

GIANINA TERIBELE VENTURIN

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA
MEDULA ÓSSEA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE
LATERAL AMIOTRÓFICA**

PORTO ALEGRE

2012

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

Gianina Teribele Venturin

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA
MEDULA ÓSSEA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE
LATERAL AMIOTRÓFICA**

Tese submetida à Pontifícia
Universidade Católica do Rio
Grande do Sul como parte dos
requisitos para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Porto Alegre, Agosto de 2012.

FICHA CATALOGRÁFICA

V469e Venturin, Gianina Teribele
Potencial terapêutico das células mononucleares da medula óssea em um modelo experimental de esclerose lateral amiotrófica / Gianina Teribele Venturin. - Porto Alegre: PUCRS, 2012.

152f.: il. gráf. tab. Inclui artigo de periódico a ser submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Tese (Doutorado) – 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.

1. ESCLEROSE AMIOTRÓFICA LATERAL/terapia. 2. CÉLULAS-TRONCO. 3. MEDULA ÓSSEA. 4. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS/diagnóstico. 5. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO. 6. DEGENERAÇÃO NEURAL/terapia. 7. LEUCÓCITOS MONONUCLEARES. 8. CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS. 9. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. 10. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. 11. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Título.

C.D.D. 616.853
N.L.M. WE 550

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA
MEDULA ÓSSEA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE
LATERAL AMIOTRÓFICA**

Gianina Teribele Venturin

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, Área de Concentração Neurociências, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes

Banca Examinadora

Prof. Dr. Acary Souza Bulle de Oliveira

Prof. Dr. Antonio Carlos Huf Marrone

Prof. Dr. Asdrubal Falavigna

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

Dr. Fabrício Simão (Suplente)

*Aos meus pais, pelo amor e apoio
incondicional que sempre me dedicaram.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Jaderson Costa da Costa: a sua dedicação à pesquisa e à busca constante por conhecimento são inspiradoras e foram fundamentais para que eu fizesse ciência. Obrigada pela acolhida em seu laboratório desde a iniciação científica, e por todo o incentivo ao meu desenvolvimento profissional e pessoal que recebi ao longo destes anos.

Ao Dr. João Antonio Pêgas Henriques, por permitir que parte desta pesquisa fosse realizada no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da UFRGS. Também ao Iuri Marques de Oliveira, por ter contribuído com a realização e análise dos cometas.

Ao Dr. Jefferson Becker, por sua disponibilidade e gentileza em realizar a avaliação eletromiográfica. Com certeza o seu suporte enriqueceu este trabalho.

A todos os funcionários e bolsistas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular: seu apoio foi fundamental para a obtenção das células e análise por PCR, e sem vocês esse trabalho não teria sido realizado. Em especial, quero expressar a minha gratidão ao Daniel Marinowic que foi incansável em sua disposição para ajudar ao longo de todas as etapas deste processo.

Aos meus queridos colegas do Neurolab e Sinalização Celular. Posso dizer que tenho a sorte de ter feito muitos amigos no convívio diário com vocês. Obrigada pelo apoio, pela alegria de seus sorrisos e por compartilharem minha vida. Estejam certos de que todos vocês tiveram uma preciosa contribuição e marcaram minha trajetória. Ao Ricardo Breda, agradeço por todo o apoio técnico. Quero agradecer especialmente à Simone Salamoni, Daniela Abreu, Zuzete Pires e Raquel. Obrigada pelo carinho e amizade que sempre me dedicaram. Gabriele Zanirati, obrigada pela ajuda, pelas risadas, por tudo! Samuel, querido, tua consultoria científica teve um valor imenso na realização deste trabalho, mas o prazer da tua companhia e da tua amizade tem valor inestimável! Si de Paula, embora não nos vejamos mais diariamente, quero que saiba que você é uma grande amiga que fiz nesta jornada, e que é muito especial para mim.

Agradeço à Nelcy, pela paciência e solicitude em responder as minhas infindáveis dúvidas e solicitações. Da mesma forma, obrigada às secretárias do IPB com quem convivi, em especial Elisângela e Marilaine.

Obrigada às secretárias da Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Vanessa e Raquel, e também ao Ernesto pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei. Aos professores, agradeço pelo convívio, ensinamentos e atendimento sempre atencioso.

Obrigada aos demais familiares e amigos para todas as horas. Em especial meus primos Diogo e Alessandra e minha amiga Andressa.

Leonardo, embora você só tenha acompanhado uma parte deste trabalho, o teu apoio foi muito importante para que eu o concluísse. Obrigada por todo o amor, e também por toda a paciência.

Aos meus pais, Ildo e Miriam, e ao meu irmão Gianfrancesco. Obrigada, vocês são a melhor família que alguém poderia ter. Amo vocês!

À PUCRS, e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde pela oportunidade de desenvolver o doutorado.

À CAPES pela bolsa concedida e, CNPq, Pandurata e PUCRS pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma perda seletiva de neurônios motores na medula espinhal, tronco encefálico e córtex motor. A perda de motoneurônios dá início a uma paralisia progressiva, levando o paciente a óbito em 2 a 5 anos. O tratamento se baseia principalmente em medidas sintomáticas e a terapia farmacológica existente não é curativa. Assim, é de máxima importância o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Como alternativa, existe a perspectiva do uso de células-tronco para substituir neurônios em degeneração, ou impedir/retardar o processo de morte neuronal. O objetivo deste estudo foi verificar se as células mononucleares da medula óssea (CMMO) apresentam potencial terapêutico em camundongos transgênicos que superexpressam SOD1^{G93A}. Estes animais apresentam características fisiopatológicas e fenotípicas que se assemelham à ELA. Aos 70 dias (pré-sintomático) ou 110 dias (sintomático) de vida os animais receberam 10⁷ CMMO pela veia da cauda. Camundongos C57BL/6-EGFP ou SOD1^{G93A} foram utilizados como doadores. Animais controle receberam solução salina. Para determinar a idade em que os animais passam a apresentar sintomas da doença e diferenças na progressão, foram utilizados o teste motor do Rotarod, eletroneuromiografia e o peso corporal dos animais. A sobrevida dos animais também foi analisada. Após a eutanásia foram coletadas amostras para avaliação da migração celular por PCR. Grupos adicionais de animais foram tratados conforme previamente descrito e eutanasiados aos 120 dias de vida para avaliação histológica e ensaio do cometa alcalino. Nossos resultados indicam que o transplante intravenoso de EGFP^{CMMO} aumenta a sobrevida de animais tratados aos 70 ou aos 110 dias de vida. Quando a intervenção é feita no período pré-sintomático, o aumento da sobrevida é acompanhado de preservação da função motora e de motoneurônios do corno ventral da medula espinhal. Entretanto, quando as células transplantadas são mSOD1^{CMMO}, o efeito observado nos mesmos parâmetros é apenas intermediário. Além disso, quando o transplante ocorre no período sintomático, somente as EGFP^{CMMO} promovem aumento na sobrevida, embora discreto. A perda de função motora e a progressão não se modificam. Finalmente, embora as células tenham sido administradas sistemicamente, migram para a medula espinhal, onde foram identificados fragmentos de seu DNA. Não foram identificadas diferenças entre os grupos na avaliação por eletroneuromiografia, nem da integridade de do DNA avaliada pelo ensaio do cometa alcalino. Nossos

resultados até o momento sugerem que a fração mononuclear da medula óssea tem potencial terapêutico no tratamento da ELA, uma vez que verificamos melhora de desempenho motor e aumento de sobrevida em animais submetidos ao transplante. Apesar disso, os desfechos são mais favoráveis quando o tratamento é precoce e as células não expressam a mutação da SOD1 desencadeadora da ELA. Assim, nossos dados representam avanço na disponibilização do tratamento com células-tronco para pacientes com ELA, mas questões relacionadas ao período de intervenção e fonte das células devem ser cuidadosamente avaliadas.

Palavras-chave: Esclerose Lateral Amiotrófica, Células-tronco, Medula Óssea.

ABSTRACT

Lateral amyotrophic sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the selective loss of both lower and upper motoneurons in the spinal cord, brain stem and motor cortex. Loss of motoneurons leads to progressive paralysis, and death in 2 to 5 years. Treatment is based on symptomatic measures and pharmacological therapy available is not curative. Thus, it is of great importance to develop new therapeutic strategies to manage this disease. Alternatively, stem cells to replace could be used to replace degenerating neurons or to stop/delay neuronal death. The aim of this study was to verify if bone marrow mononuclear cells (BMMC) have therapeutic potential in transgenic mice superexpressing SOD1^{G93A}. These animals' phenotypic and physiopathological characteristics mimic those of ALS. Seventy-day-old or 110-day-old mice were administered with 10⁷ BMMC in the tail vein. BMMC were obtained from C57BL/6-EGFP or SOD1^{G93A} donors. Control animals received saline. In order to determine disease onset and progression, animals were evaluated in the Rotarod test, by electromyography and had their body weight measured. Survival was also evaluated. Tissue samples were collected for PCR analysis of cell migration. Additional groups of animals were euthanized at 120-days-old for histological analysis and the alkaline comet assay. Our results indicate that ^{EGFP}BMMC transplantation in 70-day-old mice (pre-symptomatic) mice prolong survival, preserve motor function and preserve motoneurons in the ventral horn of the spinal cord. However, for ^{mSOD1}BMMC the observed effect is intermediary. Furthermore, in 110-day-old (symptomatic) mice, only ^{EGFP}BMMC prolonged survival. This effect was more discrete than the one observed for pre-symptomatic-treated animals. Finally, systemically administered BMMC migrate into the spinal cord where fragments of their DNA were identified by PCR. There were no differences between the experimental groups in the electromyographical evaluation or DNA integrity measured by the alkaline comet assay. Our results suggest that BMMC have therapeutic potential in ALS since we observed improved motor performance and prolonged survival in animals that received the transplant. Nonetheless, outcomes were better when intervention was early and the transplanted cells did not express the mutated SOD1. Thus, our data represent a step forward in making cell-based therapy available for ALS patients. However, questions associate the time of intervention and the source of the cells should be carefully addressed.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, Stem Cells, Bone Marrow.

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
1.1	Esclerose Lateral Amiotrófica	18
1.1.1	<i>Características clínicas</i>	18
1.1.2	<i>Epidemiologia</i>	20
1.1.3	<i>Fisiopatologia</i>	21
1.1.4	<i>Superóxido Dismutase Dependente de Cobre e Zinco (SOD1)</i>	24
1.1.5	<i>Tratamento</i>	25
1.2	Células-tronco.....	26
1.2.1	<i>Células-tronco da medula óssea</i>	28
1.2.2	<i>Células-tronco na ELA</i>	29
2	OBJETIVOS	53
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	53
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1	Animais.....	54
3.1.1	<i>Aspectos Éticos</i>	54
3.1.2	<i>Modelo experimental</i>	55
3.2	Delineamento Experimental	56
3.3	Preparação das Células Mononucleares da Medula Óssea (CMMO).....	58
3.4	Caracterização das Populações Celulares Presentes.....	59
3.5	Transplante das CMMO	60
3.6	Avaliação da sobrevivência.....	60
3.7	Avaliação do início dos sintomas da ELA e progressão da doença nos camundongos SOD1 ^{G93A}	61
3.7.1	<i>Determinação do peso corporal</i>	61
3.7.2	<i>Avaliação neuromotora por meio do teste de desempenho no Rotarod e avaliação neurofisiológica</i>	61
3.8	Detecção das células transplantadas por <i>Nested PCR</i>	62
3.9	Ensaio Cometa Alcalino	63
3.10	Avaliação Quantitativa do Número de Motoneurônios.....	64
3.11	Análise estatística	65

4	RESULTADOS.....	67
4.1	Caracterização das populações celulares presentes nas amostras obtidas de camundongos C57BL/6-EGFP) ou transgênicos SOD1 ^{G93A}	67
4.2	O tratamento com CMMO promove aumento da sobrevivência nos camundongos transgênicos SOD1 ^{G93A} tratados aos 70 ou 110 dias de vida.....	68
4.3	O tratamento com CMMO retarda o início, estágio sintomático e a progressão da ELA em camundongos transgênicos SOD1 ^{G93A} tratados pré-sintomaticamente.	71
4.4	O tratamento com ^{EGFP} CMMO promove melhora da função motora nos camundongos transgênicos SOD1 ^{G93A} tratados pré-sintomaticamente.	76
4.5	Fragmentos de DNA das CMMO administradas sistemicamente são identificados por PCR na medula espinhal dos animais transplantados.	79
4.6	Transplante de ^{EGFP} CMMO não altera o grau de dano ao DNA medido por ensaio cometa alcalino em camundongos SOD1 ^{G93A}	79
4.7	Transplante pré-sintomático de ^{EGFP} CMMO promove a preservação dos motoneurônios da região lombar da medula espinhal em camundongos SOD1 ^{G93A}	80
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÕES	94
7	REFERÊNCIAS.....	95
8	ANEXOS	112

