F_{4,38} = 7,99$; $p < 0,001$; Figura 6A), quando comparados com o controle *sham*. A fase da queda no protocolo acelerado também foi menor nestes animais em relação ao controle *sham* ($F_{4,38} = 15,41$; $p < 0,001$; Figura 5C). Não houve diferenças entre os controles *sham* e *naive* em nenhum dos protocolos adotados ($p > 0,05$).

Todos os grupos tiveram desempenho semelhante no teste de suspensão em fio ($F_{4,33} = 1,011$; $p > 0,05$; Figura 7A).

4.2 CITOMETRIA DE FLUXO E FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA PARA TRANSPLANTE

A fração mononuclear isolada para o transplante apresentou positividade para os marcadores CD34 (precursora hematopoiética), CD19 (linhagem linfócito B), CD45 (leucócito/eritrócito não maduro) e CD117 (célula tronco hematopoiética) (Figura 8).

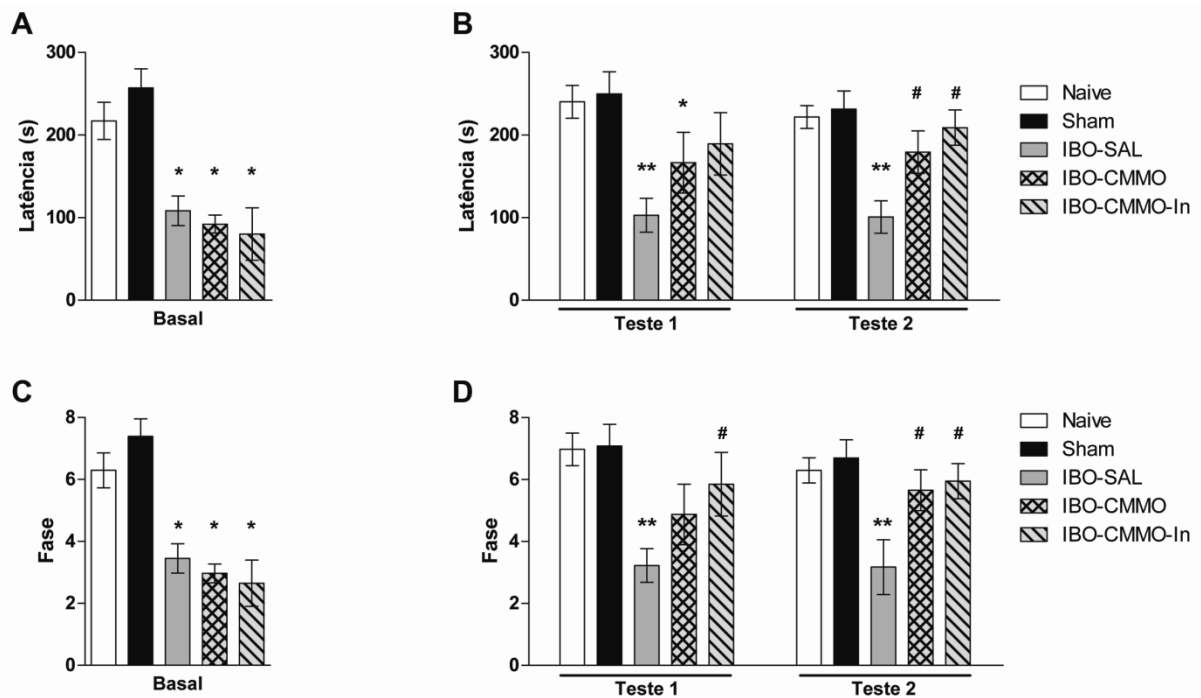


Figura 5 – Transplante de CMMO melhora o desempenho de ratos com lesão bilateral do núcleo fastigial no teste do *rotarod* executado com o protocolo acelerado. A lesão do núcleo fastigial com ácido ibotênico diminui a latência de queda (A) e a fase em que esta ocorre (C). Após o transplante, os animais que receberam CMMO (IBO-CMMO) aumentam o tempo de permanência no *rotarod* (B) e a fase em que a queda ocorre (D) no teste realizado 14 dias pós-cirurgia (Teste 2), mas não no teste realizado 7 dias pós-cirurgia (Teste 1). Os animais que receberam CMMO inativadas (IBO-CMMO-In) possuem maior latência de queda no teste realizado 14 dias pós-cirurgia (B, Teste 2) e maior fase em que esta ocorre em ambos os testes (D). Os animais lesionados que receberam salina (IBO-SAL) apresentam desempenho pior em ambas as variáveis tanto no teste realizado 7 dias pós-cirurgia quanto no teste realizado 14 dias pós-cirurgia (B e D). (* = $p < 0,05$ vs. *Sham*; ** = $p < 0,01$ vs. *Sham*; # = $p < 0,05$ vs IBO-SAL; dados expressos como média \pm EP; $n = 6-10$ por grupo)

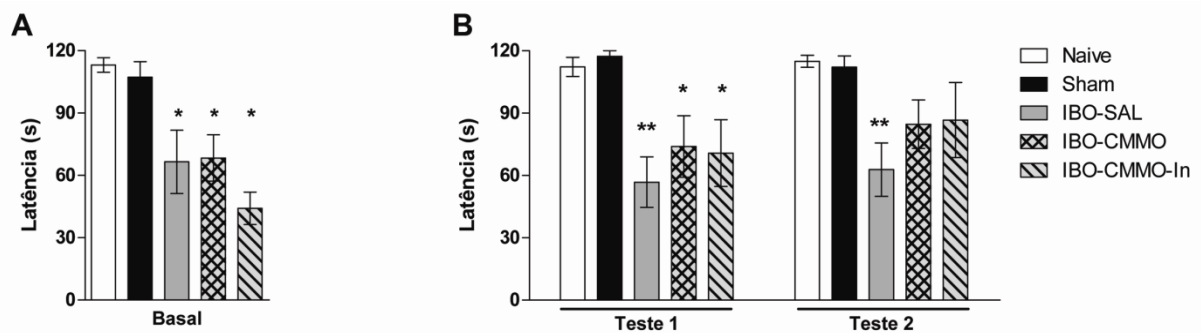


Figura 6 – Transplante de CMMO melhora o desempenho de ratos com lesão bilateral do núcleo fastigial no teste do *rotarod* executado com protocolo fixo. A lesão do núcleo fastigial com ácido ibotênico diminui a latência de queda (A). Após o transplante, os grupos que receberam CMMO (IBO-CMMO) ou CMMO inativadas (IBO-CMMO-In) apresentam desempenho semelhante ao grupo que não teve nenhuma lesão (*Sham*), em um teste realizado 14 dias pós-cirurgia (B, Teste 2). O grupo que recebeu salina (IBO-SAL) apresentou pior desempenho em todos os testes realizados (B). (* = $p < 0,05$ vs. *Sham*; ** = $p < 0,01$ vs. *Sham*; dados expressos como média \pm EP; $n = 6-10$ por grupo)

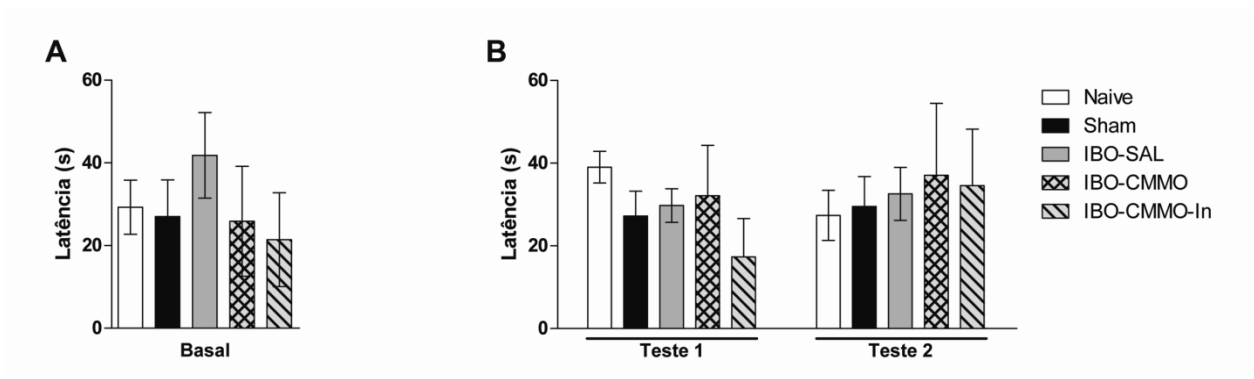


Figura 7 – Transplante de CMMO não afeta o desempenho de ratos com lesão bilateral do núcleo fastigial no teste de suspensão em fio. Os animais que tiveram o núcleo fastigial lesionado por ácido ibotênico não apresentaram diferença no tempo de permanência no fio em relação aos controles Sham e Naive (A). Após o transplante, nenhum grupo apresentou diferença quanto ao tempo de permanência, tanto no teste realizado 7 dias pós-cirurgia bem como no teste realizado 14 dias pós-cirurgia (B). (dados expressos como média \pm EP; n = 6-10 por grupo)

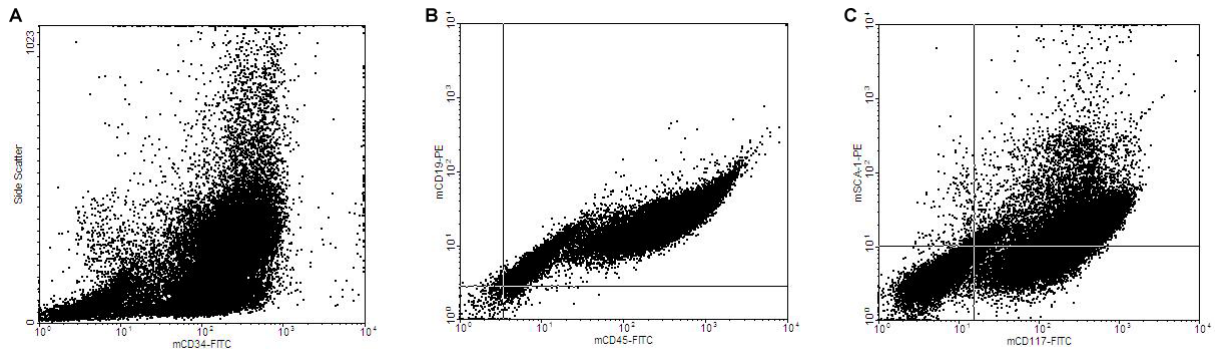


Figura 8 – Citometria de fluxo para imunofenotipagem das CMMO. As células extraídas da medula óssea de camundongos C57BL/6-EGFP eram CD34+ (A), CD45+ e CD19+ (B) e CD117+ (C).

4.3 EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMMO SOBRE O DESEMPENHO MOTOR DE RATOS COM LESÃO BILATERAL DO NÚCLEO FASTIGIAL

O transplante de CMMO aumentou o tempo de equilíbrio dos animais com lesão bilateral do núcleo fastigial no teste do rotarod executado com o protocolo acelerado (Figura 5B). Houve efeito do tratamento ($F_{4,76} = 13,04$; $p < 0.0001$), do momento do teste ($F_{2,76} = 6,27$; $p < 0.01$) e interação entre tratamento e teste ($F_{8,76} = 2,77$; $p < 0.01$). Observou-se que no teste realizado 7 dias pós-cirurgia (Teste 1), os

grupos IBO-SAL e IBO-CMMO possuíram desempenho pior que o controle *Sham* ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Neste teste, o grupo IBO-CMMO-In não apresentou diferença de desempenho em relação ao controle *Sham*. No teste realizado 14 dias pós-cirurgia (Teste 2), o grupo IBO-SAL permaneceu com desempenho pior que o grupo *Sham* ($p < 0,01$), além de apresentar desempenho pior que ambos os grupos IBO-CMMO e IBO-CMMO-In ($p < 0,05$). Estes dois últimos grupos apresentaram desempenho semelhante ao controle *Sham* ($p > 0,05$). Os grupos *Naive* e *Sham* tiveram desempenho igual em todos os testes realizados ($p > 0,05$).

De maneira semelhante ao ocorrido com a latência, o transplante de CMMO aumentou a fase de queda no teste do *rotarod* com o protocolo acelerado (Figura 5D). Houve efeito do tratamento ($F_{4,76} = 11,87$; $p < 0,001$), do momento do teste ($F_{2,76} = 5,75$; $p < 0,01$) e interação entre o teste e o tratamento ($F_{8,76} = 2,88$; $p < 0,01$). Observou-se que no teste realizado 7 dias pós-cirurgia (Teste 1) apenas o grupo IBO-SAL apresentou desempenho pior que o controle *Sham* ($p < 0,01$). Ainda, o grupo IBO-CMMO-In apresentou desempenho melhor do que o grupo IBO-SAL ($p < 0,05$). No teste realizado 14 dias pós-cirurgia (Teste 2), o grupo IBO-SAL permaneceu com desempenho pior que o grupo *Sham* ($p < 0,01$), além de apresentar desempenho pior que ambos os grupos IBO-CMMO e IBO-CMMO-In ($p < 0,05$). Estes últimos dois grupos apresentaram desempenho semelhante ao controle *Sham* ($p > 0,05$). Os grupos *Naive* e *Sham* tiveram fase de queda semelhante em todos os testes realizados ($p > 0,05$).

O transplante com CMMO aumentou a latência de queda dos animais com lesão bilateral de núcleo fastigial submetidos ao teste rotarod com protocolo fixo (Figura 6B). Houve efeito do tratamento ($F_{4,78} = 10,96$; $p < 0,001$), sem efeito do momento do teste ($F_{2,78} = 2,79$; $p = 0,068$) ou interação entre teste e tratamento ($F_{8,78} = 1,23$; $p = 0,29$). Observou-se que no teste realizado 7 dias pós-cirurgia, todos os grupos que receberam ácido ibotênico apresentavam latência de queda menor que o controle *Sham* ($p < 0,01$ para IBO-SAL e $p < 0,05$ para IBO-CMMO e IBO-CMMO-In). Embora os valores das latências para os grupos IBO-CMMO e IBO-CMMO-In foram um pouco maiores, a diferença foi estatisticamente significativa. No teste realizado 14 dias pós-cirurgia (Teste 2), não houve diferença estatística nos valores da latência entre os

grupos IBO-CMMO e IBO-CMMO-In em relação ao controle *Sham*). O grupo que recebeu salina (IBO-SAL) permaneceu com a latência menor que o controle *Sham* ($p < 0,01$). Os grupos *Naive* e *Sham* tiveram latências de queda semelhantes em ambos os testes realizados ($p > 0,05$).