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Patogênese da esclerose lateral amiotrófica. Diagrama contendo as principais hipóteses para a patogênese da doença.....	22
Figura 2. Modelo da diferenciação das células-tronco.....	27
Figura 3. Figura comparativa das características fenotípicas de camundongos transgênicos SOD1 ^{G93A} (G93A) e camundongos Wild-Type (WT).....	56
Figura 4. Delineamento temporal do estudo para animais tratados aos 70 dias de vida (10 ^a semana, pré-sintomático).	57
Figura 5. Delineamento temporal do estudo para animais tratados aos 110 dias de vida (entre a 15 ^a e 16 ^a semanas, sintomático).....	58
Figura 6. Obtenção de CMMO de camundongos C57BL/6-EGFP.....	59
Figura 7. Expressão de marcadores de superfície para células da medula óssea de camundongos C57BL/6.	67
Figura 8. Expressão de marcadores de superfície para células da fração mononuclear da medula óssea de camundongos SOD1 ^{G93A}	68
Figura 9. CMMO promovem aumento de sobrevida em camundongos SOD1 ^{G93A} tratados aos 70 dias de vida.	70
Figura 10. ^{EGFP} CMMO promovem aumento de sobrevida em camundongos SOD1 ^{G93A} sintomáticos tratados aos 110 dias de vida.....	70
Figura 11. Curva comparativa da sobrevida de camundongos SOD1 ^{G93A} tratados com ^{EGFP} CMMO aos 70 ou 110 dias de vida.	71
Figura 12. O tratamento com CMMO aos 70 dias de vida retarda o início da ELA em camundongos SOD1 ^{G93A} . ..	72
Figura 13. O tratamento com CMMO aos 70 dias de vida retarda o estabelecimento de estágio sintomático em camundongos SOD1 ^{G93A}	73
Figura 14. Início da ELA determinado para camundongos SOD1 ^{G93A} tratados aos 110 dias de vida.	74
Figura 15. Estágio sintomático determinado para camundongos SOD1 ^{G93A} tratados aos 110 dias de vida.	74
Figura 16. O tratamento com CMMO aos 70 dias de vida, mas não aos 110, aumenta o tempo de progressão da ELA em camundongos SOD1 ^{G93A}	75

Figura 17. ^{EGFP} CMMO promovem melhor desempenho motor em camundongos SOD1 ^{G93A} transplantados aos 70 dias de vida..	77
Figura 18. CMMO não alteram progressão do déficit motor quando administradas aos 110 dias de vida de camundongos SOD1 ^{G93A} .	78
Figura 19. Registro eletroneuromiográfico de atividade espontânea na pata posterior de camundongo SOD1 ^{G93A} do grupo SAL aos 115 dias de vida.	78
Figura 20. Transplante de ^{EGFP} CMMO não previne dano ao DNA medido por ensaio do cometa alcalino em camundongos SOD1 ^{G93A} .	80
Figura 21. ^{EGFP} CMMO têm efeito neuroprotetor quando administradas pré-sintomaticamente a camundongos SOD1 ^{G93A} .	81
Tabela 1. Revisão dos estudos utilizando terapia celular na ELA.	31
Tabela 2. Revisão dos estudos clínicos utilizando terapia celular na ELA.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS4	Gene Esclerose Lateral Amiotrófica 4
ANG	Angiogenina
ANG2	Angiogenina 2
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
ChAT	Colina Acetiltransferase
CMMO	Células mononucleares da medula óssea
CNPase	2'3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase
CsA	Ciclosporina
CTNF	Fator Trófico Ciliar do Nervo
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindol
EAAT2	Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 2
EGFP	Proteína fluorescente verde
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ENMG	Eletroneuromiografia
FD	Frequência de dano
FIG4	Fosfoinositídeo fosfatase
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GF	Fatores tróficos
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GFP	Proteína fluorescente verde
GLT-1	Transportador glial de glutamato
GRP	Células precursoras glia-restritas
HSC	Células-tronco hematopoiéticas
HUCB	Sangue cordão umbilical humano
HUCB-NSC	Células neurais derivadas de células-tronco do sangue do cordão umbilical
Iba-1	Molécula adaptadora da ligação de cálcio ionizado 1
i.c.v.	Intracerebroventricular
ID	Índice de dano
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGF1-R	Receptor fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGFBP5	Proteína ligante 5 do fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
HSC	Células-tronco hematopoiéticas
HSP70	Proteína de choque térmico induzível 70
MAP2	Proteína associada à microtúbulo-2
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito 1
ME	Medula espinhal
MNP	Células precursoras de motoneurônios humanas
MO	Medula óssea
MSC	Células-tronco mesenquimais
MSC-NSC	Células-tronco neurais derivadas de células-tronco mesenquimais
mSOD1	Enzima SOD1 mutante
NeuN	Núcleo neuronal
NF	Neurofilamento
NGF	Fator de crescimento neural
Ngn1	Neurogenina 1
NSC	Células-tronco neurais
NSE	Enolase neurônio-específica
NT	Células de linhagem neuronal
NT-3	Neurotrofina 3
OEC	Células olfativas embainhantes
Olig2	Fator de transcrição de oligodendrócitos 2
O4	Marcador de oligodendrócito 4
PBS	Tampão fostato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
Rpm	Rotações por minuto
RR	Rotarod

SCF	Fator de células-tronco
SNC	Sistema nervoso central
SOD1	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
TDP43	Proteína ligante de DNA TAR 43
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TUJ1	Beta tubulina classe III
VAPB	Proteína de membrana associada à sinaptobrevina B
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
Wt	Wild-type
YFP	Expressão da proteína fluorescente amarela.

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Esclerose Lateral Amiotrófica

1.1.1 Características clínicas

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa fatal conhecida classicamente como doença de Charcot, nome do neurologista francês que a descreveu. Na literatura norte-americana é chamada de doença de Lou Gehrig em homenagem ao grande astro de beisebol do *New York Yankees* que faleceu em decorrência desta enfermidade (Cleveland and Rothstein 2001). É a doença do neurônio motor mais comum no adulto e se caracteriza por uma perda seletiva de neurônios motores na medula espinhal, tronco encefálico e córtex motor (Julien 2001; Bruijn et al. 2004).

Clinicamente os pacientes apresentam a combinação de sinais de comprometimento de 1º e 2º neurônios motores, ou seja, envolvimento do feixe motor corticoespinhal (piramidal) e de neurônios motores no corno anterior da medula espinhal e núcleos motores de nervos cranianos bulbares. De maneira geral, os sintomas clínicos predominantes são: fraqueza e atrofia muscular, fasciculações e espasticidade (Mulder et al. 1986; Rowland and Shneider 2001).

Tendo em mente que as características clínicas estão relacionadas com o nível de acometimento neurológico, pacientes com paralisia bulbar – quando há morte de neurônios motores inferiores do bulbo – poderão apresentar disfagia, disartria, fraqueza facial e da língua, que apresenta fasciculações. Já a paralisia pseudo-bulbar – quando há perda de neurônios motores superiores – se caracteriza por um estado de labilidade emocional, relacionado ao choro ou riso patológico. Na ELA de início cervical, os sintomas estão relacionados com os membros superiores, com fraqueza muscular proximal e distal. Assim como na ELA bulbar, os sintomas podem estar relacionados à perda de neurônios motores superiores e inferiores. Já o início lombar está associado com a perda de neurônios inferiores e os sintomas relacionados com o membro inferior.

Na maioria dos pacientes, são acometidos primeiro os neurônios motores inferiores da medula espinhal, enquanto que em um para cada quatro ou cinco pacientes, o início é bulbar (Mitchell and Borasio 2007). Com a progressão da doença, há paralisia praticamente completa de braços, pernas e dos músculos necessários para a fala, deglutição e respiração. Os músculos que controlam os movimentos oculares e esfíncteres urinários são relativamente preservados. Alguns pacientes ainda podem apresentar um quadro de demência frontotemporal (Neary et al. 2000).

O diagnóstico da ELA é feito com base na presença de sinais clínicos que indicam comprometimento de neurônios motores superiores e inferiores. Além disso, é necessária uma evolução progressiva dos sinais ou sintomas em uma região ou para outras regiões do corpo, que não podem ser explicados por nenhum outro processo patológico (evidente em estudos eletrofisiológicos, de imagem, sorológico e do líquido cefalorraquidiano). (Wijesekera and Leigh 2009). Os critérios estabelecidos pela Federação Mundial de Neurologia (WFN – *World Federation of Neurology*), conhecidos como “El Escorial” e “El Escorial Revisado” (Brooks 1994; Brooks et al. 2000), inicialmente utilizados em pesquisa, hoje também contribuem para o diagnóstico. Apesar desses avanços, a ELA em seus estágios iniciais está relacionada com uma grande variedade de sinais e sintomas, dificultando o diagnóstico, que pode levar até 12 meses para ser estabelecido (Shook and Pioro 2009). Como não há tratamentos disponíveis que modifiquem definitivamente o curso da doença, o diagnóstico precoce da ELA não tem sido considerado imperativo. Entretanto, será cada vez mais importante diagnosticar a doença precocemente face às muitas tentativas para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes (Mitchell and Borasio 2007).

A ELA é uma doença progressiva e o óbito se dá usualmente entre 2 a 5 anos de evolução da doença, em decorrência de disfunção ou insuficiência respiratória. Entretanto, o prognóstico é variável – vinte por cento dos pacientes têm sobrevida maior ou igual a cinco anos, 10% maior ou igual a 10 anos, e ocasionalmente alguns pacientes sobrevivem por 20 anos (Rowland and Shneider 2001; Bento-Abreu et al. 2010). De maneira geral, o aparecimento dos primeiros sintomas ocorre entre 55 e 65 anos de idade. Em alguns poucos indivíduos – 5% dos casos – a ELA se manifesta antes dos 30 anos de idade. Entretanto, há uma relação de maior sobrevida para os pacientes mais jovens (Worms 2001; Gouveia and de Carvalho 2007).

1.1.2 *Epidemiologia*

Estima-se que a incidência global de ELA varie entre aproximadamente 1,5 a 2,5 por cada 100.000 e a prevalência entre 2-7 por 100.000 por ano, afetando, preferencialmente, pacientes do sexo masculino (Yoshida et al. 1986; Worms 2001; Logroscino et al. 2005; Johnston et al. 2006; Uccelli et al. 2007). Apesar disso, estudos recentes indicam que o número de casos está mais próximo da igualdade entre o sexo masculino e feminino (Logroscino et al. 2008). Recentemente, estimou-se que a taxa de mortalidade para a ELA nos Estados Unidos é de 1,84 por 100.000 habitantes (Sejvar et al. 2005).

Dados de incidência e taxa de mortalidade para a população sul-americana foram obtidos no Brasil e na Argentina. Nesta, calcula-se que a incidência seja de seis por 100.000 (Bettini et al. 2011). É provável que o aumento de incidência em relação aos dados globais seja em razão de o estudo ter sido realizado em um centro de referência no tratamento de doenças do motoneurônio naquele país. No Brasil, foram observadas taxas de mortalidade de 0,9/100.000 no Rio de Janeiro e entre 0,44 e 0,76/100.000 em São Paulo, abaixo das taxas encontradas em estudos conduzidos em outros países (de Matos et al. 2011). Por outro lado, um estudo realizado em âmbito nacional observou que as características epidemiológicas da doença são semelhantes às descritas em estudos internacionais (Dietrich-Neto et al. 2000).

Ao longo das últimas décadas, apesar do grande esforço investigativo que tem sido feito, não foi encontrada associação entre os fatores ambientais, físicos e tóxicos estudados e o desenvolvimento de ELA. As exceções foram estudos relatando um maior risco de desenvolver a doença entre jogadores italianos de futebol (Chio et al. 2005), militares (Weisskopf et al. 2005) e fumantes (Sutedja et al. 2007).

A maior parte dos casos de ELA é esporádica, mas 5-10% dos pacientes têm uma história familiar da doença (ELA Familiar), em geral herdada de forma dominante, embora formas autossômicas recessivas já tenham sido descritas (Mulder et al. 1986; Pasinelli and Brown 2006). A partir da investigação conduzida por Tippu Siddique e colaboradores (1991) - que mapeou a ELA familiar no cromossomo 21, tendo levado à identificação das mutações da superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (SOD1) (Siddique et al. 1991) - tem sido conduzido um grande número de estudos para identificar outras mutações relacionadas com a ELA. Dessa forma, ao longo das últimas décadas, foram identificadas mutações em genes como ALS4, ANG, VAPB e FIG4

(Chance et al. 1998; Pasinelli and Brown 2006; Dion et al. 2009; Mitne-Neto et al. 2011). Mais recentemente, foram descritas mutações nos genes que codificam a proteína ligante 43 TAR-DNA (também conhecido como TDP43), FUS, UBQLN2 (Kabashi et al. 2008; Sreedharan et al. 2008; Vance et al. 2009; Deng et al. 2011), e relacionadas com o gene da optineurina (Maruyama et al. 2010) e C9ORF72 (DeJesus-Hernandez et al. 2011; Renton et al. 2011; Chio et al. 2012; Majounie et al. 2012; Millicamps et al. 2012). Algumas destas mutações estão relacionadas também com a forma esporádica da doença. De todos os casos de ELA familiar, em torno de 20% vêm de mutações no gene que codifica a enzima SOD1 (Siddique et al. 1991; Rosen 1993). Mais de 100 mutações foram encontradas na SOD1 em pacientes com ELA familiar, distribuídas ao longo de todo o gene (Borchelt et al. 1994).

1.1.3 Fisiopatologia

Acredita-se que, a exemplo do que ocorre para outras doenças neurodegenerativas, o mecanismo patológico subjacente à ELA não seja único, mas sim um conjunto de alterações celulares e bioquímicas que acabam por desencadear a degeneração de neurônios motores. Nas últimas duas décadas, tem sido proposta uma série de hipóteses, que não são excludentes e sim complementares umas às outras, que tentam elucidar a fisiopatogenia da ELA.

É importante mencionar que o estudo da ELA familiar, mesmo que ela seja menos frequente que a ELA esporádica, é de extrema relevância. Isso se deve ao fato de que as duas formas seguem cursos clínicos semelhantes, e, portanto, a investigação dos mecanismos patogênicos relacionados com a ELA familiar pode contribuir para a elucidação também dos mecanismos subjacentes à forma esporádica.