O transplante com CMMO não influenciou o desempenho no teste de suspensão em fio (Figura 7B). Não houve efeito de tratamento ($F_{4,39} = 0,39$; $p = 0,81$) ou do momento do teste ($F_{2,64} = 0,49$; $p = 0,62$).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA LESÃO DO NÚCLEO FASTIGIAL APÓS TRANSPLANTE COM CMMO

A lesão foi verificada qualitativamente 18 dias após a cirurgia (14 dias após o transplante com CMMO), em todos os grupos experimentais. Observou-se que nos animais que receberam ácido ibotênico houve perda neuronal significativa, evidenciada pela ausência de células grandes e perda de substância de Nissl, o mesmo não sendo observado nos animais dos grupos *sham* e *naive* (Figura 9). Observa-se que nos grupos que sofreram lesão, a região previamente ocupada pelos neurônios do núcleo apresenta limites menos definidos em relação aos grupos com o núcleo fastigial intacto. Entre os tratamentos administrados (IBO-SAL, IBO-CMMO e IBO-CMMO-In) não houve diferença discernível na lesão nem modificação estrutural após o transplante com CMMO.

Quanto à extensão da lesão, esta foi semelhante nos três grupos que receberam ácido ibotênico, abrangendo todo o volume do núcleo fastigial exceto em sua parte mais anterior. A localização anatômica correspondeu à região entre os planos coronais -11,6 e -11,9 do atlas de Paxinos e Watson (definidos em mm em relação ao bregma), que foi a região alvo pretendida com o esquema de coordenadas adotados na cirurgia (Tabela 1). Nos planos mais anteriores, há um maior volume do núcleo interpósito e um menor volume do núcleo fastigial, o que diminuiria a seletividade da lesão.

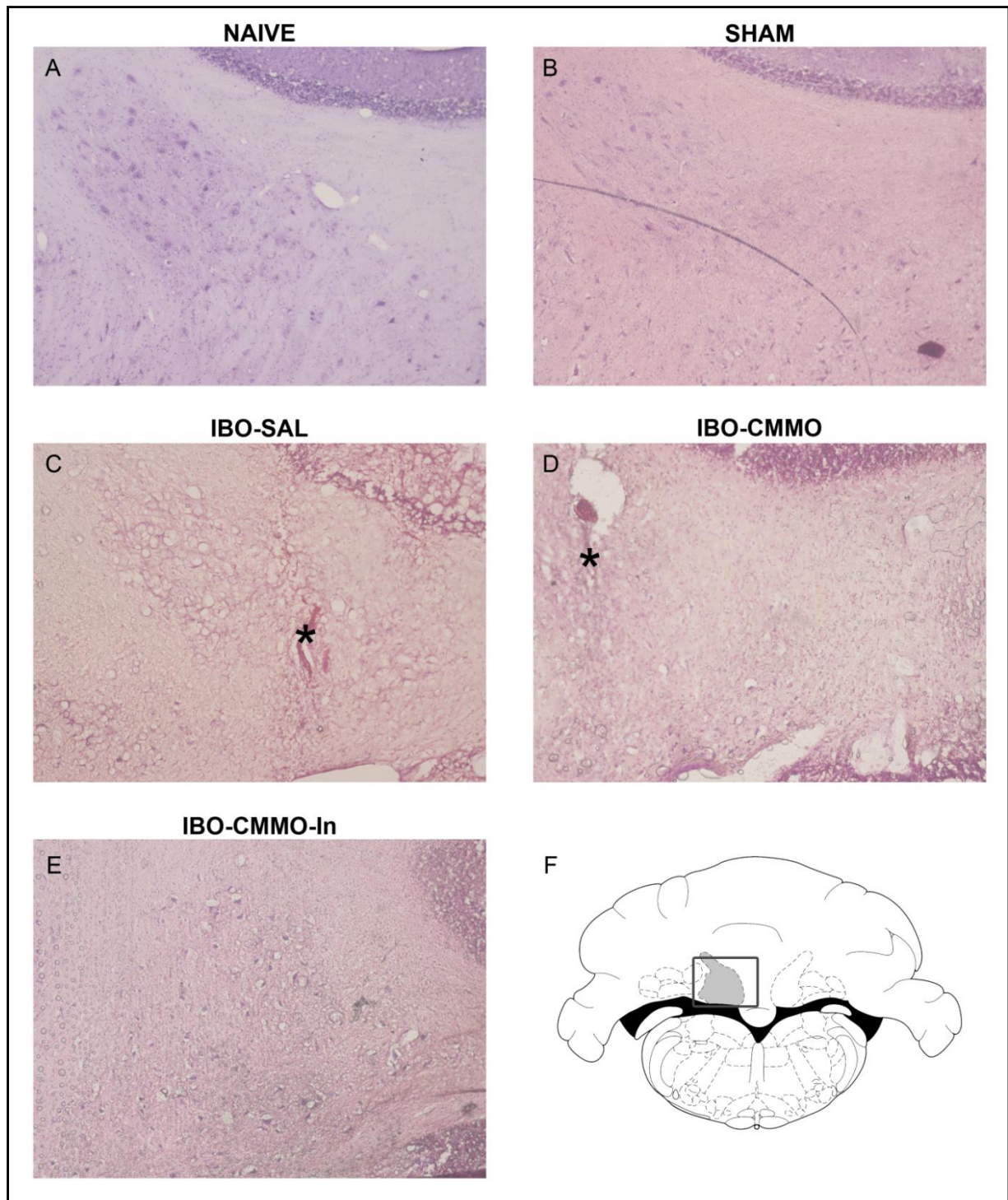


Figura 9 – Fotomicrografias das lesões do núcleo fastigial por ácido ibotênico 14 dias após transplante de CMMO. Foi empregada a técnica de Nissl. Observa-se que nos grupos que não receberam ácido ibotênico (A e B) há presença de células grandes com substância de Nissl evidente. Os grupos tratados com ácido ibotênico, independentemente do transplante recebido, apresentam aspecto histológico semelhante da lesão, com perda do delineamento do núcleo e perda neuronal expressiva (C, D e E). Os trajetos da agulha e pontos de infusão estão marcados com um asterisco. Na imagem F, o retângulo cinza escuro marca a área correspondente a cada fotomicrografia. O núcleo fastigial está preenchido com cinza claro.

4.5 VERIFICAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE CMMO DO ANIMAL DOADOR NO SITIO DE LESÃO DO ANIMAL RECEPTOR

Os camundongos doadores expressavam EGFP para identificar células originadas a partir do transplante de CMMO. Nas análises, as amostras apresentaram auto-fluorescência, não sendo possível distinguir marcações EGFP positivas das EGFP negativas. Assim, não é possível afirmar se houve a migração das células do doador para os locais de lesão e se estas originaram novas células (repopulação neuronal).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que o transplante sistêmico da fração mononuclear da medula óssea foi capaz de melhorar a ataxia no modelo de lesão excitotóxica do núcleo fastigial do cerebelo induzida pelo ácido ibotênico.

Nossos resultados concordam com uma série de trabalhos que demonstram que o transplante exógeno de células tronco possui potencial terapêutico em uma miríade de modelos de doença do SNC (Braga-Silva *et al.*, 2008, Li e Chopp, 2001). Os métodos empregados, tanto no mecanismo de lesão quanto na abordagem do transplante são variados. Até o presente momento, não encontramos nenhum estudo que avalie o mesmo tipo de lesão excitotóxica no cerebelo e mesma via de transplante de CMMO, o que torna impossível qualquer comparação. Entretanto, o potencial das células da medula óssea em gerar células de Purkinje em camundongos C57BL/6 foi demonstrado por Priller e colaboradores (2001) utilizando como marcador células da medula óssea transfectadas por retrovirus para expressarem GFP. Assim, no seguimento de longo prazo (15 meses) foram evidenciados neurônios de Purkinje expressando GFP em ambos os hemisférios cerebelares. Por outro lado, em mulheres que apresentavam doença maligna hematológica e que foram submetidas a quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea foi feita análise *post-mortem* do cerebelo, sendo analisados um total de 5.860 células de Purkinje de mulheres cujos doadores eram homens (04 pacientes) e 3.202 células de Purkinje daquelas que foram transplantadas com células da medula óssea de mulheres (05 pacientes). Tal estudo consistiu na identificação do cromossoma Y nas células de Purkinje. Nas mulheres que receberam células da medula óssea de homens foram encontrados 4 neurônios de Purkinje com cromossoma X e Y e em outros dois neurônios de Purkinje foram identificados um número maior do que o número diplóide de cromossomas sexuais. Não foram identificados cromossomas Y naquelas mulheres cujos doadores eram mulheres. Embora a contribuição das células masculinas provenientes da medula óssea seja relativamente pequena (aproximadamente 0.1% dos neurônios identificados), estes achados sugerem a capacidade do cerebelo em gerar células de Purkinje na idade

adulta e a possível contribuição das células da medula óssea com a neurogênese (Weimann *et al.*, 2003).

Uma das particularidades do estudo é o fato de se tratar de um xenotransplante. Há relatos que sugerem que as células tronco da medula óssea não provocam resposta imunológica, devido à ausência de marcadores de superfície (Saito, 2002). Assim, foram realizados xenotransplantes de células tronco mesenquimais humanas em miocárdio de ratos (Grinnemo *et al.*, 2004), células tronco da medula óssea de camundongos injetadas no cérebro de ratos (Borlongan *et al.*, 2004), células tronco de cordão umbilical humano injetadas intravenosamente em ratos (Chen *et al.*, 2001 e 2002), células tronco da medula óssea humana injetadas em cérebro de rato (Zhao *et al.*, 2002) e células tronco neuro-epiteliais de camundongos no cérebro de ratos (Modo *et al.*, 2002). Estudo delineado para avaliar a eventual resposta imunológica pós-transplante de células da medula óssea de camundongos no miocárdio de ratos submetidos a isquemia por ligadura da artéria coronária, evidenciou que o transplante xenogênico foi *imunologicamente tolerado*, sobreviveu e diferenciou-se, resultando em uma quimera cardíaca com melhora da função ventricular esquerda (MacDonald *et al.*, 2005). Nosso estudo demonstra ser viável um xenotransplante de células tronco de medula óssea e está de acordo com observações anteriores obtidas em nosso laboratório (De Paula *et al.*, 2009; Costa-Ferro *et al.*, 2010).

Os mecanismos responsáveis pelo efeito benéfico das CMMO é desconhecido, embora postulem-se vários mecanismos, como transdiferenciação, estímulo de neurogênese de células endógenas e neuroproteção (Lindvall, 2004). Van Velthoven e colaboradores demonstraram que o efeito terapêutico está associado com neurogênese e o surgimento de novas células gliais e neurônios em um modelo de isquemia. Em nosso estudo, o aspecto histológico das lesões não parece ter sido modificado em função do tratamento, embora as técnicas histológicas empregadas não permitem distinguir os diferentes fenótipos de glia. Outros estudos demonstram que os novos neurônios formados podem possuir seu fenótipo determinado apenas por técnicas imunohistoquímicas, apresentando uma morfologia esférica (Zhao, 2002). Assim, não podemos afirmar se a neurogênese apresenta algum papel nos resultados obtidos. É possível que a melhora das manifestações motoras nos animais com lesão

do núcleo fastigial sejam decorrentes da neuroplasticidade, processo este que ocorre habitualmente nesses animais. Assim, hipotetizamos que as células tronco da medula óssea exerçam um efeito facilitador dessa neuroplasticidade, acelerando e/ou aperfeiçoando esse processo. Nesta linha, Koblar e colaboradores (2009) adaptaram um modelo em aves para investigar o efeito do xenotransplante *in ovo* de células tronco derivadas da polpa dentária humana no desenvolvimento dos axônios do gânglio trigeminal da ave receptora. Estes autores elegantemente demonstraram esse efeito neuroplástico e, portanto, independente de qualquer processo de organização estrutural. Um dos mecanismos que desperta interesse é o papel modulador das células tronco sobre a neuroinflamação, processo este decisivo nos processos de injúria do SNC (Phinney, 2007; Taupin, 2008). No nosso modelo, empregamos o ácido ibotênico, que provoca uma lesão excitotóxica por glutamato via receptor NMDA (Zinkand, 1992). Demonstrou-se que a micróglia tem papel central no dano neuronal por excitotoxicidade NMDA dependente (Kim, 1998), e que no córtex cerebelar e outras estruturas, a ativação da micróglia ocorre proporcionalmente ao dano sofrido (Igarashi, 2007). Em lesões isquêmicas, um transplante de células tronco mesenquimais modulou negativamente a resposta local da micróglia, e provocou diminuição na expressão de uma série de genes com atividade pró-inflamatória (Hirokazu, 2008). Assim, a modulação da neuroinflamação pode ter sido fator que contribuiu para a recuperação do déficit neurológico em nosso modelo. A migração das células tronco de medula óssea para o cerebelo quando injetadas no ventrículo lateral de camundongos recém-nascidos já havia sido demonstrada (Kopen *et al.*, 1999). A via de administração que escolhemos para o transplante foi a sistêmica, que tem como uma de suas maiores vantagens ser de fácil administração e não requerer procedimento cirúrgico. Uma das desvantagens é o fato de requerer que as células transplantadas migrem para o local de lesão (Bliss, 2007). Assim, um aspecto importante a ser avaliado no trabalho seria identificar as células marcadas com EGFP nos locais de lesão. Embora utilizássemos como doador camundongos transgênicos cujas células expressam GFP, não conseguimos identificar estas células por dificuldades técnicas que inviabilizaram distinguir as células tronco injetadas da fluorescência normal ou artefactual do tecido. Por outro lado, os resultados obtidos quanto à melhora da postura e equilíbrio dos