Muitas hipóteses atualmente aceitas para explicar a fisiopatogenia da ELA foram propostas a partir de estudos com animais expressando diferentes mutações da SOD1. Elas incluem: dano oxidativo, acúmulo de agregados celulares, disfunção mitocondrial, falhas no transporte axonal, deficiência de fatores tróficos, inflamação, efeitos da astrogliose e excitotoxicidade promovida por glutamato (Figura 1) (Bruijn et al. 2004; Rothstein 2009; Bento-Abreu et al. 2010).

O papel do dano oxidativo tem sido estudado para inúmeras doenças degenerativas. Sabe-se que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio causa morte

celular. Na ELA, a hipótese que se baseia na morte neuronal como consequência do estresse oxidativo é bastante aceita, especialmente após a descrição das mutações da SOD1. Esta hipótese pode ser reforçada pelos achados em estudos *post-mortem*, nos quais pacientes apresentavam elevação de marcadores de dano oxidativo (Beal et al. 1997; Ferrante et al. 1997; Simpson et al. 2003). A cascata oxidativa poderia ser desencadeada quando a enzima mutada convertesse peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila reativos (hipótese da peroxidase), pela nitração dos resíduos de tirosina em algumas proteínas alvo (hipótese do peroxinitrito) ou seria mediada pelo cobre (Rothstein 2009).

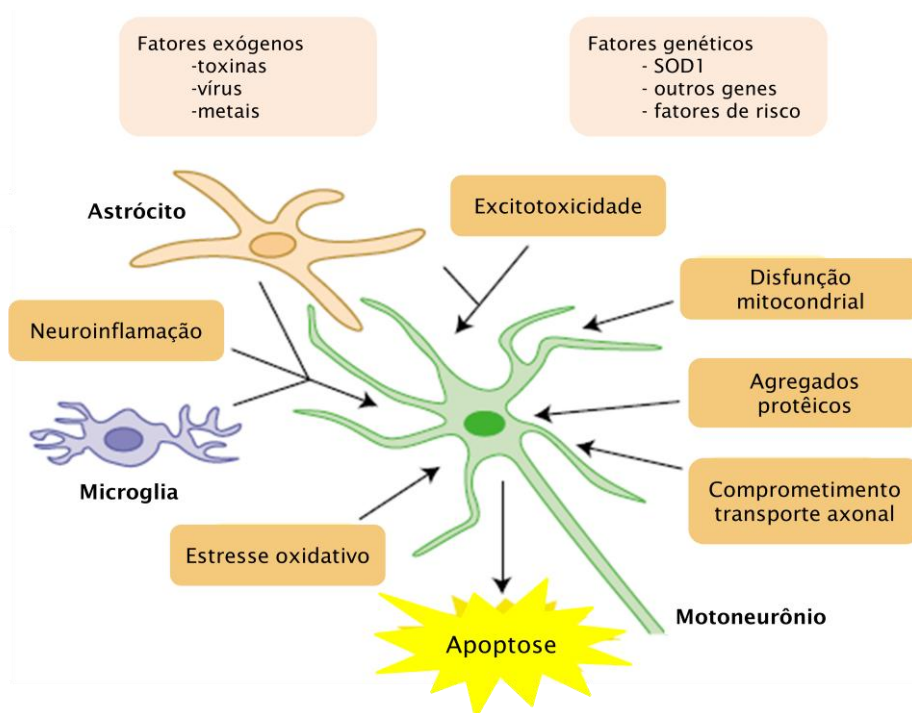


Figura 1. Patogênese da esclerose lateral amiotrófica. Diagrama contendo as principais hipóteses para a patogênese da doença. Adaptado de Goodall e Morrison, 2006 (Goodall and Morrison 2006).

Além disso, as hipóteses do dano oxidativo e da excitotoxicidade podem ser consideradas complementares. O glutamato é um neurotransmissor conhecido por desencadear uma resposta excitotóxica, na qual há aumento de influxo de cálcio, neste caso no neurônio motor, ativando cascatas de sinalização que resultam na morte celular. Complementarmente, o aumento de cálcio intracelular levará à produção de radicais livres. De fato, há relatos de níveis aumentados de glutamato no líquido cefalorraquidiano de pacientes com ELA (Shaw et al. 1995; Spreux-Varoquaux et al. 2002). Este aumento tem sido relacionado com a depleção do transportador astrocítico

de glutamato EAAT2 (Rothstein et al. 1995; Bristol and Rothstein 1996). A hipótese excitatória também contribuiu para o desenvolvimento do riluzole, fármaco utilizado no tratamento da ELA e cujo mecanismo de ação envolve a inibição da liberação do glutamato (Miller et al. 2007).

Por outro lado, a identificação do envolvimento do EAAT2 no mecanismo excitotóxico é um dos achados que contribuiu para a hipótese de que as células da glia também têm um papel importante na fisiopatologia da ELA. Esta observação, somada a outros achados recentes, aponta para um processo de degeneração neuronal que não seja “célula-autônomo” (Clement et al. 2003; Di Giorgio et al. 2007; Nagai et al. 2007; Diaz-Amarilla et al. 2011). Nesses estudos, observou-se que células gliais que não expressam a mutação da SOD1 aumentam a sobrevivência e retardam a degeneração de motoneurônios que carregam a mutação da enzima. O inverso também é verdadeiro, já que também se verificou que astrócitos expressando a SOD1 mutada reduzem a sobrevivência dos neurônios motores.

De maneira semelhante, quando a expressão de SOD1 mutada é reduzida na microglia, há uma redução da progressão da doença em seus estágios mais tardios (Boillee et al. 2006). A ativação microglial e dendrítica é um aspecto patológico importante na ELA (Hall et al. 1998; Henkel et al. 2004), uma vez que estas células podem estar envolvidas com a produção de citocinas inflamatórias encontradas no líquido cefalorraquidiano de pacientes ou em animais com ELA (Almer et al. 2001; Robertson et al. 2001).

Acredita-se que o mecanismo final de morte celular dos neurônios motores na ELA seja a apoptose (Sathasivam and Shaw 2005). Há relatos da ativação da caspase-1 durante a fase sintomática inicial e da caspase-3 como efetor final da morte celular em camundongos que expressam mutações da SOD1 (Pasinelli et al. 2000). Também, em um estudo conduzido em camundongos com uma deleção do elemento de resposta à hipóxia do gene que codifica VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), observou-se que esta deleção provocava degeneração de neurônios motores, sugerindo um papel importante do VEGF na patogênese da ELA (Oosthuyse et al. 2001). Os possíveis mecanismos de ação do VEGF devem incluir um efeito neuroprotetor, bem como a prevenção de lesão isquêmica pelo controle da perfusão vascular (Azzouz et al. 2004; Wang et al. 2007). Outros fatores de crescimento como o IGF-1 (fator de crescimento do tipo insulina-1) e GDNF (fator neurotrófico derivado da glia) parecem retardar o aparecimento dos sintomas e a progressão da doença em modelos animais

(Wang et al. 2002; Kaspar et al. 2003). Além disso, já foram observados níveis abaixo do normal de fatores tróficos em amostras coletadas *post-mortem* de pacientes com ELA (Anand et al. 1995). Mutações do gene que codifica VEGF também parecer estar relacionadas ao maior risco de desenvolvimento de ELA (Lambrechts et al. 2009).

Outras hipóteses propostas para explicar os mecanismos patogênicos da ELA se baseiam na observação da existência de disfunção mitocondrial (Krasnianski et al. 2005), de acúmulo de agregados intracelulares (Bruijn et al. 1998) e de neurofilamentos (Xu et al. 1993), e de falhas no transporte axonal (Williamson and Cleveland 1999). Recentemente, descobriu-se que uma forma da proteína TDP-43 está presente em inclusões citoplasmáticas tanto em pacientes com ELA esporádica quanto familiar (Gitcho et al. 2008; Sreedharan et al. 2008; Van Deerlin et al. 2008). A presença dessa proteína mutante nos pacientes com ELA estabelece um paralelo com outra doença neurodegenerativa, a doença de Alzheimer (Rothstein 2009). Embora seja pouco provável que a biologia da TDP-43 esteja esclarecida antes dos próximos 15-20 anos, o estudo dessa proteína possivelmente trará luz sobre muitos aspectos que permanecem obscuros quanto à patogênese da ELA. O mesmo provavelmente se dará para a FUS, embora o conhecimento acerca de seu papel na patogênese da ELA ainda seja muito limitado.

1.1.4 Superóxido Dismutase Dependente de Cobre e Zinco (SOD1)

A SOD1 é uma enzima ubíqua, que contém 153 aminoácidos por subunidade, funcionando como um homodímero. É predominantemente citosólica, e a cada uma de suas subunidades está ligado um átomo de zinco e um átomo de cobre. A SOD1 catalisa a reação de dismutação que converte ânions superóxido, originários de erros da fosforilação oxidativa na mitocôndria, em peróxido de hidrogênio que pode então ser transformado em água e oxigênio (Roberts et al. 2007).

Já foram encontradas mais de 125 mutações da SOD1, que, com poucas exceções, são herdadas dominantemente (Pasinelli and Brown 2006). Apesar da duração da doença ser semelhante para todas as mutações, não há uma correlação clara entre a atividade enzimática, progressão clínica e fenótipo. Embora os primeiros estudos indicassem perda de atividade enzimática nos pacientes com mutações da SOD1, animais transgênicos expressando inúmeras mutações da SOD1 relacionadas com a

ELA, entre elas a mutação SOD1^{G93A} (glicina substituída por alanina na posição 93), desenvolveram os sintomas fenotípicos característicos da doença, mas mantiveram níveis elevados de atividade da enzima (Gurney et al. 1994). Por outro lado, animais depletados de SOD1 não desenvolveram sintomas de doença do neurônio motor, nem tiveram comprometimento da sobrevivência. Assim, chegou-se à conclusão de que as enzimas mutantes adquiriram propriedades tóxicas, que não estão relacionadas com seu grau de atividade (Cleveland and Rothstein 2001; Rothstein 2009). Embora haja inúmeras hipóteses que tentam explicar o mecanismo responsável pela toxicidade da SOD1, ele ainda não foi completamente elucidado.

1.1.5 Tratamento

Nas últimas décadas, foram realizados inúmeros ensaios clínicos visando à disponibilização de medicamentos eficazes para o tratamento da ELA. Contudo, mesmo com o grande volume de estudos, um único fármaco, o riluzole, foi colocado no mercado. O riluzole atua inibindo a liberação de glutamato, agindo nos canais de sódio, e promove um aumento médio de dois a três meses na sobrevivência do paciente (Bensimon et al. 1994; Lacomblez et al. 2002; Miller et al. 2007).

Assim, quase 150 anos após Charcot ter descrito a ELA, o pilar de manejo dessa doença continua baseado em medidas paliativas. Foram feitos progressos no sentido de envolver equipes multidisciplinares no cuidado do paciente, garantindo melhor qualidade de vida e ajudando-o a se manter autônomo pelo maior tempo possível. O tratamento dos sintomas – como câibras, espasticidade, disfagia, salivação excessiva e persistente, laringoespasma, dor, dificuldades de comunicação, labilidade emocional, constipação, depressão, insônia, ansiedade e fadiga – é feito com a ajuda de fisioterapeutas, fonoaudiólogos, apoio de psicólogos, nutricionistas e também pelo uso de medicamentos. Em estágios mais avançados da doença, quando a ingestão oral de alimentos fica muito dificultada, deve-se considerar a necessidade de uma gastrostomia. A ventilação não-invasiva passa a ser indicada quando o paciente tem sintomas de dispnéia, hipoventilação noturna crônica, como fadiga durante o dia e sono desordenado. O suporte respiratório também pode ser invasivo, via traqueostomia (Mitchell and Borasio 2007; Mitsumoto and Rabkin 2007; Miller et al. 2009).

Recentemente, Benjamin Brooks (2009) revisou as publicações dos resultados de ensaios clínicos conduzidos para testar a eficácia de inúmeras drogas na ELA (Brooks 2009). Foram testados agentes antioxidantes, anti-apoptóticos e anti-inflamatórios, novos agentes moduladores do glutamato, além de estratégias imunológicas e de politerapia, todos sem sucesso. O tratamento dos pacientes com fatores tróficos como BDNF e IGF-1, ou com xaliprodeno, que tem propriedades de fator de crescimento, também não foram eficazes.

Assim, a ELA é uma doença progressiva e fatal que continua sem tratamento curativo. Por isso, cresceu nos últimos anos o interesse no estudo de alternativas terapêuticas baseadas em células-tronco.

1.2 Células-tronco

As células-tronco representam uma unidade natural do desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual e são um subconjunto de células imaturas, indiferenciadas e não especializadas. Elas apresentam a capacidade tanto de se autorregenerar, ou seja, dividir-se e criar outras células-tronco, quanto de se diferenciar e originar diferentes linhagens celulares. As células-tronco são em geral classificadas segundo sua origem em células-tronco embrionárias e células-tronco “adultas” ou somáticas. As células-tronco embrionárias são derivadas do blastocisto e são totipotentes, isto é, têm a capacidade de se diferenciar em células derivadas de endoderma, mesoderma e ectoderma. As células-tronco adultas ou somáticas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados ou especializados (Figura 2). São células ditas multipotentes, por terem capacidade de diferenciação mais restrita e são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida. Estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (Morrison et al. 1997; Kaji and Leiden 2001).