animais tratados, aliado à demonstração que a injeção intravenosa em roedores de células tronco de cordão umbilical (De Paula *et al.*, 2009), da medula óssea (Costa-Ferro, ZSM *et al.*, 2010) ou células tronco neurais humanas (Jeong *et al.*, 2003), e a demonstração que as células da medula óssea de camundongos (Alvarez-Dolado *et al.*, 2003; Priller *et al.*, 2001) e de pacientes podem migrar para o cerebelo (Weimann *et al.*, 2003), sugerem que o efeito observado seja decorrente da ação destas células. Os mecanismos pelos quais as células tronco da medula óssea exercem esta ação ainda é desconhecido. Existem evidências experimentais *in vitro* e *in vivo* (Alvarez-Dolado *et al.*, 2003) de que possa ocorrer fusão com as células de Purkinje em camundongos ou em seres humanos (Weimann *et al.*, 2003) ou transdiferenciação em células de Purkinje em camundongos (Priller *et al.*, 2001). Recentemente autores tem sugerido um efeito parácrino dessas células, ou seja, os efeitos da terapia com células tronco devem-se provavelmente aos fatores tróficos secretados por estas células ou estimulada sua liberação pelas células tronco residentes (Borlongan *et al.*, 2004; Phinney, 2007; Miranda, 1998; De Paula *et al.*, 2009; Costa-Ferro *et al.*, 2010). Assim, em um modelo de isquemia, Borlongan e colaboradores (2004) demonstraram que a terapia celular tem efeito sem que seja necessária a migração das células para o sistema nervoso, desde que fatores tróficos secretados ultrapassem a barreira hemato-encefálica. Embora neste estudo só foi possível obter o transporte pela barreira após administração de manitol, o mecanismo de injúria empregado foi diferente. Foi demonstrado que lesões excitotóxicas por mecanismo NMDA dependente aumentam a permeabilidade da barreira hemato-encefálica por até 12 dias após a infusão (Brace, 1997). Na mesma linha Miranda e colaboradores (1997) utilizando camundongos “knock-out” para a enzima esfingomielinase ácida (um modelo de doença de Niemann Pick), onde células da medula óssea foram injetadas na veia da cauda nos animais adultos ou na veia temporal ou intraperitoneal em camundongos recém-nascidos, verificaram que, embora em animais recém-nascidos fossem detectadas maior número de células da medula óssea no cérebro, a quantidade era extremamente pequena apesar de haver até 8% de atividade de esfingolipidade em relação aos controles, com melhora da ataxia e repopulação neuronal (células Purkinje) em certas áreas do cerebelo (Miranda *et al.*, 1998). Assim, mesmo sem evidência direta da presença das células transplantadas nos

sítios lesionados, a translocação de fatores humorais liberados na circulação sanguínea ou induzidos localmente podem ter contribuído para nossos resultados.

Nosso objetivo não foi determinar a melhor janela terapêutica ou dose para o transplante de células mesenquimais da medula óssea. Entretanto, vários estudos demonstram que esta é ampla, sugerindo que o momento do transplante deve coincidir com o momento da resposta inflamatória (Van Velthoeven, 2009). O tempo que empregamos é compatível com a resposta inflamatória associada a lesão neurotóxica, e compatível com o tempo empregado em outros estudos de terapia com células tronco em outros modelos de lesão, embora a comparação direta seja difícil pela diversidade de abordagens experimentais.

Um resultado intrigante foi que o perfil de melhora obtido com o transplante de CMMO foi replicado após transplante de sua variante inativa. Estas células presumidamente não possuem a capacidade de migrar ou secretar fatores tróficos. Sua inclusão permite verificar o papel da resposta imunológica ao xenotransplante. Tal resposta envolve uma série de mecanismos. Na reação tardia, a resposta celular possui papel importante, ocorrendo liberação de citocinas relacionadas com a resposta TH2 (Auchinchloss, 1998). A IL-10 é uma das citocinas desse grupo, e tem papel regulador sobre a imunidade inata e sobre outras citocinas pró-inflamatórias, da mesma forma que as células tronco (Carpentier, 2009). A IL-10 teve um efeito protetor em neurônios cerebelares lesados por excitotoxicidade (Bachis, 2001). Além disso, a administração sistêmica de IL-10 três dias após a lesão por ácido ibotênico em outras áreas cerebrais provocou redução do tamanho da lesão, embora um curso mais crônico não tenha sido avaliado (Mesples, 2003). A quemocina é uma citocina pró-inflamatória com atividade de quimio-atração e atividade regulatória do processo inflamatório celular e compartilha os mesmos receptores da interleucina-8 (IL-8) e seus receptores estão amplamente expressados no sistema nervoso central tanto em situações fisiológicas quanto patológicas e envolvidas de modo variável na apoptose. Limatola e colaboradores (2000) demonstraram que as quemocinas que classicamente pertencem ao sistema imunológico exercem algum efeito neurotrófico em células granulares do cerebelo, protegendo-as da apoptose e utilizando para isso os receptores AMPA. Outro elemento importante nesta “equação” imunológica é a atividade da microglia. A microglia

desempenha duas funções antagônicas: uma visão, baseada principalmente em estudos *in vitro*, é de efector imunológico neurotóxico, o que dificultaria a sobrevivência neuronal; a outra visão, baseada em estudos *in vivo*, é diametralmente oposta, e sugere que a microglia tem um efeito neurotrófico (Streit, 2000). Assim, vários estudos demonstram o efeito neuroprotetor da microglia pela sua produção de fatores de crescimento ou indiretamente pela sua produção de moléculas imunossupressoras (Polazzi *et al.*, 2001; Melchior *et al.*, 2006). Pesquisas sugerem que a interação da microglia com as células T CD4⁺ é fundamental para o desenvolvimento e/ou manutenção da resposta neuroprotetora das células T. Estes autores demonstram que a ativação da microglia protege os neurônios motores faciais de camundongos da morte determinado pela secção dos seus axônios (Byram *et al.*, 2004). Estes achados, aliados aos experimentos de co-cultura, são explicados admitindo-se que as moléculas liberadas no meio pelos neurônios em processo de apoptose sinalizam para a microglia liberar moléculas para resgatar estes neurônios, potencializando assim a ação anti-apoptótica da microglia (Byram *et al.*, 2004; Melchior *et al.*, 2006). A presença de moléculas sinalizadoras que podem atuar tanto em neurônios quanto na microglia sugerem que esta atividade microglial “sutil” pode modular a transmissão sináptica basal e com isso o funcionamento neuronal. Portanto, da ativação da microglia emergem os compartimentos microestruturais e funcionais nos quais as neuroquinas, interleucinas e outras moléculas sinalizadoras determinam uma comunicação célula à célula mais ampla do que aquela habitualmente observada no cérebro saudável. Esta “neo-compartimentalização” que ocorre em determinadas áreas do sistema nervoso sob esta interação modulatória da microglia e neurônios seria responsável pela neuroplasticidade (Banati, 2002). É interessante observar que está se iniciando uma mudança de paradigma em relação a terapia com células tronco, com inclinação para os aspectos imunológicos. Assim, pesquisadores que investigam alternativas terapêuticas para erros inatos do metabolismo i.e para doenças em que há uma mutação gênica determinando incapacidade de efetivar determinada rota metabólica, têm utilizado experimentalmente o transplante de células tronco em camundongos como alternativa para que estas células produzam a enzima faltante e/ou modifiquem o microambiente para que isso ocorra. Os camundongos *twitcher* constituem modelo

experimental para a doença progressiva denominada de leucodistrofia de células globóides, onde há mutação no gene da galactosilceramidase. Wu e colaboradores (2000) identificaram no cérebro desses animais células da medula óssea GFP positivas do camundongo doador, e enfatizaram a possível modulação da atividade microglial e ação anti-apoptótica desta terapia. Se considerarmos que as células inativadas por meio químico tornam-se eventualmente agente antigênico “estranho” visto estas células terem perdido suas características biológicas, poderíamos hipotetizar que a resposta imunológica induzida poderia “despertar” a atividade microglial neuroprotetora com sua capacidade de secreção de fatores tróficos, determinando melhora no desempenho motor (postura e equilíbrio) nesses animais. Tal mecanismo presumido deve, entretanto, ser investigado detalhadamente.

Em resumo, demonstramos que o tratamento com células tronco de medula óssea pode auxiliar a reverter um déficit neurológico causado por excitotoxicidade. Se os mecanismos tradicionalmente relacionados com os efeitos terapêuticos das células tronco ocorrem paralelamente com outros mecanismos envolvidos com o estado imunológico do hospedeiro, isto permanece por ser esclarecido.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho investigamos os efeitos das células da fração mononuclear da medula óssea no desempenho motor e na repopulação neuronal em um modelo de ataxia cerebelar por infusão direta de ácido ibotênico.

Nosso estudo possibilitou as seguintes conclusões:

1. A lesão do núcleo fastigial do cerebelo por injeção do ácido ibotênico determinou ataxia em todos os animais.
2. A lesão determinada pelo ácido ibotênico ficou limitada ao núcleo fastigial, com perda neuronal significativa
3. O transplante de CMMO melhorou o desempenho motor dos animais com lesão do núcleo fastigial.
4. A infusão de células inativadas também melhorou o desempenho motor dos animais com lesão do núcleo fastigial
5. Não evidenciamos repopulação neuronal após o transplante com CMMO ou células inativadas
6. Não foi possível constatar a incorporação de CMMO do animal doador no sitio de lesão do animal receptor

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Futuramente, mantendo esta mesma linha de pesquisa, pretendemos aprofundar nossos achados sobre o potencial terapêutico das células-tronco da medula óssea no modelo experimental de ataxia cerebelar. Para tanto, planejamos:

1. Identificar e quantificar as células do animal doador no animal receptor utilizando marcadores com maior sensibilidade
2. Caracterizar o fenótipo das células transplantadas e identificadas no cerebelo
3. Avaliar a reação microglial pós-lesão e pós-transplante
4. Avaliar o papel das citocinas na resposta ao transplante celular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVAREZ-DOLADO M, PARDAL R, GARCIA-VERDUGO JM, FIKE JR, LEE HO, PFEFFER K, LOIS C, MORRISON SJ, ALVAREZ-BUYLLA. A Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature** 425: 968-973, 2003.
2. ANDRADE AF, PAIVA WS. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. **Rev Assoc Med Bras**, 2008.
3. APFEL MI, ÉSBERARD C, RODRIGUES FK. Estudo Estereológico das Células de Purkinje Cerebelares Submetidas à Intoxicação Alcoólica em Ratos Wistar. **Arq Neuropsiquiatr**, 2002.
4. AUCHINCLOSS H, SACHS DH. Xenogeneic transplantation. **Annu Rev Immunol** 16:433-470, 1998.
5. AZIZI A.S., STROKES, D., AUGELLI B.J., DIGIROLAMO, C. *et al.* Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. **Proc. Natl. Acad Sci USA** 95: 3098-3913, 1998.
6. BACHIS A, COLANGELO AM, VICINI S, DOE PP, DE BERNARDI MA, BROOKER G, MOCCHETTI I. Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. **J Neurosci** 21(9):3104-3112, 2001.
7. BANATTI RB. Brain plasticity and microglia: is transsynaptic glial activation in the thalamus after limb denervation linked to cortical plasticity and central sensitisation? **J Physiol Paris** 96(3-4):289-99, 2002.
8. BATINI C, COMPOINT C, BUISSERET-DELMAS C. Cerebellar nuclei and the nucleocortical projections in the rat: retrograde tracing coupled to GABA and glutamate immunohistochemistry. **J. Comp. Neurol** 315: 74-84, 1992.
9. BAUMEL Y, JACOBSON G, COHEN D. Implications of Functional anatomy on information processing in the deep cerebellar nuclei. **Frontier in cellular neuroscience**, 2009.

10. BJORNSON, C.R., RIETZE, R.L., REYNOLDS, B.A., MAGLI, M.C., AND VESCOVI, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science** 283: 534–537, 1999.
11. BLISS T, GUZMAN R, DAADI M, STEINBERG GK. Cell transplantation therapy for stroke. **Stroke** 38:817–826, 2007.
12. BLOEDEL JR. The cerebellum and memory storage **Science** 238:1728-1729, 1987.
13. BORLONGAN CV, LINDA JG, DILLON-CARTER O, YU G, HADMAN M, CHENG C, CARROLL J, HESS D. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. **Brain Research** 1010: 108-116, 2004.
14. BORLONGAN CV, LINDA JG, DILLON-CARTER O, YU G, HADMAN M, CHENG C, CARROLL J, HESS D. Intracerebral xenografts of mouse bone marrow cells in adult rats facilitate restoration of cerebral blood flow and blood–brain barrier. **Brain Research** 1009: 26:33, 2004.
15. BOTEZ MI, BOTEZ-MARQUARD T, MAYER P, MARCHAND L, LALONDE R, READER TA. The treatment of spinocerebellar ataxias: facts and hypotheses. **Med Hypotheses** 51:381-384, 1998.
16. BRACE H, LATIMER M, WINN P. Neurotoxicity, blood-brain barrier breakdown, demyelination and remyelination associated with NMDA-induced lesions of the rat lateral hypothalamus. **Brain Res Bull** 43(5): 447-455, 1997.
17. BRAGA-SILVA J, GEHLEN D, PADOIN AV, MACHADO DC, GARICOCHEA B, COSTA DA COSTA J. Repair of Human Median and Ulnar Nerves? Can Local Supply of Bone Marrow Mononuclear Cells Improve the Outcome from Late Tubular. **Journal of Hand Surgery (European Volume)** 33;488-493, 2008.
18. BRAZELTON T. R., ROSSI F. M., KESHET G. I., *et al.* From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science** 290: 1775-1779, 2000.
19. BRUSSE E, MAAT-KIEVIT JA, SWIETEN JC. Diagnosis and management of early-and late-onset cerebellar ataxia. **Clin Genet** 2007.

20. BUETI D, WALSH V, FRITH C, REES G. Different brain circuits underlie motor and perceptual representations of temporal intervals. **J. Cogn. Neurosci**, 2008.
21. BYRAN SC, CARSON MJ, DEBOY CA, SERPE CJ, SANDERS VM, JONES KJ. CD4-positive T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation. **The Journal of Neuroscience** 24(18):4333–39, 2004.
22. CARPENTIER PA, PALMER TD. Immune Influence on Adult Neural Stem Cell Regulation and Function. **Cell** 64:79-92, 2009.
23. CHEN J, SANBERG PR, LI Y, WANG L, LU M, WILLING AE, SANCHEZ-RAMOS J, CHOPP M. Deficits After Stroke in Rats Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Reduces Behavioral. **Stroke** 32:2682-2688, 2001.
24. COGLE, C.R., YACHNIS A. T., LAYWELL, E. D. *et al.* Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. **Lancet** 363: 1432-37, 2004.
25. COSTA-FERRO, ZSM; VITOLA, AS; PEDROSO, MF; CUNHA, FB; XAVIER, LL; MACHADO, DC; SOARES, MBP; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R; DACOSTA, JC. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy; **Seizure in press**, 2010.
26. CROSBY DG, BERTHOLD RV. Fluorescence spectra of some simple coumarins. **Anal Biochem** 4:349-57, 1962.
27. DE PAULA S, VITOLA AS, GREGGIO S, DE PAULA D, MELLO PB, LUBIANCA JM, XAVIER LL, FIORI HH, DACOSTA JC. Hemispheric Brain Injury and Behavioral Deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. **Pediatric Research** 65(6):631-635, 2009.
28. DE VERA N, CAMON L., MARTINEZ E. Cerebral distribution of polyamines in kainic acid-induced models of status epilepticus and ataxia in rats. Overproduction of putrescine and histological damage. **Eur Neuropsychopharmacol** 12(5):397-405, 2002.

29. DEZAWA, M., TAKAHASHI, I., ESAKI, M., TAKANO, M., SAWADA H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. **Eur J Neurosci** 14(11):1771-6, 2001.
30. DOW RS, KRAMER RE, ROBERTSON LT. Disorders of the cerebellum. **Clinical Neurology** 3:1-143, 1991.
31. DUNNETT S.B., ROSSER A.E. Cell therapy in Huntington's disease. **NeuroRx** 1:394-405, 2004.
32. EGLITIS, M. A., D. DAWSON, ET AL. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. **Neuroreport** 10(6): 1289-92, 1999.
33. EGLITIS, M.A, E MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94(8):4080-5, 1997.
34. ENGELHARDT E, MOREIRA D. O cerebelo e suas principais conexões: Estudo com Tensor de Difusão. **Revista Brasileira de Neurologia**, 2009.
35. EVIDENT VG, GWINN-HARDY KA, CAVINESS JN, GILMAN S. Hereditary ataxias. **Mayo Clin Proc** 75:475-90, 2000.
36. FERNANDEZ AM, CARRO EM, LOPEZ TA. Insulin-like growth factor I treatment for cerebellar ataxia: Addressing a common pathway in the pathological cascade? **Brain Research Reviews**, 2005.
37. FRISÉN, J. Stem cell plasticity? **Neuron**, 35:415-418, 2002.
38. FUCHS, E, SEGRE, JA. Stem cells: a new lease on life. **Cell** 100:143-155, 2000.
39. GONZALEZ-MACIEL A, ROMERO-VELASQUEZ RM, HERNANDEZ-ISLAS JL, SICILIA-ARGUMEDDO G, FRAGOSO-SORIANO R, CRAVIOTO J. Purkinje cell density in cerebella of alcoholized and non-alcoholized male rat offspring. **Arch Med Res** 1994;25: 427-434.

40. GREEN JT, ARENOS JD, DILLON CJ. The effects of moderate neonatal ethanol exposure on eyeblink conditioning and deep cerebellar nuclei neuron numbers in the rat. **Alcohol** 39:135-150, 2006.
41. GRINNEMO KH, MANSSON A, DELLGREN MD, KLINGBERG D, WARDELL E, DRVOTA V, TAMMIK C, HOLGERSSON J, RINGDE'N O, SYLVE C, LE BLANC K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery** 127(5): 1293-1300, 2004
42. GRÜSSER-CORNEHLS U, BÄURLE J. Mutant mice as a model for cerebellar ataxia. **Prog Neurobiol** 63(5):489-540, 2001.
43. HAAS S, WEIDNER N, WINKLER J. Adult stem cell therapy in stroke. **Current Opin Neurol**;18:59-64, 2005.
44. HIROKAZU O, YLOSTALO JH, FORAKER JE, ROBINSON AP, REGER RL, SHIODA S, PROCKOP DJ. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. **PNAS** 105(38):14638-43, 2008.
45. IGARASHI T, POTTS MB, NOBLE-HAEUSSLEIN LJ. Injury severity determines Purkinje cell loss and microglial activation in the cerebellum after cortical contusion injury. **Exp Neurol** 203(1):258-268, 2007.
46. JAIN KK. Drug-induced cerebellar disorders. **Drug-induced neurological disorders** 1:272-282, 1996.
47. JEONG SW, CHU K, JUNG KH, KIM SU, KIM M, ROH JK. Human Neural Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery in rats with Experimental Intracerebral Hemorrhage. **Stroke** 34:2258-63, 2003.
48. JOYAL CC, Meyer C. Effects of midline and lateral cerebellar lesion on motor coordination and spatial orientation. **Brain Research**, 1996.
49. KAJI EH, LEIDEN JM. Gene and stem cell therapies. **Jama** 285(5):545-50, 2001.

50. KIM WK, KO KH. Potentiation of N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity by immunostimulated murine microglia. **J Neurosci Res** 54(1): 17-26, 1998.
51. KIM, J. Y., KOH, H. C., LEE, J.Y., CHANG, M. Y., *et al.* Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. **J Neurochem** 85(6):1443-54, 2003.
52. KLOCKGETHER T, DICHGANS J. The genetic basis of hereditary ataxia. **Prog Brain Res** 114:569-76, 1997.
53. KOBLAR SA, GRONTHOS S, ARTHUR A. Stem cell therapy: Neuroplasticity as a novel cellular mechanism for regeneration. **Journal of Clinical Neuroscience** 16(3):480, 2009.
54. KODA M, OKADA S, NAKAYAMA T, KOSHIZUKA S, KAMADA T, NISHIO Y, *et al.* Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. **Neuroreport** 16:1763-1767, 2005.
55. KOPEN GC, PROCKOP DJ, PHINNEY DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Cell Biology** 96:10711-10716, 1999.
56. KORBLING, M., ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **N Engl J Med** 349(6): 570-82, 2003.
57. KRIENEN FM, BUCKNER RL. Segregated fronto-cerebellar circuits revealed by intrinsic functional connectivity. **Cereb Cortex** 19(10):2485-97, 2009.
58. LI Y, CHEN J, CHEN XG, WANG L, GAUTAM SC, XU YX, KATAKOWSKI M, ZHANG LJ, LU M, JANAKIRAMAN N, CHOPP M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery. **Neurology** 59: 514-523, 2002.
59. LI, Y., CHOPP M. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. **Cell Transplant** 10(31): 31-40, 2001.
60. LIMATOLA C, CIOTTI MT, MERCANTI D, VACCA F, RAGOZZINO D, GIOVANNELLI A, SANTONI A, EUSEBI F, MILEDI R. The chemokine growth-related gene product β protects rat cerebellar granule cells from apoptotic cell

death through α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors. **PNAS** 97(11):6197-6201, 2000.

61. LINDVALL O, KOKAIA Z. Recovery and rehabilitation in stroke: stem cells. **Stroke** 35: 2691-4, 2004.
62. LINPTON SA, ROSENBERG PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med** 330:613-22, 1994.
63. MACDONALD DJ, LUO J, TAKAYUKI S, DUONG M, BERNIER PL, CHIU RCJ, SHUM-TIM D. Persistence of marrow stromal cells implanted into acutely infarcted myocardium: Observations in a xenotransplant model. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery** 130 (4): 1114-1121, 2005.
64. MARTIN JH. Neuroanatomy, 1996.
65. MASSION J. Movement, posture and equilibrium: interaction and coordination. **Prog. Neurobiol** 38: 35 – 56, 1992.
66. MCCORMICK DA, THOMPSON RF. Cerebellum: essential involvement in the classically conditioned eyelid response. **Science** 223:296-298, 1984.
67. MELCHIOR B, PUNTAMBEKAR SS, CARSON MJ. Microglia and the control of autoreactive T cell responses. **Neurochem Int** 49(2): 145–153, 2006
68. MESPLES B, PLAISANT F, GRESSENS P. Effects of interleukin-10 on neonatal excitotoxic brain lesions in mice. **Brain Res Dev Brain Res** 141(1-2):25-32, 2003.
69. MEZEY, E., CHANDROSS, K. J., HARTA, G., *et al.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science** 209: 1779-82, 2000.
70. MIMURA, T., DEZAWA, M., KANNO, H., SAWADA, H., YAMAMOTO I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. **J Neurosurg** 101(5):806-12, 2004.
71. MIRANDA SRP, ERLICH S, VISSER JWM, GATT S, DAGAN A, FRIEDRICH Jr VL, SCHUCHMAN EH. Bone marrow transplantation in acid sphingomyelinase-

- deficient mice: engraftment and cell migration into the brain as a function of radiation, age, and phenotype. **Blood** 90:444-452, 1997.
72. MIRANDA, S.R.P., ERLICH, S., FRIEDRICH, V.L. Jr., HASKINS, M.E., GATT, S, SCHUCHUMAN E.H. Biochemical, pathological, and clinical response to transplantation of normal bone marrow cells into acid sphingomyelinase deficient mice. **Transplantation** 65:884-892, 1998
73. MODO M, REZAIE P, HEUSCHLING P, PATEL S, MALE DK, HODGES H. Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. **Brain Research** 958:70–82, 2002.
74. MORRISON SJ, SHAH NM, ANDERSON DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell** 88:287-298, 1997.
75. OKABE, M., IKAWA, M., KOMINAMI, K. *et al.* Green mice as a source of ubiquitous green cells. **FEBS Letters** 407:313-319, 1997.
76. PAXINOS, G, WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates 2 ed. 1986
77. PETERSEN B.E., BOWEN W.C., PATRENE K.D, *et al.* Bone marrow as potential source of hepatic oval cells. **Science** 284: 1168-1170, 1999.
78. PHINNEY, D.G., PROCKOP, D.J. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. **Stem Cells** 25:2896-2902, 2007.
79. POLAZZI E, GIANNI T, CONTESTABILE A. Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: Evidence for reciprocal signaling. **Glia** 36:271-280, 2001.
80. PRILLER J, PERSONS DA, KLETT FF, KEMPERMANN G, KREUTZBERG GW, DIRNAGL U. Neurogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. **The Journal of Cell Biology** 155(5):733-38, 2001.
81. ROSENBERG SM. Mutation for survival. **Curr Opin Genet Dev** 7(6):829-34, 1997.

82. SAITO T, KUANG JQ, BITTIRA B, AL-KHALDI A, CHIU RCJ. Xenotransplant Cardiac Chimera: Immune Tolerance of Adult Stem Cells. **Ann Thorac Surg** 74(1): 19-24, 2002.
83. SARNA JR, HAWKES R. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. **Progress in Neurobiology**, 2003.
84. SHAKKOTTAI VG, PAULSON HL. Physiologic alterations in ataxia: channeling changes into novel therapies. **Arch Neurol** (10):1196-201, 2009.
85. SHI, Q., RAFIL, S., WU, M.H. *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. **Blood** 92:362-367, 1998.
86. STREIT WJ. Microglial Response to Brain Injury: A Brief Synopsis. **Toxicol Pathol** 28(1):28-30, 2000.
87. TAUPIN P. Adult neurogenesis, neuroinflammation and therapeutic potential of adult neural stem cells. **Int J Med Sci** 5(3):127-132, 2008.
88. TERADA, N., HAMAZAKI, T., OKA, M., *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous fusion. **Nature** 416: 542-45, 2002.
89. TROUILLAS P, TAKAYANAGI T, HALLET M, CURRIER RD, SUBRAMONY SH. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. **Journal of Neurology Science** 145:205-211, 1997.
90. VAN VELTHOVEN CT, KAVELAARS A, VAN BF, HEIJNEN CJ. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. **Brain Behav Immun**, 2009.
91. VOOGD J, GLICKSTEIN M. The anatomy of the cerebellum. **Trends Neurosci** 21:370-375, 1998.
92. VOOGD J, RUIGROK TJ. The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: the congruence of projection zones and the zebrin pattern. **J Neurocytol** 33(1):5-21, 2004.


93. WEIMANN JM, CHARLTON CA, BRAZELTON TR, HACKMAN RC, BLAU HM. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. **PNAS** 100(4):2088-93, 2003.
94. WELSH J.P, HARVEY J.A. The role of the cerebellum in voluntary and reflexive movements: history and current status. **The Cerebellum Revisited**, 24: 301-334,1992.
95. WU YP, MCMAHON, KRAINE MR, TISCH R, MEYERS A, FRELINGER J, MATSUSHIMA GK, SUZUKI K. Distribution and Characterization of GFP1 Donor Hematogenous Cells in Twitcher Mice after Bone Marrow Transplantation. **AJP** 156(6):1849-1854, 2000.
96. ZHAO LR, DUAN WM, REYES M, KEENE D, VERFAILLIE CM, LOW WC. Human Bone Marrow Stem Cells Exhibit Neural Phenotypes and Ameliorate Neurological Deficits after Grafting into the Ischemic Brain of Rats. **Exp Neurol** 174(1):11–20, 2002.
97. ZINKAND WC, MOORE WC, THOMPSON C, SALAMA AI, PATEL J. Ibotenic acid mediates neurotoxicity and phosphoinositide hydrolysis by independent receptor mechanisms. **Mol Chem Neuropathol**. 16(1-2):1-10, 1992.

9 ANEXOS

9.1 CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

*Recebido
17/03/09*

PARA A DELEGADA SANTOS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 023/09 - CEUA Porto Alegre, 09 de março de 2009.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00060, intitulado: **"Transplante de Células-tronco de medula óssea para o tratamento da ataxia cerebelar em modelo experimental"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,

P. Anamaria Feijó
Profa. Dr. Anamaria Feijó
Coordenadora do CEUA - PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa
Instituto do Cérebro/ HSL
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar sala 314- CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

195 Santos

RECEBIDO EM 17/03/09
Silvane - 9:35 *my*

9.2 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

The screenshot shows a web browser window displaying the Editorial Manager interface. The page title is "The Cerebellum" and the user is logged in as an "Author". The main content area is titled "Submissions Being Processed for Author" and shows a table with one submission record. The table has columns for Action, Manuscript Number, Title, Initial Date Submitted, Status Date, and Current Status. The submission record shows a manuscript number of CERE-D-10-00021, titled "The Effect of Bone Marrow Mononuclear Cells Transplantation on Motor Deficits in Rats with Excitotoxic Lesions of the Fastigial Nuclei", submitted on 19-02-2010, with a status date of 19-02-2010 and a current status of "With Editor".