Como resultado do progresso contínuo do conhecimento a respeito da capacidade regenerativa do sistema nervoso e do potencial terapêutico das células-tronco, houve um grande aumento no interesse em se estudar estratégias baseadas em terapia celular para o tratamento de doenças neurológicas. A hipótese se baseia na ideia de que, uma vez introduzidas no sistema nervoso central (SNC), essas células poderiam

promover a reposição das células perdidas durante o curso da doença ou ainda modular a regeneração endógena e/ou cascatas inflamatórias.

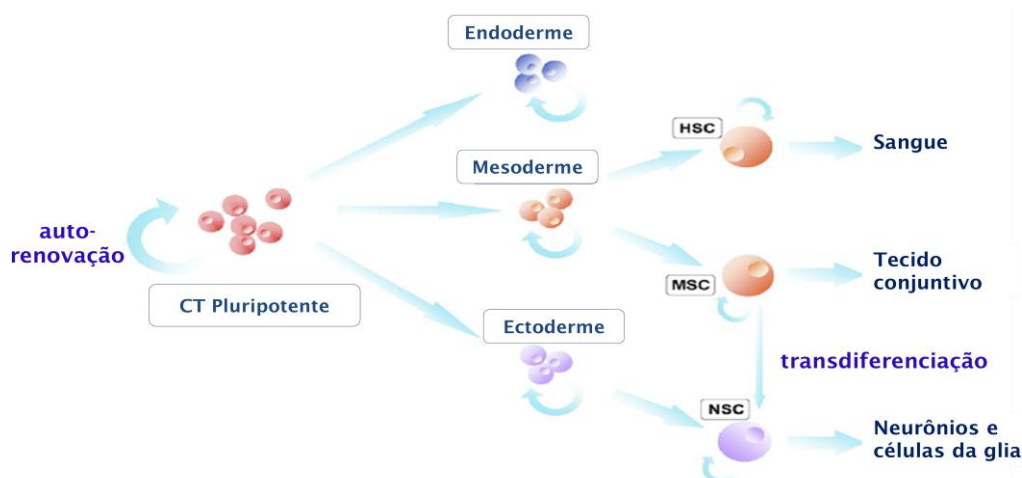


Figura 2. Modelo da diferenciação das células-tronco. A partir de uma célula pluripotente, as células-tronco perdem gradualmente seu potencial de diferenciação. Células-tronco multipotentes têm potencial de transdiferenciação em linhagem neuronal. HSC: célula-tronco hematopoiética; MSC: célula-tronco mesenquimal; NSC: célula-tronco neural. Adaptado de Carney e Shah, 2011 (Carney and Shah 2011).

No caso das doenças neurodegenerativas, deve-se considerar que são doenças que progridem, e, na maioria, são tratadas sintomaticamente, havendo, para algumas, possibilidade de atenuamento das manifestações, mas não de sustar sua evolução. Entre estas se incluem, além da ELA, as doenças de Parkinson, de Huntington e de Alzheimer, as ataxias cerebelares hereditárias (ataxias espino-cerebelares – SCA), várias doenças de nervos periféricos (ex. neuropatias hereditárias), doenças musculares e neuromusculares e doenças autoimunes como a esclerose múltipla. Apesar de serem diferentes na etiologia, na fisiopatogenia ou na doença subjacente, muitas têm como característica em comum a perda neuronal (DaCosta 2012). A reposição celular surge como uma alternativa promissora no tratamento dessas doenças.

Mais do que estudar somente a reposição seletiva de neurônios ou de células da glia que tenham sido perdidas no curso de uma determinada doença ou em decorrência de uma lesão, pesquisadores têm se debruçado sobre os efeitos da terapia celular na neurogênese endógena. Esta poderia ser induzida ou aumentada através da administração de células-tronco. As células seriam responsáveis por uma liberação de fatores tróficos ou, ainda, por uma modulação dos processos inflamatórios capaz de promover essas modificações ou ainda prover neuroproteção ao tecido (Lindvall and

Kokaia 2006; Lindvall and Kokaia 2010). Assim, há pelo menos duas estratégias principais no uso de células-tronco para o tratamento da ELA. A primeira, e mais óbvia, seria produzir novos neurônios motores para repor aqueles perdidos em decorrência do processo degenerativo inerente à doença. A segunda seria produzir células de suporte que protegeriam os neurônios motores sobreviventes de sofrer degeneração (Suzuki and Svendsen 2008). Essas células poderiam alterar o curso da doença através da reposição de neurônios motores perdidos no curso da doença, ou ainda dos astrócitos disfuncionais que ajudam a promover a morte neuronal, estimular a proliferação de progenitores endógenos, liberar fatores tróficos e modular a inflamação (Silani et al. 2004; Garbuzova-Davis and Sanberg 2009; Lindvall and Kokaia 2010).

1.2.1 Células-tronco da medula óssea

Nos últimos anos, têm sido conduzidos estudos, em modelos experimentais de doenças neurológicas, que avaliam a segurança e eficácia da administração de uma série de células das mais diversas origens: pluripotentes (i.e. embrionárias) ou de linhagem mais restrita como células-tronco ou progenitoras neurais (fetais ou adultas) ou células de linhagens não-neuronais (mesenquimais derivadas principalmente de cordão umbilical ou medula óssea) (Conti et al. 2003; Krabbe et al. 2005; Weiss and Troyer 2006; Wang et al. 2009).

Apesar das células-tronco neurais (NSC) serem consideradas padrão-ouro para o tratamento de doenças neurológicas, um dos maiores obstáculos para seu uso clínico é a dificuldade de sua obtenção. Questões ético-religiosas envolvidas na extração deste material – proveniente de tecido fetal e/ou *post-mortem* – e as preocupações com os riscos de resposta imunológica ou de formação de tumores malignos também inibem a aplicabilidade clínica dessas células. Por outro lado, as vantagens em se estudar células-tronco da medula óssea (MO) incluem a maior facilidade de obtenção, sendo que podem ainda ser obtidas em maior quantidade (ideal para aplicação clínica) do que as demais células-tronco adultas. Ainda, elas podem ser obtidas a partir de uma pequena amostra de MO de um dado paciente, expandidas em cultura, e administradas a este mesmo doador.

A MO é uma fonte permanente de células-tronco e contém três tipos de populações: células-tronco hematopoiéticas (HSC), células-tronco mesenquimais

(MSC) e possivelmente progenitoras endoteliais (Korbling and Estrov 2003). As HSCs caracterizam-se pela expressão de marcadores de superfície específicos, o que permite seu isolamento. O fenótipo da medula óssea humana inclui células CD34⁺, CD38⁻, CD133⁺, entre outros (Brignier and Gewirtz 2010). Essas células, originalmente, são capazes de diferenciar-se na linhagem linfóide, que dá origem aos linfócitos B e T, e na linhagem mieloide, que origina basófilos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, plaquetas e eritrócitos (Fuchs and Segre 2000). Já as MSC expressam, em geral, os marcadores de superfície CD29, CD44, CD49a-f, CD51, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD166 (Phinney and Prockop 2007). Porém, para serem consideradas MSC precisam ser aderentes e diferenciar-se em osteoblasto, adipócitos e condroblastos *in vitro* (Dominici et al. 2006). As MSC, por meio da secreção de fatores solúveis, têm efeitos tróficos, anti-inflamatórios e imunomodulatórios, podendo suprimir as células T e células *natural killer* (NK) *in vitro* (Selmani et al. 2008; Brignier and Gewirtz 2010).

Já foi demonstrado que as células da MO podem dar origem, *in vivo*, a células de outras linhagens como microglia e neurônios (Eglitis and Mezey 1997; Brazelton et al. 2000; Mezey et al. 2000). Além disso, a transdiferenciação de células da MO em neurônios no SNC foi também demonstrada em seres humanos (Cogle et al. 2004). A incorporação destas células no tecido nervoso parece ser 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, a liberação de fatores tróficos, citocinas ou ativação de células endógenas. Além disso, as células-tronco da MO têm se mostrado eficazes em muitos estudos com modelos experimentais de inúmeras doenças do sistema nervoso, como em lesões da medula espinhal (Koda et al. 2005), acidentes vasculares cerebrais (Haas et al. 2005), epilepsia (Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011; Costa-Ferro et al. 2012), doença de Parkinson (Levy et al. 2008) e mesmo na ELA.

1.2.2 Células-tronco na ELA

Inúmeros estudos vêm sendo conduzidos ao longo dos últimos anos, grande parte dos quais utilizando ratos ou camundongos transgênicos (SOD1), embora estudos

clínicos também estejam surgindo. Entre as abordagens mais utilizadas no campo da terapia celular estão aquelas envolvendo células-tronco do cordão umbilical (HUCB), células-tronco da MO e células-tronco neurais (tabela 1 e tabela 2).

Tabela 1. Revisão dos estudos utilizando terapia celular na ELA em modelos animais.

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Ende et al. 2000)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; não informado; 8s (pré-sintomático)	34,2-35x10 ⁶ HUCB ou 5x10 ⁶ wtCMMO; i.v. (retro-ocular); 800 cGY	↑ Sobrevida (21d para animais tratados com HUCB e 11d para animais tratados com CMMO)	NA	DNA das HUCB encontrado no baço, pulmões e linfonodos, mas não no encéfalo ou ME; diferenciação NA
(Willing et al. 2001)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; não informado; 8s (pré-sintomático)	150.000 hNT; Intra-espinhal (L4-L5); CsA 25 mg/kg/dia	Atraso no deterioro da função motora; aumento marginal sobrevida (P = 0,12)	NA	NA
(Garbuzova-Davis et al. 2001)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; não informado; ~115d (sintomático)	150.000 hNT; intra-espinhal (L4-L5); CsA 10 mg/kg/dia	hNT não alteraram sobrevida, peso, reflexo de extensão ou função motora (com exceção de um único animal)	Avaliação qualitativa de um único animal: ↑ motoneurônios na proximidade da área do transplante	NA
(Garbuzova-Davis et al. 2002)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; não informado; ~7s (pré-sintomático)	150.000 hNT; intra-espinhal (L4-L5); CsA 25 mg/kg/dia	↑sobrevida (20d), mas P=0,16; atraso no aparecimento de disfunção motora	Presença de motoneurônios próximos ao local do transplante (dados qualitativos)	hNT observadas nas substâncias branca e cinzenta da ME 11s pT

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Garbuzova-Davis et al. 2003)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; não informado; 9s (pré-sintomático)	100.000 HUCB; i.v.(jugular); CsA 10mg/kg/dia	↑ sobrevida (~3s) e atraso na progressão: perda de peso e da função motora se dão tardiamente nos grupos tratados	NA	HUCB encontradas no baço, rins, fígado, pulmões e coração 10-12s pT; no SNC distribuídas no cérebro e ME cervical e lombar; expressão de CD45, nestina, TuJ1 e GFAP; também recuperadas da circulação periférica
(Corti et al. 2004)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 4s (pré-sintomático)	30x10 ⁶ GFP-CMMO, YFP-CMMO ou mSOD1-CMMO; i.p.; 800 rad	GFP/YFP-CMMO ↑ Sobrevida (10-13d) e atrasa declínio da função motora; efeito não observado para mSOD1-CMMO; não foram observadas variações entre os sexos	GFP/YFP-CMMO preservam motoneurônios e densidade axonal; efeito não observado para mSOD1-CMMO	GFP/YFP-CMMO diferenciadas em neurônios no córtex cerebral e cerebelo; células GFP expressando marcadores gliais no encéfalo e ME; células GFP também nos tecidos musculares cardíaco e esquelético
(Garbuzova-Davis et al. 2006)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; machos; 8-9s (pré-sintomático)	75.000 hNT; intra-espinal [em 1 (L4-L5) ou 3 regiões: (L4-L5, L3-L4 e L2-L3)]	Tendência ao ↑ sobrevida (p=0,1) no grupo tratado com um implante; não houve diferença o grupo tratado com múltiplos implantes	Avaliação qualitativa mostrou motoneurônios de soma grande próximos ao implante, nos animais não tratados são menores e com nucléolos de difícil identificação	hNT observadas na ME 11-12s pT; estabeleceram processos neuríticos de diferentes comprimentos independentemente do número de implantes

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Yan et al. 2006)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 8s (pré-sintomático)	4x10 ⁴ hNSC; intra-espinhal (L4-L5); FK506 (2 µg/g), FK506 + rapamicin (1 µg/g), FK506 + rapamicin (1µg/g) + micofenolato (100 µg/g) ou anticorpos CD4 (20 µg/g)	Imunossupressão associada com hNSC atrasou início, ↓ progressão e ↑ sobrevida (aproximadamente 2s); escore motor também mostrou preservação de força muscular	FK506 em associação com outros imunossupressores ou anticorpos CD4 protegem o enxerto	Muitas hNSC diferenciaram-se em neurônios TUJ1 ⁺ , havendo pouca expressão de GFAP e nenhuma co-localização com O4 ou Rip; 1m pT foram encontrados marcadores sinápticos
(Xu et al. 2006)	Ratos SOD1 ^{G93A} ; ambos; 62d (pré-sintomático)	5x10 ⁴ hNSC; intra-espinhal (L4-L5); FK506 1mg/kg/dia	↑ sobrevida (~10d) e atraso do aparecimento dos sintomas	↑ níveis de GDNF e BDNF na ME e no líquido	Diferenciação na linhagem neuronal, expressando TUJ1, algumas células GFAP e Nestina; motoneurônios do hospedeiro em contato com sinaptofisina das hNSC
(Cabanes et al. 2007)	Camundongo <i>mdf</i> ; não informado; 6s (sintomáticos)	300.000 GFP-HSC; intra-espinhal (unilateral, L4-L5); s/i	HSC promovem melhora da função motora nos animais tratados;	Preservação de motoneurônios nos animais tratados; ↑ concentração de GDNF no parênquima neural	HSC sobrevivem na ME até 10s pT; algumas expressam marcadores microgliais, mas nenhum marcador neuronal ou astrocítico