Submissions Being Processed for Author

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission	CERE-D-10-00021	The Effect of Bone Marrow Mononuclear Cells Transplantation on Motor Deficits in Rats with Excitotoxic Lesions of the Fastigial Nuclei	19-02-2010	19-02-2010	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Internet | Protected Mode: On 100%

9.3 ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA A REVISTA "THE CEREBELLUM"

Editorial Manager(tm) for The Cerebellum
Manuscript Draft

Manuscript Number: CERE-D-10-00021

Title: The Effect of Bone Marrow Mononuclear Cells Transplantation on Motor Deficits in Rats with Excitotoxic Lesions of the Fastigial Nuclei

Article Type: Original Article

Corresponding Author: Dr. Jaderson Costa Dacosta, M.D., Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

First Author: Mariana M Santos

Order of Authors: Mariana M Santos; Cristiano A Köhler, M.D.; Fabiano Brito; Daniel Marinowic; Jaderson Costa Dacosta, M.D., Ph.D.

Abstract: Cerebellar ataxia can be thought of as a syndrome which has many different causes, such as multiple sclerosis, alcoholic cerebellar disease genetic and degenerative ataxias which have no known etiology. Only neuroprotective and symptomatic treatments are available that make imperative to seek for new therapeutical strategies. Bone marrow derived cells were found to differentiate into cerebellar Purkinje neurons showing the differentiative capacity of these cells. The aim of this study is to assess the potential benefits of a mouse bone marrow mononuclear cell (BMMC) transplant in motor performance of an ataxia model in rats. Male Wistar rats had bilateral infusions of ibotenic acid (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1 $\mu\text{L}/\text{side}$) into the fastigial cerebellar nuclei to induce the ataxic symptoms. The baseline motor assessment was carried on three days after the surgery using the rotarod and the wire suspension tests. In the fourth day, the lesioned animals received an intravenous administration of saline (IBO-SAL group), BMMCs (IBO-BMMC group) or inactivated BMMCs (IBO-BMMC-In group). New motor assessments were carried on days 7 and 14 post-surgery. The infusion of ibotenic acid into the cerebellar fastigial nuclei impaired the equilibrium as assessed by both fixed and accelerated speed rotarod tests, with no effect in the wire suspension test. The intravenous administration of both BMMCs and inactivated BMMCs after the excitotoxic lesion improved the equilibrium time in the fixed speed and in the accelerated rotarod test, with no effect on the wire suspension test. The improvement was seen in both groups only in the last post-transplant test session. We demonstrated that a xenotransplant of mouse BMMCs can improve the motor performance in an ataxia model induced with the excitotoxic lesion of the fastigial nucleus of rats. The mechanisms mediating this effect require further investigation.

Suggested Reviewers:

**The Effect of Bone Marrow Mononuclear Cells Transplantation on Motor Deficits
in Rats with Excitotoxic Lesions of the Fastigial Nuclei**

Mariana Marczyk Santos^{1,4}, Cristiano André Köhler^{2,5}, Fabiano Brito¹, Daniel
Marinowic³, Jaderson Costa Dacosta^{1,3,4}.

¹Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do
Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

²Centro de Memória, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av.
Ipiranga 6690, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

³Centro de Terapia Celular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, Porto Alegre, Rio Grande do Sul,
Brasil

⁴Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Faculdade de
Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

⁵Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre, Rio
Grande do Sul, Brasil

Corresponding author:

Jaderson Costa Dacosta, M.D., Ph.D

Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do Cérebro,
PUCRS

Av. Ipiranga 6690/220, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3320-3250

Fax: +55 51 3320-3250

e-mail: jcc@pucrs.br

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The authors declare no conflicts of interest.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

1
2
3
4 Cerebellar ataxia can be thought of as a syndrome which has many different causes,
5 such as multiple sclerosis, alcoholic cerebellar disease genetic and degenerative ataxias
6 which have no known etiology. Only neuroprotective and symptomatic treatments are
7 available that make imperative to seek for new therapeutical strategies. Bone marrow
8 derived cells were found to differentiate into cerebellar Purkinje neurons showing the
9 differentiative capacity of these cells. The aim of this study is to assess the potential
10 benefits of a mouse bone marrow mononuclear cell (BMMC) transplant in motor
11 performance of an ataxia model in rats. Male Wistar rats had bilateral infusions of
12 ibotenic acid (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1 $\mu\text{L}/\text{side}$) into the fastigial cerebellar nuclei to induce the
13 ataxic symptoms. The baseline motor assessment was carried on three days after the
14 surgery using the rotarod and the wire suspension tests. In the fourth day, the lesioned
15 animals received an intravenous administration of saline (IBO-SAL group), BMMCs
16 (IBO-BMMC group) or inactivated BMMCs (IBO-BMMC-In group). New motor
17 assessments were carried on days 7 and 14 post-surgery. The infusion of ibotenic acid
18 into the cerebellar fastigial nuclei impaired the equilibrium as assessed by both fixed
19 and accelerated speed rotarod tests, with no effect in the wire suspension test. The
20 intravenous administration of both BMMCs and inactivated BMMCs after the
21 excitotoxic lesion improved the equilibrium time in the fixed speed and in the
22 accelerated rotarod test, with no effect on the wire suspension test. The improvement
23 was seen in both groups only in the last post-transplant test session. We demonstrated
24 that a xenotransplant of mouse BMMCs can improve the motor performance in an
25 ataxia model induced with the excitotoxic lesion of the fastigial nucleus of rats. The
26 mechanisms mediating this effect require further investigation.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Key-words: cerebellar ataxia, stem cells, excitotoxicity, fastigial nucleus

Introduction

1
2
3
4
5 The cerebellar ataxias are a heterogeneous group of neurological disorders
6
7 characterized by inadequate postural control, and incoordination of movements,
8
9 presented in balance and gait disturbances [1-7]. Such symptoms are frequently related
10
11 to the deep cerebellar nuclei, which have different roles in the control of motor
12
13 functions. The fastigial nucleus is the main nucleus related to the control of equilibrium
14
15 [8].
16
17

18
19 The neuronal death in cerebellar ataxias can be caused by several factors [9]. Of
20
21 particular interest is the excitotoxicity mediated by glutamate and other excitatory
22
23 neurotransmitters, which cause cerebellar lesion through an influx of sodium and
24
25 subsequent cellular swelling, followed by an influx of calcium that triggers several
26
27 events that ultimately lead to neuronal death [10-11]. Some neurotoxins act the same
28
29 way. Ibotenic acid (x-amino-3-hydroxy-5-isoxazolyl-acetic acid) is a naturally
30
31 occurring compound found in the *Amanita muscaria* mushroom. It has been used widely
32
33 for central nervous system lesions, with the advantage of causing cellular excitotoxic
34
35 damage through the NMDA glutamate receptor, but without compromising the axonal
36
37 function [12]. It has been show that ibotenic acid causes equilibrium deficits and gait
38
39 impairment when infused into the fastigial nuclei [13, 8, 14].
40
41
42
43
44
45

46 The physiopathological processes inherent to the ataxias are still poorly
47
48 understood, and hence there is little progress regarding the therapeutical approaches to
49
50 the motor symptoms [15-16]. That makes imperative to seek for new therapeutical
51
52 strategies. To date, there is a great body of evidence either from animal models of
53
54 neurodegenerative disorders or from specific clinical scenarios [17-23] that stem cell
55
56 based therapies can aid in the recovery of neurological disorders. Several studies
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 suggest that stem cells can also improve the ataxic symptoms [24-28]. However, the
2 cerebellar mechanisms of disease and the approach for the stem cell therapy are
3 heterogeneous.
4
5

6
7 The main aim of this study is to assess the potential benefits of the systemic
8 administration of mice bone marrow mononuclear cells (BMMC) in an ataxia model
9 induced by the infusion of ibotenic acid in the cerebellar fastigial nucleus of rats.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Materials and Methods

Animals

Two-month-old male Wistar rats (250-300 g) from the breeding colony of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, were used. They were housed five to a cage, with food and water *ad libitum*, and kept at 22-24 °C under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). All the procedures were performed in accordance with NIH Guide for Care and of Laboratory Animals and were approved by the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul experimental animal committee on March 9th, 2009, as documented in the record 023/09.

Drugs

Ibotenic acid was obtained from Sigma. One milligram was diluted in 100 μ L of phosphate buffered saline (PBS) 0.1 M pH 7.4, to a final concentration of 10 μ g/ μ L. The diluted drug was distributed in 3 μ L aliquots and stored at -20 °C. Immediately before the infusion, each aliquot was thawed and vortexed for 30 s.

Stereotaxic surgery

The animals were deeply anesthetized *i.p* with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and fixed in a stereotaxic alignment system (Kopf Instruments, Tujunga, CA). The scalp was opened through a midline incision and the skull bone exposed. Ibotenic acid (lesioned groups) or saline (sham group) was bilaterally infused

1 into the fastigial nuclei (1 μ L/site), at four distinct locations per hemisphere,
2 determined from the atlas of Paxinos and Watson (Table 1) [29]. These coordinates
3 were obtained from pilot studies, and were aimed to selectively lesion the fastigial
4 nuclei, sparing the adjacent interpositus nuclei. A 25G needle linked by a polyethylene
5 tube to a 10 μ L Hamilton syringe was used for the infusions. For each site, a small burr
6 hole was drilled and the needle was lowered deep into the cerebellar vermis. The proper
7 volume for the site was infused at a flow rate of 0.1 μ L/min with the aid of a pump
8 (KDS2000, KD Scientific). When the injection was done, the needle was held in place
9 for 1-2 minutes, to avoid reflux and to allow for the spreading of the injected volume,
10 and then it was raised and repositioned in the next infusion site. When all the infusions
11 for both hemispheres were done, the surgical wound was cleaned and the skin closed
12 with silk sutures.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 For the lesioned animals, the surgery was considered successful if they had
29 motor manifestations of cerebellar ataxia according to De Vera scale [30]. Briefly, after
30 recovery from anesthesia, the subjects were observed for two hours and the motor
31 impairment quantified as follows: 0=no alteration, 1=motor incoordination, 2=gait
32 impairment with dragging the posterior legs along the floor with frequent falling,
33 3=total loss of postural control. Only the animals that had scores of 2 or 3 were used.
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 As the naïve control group, some animals were submitted to the same surgical
44 procedures, without receiving any intracerebellar injections.
45
46
47
48
49

50 **Handling**

51 Two handling sessions were carried on twenty-four and forty-eight hours after
52 the stereotaxic surgery. At each session, the animals were removed from their home
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 cage and handled by the experimenter in a manner that they got used to the procedures
2 used during the motor assessment tests. The handling time was five minutes for each
3
4 animal.
5
6
7
8
9

10 **Bone marrow mononuclear cells extraction and transplant**

11
12
13
14 Bone marrow mononuclear cells were extracted from 20 male C57BL/6-EGFP
15 adult mice. The animals were deeply anesthetized with ketamine and xylazine and the
16 humeri, femurs and tibiae were dissected and isolated. The epiphyses were cut and fresh
17 bone marrow was extracted by flushing with PBS. Bone marrow was aspirated and
18 processed through repeated cycles of suspension and centrifugation. The mononuclear
19 cell layer was separated using a Ficoll-Paque gradient adjusted to a density of 1,077
20 g/mL, and the cell count was determined using a Neubauer chamber. The extracted cells
21 were distributed in 200 μ L aliquots, which contained 10^7 BMBCs. The BMBC
22 phenotype was determined using flow cytometry. The cells stained positively for CD34,
23 CD45, CD19 and CD117.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 The cells obtained from the first ten mice were used directly for the transplant.
40 The remaining cells were inactivated through fixation in 10% formaldehyde. Their
41 viability was measured by incubation with 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl
42 tetrazolium bromide (MTT) and dimethyl sulphoxide (DMSO) for 4 hours, followed by
43 analysis at 570 nm in an ELISA reader. The functional status of these cells was less than
44
45
46
47
48
49
50
51 95%.
52

53 On the fourth day post-surgery, the animals with fastigial nuclei lesions were
54 randomly assigned to receive an intravenous infusion of 200 μ L of saline (IBO-SAL
55 group), BMBCs (IBO-BMBC group) or inactivated BMBCs (IBO-BMBC-In group).
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 The sham and naïve control groups received 200 μ L of saline intravenously. For the
2 intravenous infusion, the animal was put into a restrainer, and the volume was infused
3 through one of the caudal veins using a syringe (BD Ultra-Fine 0,5 mL).
4
5
6
7
8

9 **Motor performance assessment**

10
11
12
13
14 The motor assessment tests were carried on the third (Baseline), seventh (Test 1)
15 and fourteenth (Test 2) days post-surgery. The Baseline test day was chosen to be the
16 day prior the BMMC transplant.
17
18
19
20

21
22 The rotarod test was used to assess motor coordination and equilibrium. A fully
23 automated apparatus equipped with a sensor that detected the fall and automatically
24 stopped the timer was used (EFF 411, Insight, Brazil). The test was carried on using
25 both the accelerated and the constant speed protocols.
26
27
28
29
30

31
32 The accelerated rotarod test started with the rod initially kept at a constant speed
33 of 5 rpm. The animals were put onto the rod and were allowed to habituate to the
34 apparatus for up to a minute. If the animal fell down, it was put again onto the rod.
35
36 Upon completion of the habituation time, the speed was gradually increased from 5 to
37 37 rpm across ten phases (phase 1-2: 16 rpm; phase 3-4: 20 rpm; phase 5-6: 25 rpm;
38 phase 7-8: 28 rpm; phase 9-10: 37 rpm). The transition across all phases took six
39 minutes. Upon reaching the maximum speed, the animal was kept in place for an
40 additional minute, when it was put back to its home cage. Each daily session consisted
41 of four trials, separated by 15-minute intervals. For each session, the mean of the
42 latencies to fall and the mean of the phase in which the fall occurred in the four trials
43 was calculated.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 The constant speed rotarod test was carried on at 20 rpm, with a ceiling of 120 s.
2 Since this test was performed immediately after the accelerated test, the animals weren't
3
4 allowed to habituate. Each daily session consisted of four trials, separated by 15-minute
5
6 intervals. For each session, the mean of the latencies to fall in the four trials was
7
8 calculated.
9