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Corti et al. 2007)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 70d (pré-sintomático)	20.000 GFP-Le+CX+ NSC; intra-espinhal (L4-L5); s/i	↑ sobrevida (~20d), atraso no aparecimento de declínio motor, sem alteração no tempo de progressão	↓ perda de motoneurônios e preservação da densidade axonal; ↑ níveis de VEGF e IGF-1, <i>downregulation</i> de IGF-1R e ↓ expressão de IGFBP5	Migração de até 5 mm de distância do local de implantação nas direções rostral e caudal; expressão de NF, MAP2, NeuN, ChAT, GFAP e O4
(Habisch et al. 2007)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 45d (pré-sintomático)	100.000 hMSC, ou hMSC-NSC, ou HUCB ou HUCB-NSC, intratecal (cisterna magna); CsA 40 mg/kg/dia	Sem modificação na sobrevida ou progressão; ↑ transitório função motora durante período pré-sintomático das fêmeas tratadas com hMSC-NSC	Não houve diferença estatística na densidade de motoneurônios em nenhum período estudado (55d ou 110d de vida)	hMSC e hMSC-NSC distribuídas no espaço subaracnoidal (grande parte nas cisternas magna e basais); observadas também no cerebelo, não foram detectadas na ME
(Suzuki et al. 2007)	Ratos SOD1 ^{G93A} ; fêmeas; 70d (pré-sintomático)	120.000 – 180.000 GDNF-hNP ou wt-hNP; intra-espinhal (unilateral -L1-L4); CsA 10mg/kg/dia	Não foi observado efeito benéfico nem prejudicial	GDNF-hNP secretaram GDNF e preservaram motoneurônios, sem alteração na astrogliose; sobrevivência neuronal é resultante da secreção de GDNF; wt-hNP não promovem mesmo efeito; ativação microglial que pode estar relacionada com rejeição	GDNF-hNP migraram unilateralmente para regiões em degeneração; têm expressão de GFAP e Nestina, mas não vimentina, S100, nem marcadores neuronais ou GLUT1

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Zhao et al. 2007)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; não informado; 8s (pré-sintomático)	3x10 ⁶ hMSC; i.v. (veia da cauda); 6 Gy	Retardo início (14d) e ↑ sobrevida (18d); retardo de 3s na perda de função motora; ↑ amplitude do potencial ação composto muscular	Preservação de motoneurônios (16s ou 20s de vida)	hMSC migram ao cérebro, tronco cerebral e ME (corno ventral), pulmão, fígado, baço e MO; No cérebro expressam GFAP e β-tubulina III e na ME NSE ou - β tubulina III; Maioria das hMSCs não expressa marcadores neurais
(Garbuzova-Davis et al. 2008)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; machos; 7-8s (pré-sintomático)	10x10 ⁶ , 25x10 ⁶ ou 50x10 ⁶ HUCB; i.v. (veia jugular); CsA 10 mg/kg/dia	Dose de 25x10 ⁶ ↑ sobrevida (~15d), retarda a progressão e melhora desempenho motor	Dose de 25x10 ⁶ : ↓densidade microglia na ME, promove ↑ citocinas Th2 no plasma, ↑ linfócitos e ↓neutrófilos no sangue periférico, e ↑ resposta células esplênicos ao mitogênio; dose 50x10 ⁶ : ↑ Th1	HUCB distribuídas na ME cervical e lombar; células expressando nestina observadas na ME de todos os animais transplantados
(Morita et al. 2008)	Camundongo SOD1-Leu126delTT; ambos; 13 ou 14s (pré-sintomático)	3-4x10 ⁵ GFP-OEC ou GFP-MS (de ratos); i.c.v; FK506 (3mg/kg/dia para grupo MSC)	OEC ou MSC não alteram peso, extensão membro posterior, início e sobrevida; MSC ↑ tempo de progressão em fêmeas	OEC não alteram densidade de motoneurônios, MSC ↓ perda de motoneurônios, mas não há diferença estatística; presença de imunorreatividade para GFAP e Iba1 em animais que receberam MSC	Somente MSC invadem parênquima da ME, também encontradas no cerebelo

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Lepore et al. 2008)	Ratos SOD1 ^{G93A} ; não informado, 90d (pré-sintomático)	1,5x10 ⁶ GRP (6 injeções bilaterais); intra-espinhal (C4,C5 e C6); CsA 10mg/kg/dia	GRP não tem efeito sobre o declínio no peso e no aparecimento dos sintomas da doença, mas atrasam a progressão e promovem ↑ sobrevida (~17d); ↓ perda da função motora dos membros anteriores, embora não tenham tido efeito na taxa de declínio do membro posterior, sugerindo efeitos anatômicos específicos após transplante na região cervical	↑ número de motoneurônios cervicais sobreviventes, atenuação da queda dos níveis de GLUT1 na ME cervical e ↓ microgliose; não foram observadas alterações nos níveis de VEGF, BDNF e IGF-1	GRP nas substâncias branca e cinzenta da ME até 80d pT, migração rostral e caudal de ~8mm; expressão inicial de nestina, com diferenciação em astrócitos integrados aos motoneurônios do hospedeiro; diferenciação discreta em oligodendrócitos; não originaram neurônios, microglia ou macrófagos; não apresentaram inclusões de ubiquitina e expressam GLUT1
(Rizvanov et al. 2008)	Camundongo (SOD1 ^{G93A}) ^{dl1} Gur; ambos; 22-25s (pré-sintomático)	10x10 ⁶ HUCB expressando L1CAM e VEGF; retro-orbital; s/i	NA	NA	Migração para o sítio de neurodegeneração, proliferação e diferenciação em células endoteliais
(Suzuki et al. 2008)	Ratos SOD1 ^{G93A} ; fêmeas; 81d (pré-sintomático)	2x 120.000 hMSC ou hMSC-GDNF; intramuscular; CsA 10mg/kg/dia	hMSC-GDNF ↑ sobrevida (18-28 dias)	hMSC-GDNF ↓ desnervação, ↑ motoneurônios, ↑ níveis de GDNF musculares; ↑ de agrina na placa motora terminal para ambos os tipos celulares	Células sobrevivem no músculo por até 8s; algumas podem ter adquirido fenótipo de muscular

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Vercelli et al. 2008)	Camundongo (SOD1 ^{G93A}) ^{dl1} Gur; ambos; 28s (pré-sintomático)	10 ⁵ hMSC; intra-espinhal (lombar); s/i	Nas fêmeas: ↑ desempenho motor avaliado por escore, mas sem diferença no RR, peso e sobrevida; nos machos: ↑ desempenho motor avaliado por escore, RR e preensão patas, ↑ sobrevida	Preservação motoneurônios, ↓ ativação microglial e ↓ astrocitose reativa	Migração para espaço subaracnóideo, e ao longo do eixo dorsoventral da ME; em alguns casos craniocaudal; hMSC sobreviveram por mais de 10s e expressaram GFAP e MAP2
(Boucherie et al. 2009)	Rato SOD1 ^{G93A} ; não informado; 90d (sintomático precoce)	1,95x10 ⁵ wt-MSC; intratecal; s/i	MSC preservam desempenho motor e ↑ sobrevida (16d)	↓ perda de neurônios motores e proliferação microglial, mas não alteram astrocitose; ↓ NOX-2 e COX-2	MSC nas substâncias branca e cinzenta do corno ventral; comarcação com GFAP, sem transdiferenciação em neurônios maduros
(Hwang et al. 2009)	Camundongo Tg SOD1 ^{G93A} ; não informado; 70d (pré-sintomático)	1x10 ⁵ hNSC ou VEGF-hNSC; intratecal; s/i	VEGF-hNSC ↑ sobrevida (12d) e atrasam declínio da função motora	VEGF-hNSC ↓ expressão de Bax e caspase-3, e ↑ Bcl-2 e Bcl-XL	12,3% das VEGF-hNSC migraram para o parênquima da ME; maioria negativa para GFAP, mas expressaram marcador neuronal MAP2
(Ohnishi et al. 2009)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; fêmeas; 12s (sintomático precoce)	6x10 ⁷ GFP-CMMO ou mSOD1-CMMO; intra-MO; 5,5Gy x 2 ou 6Gy x 2	Somente GFP-CMMO ↑ sobrevida (~10d) e melhoram função motora; não houve diferença na perda de peso entre os grupos	Não houve diferença nos números de motoneurônios, axônios e células microgliais entre transplante com GFP ou mSOD1-CMMO	Células GFP ⁺ na substância cinzenta ventral, algumas com morfologia microglial; expressão de Iba-1, mas não de GFAP, NeuN ou O4

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Park et al. 2009)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 75d (pré-sintomático)	10 µL de hNP, GF-hNP; intratecal (cisterna magna); CsA 10mg/kg	IGF1-hNP e GDNF-hNP promoveram melhora transiente no desempenho motor; GDNF-hNP ↓sobrevida (~10d), demais não foram diferentes do controle para este parâmetro; sobrevida fêmeas menor do que machos.	GDNF-hNP preservam motoneurônios	hNPs migram pelo espaço subaracnoideo e se enxertam na substância branca da ME; células GFAP ⁺ migram para a substância cinzenta 4s pT; há expressão de TUJ1, GFAP e raramente oligodendrócitos CNPase ⁺ ; algumas células expressam EAAT2 e GDNF
(Xu et al. 2009)	Ratos SOD1 ^{G93A} ; ambos; 8s (pré-sintomático)	2x10 ⁴ hNSC (4 injeções bilaterais); intra-espinhal (L4-L5); FK506 1mg/kg/dia	NA	NA	hNSC com terminais sinaptofisina-positivos contendo vesículas sinápticas, formando sinapses com motoneurônios do hospedeiro
(Zhang et al. 2009)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; não informado; 8s (pré-sintomático) ou múltiplos (8,10 e 12s)	5x10 ⁵ hMSC; intratecal	Transplante múltiplo melhora função motora, peso e prolonga sobrevida; efeito não observado para transplante único	Transplante múltiplo preserva motoneurônios	Poucas células migraram para o parênquima da ME

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Corti et al. 2010)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 70d (pré-sintomático)	1x10 ⁶ Wt-Lin-c-kit ⁺ , mSOD-Lin-c-kit ⁺ ou GLT1-kd-c-kit ⁺ ; i.v. (veia da cauda); s/i	Células de doadores wt ↑ sobrevida (16-17d), ↓ progressão, atrasam início, ↑ desempenho motor; células mSOD não promoveram modificações	Células de doadores wt ↑ densidade axonal, ↓ perda de motoneurônios, ↓ resposta inflamatória medida por microglia, preservam níveis de GLT1, ↑ VEGF e Ang2; células mSOD ↓ VEGF e Ang2	Células nas substâncias branca e cinzenta da ME, em especial corno anterior, maior número nas regiões lombar e cervical; proliferam, poucas se dividem <i>in vivo</i> , não expressando marcadores neurais
(Kim et al. 2010)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 60d (pré-sintomático)	1x10 ⁴ , 2x10 ⁵ ou 1x10 ⁶ hMSC (obtidas de pacientes com ELA); intratecal (cisterna magna); CsA 10mg/kg/dia	↑ sobrevida dose de 2x10 ⁵ e 1x10 ⁶ , maior efeito observado para 1x10 ⁶ células (~10d) que também preserva função motora; não foram observadas diferenças no início da doença, peso ou entre os sexos	↓ perda de motoneurônios nas doses de 2x10 ⁵ e 1x10 ⁶ células (maior efeito para 1x10 ⁶)	hMSC encontradas no sistema ventricular e espaço subaracnóideo, algumas migraram para o cérebro e ME
(Mitrecic et al. 2010)	Ratos SOD1 ^{G93A} ; ambos, 14s (pré-sintomático) e 26s (sintomático)	10 ⁷ GFP-NSC ou 10 ⁷ GFP-NSC + TNF (150ng); veia da cauda; s/i.	NA	NA	NSC córtex, hipocampo e ME, ↑ quantidade nos sintomáticos; expressão inicial nestina com ↓, passando a MAP2, GFAP, O4 e CD68; total células ↓ 3 e 7d pT; TNF ↑ sobrevivência e diferenciação celular

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Bigini et al. 2011)	Camundongo SOD1 ^{G93A} e wobbler; fêmeas e ambos; 10s e 4s (pré-sintomático)	500.000 ou 300.000 HUCB para SOD1 ^{G93A} , ou wobbler; i.c.v.; CsA 40mg/kg/dia	Melhora dos sintomas da progressão em ambos modelos e ↑ sobrevida animais SOD1 ^{G93A} (18d)	Discreta neuroproteção motoneurônios nos wobbler; secreção de citocinas e fatores tróficos pelas HUCB <i>in vivo</i>	HUCB observadas nos ventrículos laterais até 4m pT, não foram encontradas células na ME; pequeno número expressou nestina e GFAP
(Wyatt et al. 2011)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; não informado; 60d (pré-sintomático)	40.000 hMNP; intra-espinhal; FK506 + Rapamicina 1 mg/kg/dia	NA	↑ níveis de NGF e NT-3, mas não de VEGF; preservação motoneurônios	Células não migraram a partir do local de injeção; expressão de NeuN, p75, TUJ1 e ChAT
(Hefferan et al. 2011)	Rato SOD1 ^{G93A} ; ambos; 60-67d (pré-sintomático)	5 x 10.000 hNSC; intra-espinhal (bilateral, L2-L5); FK506 (1,5 mg/kg) ou micofenolato (30mg/kg) + FK506 (3 mg/kg) ou micofenolato (30mg/kg) + FK506 (3 mg/kg)	NA	NA	Em animais tratados com FK506 + micofenolato hNSC migram até 500 µm; ↑ sobrevivência das hNSC com este tratamento; 3s pT hNSC expressam duplacortina, com brotamento axodendrítico extenso em direção aos neurônios do animal transplantado

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Forostyak et al. 2011)	Ratos SOD1 ^{G93A} ; machos; 16s (sintomático precoce)	5x10 ⁴ GFP-MSC intra-espinhal + 2x10 ⁶ GFP-MSC i.v.; CsA 10 mg/kg/dia	Preservação da função motora e ↑ sobrevida (11d)	Preservação de motoneurônios e ↓ marcação destes por TUNEL	Células sobrevivem na medula espinhal até eutanásia do animal e migram nas direções rostral e caudal
(Lepore et al. 2011)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 50-60d (pré-sintomático)	2,5x10 ⁴ ou 7,5x10 ⁴ hGRP; intra-espinhal (C4-C5); CsA (10 mg/kg) ou FK-506 + Rapamicina	Sem benefício terapêutico	Não houve alteração nos níveis de GLT1, e densidade de motoneurônios	GRP s nas substâncias branca e cinzenta da ME, migraram rostral e caudalmente até 6mm; expressão de GFAP, Iba1 e Olig2, interagiram com motoneurônios espacialmente
(Souayah et al. 2012)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; fêmeas; 5-6s (pré-sintomático)	100x10 ⁶ HUCB; i.v. (retro-orbital); s/i	HUCB promovem melhora da probabilidade de transmissão neuromuscular em preparações nervo-musculares do sóleo	NA	NA

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Canzi et al. 2012)	Camundongo wobbler; não informado; 4s (pré-sintomático)	5x10 ⁵ Células-tronco derivadas do músculo esquelético (humanas); i.c.v.; s/i.	Atenuada a progressão da alteração de adução da pata dianteira, melhora da força muscular a partir de 6s de vida	Transplante não reduz taxa de perda de motoneurônios, mas preserva parcialmente integridade das fibras musculares; ↑ expressão gênica de IL-10, IL-10RA e IL-13, bem como ↑ proteína IL-10 e IL-13	1d pT células no sistema ventricular, 1s pT no ventrículo lateral, região periaquedutal, cisterna magna e meninge da ME, 18s pT houve pequena integração no parênquima cerebral; <i>in vitro</i> expressam nestina, GFAP e β-tubulina III
(Pastor et al. 2012)	Camundongo <i>mdf/mcd</i> ; não informado; Pré-sintomático e sintomático	1x10 ⁶ GFP-CMMO ou 500.000 GFP-MSK; intra-espinhal (corno anterior); s/i.	CMMO promovem melhora da função motora em 55% dos animais tratados; transplante de MSC promove melhora de 33% dos animais	↑ expressão de GDNF na área do implante de CMMO; para MSC os níveis foram similares, mas não houve diferença estatística vs não-tratados	Clusters de CMMO no local da injeção; migraram 0,5cm rostral e caudalmente; muitas próximas a vasos sanguíneos; 30% das MSC apresentaram mesma distribuição, MSC não sobrevivem na ME e entram em apoptose (caspase-3 ⁺); não houve transdiferenciação ou fusão celular

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Garbuzova-Davis et al. 2012)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; machos; 8-9s (pré-sintomáticos) e 13s (sintomático)	10 ⁶ ou 2,5x10 ⁶ HUCB semanalmente em animais sintomáticos e 10 ⁶ HUCB semanalmente em animais pré-sintomáticos; i.v. (veia dorsal superficial do pênis); s/i	↑ sobrevida (~10d) grupo de animais pré-sintomáticos e sintomáticos quando dose 2,5x10 ⁶ , com melhora do e melhora do desempenho motor; em animais pré-sintomáticos retardo perda de peso e de função motora	HUCB ↓ perda de motoneurônios em animais pré-sintomáticos e sintomáticos com dose 2,5x10 ⁶ ; HUCB ↓ densidade microglial e densidade de astrócitos em todos os grupos tratados	HUCB detectadas na ME, cérebro e órgãos abdominais 4 ou 8s pT; mais de 50% das células no corno ventral
(Knippenberg et al. 2012)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 40d (pré-sintomático) ou 90d (sintomático precoce)	200.000 HUCB; intra-espinhal; CsA 25 mg/kg/dia	Tratamento aos 40d ↑ sobrevida (12d), ↓ perda de peso e melhora atividade locomotora; resultado mais evidente para fêmeas	Tratamento aos 40d ↓ em até 50% perda de neurônio motor e ↓ 40% ativação astrocítica; Para os dois períodos de tratamento houve ↑ níveis de HSP70 na ME; não houve diferença nos níveis de BDNF, CNTF, GDNF, IGF-1 e VEGF	Detecção de células até 9s pT no corno ventral da ME; sem co-localização com marcadores neuronais ou gliais

Referência	Modelo; sexo; idade dos animais*	Concentração e tipo de célula; via de administração; imunossupressão	Resultados observados na avaliação da sobrevida e da funcionalidade	Resultados observados na avaliação morfológica e/ou molecular	Migração e diferenciação celular
(Uccelli et al. 2012)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 90d (sintomático precoce)	10 ⁶ wt-MSC; i.v. (veia da cauda); s/i	↑ sobrevida (~15d) e atraso na progressão da doença medido por testes motores e peso corporal	↓ células reativas a ubiquitina, células GFAP ⁺ e microglia, sem alteração na densidade de motoneurônios e células positivas para GLT1; entretanto, expressão de mRNA nos animais tratados dobrou; ↓ expressão de RNA para TNFα e IL1β; ↓ estresse oxidativo; ↓ liberação de aspartato	Células detectadas em toda ME 24 e 48h pT, número menor de células detectadas 20d pT e desapareceram quase totalmente 35d pT
(Choi et al. 2012)	Camundongo SOD1 ^{G93A} ; ambos; 8s (pré-sintomático); 14-16s (sintomático) e múltiplo (13 e 15s)	1x10 ⁶ hMSC ou Ngn1-MSC; i.v. (veia da cauda); CsA 4mg/kg	8s: Ngn1-MSC atrasa progressão e ↑ sobrevida (~3d), MSC não tem efeito; sintomáticos: melhora motora com MSC ou Ngn1-MSC, mas somente últimas ↑ sobrevida (~7d)	↑ número de motoneurônios; maior preservação observada para Ngn1-MSC quando comparada com MSC	Ambos tipos de células detectados na ME, mas Ngn1-MSC em maior número; migração parece envolver MCP-1; não se diferenciaram

* Os animais foram considerados pré-sintomáticos, sintomáticos precoces ou sintomáticos de acordo com os critérios revisados por Turner e Talbot (Turner and Talbot 2008).

↑: Aumento

↓: Redução

~: Valor aproximado

Abreviações: **Ang2:** Angiopietina 2; **BDNF:** Fator neurotrófico derivado do cérebro; **ChAT:** Colina Acetiltransferase; **CMMO:** Células mononucleares da medula óssea; **CNPase:** 2'3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase (marcador de oligodendrócitos); **CTNF:** Fator Trófico Ciliar do Nervo; **d:** Dias; **EAAT2:** Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 2; **CsA:** Ciclosporina; **GDNF:** Fator neurotrófico derivado da glia; **GF:** Fatores tróficos; **GFAP:** Proteína glial fibrilar ácida; **GFP:** Expressão da proteína fluorescente verde; **GLT-1:** Transportador glial de glutamato; **GRP:** Células precursoras glia-restritas; **h:** Humanas; **hMNP:** Células precursoras de motoneurônios humanas; **hNT:** Células de linhagem neuronal humana; **hNSC:** Células-tronco neurais humanas; **HUCB:** Sangue cordão umbilical humano; **HUCB-NSC:** células neurais derivadas de células-tronco do sangue do cordão umbilical; **Iba-1:** Molécula adaptadora da ligação de cálcio ionizado 1 (marcador microglia ativada); **i.c.v.:** intracerebroventricular; **IGF-1:** Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; **IGF1-R:** Receptor fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; **IGFBP5:** Proteína ligante 5 do fator de crescimento semelhante à insulina; **IL-10:** Interleucina 10; **IL-13:** Interleucina 13; **IL-10R:** Receptor interleucina 10; **IL-1 β :** Interleucina 1 beta; **i.p.:** intraperitoneal; **i.v.:** Intravenoso; **HSC:** Células-tronco hematopoiéticas; **HSP70:** proteína de choque térmico induzível 70; **m:** Meses; **MCP-1:** Proteína quimioatrativa de monócito 1; **MAP2:** Proteína associada à microtúbulo-2; **ME:** Medula espinhal; **MO:** Medula óssea; **MSC:** Células-tronco mesenquimais; **MSC-NSC:** células neurais derivadas de células-tronco mesenquimais; **mSOD1:** Expressão da proteína SOD1 mutante; **NA:** Não avaliado; **Ngn1:** Neurogenina 1; **NeuN:** Núcleo neuronal; **NF:** Neurofilamento; **NGF:** Fator de crescimento neural; **NT-3:** Neurotrofina 3; **NSE:** Enolase neurônio-específica; **OEC:** Células olfativas embainhantes; **Olig2:** Fator de transcrição de oligodendrócitos 2; **O4:** Marcador de oligodendrócito 4; **pT:** Pós-transplante; **p75:** Receptor de neurotrofina; **Rip:** Marcador de oligodendrócito; **s:** Semanas; **s/i.:** Sem imunossupressão; **TNF α :** Fator de necrose tumoral alfa; **TUJ1:** Beta tubulina classe III; **SNC:** Sistema nervoso central; **VEGF:** Fator de crescimento do endotélio vascular; **wt:** Wild-type; **YFP:** Expressão da proteína fluorescente amarela.

Tabela 2. Revisão dos estudos clínicos utilizando terapia celular na ELA.

Referência e país de realização do estudo	Tipo de estudo, número e características clínicas dos pacientes	Tipo de célula, dose, via de administração e uso de imunossupressão	Resultados observados
(Janson et al. 2001) Estados Unidos	Relato de caso; 3 pacientes	Células CD34 ⁺ isoladas do sangue periférico; 10 ⁵ - 10 ⁷ células; administração intratecal	Não houve alteração clínica
(Mazzini et al. 2003) Itália	Fase I; 7 pacientes com diagnóstico de ELA definitiva baseado no El Escorial, comprometimento medular, mas sem ou com pouco envolvimento bulbar, sem sinais de falência respiratória	Células-tronco mesenquimais da medula óssea; diferentes doses; implante na medula espinhal torácica	Não houve manifestação de efeitos adversos graves; foram observados pequenos eventos adversos como irradiação de dor intercostal e alterações de sensibilidade nas pernas, ambos reversíveis; não foram observadas modificações do volume da medula espinhal ou formação de tumores
(Appel et al. 2008) Estados Unidos	6 pacientes com diagnóstico de ELA definitiva de acordo com El Escorial	Infusão de células CD34 ⁺ de doador alogênico; pacientes foram irradiados com 450cGy e tratados com fludarabina, ATG e tracolimus	Células transplantadas migraram ao sistema nervoso central e podem ter papel imunomodulatório; entretanto, não se observou melhora clínica

Referência e país de realização do estudo	Tipo de estudo, número e características clínicas dos pacientes	Tipo de célula, dose, via de administração e uso de imunossupressão	Resultados observados
(Mazzini et al. 2008) Itália	Fase I; 9 pacientes com diagnóstico de ELA definitiva baseado no El Escorial, comprometimento medular, sem ou pouco envolvimento bulbar, sem sinais de falência respiratória	Células-tronco mesenquimais da medula óssea; entre 7.0×10^6 e 152×10^6 ; implante na medula espinal torácica	Procedimento foi seguro: acompanhamento de 4 anos não revelou efeitos colaterais; não houve alteração morfológica ou formação de tumor; 4 pacientes apresentaram retardo no declínio da capacidade vital, medido pelo escore ALS-FRS
(Deda et al. 2009) Turquia	Fase II; 13 pacientes com ELA confirmada por ENMG e duração superior a 6 meses; recebendo terapia medicamentosa máxima e em rápido declínio neurológico: capacidades vitais em período terminal e dependência de ventilação mecânica	Células mononucleares da medula óssea; pelo menos 10^6 células; implante na medula espinal (C1-C2)	Pacientes acompanhados por 1 anos após o transplante; melhora clínica em comparação com status pré-operatório; 1 paciente permaneceu estável, sem melhora nem declínio; 3 pacientes faleceram após 1,5, 2 e 9 meses por infecção pulmonar ou infarto do miocárdio
(Martinez et al. 2009) México	10 pacientes; diagnóstico baseado no El Escorial, ressonância magnética excluindo dano ao cérebro ou medula espinal, presença de valores de capacidade vital forçada e estado nutricional adequado	Células CD133 ⁺ isoladas da fração mononuclear do sangue periférico; 10^5 células; córtex frontal motor	O procedimento foi seguro e bem tolerado; em comparação com grupo controle não tratado, observou-se sobrevida estatisticamente superior para os pacientes que receberam células CD133 ⁺