10
11 The wire suspension test was used to assess muscular strength. The apparatus
12
13 consisted in a 2 mm thick copper wire suspended 80 cm above the floor by two wooden
14
15 posts, kept 80 cm apart from each other. The floor was covered with foam to prevent
16
17 injuries upon the fall of the animal. In the test session, the animal was taken to the wire
18
19 by the experimenter so that it could attach its forepaws. The total time of suspension
20
21 was measured using a stopwatch, with a ceiling of 60 s. Immediately after a fall
22
23 occurred, the stopwatch was stopped, and the latency to fall recorded. Each daily
24
25 session consisted of two trials, separated by 15-minute intervals. For each session, the
26
27 mean of the latencies for the two trials were calculated.
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **Histological analysis**

37
38
39
40

41 Eighteen days after the surgery (14 days post-transplant), the animals were
42
43 deeply anesthetized *i.p* with ketamine and xylazine and perfused transcardially with 150
44
45 mL of saline followed by 300 mL of 4% paraformaldehyde (PFA). The cerebellum was
46
47 removed and post-fixed for forty-eight hours in PFA 4%, cryoprotected in increasing
48
49 concentrations of sucrose (10%, 20% and 30%), and finally frozen in cold isopentane
50
51 and embedded in Tissue-Tek (Sakura). Coronal sections (20 μ m) were cut in a cryostat
52
53 (Shandon, United Kingdom), and every second section across a 1600 μ m range was
54
55 mounted onto poly-L-lysine coated slides and stained using Nissl method. Digitized
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 images were obtained with a video camera installed in an Olympus BX40 microscope,
2 interfaced by software (Image Pro-Plus 6.1, Media Cybernetics). Qualitative
3
4 histological analysis was performed using the atlas of Paxinos and Watson [29] to
5
6 identify the fastigial nuclei and lesion sites.
7
8
9

10 11 **Statistical analysis**

12
13
14
15
16
17 The effect of the fastigial nuclei lesions on the motor performance immediately
18
19 after the surgery was analyzed by ANOVA followed by Dunnet's test. The effect of the
20
21 BMMC transplant on the motor deficits was analyzed by two-way repeated measures
22
23 ANOVA, using the test session (Baseline, Test 1 or Test 2) and experimental group
24
25 (IBO-SAL, IBO-BMMC, IBO-BMMC-In, Sham or Naive) as factors, with Bonferroni
26
27 post-hoc test for group comparisons. The significance level adopted was 5%. All the
28
29 calculations and graphs were elaborated using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad
30
31 Software).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Results

Motor performance in the ataxia model induced by bilateral fastigial nuclei lesions with ibotenic acid

The animals that received ibotenic acid infusions into the fastigial nuclei had shorter latencies to fall in the rotarod test, in both the accelerated ($F_{4,38} = 13.75$; $p < 0.001$; Figure 1a) and fixed speed protocols ($F_{4,38} = 7.99$; $p < 0.001$; Figure 2a), when compared to the sham control group. These effects were observed three days after surgery (Baseline test). The phase in which the fall occurred was also decreased in those animals with respect to the sham control group ($F_{4,38} = 15.41$; $p < 0.001$; Figure 1c). There was no difference between the sham and naïve control groups in any protocol ($p > 0.05$).

All the experimental groups had similar latencies to fall in the wire suspension test carried on three days after stereotaxic surgery ($F_{4,33} = 1.011$; $p > 0.05$; Figure 3a).

Effect of BMNC transplantation in the motor deficits induced by bilateral fastigial nuclei lesions with ibotenic acid

The performance of the lesioned groups in the accelerated rotarod test was improved after BMNC transplantation. The equilibrium time was increased in the animals with fastigial lesions that received either BMNCs or inactivated BMNCs, but not saline. (Figure 1b). There was a statistically significant effect for treatment type ($F_{4,76} = 13.04$; $p < 0.0001$), test session ($F_{2,76} = 6.27$; $p < 0.01$) and treatment by test session interaction ($F_{8,76} = 2.77$; $p < 0.01$). In the session accomplished one week after

1 the surgery (Test 1), both IBO-SAL and IBO-BMMC groups had worst performances
2 when compared to the sham control group ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). There
3 wasn't any statistically significant difference between the IBO-BMMC-In and sham
4 groups. In the test session carried on two weeks after the surgery (Test 2), the IBO-SAL
5 group remained with the motor impairment with respect to the sham group ($p < 0.01$),
6 and also had worst performance when compared to both IBO-BMMC e IBO-BMMC-In
7 ($p < 0.05$). The latter groups had performances similar to the sham group ($p > 0.05$).
8 Sham and naïve groups had similar performance in the two post-transplant sessions ($p >$
9 0.05).

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22 The BMMC transplantation also increased the phase in which the fall occurred
23 in the accelerated rotarod test, for both the groups that received BMMCs or inactivated
24 BMMCs, but not saline (Figure 1d). There were significant effects for the treatment
25 ($F_{4,76} = 11.87$; $p < 0.001$), test session ($F_{2,76} = 5.75$; $p < 0.01$) and treatment by test
26 session interaction ($F_{8,76} = 2.88$; $p < 0.01$). In the test session carried on seven days after
27 the surgery (Test 1), just the IBO-SAL group had worst performance when compared to
28 the sham group ($p < 0.01$). Also, the IBO-CMMO-In group had better performance than
29 the IBO-SAL group ($p < 0.05$). In the second post-transplant session (Test 2), the IBO-
30 SAL group remained with the impairment with respect to the sham group ($p < 0.01$),
31 and also had worst performance with respect to both IBO-BMMC and IBO-BMMC-In
32 groups ($p < 0.05$). These latter two groups didn't differ in the phase in which the fall
33 occurred when compared to the sham group in Test 2 session ($p > 0.05$).

34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51 The performance in the fixed speed rotarod test was improved by BMMC
52 transplant too. The animals with fastigial nuclei lesions that received either BMMC or
53 inactivated BMMC, but not saline had longer latencies to fall (Figure 2b). There was a
54 significant effect for treatment ($F_{4,78} = 10.96$; $p < 0.001$), but not test session ($F_{2,78} =$
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.79; $p = 0.068$) or treatment by test session interaction ($F_{8,78} = 1.23$; $p = 0.29$). One week after surgery (Test 1), all the lesioned groups had shorter equilibrium time with respect to the sham control group. ($p < 0.01$ for IBO-SAL and $p < 0.05$ for both IBO-BMMC and IBO-BMMC-In). In the second post-transplant session (Test 2), there wasn't any statistically significant difference among IBO-BMMC, IBO-CMMO-In or sham groups. The lesioned group that received saline (IBO-SAL) had shorter latencies that were statistically significant with respect to the sham control group ($p < 0.01$). The sham and naïve control groups had latencies to fall similar across both the test sessions ($p > 0.05$).

The BMMC transplantation did not affect the performance in the wire suspension test (Figure 3b). There was no statistically significant effects of treatment ($F_{4,39} = 0.39$; $p = 0.81$) or test session ($F_{2,64} = 0.49$; $p = 0.62$).

Histological evaluation of the fastigial nuclei lesions after BMMC transplantation

The qualitative evaluation of the fastigial nuclei at the histological level was executed in all experimental groups, eighteen days after the surgery (fourteen days post-transplant). In the animals that received ibotenic acid infusions, there was significant neuronal loss, demonstrated by the lack of large neurons and Nissl substance (Figures 4c, 4d, and 4e). The region previously occupied by the neurons of the fastigial nucleus had less defined boundaries with respect to the groups with the intact nuclei (sham and naïve, Figures 4a and 4b). We could not identify any differences among the three lesioned groups (IBO-SAL, IBO-BMMC or IBO-BMMC-In). Thus, there wasn't any structural modification after the BMMC transplantation.

1 The extension of the lesions was similar among all the groups that received
2 ibotenic acid, spanning the entire fastigial nuclei volume minus its most rostral portion.
3
4 The lesions were located across the coronal planes situated between -11.6 and -11.9
5 millimeters from bregma, according to the atlas of Paxinos and Watson [29]. In the
6
7 lateral plane, the lesions were restricted to ± 2.0 millimeters from the midline. This was
8
9 the area intended to be lesioned with the coordinates from Table 1.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Discussion

1
2
3
4
5 This study showed that the intravenous administration of mice bone marrow
6
7 mononuclear cells can attenuate the ataxic symptoms in a model induced by excitotoxic
8
9 lesions of the cerebellar fastigial nuclei of rats.
10

11
12 Our results agree with several studies that show the potential therapeutical
13
14 benefits that exogenous stem cell transplants have in a myriad of central nervous system
15
16 (CNS) disorders [23, 31]. However, the mechanisms of CNS injury and the transplant
17
18 approaches of those studies vary to a great extent. To date, we haven't found any work
19
20 that evaluates the same type of cerebellar excitotoxic lesion and the same BMMC
21
22 administration route, which makes it impossible to make direct comparisons. However,
23
24 Priller and cols. transfected the transplanted cells with a retrovirus that expressed GFP,
25
26 and hence demonstrated that bone marrow cells have the ability to generate new
27
28 Purkinje cells in C57BL/6 mice. They identified GFP positive Purkinje neurons in both
29
30 cerebellar hemispheres in the long term follow up (15 months) [27]. On the other side,
31
32 in a post-mortem analysis of Purkinje cells from women with hematological malignancy
33
34 that underwent chemotherapy, radiotherapy and bone marrow transplantation, it was
35
36 found four cells with a Y chromosome in those women whose bone marrow donor was
37
38 a male subject. In those whose bone marrow donor was also a woman, it wasn't found
39
40 any Y chromosome. Although the contribution of bone marrow cells to the total count
41
42 of Purkinje cells is definitely small (about 0.1% of the total number analyzed), this
43
44 findings suggest that the cerebellum has the ability to generate Purkinje cells in
45
46 adulthood and that bone marrow cells can possibly contribute to the neurogenesis [26].
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 One particularity of our study is that we did a xenogenic transplant. There are
57
58 studies that suggest that bone marrow stem cells do not elicit an immune response due
59
60
61
62
63
64
65

1 to the lack of surface markers [32]. Thus, there are reports of xenotransplants of human
2 mesenchymal cells to the rat myocardium [33], mice bone marrow stem cells to the rat
3 brain [34], human umbilical cord stem cells to the rat, by systemic route [35], human
4 bone marrow stem cells to the rat brain [36] and neuroepithelial stem cells from mice to
5 the rat brain [37]. A study that assessed the eventual immunological response elicited by
6 mice bone marrow transplantation directly into the rat myocardium in a model of heart
7 ischemia induced by coronary occlusion has shown that the xenogenic transplant was
8 not only immunologically tolerated, but also survived and differentiated, resulting in a
9 cardiac chimera with improvement of the left ventricular function [38]. Our study
10 demonstrates that bone marrow xenotransplantation is viable and that is in agreement
11 with previous results of our research group [39-40].

26 The mechanisms that are responsible for these beneficial effects of BMNCs are
27 not known, although transdifferentiation, stimulation of neurogenesis from endogenous
28 cells and neuroprotection are speculated to be involved [41]. Van Velthoven and cols.
29 have demonstrated that the therapeutical effect of BMNCs in an ischemia model is
30 associated with neurogenesis and development of new glial cells and neurons [42]. In
31 our study, the histological features of the lesions didn't seem to be altered by the
32 BMNC transplantation, although we could not distinguish between the different
33 phenotypes of glial cells. Other studies showed that the newly generated neurons might
34 not be phenotypically distinguishable without the use of immunohistochemical
35 techniques, since these cells have a spherical morphology [36]. Hence, we cannot say if
36 neurogenesis had a role in our results. It is also possible that the attenuation of the motor
37 deficit in the animals with fastigial lesions is mediated by neuroplasticity, a process that
38 habitually occur in this type of injury. We therefore hypothesize that BMNCs act as
39 facilitators of neuroplasticity, speeding up or enhancing this process. Koblar and cols.
40

1 investigated the effects of an in ovo xenotransplant of human dental pulp stem cells on
2 the development of the neurons in the trigeminal ganglion of the host bird. These
3 authors elegantly demonstrated such neuroplastic effects and, hence, the independence
4 from any structural reorganization process [43]. Another mechanism of interest is the
5 modulation that stem cells exert over neuroinflammation, a process that is crucial in the
6 injury of the CNS [44-45]. In our model, we used ibotenic acid, which is a neurotoxin
7 that induces an excitotoxic lesion through the activation of the NMDA glutamate
8 receptor [12]. It has been shown that microglia has a central role in such type of
9 neuronal damage [46], and the activation of microglia is proportional to the extension of
10 this type of injury in several brain structures, including the cerebellar cortex [47]. In
11 ischemic lesions, a mesenchymal stem cell transplant modulated negatively the local
12 microglial response, decreasing the expression of several genes with proinflammatory
13 action [48]. Hence, the modulation of neuroinflammation could be a factor responsible
14 for the recovery of the deficits induced in our model. Migration of bone marrow stem
15 cells to the cerebellum after intraventricular injection in newborn mice has been shown
16 previously [24]. We chose the intravenous route, which is easy to be administered and
17 does not require a surgical procedure, but requires the migration of the transplanted cells
18 to the lesion site [49]. Both in vitro and in vivo experimental data show that it is
19 possible that bone marrow cells are incorporated to Purkinje neurons in both mice [25]
20 and humans [26], or transdifferentiated into Purkinje cells in mice [27]. Although we
21 did not show the homing of the BMSCs to the fastigial lesion sites, the improvement in
22 gait and equilibrium after the transplant, coupled to the demonstration that the
23 intravenous injection of human embryonic [39], bone marrow [40] or neural stem cells
24 [50], and that both mice [25; 27] and human [26] bone marrow cells can migrate to the
25 cerebellum, suggest that the transplanted cells might have taken part in that effect.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 It has been suggested recently that stem cells can act in a paracrine way, and thus their
2 effects would be mediated by trophic factors secreted in their vicinity [34,44;28;39-40].
3
4 Borlongnan and cols. shown that the migration of stem cells to the CNS is not required
5
6 for the functional recovery in an ischemia model, if the trophic factors secreted by those
7
8 cells are able to cross the blood-brain barrier (BBB). Although the permeability of the
9
10 BBB was obtained only after the systemic administration of mannitol, the injury type
11
12 was different from our study. A previous work showed that the permeability of the BBB
13
14 is increased up to 12 days after an excitotoxic lesion induced by a NMDA-dependent
15
16 mechanism [51]. In the same line, Miranda and cols. have shown that the bone marrow
17
18 cell count in the brain of adult or newborn acid sphingomyelinase knockout mice was
19
20 very small after an intravenous infusion of bone marrow cells, although the enzyme
21
22 activity increased by 8% with improvement of the ataxia symptoms [52]. More
23
24 recently, Cendelín and cols, evaluate in a mice model of olivocerebellar degeneration
25
26 (Lurcher mutant mice) the effect of fetal cerebellar graft transplantation. The
27
28 transplantation of cerebellar tissue did not influence motor functions significantly but
29
30 led to an improvement of spatial learning ability besides the poor nerve sprouting and
31
32 cell migration from the graft to the host cerebellum that should be explained with its
33
34 trophic influence [53]. We suggest that even without the visualization of the
35
36 transplanted cells at the lesioned sites, the improvement in our model could be mediated
37
38 by trophic factors translocated from the blood circulation or locally expressed at those
39
40 sites.
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50
51 We didn't design our study to determine the best dose or time for BMMC
52
53 transplantation. However, some studies demonstrated that the temporal window is broad
54
55 and parallel to the inflammatory response associated with the injury [42]. The timing
56
57 that was used in our study is compatible with the inflammatory response induced by an
58
59
60
61
62
63
64
65