Referência e país de realização do estudo	Tipo de estudo, número e características clínicas dos pacientes	Tipo de célula, dose, via de administração e uso de imunossupressão	Resultados observados
(Gamez et al. 2010) Espanha	Observacional; 12 pacientes que fizeram transplante em 3 centros distintos na China, Grécia e Alemanha; 5 pacientes apresentando ELA definitiva e 7 clinicamente provável por El Escorial	2×10^5 células olfatórias embainhantes via intracerebral, ou células-tronco mesenquimais da medula óssea por via intratecal, ou células CD34 ⁺ da medula óssea por via intratecal	Não foram observados efeitos adversos graves; também não se observaram alterações no curso clínico natural da ELA
(Karussis et al. 2010) Estados Unidos	Fase I/II; 19 pacientes; diagnóstico de ELA com base no El Escorial, não gestando e com idade entre 25 e 65 anos se mulher, com progressão de sintomas e deterioro de pelo menos 5 graus na ALSFRS	Células-tronco mesenquimais da medula óssea; média de 54.7×10^6 por via intratecal; 9 pacientes também receberam $24,5 \times 10^6$ células por via endovenosa	Não foram observados efeitos adversos graves; escore ALSFRS se manteve estável após 6 meses de acompanhamento; 24 horas após o transplante detectados níveis elevados na proporção de células T CD4 ⁺ e CD25 ⁺ , diminuição da resposta linfocítica proliferativa, e expressão de CD40, CD83, CD86 e HLA-DR em células dendríticas mieloides
(Mazzini et al. 2010) Itália	Fase I número 16454-pre21-823; 10 pacientes com ELA de início medular, evolução de menos de 3 anos, evidência de progressão nos últimos 6 meses, escore mínimo de 3 na ALSFRS para deglutição e 2 para manuseio de utensílios e caminhar	Células-tronco mesenquimais da medula óssea; diferentes doses; implante no corno ventral da medula espinhal em T4-T5, T5-T6	O procedimento foi seguro: testes clínicos, laboratoriais e de imagem não verificaram nenhum efeito adverso grave; também não foi observada toxicidade relacionada ao transplante, nem formação de tumores

Referência e país de realização do estudo	Tipo de estudo, número e características clínicas dos pacientes	Tipo de célula, dose, via de administração e uso de imunossupressão	Resultados observados
(Cordes et al. 2011) Alemanha	Relato de caso; paciente do sexo masculino, 63 anos, diagnosticado com ELA, com escore de 25/48 na ALSFRS-R	Células CD34 ⁺ de sangue de cordão umbilical; 4×10^5 ; implante medula espinhal torácica	Ausência de efeitos adversos ou de alterações morfológicas na medula espinhal; paciente apresentou menor declínio da condição clínica
(Mazzini et al. 2012) Itália	Fase I; 19 pacientes; ensaios clínicos de 2001 e 2003 (números de registro 12947 – 29.3 e 16454 – pre21 – 823, respectivamente); no primeiro foram recrutados pacientes com comprometimento grave do membro inferior, devido ao risco da cirurgia; no segundo, pacientes com escore mínimo de 3 na ALSFRS para deglutição e 2 para manuseio de utensílios e caminhar	Células-tronco mesenquimais da medula óssea; diferentes doses; implante na medula espinhal na vértebra T7-T9 durante o primeiro estudo e T4-T6 no segundo	Não houve benefício clínico, entretanto amostra é pequena para testar eficácia; pacientes acompanhados por aproximadamente 9 anos; procedimento é seguro, imagens de ressonância magnética não apontaram alterações estruturais, nem formação de tumores
(Moviglia et al. 2012) Argentina	7 pacientes com tempo de evolução entre 3 e 5 anos, nenhum com uso de ventilação mecânica, pesando mais de 40 kg	Vacina de células T combinada com células-tronco neurais diferenciadas a partir de células-tronco mesenquimais; transplante seguido de neuroreabilitação	Redução do hematócrito após punção da medula óssea, mas não foram detectados efeitos adversos graves; houve melhora da condição clínica – avaliada pela escala ALSFRS-R, e aumento da sobrevida média

Referência e país de realização do estudo	Tipo de estudo, número e características clínicas dos pacientes	Tipo de célula, dose, via de administração e uso de imunossupressão	Resultados observados
(Blanquer et al. 2012) Espanha	Fase I; 11 pacientes; diagnóstico ELA definitiva por El Escorial, início medular e duração da doença entre 6 e 36 meses, com diminuição da capacidade vital forçada e saturação de oxigênio inferior a 90% em 2% do tempo de sono	Células mononucleares da medula óssea; implante medular no nível vertebral T3-T4	Não foram observados efeitos adversos graves; ocorreram 43 eventos não severos, mas a grande maioria for reversível, sendo somente 4 presentes ao final do acompanhamento; não foi observada alteração no declínio clínico; a análise histológica revelou maior número de motoneurônios em segmentos tratados, acompanhados de células CD90 ⁺ que não continham depósitos de ubiquitina
(Glass et al. 2012) Estados Unidos	Fase I; 12 pacientes; apresentando ELA diagnosticada por exame laboratorial ou de acordo com El Escorial, não gestando (quando mulher), sem uso de riluzole em dose estável por 30 dias	Células-tronco derivadas da medula espinhal; 100.000 células; nível vertebral T11-T12; metilprednisolona antes da cirurgia e prednisona 60 mg por até 1 mês, duas doses de basiliximab (20 mg), tracolimus via oral em níveis 4-8 ng/ml, e micofenolato 1000 mg	Transplante bem tolerado, sem efeitos adversos graves relacionados com a presença das células-tronco neurais; tratamento não acelerou a progressão da doença, e 1 paciente apresentou melhora clínica

Um dos primeiros relatos clínicos é o de Janson e colaboradores (Janson et al. 2001). Neste estudo, foram administradas células CD34⁺ a três pacientes, que apesar de tolerarem bem o procedimento, não apresentaram alterações neurológicas significativas. O maior aumento no volume de estudos clínicos se deu especialmente após o estudo testando células-tronco da MO, realizado por Mazzini e colaboradores em 2003 (Mazzini et al. 2003). Abordagens que utilizam HUCB (Cordes et al. 2011) e NSC (Gamez et al. 2010; Glass et al. 2012; Moviglia et al. 2012; Riley et al. 2012) têm sido estudadas. Entretanto, a grande maioria dos estudos utiliza células-tronco da MO (Appel et al. 2008; Mazzini et al. 2008; Deda et al. 2009; Martinez et al. 2009; Gamez et al. 2010; Karussis et al. 2010; Mazzini et al. 2010; Blanquer et al. 2012; Mazzini et al. 2012).

Os resultados obtidos até o momento indicam que o procedimento, mesmo com variações no tipo celular, dose e via de administração é seguro e bem tolerado pelos pacientes, mesmo com a administração intramedular das células. Por se tratarem em grande parte de relatos de caso e ensaios clínicos de fase I, não há relatos consistentes a respeito da eficácia do tratamento, que ainda é controversa (Appel et al. 2008; Deda et al. 2009; Martinez et al. 2009; Gamez et al. 2010). Apesar disso, e desses estudos contarem com um número limitado de pacientes, o uso de células-tronco neurais em associação com vacina imunológica (Moviglia et al. 2012), assim como o transplante de células obtidas a partir da MO parece promover benefício terapêutico (Martinez et al. 2009). Também foram relatados efeitos imunomodulatórios (Karussis et al. 2010) e neurotróficos (Blanquer et al. 2012).

É possível que os dados de eficácia limitados observados em alguns desses estudos se devam ao fato de terem sido baseados em estudos experimentais conduzidos durante fases pré-sintomáticas da doença. Como ainda não existem marcadores precoces de ELA em humanos, os pacientes procuram atendimento médico somente após o desenvolvimento dos primeiros sintomas (salvo exceções em que há herança familiar). Além disso, o diagnóstico, que é feito por exclusão, em geral leva quase um ano para ser definido, limitando o período para intervenção terapêutica às fases sintomáticas da doença. Considerando a possibilidade de translação clínica dos dados obtidos em animais, torna-se urgente a necessidade de estudos que avaliem abordagens terapêuticas em animais que já desenvolveram fraqueza e atrofia muscular.

O objetivo principal do estudo aqui proposto foi justamente determinar se a administração intravenosa de células mononucleares da MO em camundongos que já

manifestam ELA é capaz de reverter a história natural da doença. Este estudo foi delineado de maneira a permitir que os resultados obtidos a partir desta investigação sejam mais facilmente translacionados para o paciente, seja pela escolha da via de administração, períodos de intervenção ou tipo de célula. Além disso, a opção por células-tronco da MO se baseou na maior segurança imunológica e oncológica do seu uso. Por outro lado, este estudo também buscou determinar se o transplante autólogo promove benefícios comparáveis ao do transplante de células que não expressam mutação. Assim, mesmo se tratando de um estudo em modelo animal, a relevância deste trabalho está na sua possível aplicabilidade clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi verificar se as células mononucleares da medula óssea (CMMO) apresentam potencial terapêutico em camundongos transgênicos que superexpressam SOD1^{G93A}.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar comparativamente a sobrevivência de camundongos transgênicos SOD1^{G93A} tratados com CMMO aos 70 ou 110 dias de vida e comparar com grupo controle;
- Avaliar, por teste de Rotarod e eletroneuromiografia, a função neuromotora dos animais transgênicos SOD1^{G93A} tratados com CMMO aos 70 ou 110 dias de vida e comparar com grupo controle;
- Avaliar a perda de peso associada à progressão da ELA em animais transgênicos SOD1^{G93A} tratados com CMMO aos 70 ou 110 dias de vida e comparar com grupo controle;
- Avaliar, através de *nested* PCR, a presença de células transplantadas detectáveis na medula espinhal de camundongos SOD1^{G93A};
- Avaliar se o transplante de CMMO em camundongos SOD1^{G93A} previne o dano ao DNA medido pelo ensaio cometa alcalino;
- Quantificar neurônios motores em animais transgênicos SOD1^{G93A} tratados com CMMO aos 70 ou 110 dias de vida e comparar com grupo controle.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Durante este estudo foram utilizados 134 camundongos transgênicos, da linhagem B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, que superexpressam SOD1 humana com a mutação Gly93→Ala (Gurney et al. 1994). Os animais foram adquiridos junto ao Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). A colônia foi mantida através do acasalamento de portadores heterozigotos machos com fêmeas híbridas B6SLJ. Os animais transgênicos foram genotipados pela técnica de PCR a partir de DNA obtido do sangue da cauda. Para amplificar o transgene foram utilizados os *primers* direto 5'-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3' e reverso 5'-CGCGACTAACAATCAAAG-3', resultando em um fragmento de 236 pb. Um fragmento correspondente à interleucina-2 murina foi amplificado como controle positivo. Os fragmentos resultantes foram visualizados em gel de agarose. Também foram utilizados 20 camundongos C57BL/6N transgênicos e adultos que expressam EGFP (Okabe et al. 1997) (*enhanced green fluorescent protein*) (C57BL/6-EGFP), pesando entre 25 e 30 gramas. Animais transgênicos SOD1^{G93A} (n=20), também foram doadores de CMMO.

Os animais foram mantidos no alojamento do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob iluminação e temperatura controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas e aproximadamente 24°C). Todos os animais tiveram livre acesso à comida e à água, tendo sido adicionada ração dentro da gaiola dos camundongos transgênicos SOD1^{G93A} a partir de sua 15ª semana de vida.

3.1.1 Aspectos Éticos

Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (CEUA 09/00091) e seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório. Todos os procedimentos foram realizados

tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e seu sofrimento.

3.1.2 Modelo experimental

Após ter sido feita a descoberta de que mutações da SOD1 estavam associadas com a ELA familiar, foi gerado um modelo transgênico pela superexpressão de um alelo mutante de SOD1 (Gurney et al. 1994). O transgene SOD1^{G93A} foi desenhado a partir de um gene mutante humano da SOD1 que possui uma única substituição de aminoácido: glicina por alanina no códon 93. Os animais transgênicos SOD1^{G93A} são considerados um bom modelo para o estudo da ELA, e têm sido extensivamente utilizados em investigações de mecanismos patofisiológicos, bem como em estudos que avaliam alternativas terapêuticas para o tratamento da doença.

Neste modelo, ocorre degeneração progressiva de neurônios motores do corno ventral da medula espinhal, levando a fraqueza progressiva e sobrevida limitada, com sintomas fenotípicos e patológicos que se assemelham à ELA em humanos (Figura 3). O aparecimento dos primeiros sintomas ocorre em torno do 90º dia de vida (Gurney et al. 1994). Patologicamente, há grande perda axonal, coincidente com o declínio da função motora e perda de neurônios contendo colina acetiltransferase (ChAT) (Gurney et al. 1994; Fischer et al. 2004). A análise patológica desses animais também demonstra haver vacuolização mitocondrial, fragmentação do aparelho de Golgi, inclusões de neurofilamentos e agregados SOD1-reativos, além de astrocitose e microgliose (revisado por (Turner and Talbot 2008)). Os sintomas são progressivos e os animais têm uma vida média de 17-20 semanas (Weydt et al. 2003).