1 excitotoxic lesion, and is similar to other studies of cellular therapy, although not
2 directly comparable due to the different nature of the injuries.
3

4 An intriguing result was the attenuation of the motor deficits elicited by the
5 transplantation of inactivated BMSCs. These cells presumably lack the ability to
6 migrate or to secrete trophic factors. They were included to assess the role of the host
7 immune response against the xenotransplant. The late response involves several
8 mechanisms, with a major role played by the cell-mediated immune response, with the
9 release of cytokines related to the type 2 helper responses [54]. Interleukin-10 (IL-10) is
10 a cytokine from such group, and can regulate the innate immunological mechanisms and
11 the action of other proinflammatory cytokines. It has been proposed that stem cells act
12 on the immune system in a similar manner [55]. A chronic treatment with IL-10
13 protected cerebellar neurons injured by excitotoxicity [56], and its systemic
14 administration reduced the size of the lesion three days after the injection of ibotenic
15 acid in other brain areas, although a longer time course was not evaluated [57]. Other
16 mechanisms could be involved too. Chemokine is a proinflammatory cytokine which
17 has chemoattractive properties and can also regulate the inflammatory processes. It acts
18 in the same receptors of interleukin-8, which play a variable role in apoptosis and are
19 broadly expressed in the CNS, in both pathological and physiological conditions.
20 Limatola and cols demonstrated that chemokines may have neurotrophic effects in
21 cerebellar granule cells, protecting them from apoptosis through AMPA receptors [58].
22 Another important element of this “immunological equation” is the microglial activity.
23 In vitro and in vivo studies shown that microglia can have antagonical roles: it can be
24 not only a neurotoxic immunological effector, which hinders neuronal survival, but also
25 a neurotrophic mediator [59]. Several studies show such neuroprotective effects, which
26 can be due to the production of growth factors or immunosuppressor molecules [60, 61].
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Some authors demonstrated that microglial activation can protect mice facial
2 motoneurons from the death induced by axotomy, and thus suggest that the interaction
3 of microglia with CD4⁺ T cells is fundamental to the establishment or maintenance of
4 the neuroprotective response of T cells [62]. These findings are explained by the
5 assumption that the release of molecules in the extracellular space by apoptotic neurons
6 signals microglia to release rescue molecules, potentiating its antiapoptotic action [61-
7 62]. The presence of signaling molecules that can act both in neurons and the microglia
8 suggests that this “subtle” microglial activity can modulate basal synaptic transmission
9 and thus the overall neuronal function. Finally, from the microglial activation emerge
10 microstructural and functional compartments where neurokins, interleukins and other
11 signaling molecules determine a cell-to-cell communication network that is broader than
12 the one observed in the healthy brain. This neo-compartmentalization that occurs in
13 some areas of the CNS under the modulatory interaction between microglia and neurons
14 would be responsible for neuroplasticity [63]. It is imperative to point out that the
15 paradigm related to stem cell therapy is changing towards the immunological aspects.
16 Hence, researchers that investigate alternatives to inborn errors of metabolism have used
17 stem cell transplants in mice as an alternative to produce the missing enzyme or to allow
18 its production through microenvironment modifications. Using twitcher mice as an
19 experimental model for the globoid cell leukodystrophy, Wu and cols. could identify
20 GFP positive bone marrow cells from the donor after their transplantation. These
21 authors emphasize the possible modulation of microglial activity and antiapoptotic
22 effects of such therapy [64]. If we consider that the chemically inactivated stem cells
23 turn into “strange” antigenic agents, we could also hypothesize that the induced
24 immunologic response could trigger the neuroprotective activity of microglia,
25 culminating with the secretion of trophic factors that determine the motor improvement
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(equilibrium and posture) observed in the animals that received those type of cells. Such presumed mechanism, however, must be investigated further.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Conclusion

1
2
3
4
5 In conclusion, our results and experimental design demonstrated that mice bone
6
7 marrow mononuclear cell transplantation can improve the neurological deficits caused
8
9 by excitotoxic lesions of the cerebellar fastigial nuclei of rats. The transplant was able to
10
11 attenuate the equilibrium impairment when administered four days after the injury and
12
13 this improvement was seen two weeks later. However, the mechanisms associated with
14
15 this benefit remains to be investigated, especially if the actions traditionally attributed to
16
17 stem cells, like modulation of neuroplasticity and neuroinflammation, secretion of
18
19 trophic factors, neuroprotection and neurogenesis, occur in parallel to other factors
20
21 related to the host immune response to the transplant.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgments

We would like to thank Zuzete Pires and Ricardo Breda for the technical assistance. We also thank Samuel Greggio for helpful discussions. This work was supported by grants from CAPES, FUNPAR and Pandurata Ltda, Brazil.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1. Brusse E, Maat-Kievit JA, Swieten JC. Diagnosis and management of early-and late-onset cerebellar ataxia. *Clin Genet* 2007.
2. Shakkottai VG, Paulson HL. Physiologic alterations in ataxia: channeling changes into novel therapies. *Arch Neurol* 2009;10:1196-201.
3. Welsh JP, Harvey JA. The role of the cerebellum in voluntary and reflexive movements: history and current status. *The Cerebellum Revisited* 1992;24:301-34.
4. Rosenberg SM. Mutation for survival. *Curr Opin Genet Dev* 1997;6:829-34.
5. Trouillas P, Takayanagi T, Hallet M, Currier RD, Subramony SH. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. *Journal of Neurology Science* 1997;145:205-11.
6. Klockgether T, Dichgans J. The genetic basis of hereditary ataxia. *Prog Brain Res* 1997;114:569-76.
7. Grüsser-Cornehls U, Bäurle J. Mutant mice as a model for cerebellar ataxia. *Prog Neurobiol* 2001;5:489-540.
8. Martin JH. *Neuroanatomy*; 1996.
9. Fernandez AM, Carro EM, Lopez TA. Insulin-like growth factor I treatment for cerebellar ataxia: Addressing a common pathway in the pathological cascade? *Brain Research Reviews* 2005.
10. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994;330:613-22.
11. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 2000;78:3-13.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
12. Zinkand WC, Moore WC, Thompson C, Salama AI, Patel J. Ibotenic acid mediates neurotoxicity and phosphoinositide hydrolysis by independent receptor mechanisms. *Mol Chem Neuropathol* 1992;16:1-10.
13. Crosby DG, Berthold RV. Fluorescence spectra of some simple coumarins. *Anal Biochem* 1962;4:349-57.
14. Voogd J, Ruigrok TJ. The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: the congruence of projection zones and the zebrin pattern. *J Neurocytol* 2004;1:5-21.
15. Evident VG, Gwinn-Hardy KA, Caviness JN, Gilman S. Hereditary ataxias. *Mayo Clin Proc* 2000;75:475-90.
16. Botez MI, Botez-Marquard T, Mayer P, Marchand L, Lalonde R, Reader TA. The treatment of spinocerebellar ataxias: facts and hypotheses. *Med Hypotheses* 1998;51:381-84.
17. Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Current Opin Neurol* 2005;18:59-64.
18. Dunnett SB., Rosser AE. Cell therapy in Huntington's disease. *NeuroRx* 2004;1:394-405.
19. Koda M, Okada S, Nakayama T, Koshizuka S, Kamada T, Nishio Y, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport* 2005;16:1763-67.
20. Kim JY, Koh HC., Lee JY, Chang MY, et al. Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* 2003;85:1443-54.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
21. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001;14:1771-6.
 22. Mimura T, Dezawa M., Kanno H., Sawada H., Yamamoto I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg* 2004;101:806-12.
 23. Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, Machado DC, Garicochea B, Costa Dacosta J. Repair of Human Median and Ulnar Nerves? Can Local Supply of Bone Marrow Mononuclear Cells Improve the Outcome from Late Tubular. *Journal of Hand Surgery* 2008;33:488-93.
 24. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Cell Biology* 1999;96:10711-16.
 25. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla. A Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes *Nature* 2003;425:968-73.
 26. Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *PNAS* 2003;100:2088-93.
 27. Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U. Neurogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *The Journal of Cell Biology* 2001;155:733-38.
 28. Miranda SRP., Erlich S., Friedrich VL JR., Haskins ME, Gatt S, Schuman EH. Biochemical, pathological, and clinical response to transplantation of normal bone

marrow cells into acid sphingomyelinase deficient mice. Transplantation 1998;65:884-92.

29. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed San Diego:. Academic Press; 1986.

30. De Vera N, Camon L., Martinez E. Cerebral distribution of polyamines in kainic acid-induced models of status epilepticus and ataxia in rats. Overproduction of putrescine and histological damage. Eur Neuropsychopharmacol 2002;12:397-405.

31. Li Y, Chopp M. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. Cell Transplant 2001;10:31-40.

32. Saito T, Kuang JQ, Bittira B, Al-Khaldi A, Chiu RCJ. Xenotransplant Cardiac Chimera: Immune Tolerance of Adult Stem Cells. Ann Thorac Surg 2002;74:19-24.

33. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren MD, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringde NO, Sylve C, Le Blanc K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2004;127:1293-1300.

34. Borlongan CV, Linda JG, Dillon-Carter O, Yu G, Hadman M, Cheng C, Carrol J, Hess D. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. Brain Research 2004;1010:108-16.

35. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Deficits After Stroke in Rats Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Reduces Behavioral. Stroke 2001;32:2682-88.

36. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene D, Verfaillie CM, Low WC. Human Bone Marrow Stem Cells Exhibit Neural Phenotypes and Ameliorate Neurological Deficits after Grafting into the Ischemic Brain of Rats. Exp Neurol 2002;174:11-20.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
37. Modo M, Rezaie P, Heuschling P, Patel S, Male DK, Hodges H. Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Research* 2002;958:70–82.
38. MacDonald DJ, Luo J, Takayuki S, Duong M, Bernier PL, Chiu RCJ Shum-Tim D. Persistence of marrow stromal cells implanted into acutely infarcted myocardium: Observations in a xenotransplant model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2005;130: 1114-21.
39. De Paula S, Vitola AS, Greggio S, De Paula D, Mello PB, Lubianca JM, Xavier LL, Fiori HH, Dacosta JC. Hemispheric Brain Injury and Behavioral Deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatric Research* 2009;65:631-35.
40. Costa-Ferro ZSM; Vitola AS; Pedroso MF; Cunha FB; Xavier LL; Machado DC; Soares MBP; Ribeiro-Dos-Santos R; Dacosta JC. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy; *Seizure* 19 (2010) 84–92
41. Lindvall O, Kokaia Z. Recovery and rehabilitation in stroke: stem cells. *Stroke* 2004;35:2691-4.
42. Van Velthoven CT, Kavelaars A, Van BF, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. *Brain Behav Immun* 2009.
43. Koblar SA, Gronthos S, Arthur A. Stem cell therapy: Neuroplasticity as a novel cellular mechanism for regeneration. *Journal of Clinical Neuroscience* 2009;16:480.
44. Phinney DG., Prockop DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. *Stem Cells* 2007;25:2896-2902.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
45. Taupin P. Adult neurogenesis, neuroinflammation and therapeutic potential of adult neural stem cells. *Int J Med Sci* 2008;5:127-32.
 46. Kim WK, Ko KH. Potentiation of N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity by murine microglia. *J Neurosci Res* 1998;54:17-26.
 47. Igarashi T, Potts MB, Noble-Haeusslein LJ. Injury severity determines Purkinje cell loss and microglial activation in the cerebellum after cortical contusion injury. *Exp Neurol* 2007;203:258-68.
 48. Hirokazu O, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *PNAS* 2008;105:14638-43.
 49. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007;38:817-26.
 50. Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim SU, Kim M, Roh JK. Human Neural Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery in rats with Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 2003;34:2258-63.
 51. Brace H, Latimer M, and Winn P. Neurotoxicity, blood - brain barrier breakdown, demyelination and remyelination associated with NMDA-induced lesions of the rat lateral hypothalamus. *Brain Res Bull* 1997;43:447-55.
 52. Miranda SRP, Erlich S, Visser JWM, Gatt S, Dagan A, Friedrich JR VL, Schuchman EH. Bone marrow transplantation in acid sphingomyelinase-deficient mice: engraftment and cell migration into the brain as a function of radiation, age, and phenotype. *Blood* 1997;90:444-52.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
53. Cendelín J, Korelusová I, Vozeh F. The effect of cerebellar transplantation and enforced physical activity on motor skills and spatial learning in adult lurcher mutant mice. *Cerebellum* 2009;8:35-45
54. Auchincloss H, Sachs DH. Xenogenic transplantation. *Annu Rev Immunol* 1998;16:433-70.
55. Carpentier PA, Palmer TD. Immune Influence on Adult Neural Stem Cell Regulation and Function. *Cell* 2009;64:79-92.
56. Bachis A, Colangelo AM, Vicini S, Doe PP, De Bernardi MA, Brooker G, Mocchetti I. Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. *J Neurosci* 2001;21:3104-12.
57. Mesples B, Plaisant F, Gressens P. Effects of interleukin-10 on neonatal excitotoxic brain lesions in mice. *Brain Res Dev Brain Res* 2003;141:25-32.
58. Limatola C, Ciotti MT, Mercanti D, Vacca F, Ragozzino D, Giovannelli A, Santoni A, Eusebi F, Miledi R. The chemokine growth-related gene product β protects rat cerebellar granule cells from apoptotic cell death through α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors. *PNAS* 2000; 97:6197-6201.
59. Streit WJ. Microglial Response to Brain Injury: A Brief Synopsis. *Toxicol Pathol* 2000;28:28-30.
60. Polazzi E, Gianni T, CONTESTABILE A. Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: Evidence for reciprocal signaling. *Glia* 2001;36:271-80.
61. Melchior B, Puntambekar SS, Carson MJ. Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochem Int* 2006;49:145–53.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

62. Byran SC, Carson MJ, Deboy CA, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ. CD4-positive T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation. *The Journal of Neuroscience* 2004;24:4333-39.

63. Banatti RB. Brain plasticity and microglia: is transsynaptic glial activation in the thalamus after limb denervation linked to cortical plasticity and central sensitization? *J Physiol Paris* 2002;96:289-99.

64. Wu YP, McMahon, Kraine MR, Tisch R, Meyers A, Frelinger J, Matsushima GK, Suzuki K. Distribution and Characterization of GFP1 Donor Hematogenous Cells in Twitcher Mice after Bone Marrow Transplantation. *AJP* 2000;156:1849-54.

Table 1 – Coordinates used for the bilateral lesions of the fastigial nucleus. These values were obtained from a pilot study, based on the atlas of Paxinos and Watson [29].

Infusion	AP ^a	ML ^a	DV ^a	Volume ^b
1	- 11.9	± 0.9	- 6.6	0.5
2	- 11.9	± 1.0	- 6.1	0.2
3	- 11.9	± 1.5	- 5.4	0.2
4	- 12.1	± 0.6	- 6.0	0.1

AP = anteroposterior; ML = mediolateral; DV = dorsoventral

^a in millimeters, from bregma

^b in microliters

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1 – The intravenous administration of mice BMMCs improves the performance in the accelerated rotarod test of rats with bilateral fastigial nuclei lesions. Rats underwent stereotaxic surgery to receive either ibotenic acid (IBO-SAL, IBO-BMMC, IBO-BMMC-In) or saline (Sham) into the fastigial cerebellar nuclei. In the baseline test session, carried three days later, the rats with ibotenic acid induced lesions had shorter latencies to fall (A) and fell in early phases of the acceleration protocol (C) when compared to the control groups. On the fourth day after the surgery, the lesioned animals received mice BMMCs (IBO-BMMC), inactivated mice BMMCs (IBO-BMMC-In) or saline (IBO-SAL) through the caudal vein. In a test session carried on 7 days post-surgery (B and D, Test 1), the IBO-BMMC-In group had increased latencies to fall and fell down later than both the IBO-BMMC and IBO-SAL groups, with equilibrium performance similar to the Sham group. In the second test session, carried on fourteen days post-surgery (B and D, Test 2), both the IBO-BMMC and IBO-BMMC-In groups had better equilibrium performance than the IBO-SAL group. The IBO-SAL group had shorter latencies to fall and fell down earlier than the control groups in both post-transplant sessions (* = $p < 0.05$ vs. Sham; ** = $p < 0.01$ vs. Sham; # = $p < 0.05$ vs IBO-SAL, in two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni; data are presented as mean \pm SEM, $n = 6-10$ per group).

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 2 – The intravenous administration of mice BMMCs improves the performance in the fixed speed rotarod test of rats with bilateral fastigial nuclei lesions. Rats underwent stereotaxic surgery to receive either ibotenic acid (IBO-SAL, IBO-BMMC, IBO-BMMC-In) or saline (Sham) into the fastigial cerebellar nuclei. The groups given ibotenic acid infusions had shorter latencies to fall in the baseline test session, carried on three days after the surgery (A). On the fourth day post-surgery, the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

lesioned animals received mice BMMCs (IBO-BMMC), inactivated mice BMMCs (IBO-BMMC-In) or saline (IBO-SAL) through the caudal vein. Fourteen days after the surgery (B, Test 2), both the IBO-BMMC and IBO-BMMC-In groups had an equilibrium time that was not different from the control groups. In all the test sessions, The IBO-SAL group had shorter equilibrium time when compared to the controls (B, Test 1 and Test 2). (* = $p < 0.05$ vs. Sham; ** = $p < 0.01$ vs. Sham; # = $p < 0.05$ vs IBO-SAL, in two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni; data are presented as mean \pm SEM, n = 6-10 per group).

Figure 3 – The intravenous administration of mice BMMCs does not affect the performance in the wire suspension test of rats with bilateral fastigial nuclei lesions. Rats underwent stereotaxic surgery to receive either ibotenic acid (IBO-SAL, IBO-BMMC, IBO-BMMC-In) or saline (Sham) into the fastigial cerebellar nuclei.. The Baseline test was carried on three days after the surgery. The animals with the lesioned nuclei had a performance similar to the control groups (A). The intravenous administration of mice BMMCs (IBO-BMMC group), inactivated mice BMMCs (IBO-BMMC-In group) or saline (IBO-SAL group) four days after the surgery had no effect on the latency to fall from the wire in the test sessions carried on 7 or 14 days after the surgery (B). (data are presented as mean \pm SEM, n = 6-10 per group)

Figure 4 – Representative photomicrographs of Nissl stained sections showing the fastigial nucleus of each experimental group, 14 days after the systemic mice BMMC transplantation through the caudal vein. In the fastigial nucleus of the groups that did not receive infusions of ibotenic acid there are large neurons with evident Nissl substance (A and B). The nuclei of all lesioned groups have less evident

1 boundaries and expressive neuronal death, regardless of the transplant of saline (C),
2 mice BMMCs (D) or inactivated mice BMMCs (E) four days after the excitotoxic
3 lesion. Needle tracts and infusion sites are marked with asterisks. In the F panel, the
4 dark grey rectangle delimites the area of each photomicrograph. The fastigial nucleus is
5 highlighted in pale gray.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1

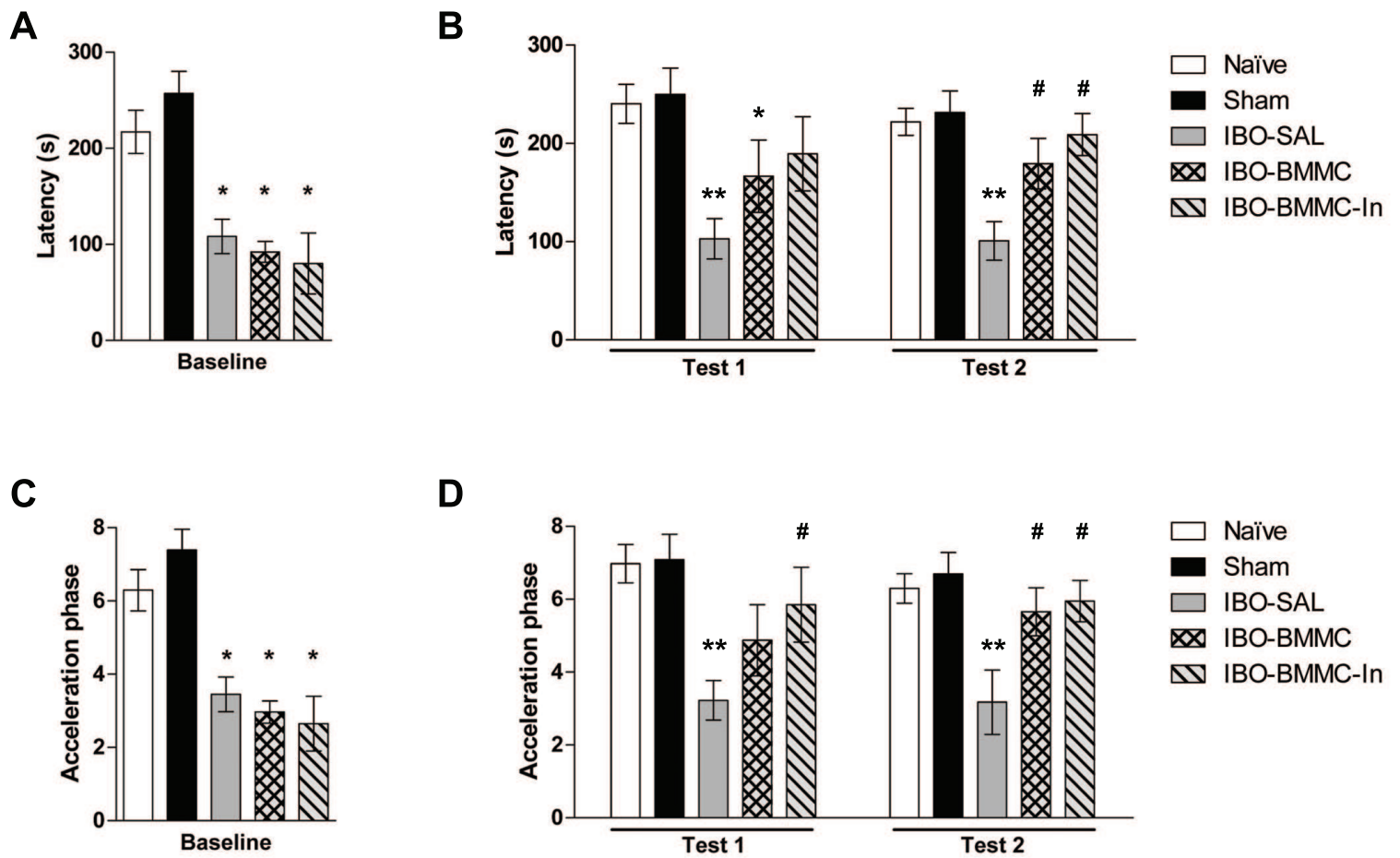


Figure 2

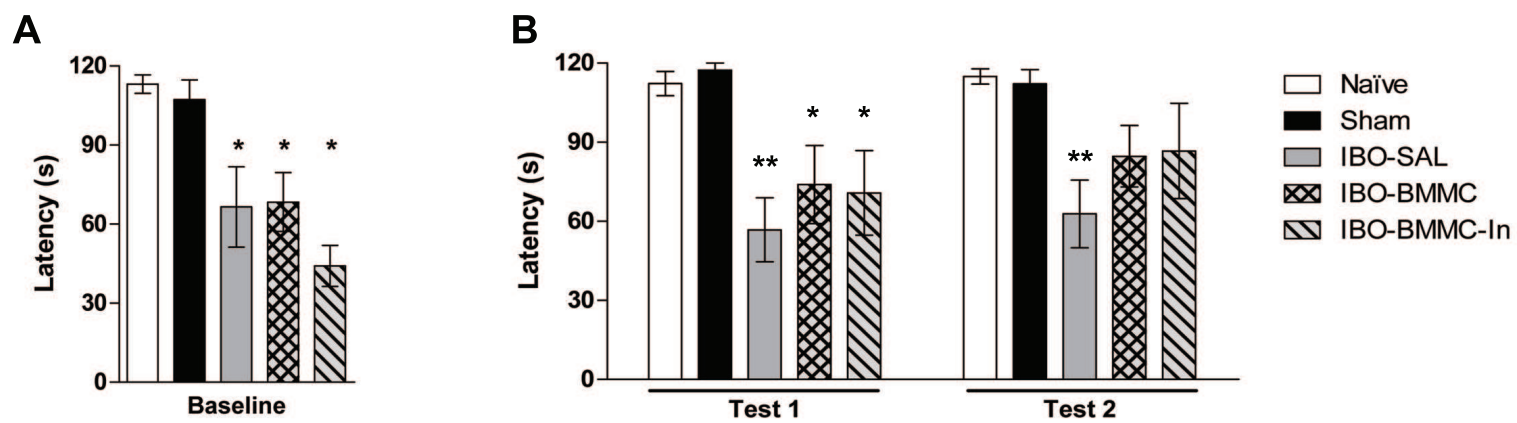


Figure 3

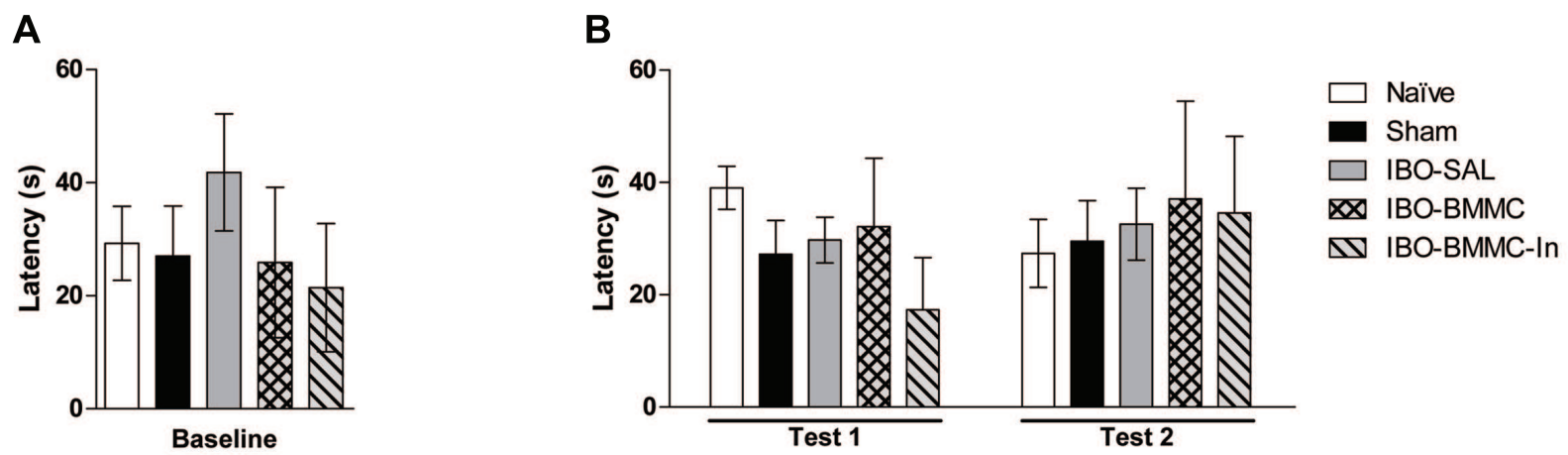


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