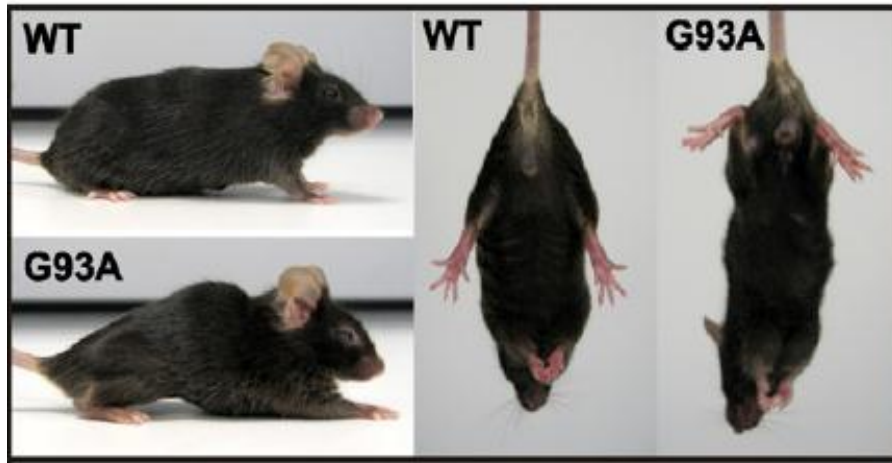


Figura 3. Figura comparativa das características fenotípicas de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$ (G93A) e camundongos Wild-Type (WT). Os animais transgênicos apresentam sintomas fenotípicos característicos da ELA como atrofia muscular dos membros posteriores e cifose acentuada. Adaptado de (Turner and Talbot 2008).

3.2 Delineamento Experimental

Para este estudo, foram estabelecidos dois tempos distintos para intervenção (transplante de CMMO): 70 ou 110 dias de vida. Também foram testadas CMMO de origens diferentes: obtidas da MO de camundongos C57BL/6-EGFP ou de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$. Os grupos experimentais estão descritos a seguir:

- i) $EGFP$ CMMO-70: constituído de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$, que receberam aos 70 dias de vida (pré-sintomático) transplante de CMMO obtidas a partir de camundongos C57BL/6-EGFP (n = 14);
- ii) $mSOD1$ CMMO-70: constituído de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$, que receberam aos 70 dias de vida (pré-sintomático) transplante de CMMO com a $SOD1$ mutada ($mSOD1$) obtidas também a partir de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$ (n = 15);
- iii) $EGFP$ CMMO-110: constituído de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$, que receberam aos 110 dias de vida (sintomático) transplante de CMMO obtidas a partir de camundongos C57BL/6-EGFP (n = 15);

- iv) m^{SOD1} CMMO-110: constituído de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$, que receberam aos 110 dias de vida (sintomático) transplante de CMMO obtidas também a partir de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$ ($n = 14$);
- v) SAL: constituído de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$ não tratados com as alternativas terapêuticas propostas neste projeto, tendo recebido em seu lugar solução salina no mesmo volume ($n = 23$). Estes animais foram inicialmente distribuídos em dois grupos, recebendo salina aos 70 ou 110 dias de vida. Entretanto, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os dois períodos, de maneira que os animais foram reagrupados em um único grupo experimental.

Para avaliar o efeito do transplante celular no aparecimento e progressão dos sintomas de ELA, os animais foram submetidos à triagem de pesagem e testes motores utilizando o Rotarod (Knippenberg et al. 2010), conforme ilustram as figuras 4 e 5. Após a eutanásia, computou-se a sobrevida dos animais e foram coletadas amostras teciduais para avaliação por PCR.

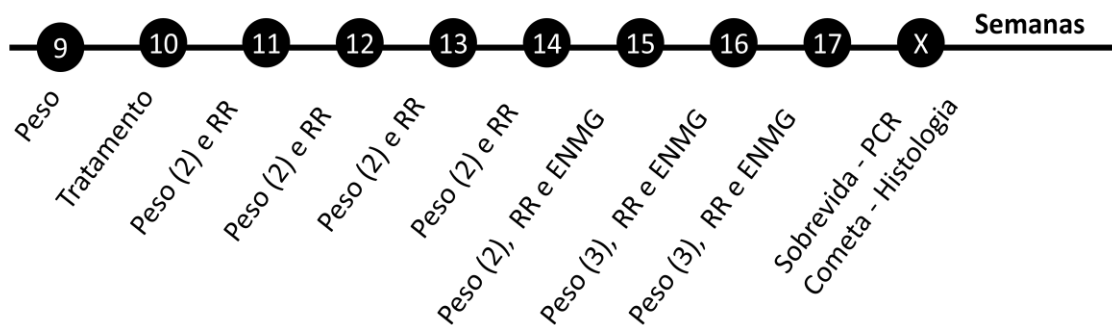


Figura 4. Delineamento temporal do estudo para animais tratados aos 70 dias de vida (10ª semana, pré-sintomático). RR: Rotarod; ENMG: Eletroneuromiografia; os números 2 e 3 indicam número de pesagens e a letra X que os animais foram acompanhados semanalmente até serem eutanasiados de acordo com os parâmetros de análise da sobrevida.

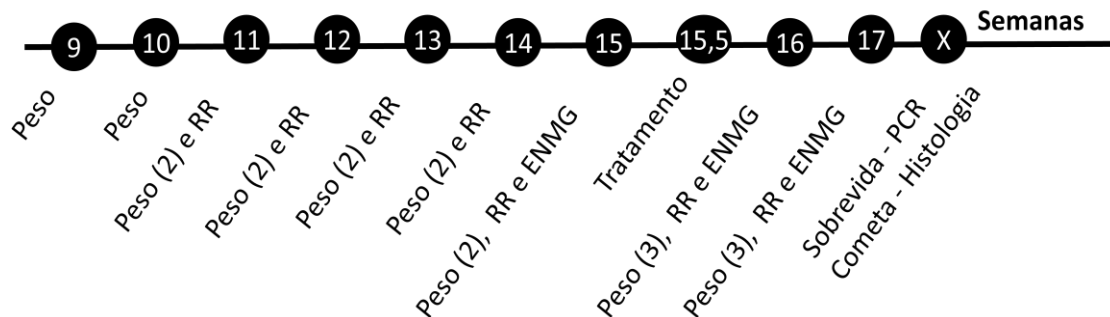


Figura 5. Delineamento temporal do estudo para animais tratados aos 110 dias de vida (entre a 15ª e 16ª semanas, sintomático). RR: Rotarod; ENMG: Eletroneuromiografia; os números 2 e 3 indicam número de pesagens e a letra X que os animais foram acompanhados semanalmente até serem eutanasiados de acordo com os parâmetros de análise da sobrevida.

Grupos adicionais de camundongos:

- a) Foram tratados conforme previamente descrito, mas foram eutanasiados aos 120 dias de vida para análise histológica (n = 5 por grupo);
- b) Receberam transplante de $mSOD1$ CMMO ou $EGFP$ CMMO e foram eutanasiados 24 horas, sete dias ou 14 dias após o transplante para avaliação por PCR (n = 2 por grupo).
- c) Foram transplantados com $EGFP$ CMMO ou tratados com salina nos dois períodos avaliados e eutanasiados aos 120 dias de vida. Amostras teciduais foram coletadas para o ensaio do cometa alcalino (n=4 por grupo).

O estudo foi delineado de maneira que os animais da mesma ninhada fossem distribuídos igualmente entre os grupos. O mesmo número de camundongos machos e fêmeas foi distribuído entre os grupos experimentais para minimizar um efeito sistêmico relacionado ao gênero na resposta ao tratamento. Todos os procedimentos foram realizados por observadores cegos ao tratamento recebido pelos animais.

3.3 Preparação das Células Mononucleares da Medula Óssea (CMMO)

As CMMO foram obtidas de camundongos C57BL/6-EGFP ou camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$. Após os animais terem sido anestesiados e dissecados, a MO de ossos longos (úmero, fêmur e tíbia) foi aspirada com o auxílio de uma agulha de 26 G contendo heparina (10.000 U em 50 mL de PBS). O material foi centrifugado a $400 \times g$ por 10 minutos. As células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 e fracionadas em

gradiente de densidade gerado pela centrifugação a $400 \times g$ em uma solução de Ficoll-Paque (Histopaque 11191, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA). A camada mononuclear formada sobre o Ficoll-Paque foi coletada e lavada com DPBS. As concentrações celulares foram determinadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com azul de tripan. A figura 6 apresenta algumas etapas deste procedimento.

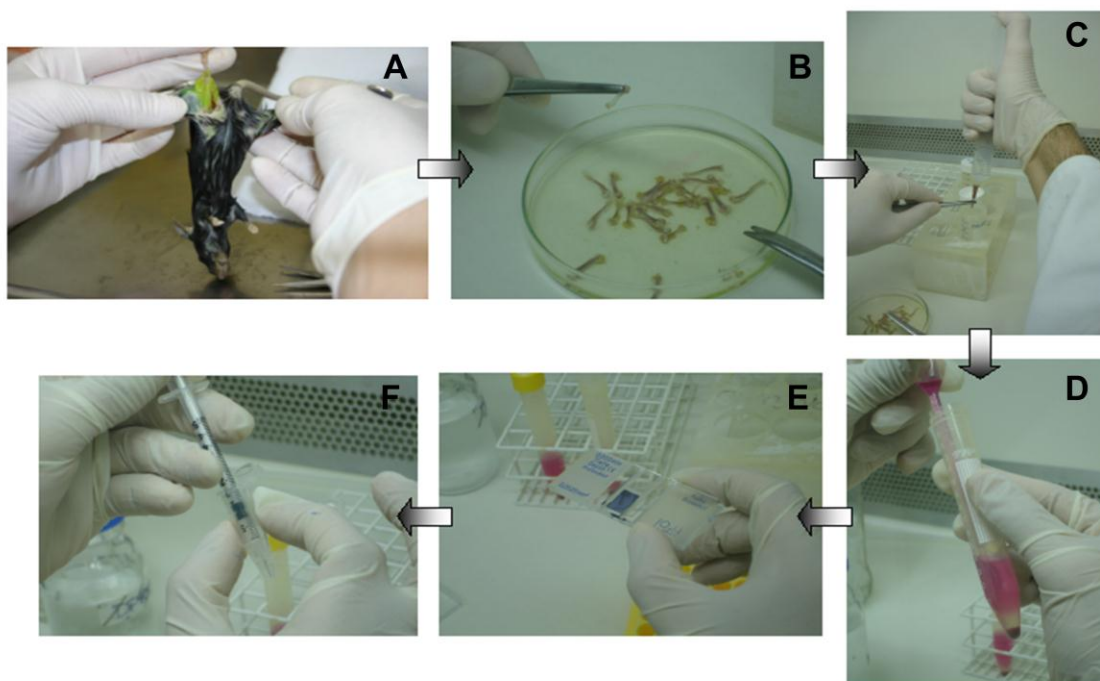


Figura 6. Obtenção de CMMO de camundongos C57BL/6-EGFP. (A) Animais são anestesiados e dissecados, (B) isolam-se os ossos longos e (C) procede-se a lavagem das cavidades ósseas. O material coletado é processado em centrifugações e ressuspensões; (D) a camada de células mononucleares é obtida por gradiente de Ficoll-Paque, (E) e as células são contadas em câmara de Neubauer e (F) aliqüotadas.

3.4 Caracterização das Populações Celulares Presentes

Para a detecção dos antígenos de superfície, as CMMO foram incubadas com anticorpos conjugados contra CD8a, CD34, CD19, CD117, CD45 e Sca1. As células marcadas foram coletadas e analisadas por um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, EUA). Uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ de MO

foi utilizada para a caracterização das populações celulares para cada par de anticorpos. Foram acrescentados 20 μL de cada anticorpo e a solução foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a $200 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. A amostra foi lavada com 2 mL de PBS (PBS, 0,1% de azida sódica e 1% de FBS) por centrifugação a $200 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 500 μL de PBS. As amostras foram analisadas em até 8 horas.

3.5 Transplante das CMMO

Os camundongos transgênicos $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ receberam o transplante das CMMO aos 70 ou aos 110 dias de vida. Os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina para facilitar a infusão das células. Com a cauda fixada, foi feita a visualização macroscópica da veia lateral da cauda, na qual foi injetado um volume de 100 μL contendo 10^7 CMMO obtidas de camundongos C57BL/6-EGFP ($^{\text{EGFP}}$ CMMO) ou de camundongos $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ ($^{\text{mSOD1}}$ CMMO). Para o transplante foi utilizada uma seringa ultrafina 29 G (BD Ultra-Fine, 0,5 mL). Logo após o transplante, os animais eram devolvidos para suas caixas e mantidos em observação até o término da sedação.

3.6 Avaliação da sobrevida

A progressão da ELA nos camundongos transgênicos $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ de todos os grupos experimentais foi observada através das medidas de peso e testes motores. Além disso, a partir dos 115 dias de vida os animais foram observados diariamente quanto aos sinais de paralisia. Para a análise da sobrevida se considerou que os camundongos haviam atingido o estágio final quando não retornavam à posição original em até 20 segundos quando apoiados sobre seu dorso em posição supinada (Kieran et al. 2004). A partir da data da eutanásia foi computada a sobrevida e o intervalo de sobrevida de cada animal. Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. A decisão de eutanasiar os animais foi feita por experimentadores cegos ao tratamento recebido por cada animal.

3.7 Avaliação do início dos sintomas da ELA e progressão da doença nos camundongos SOD1^{G93A}

Para determinar a idade em que os animais passam a apresentar os primeiros sinais de ELA, bem como as diferenças na progressão da doença entre os diferentes grupos de estudo, foi utilizado o teste motor do Rotarod e o peso corporal dos animais.

3.7.1 Determinação do peso corporal

O acompanhamento do peso dos animais é uma medida importante para a detecção da atrofia muscular e sua progressão. Assim, os animais foram pesados semanalmente a partir da 9ª semana de vida, utilizando uma balança digital. Ao completarem 11 semanas, os camundongos passaram a ser pesados duas vezes por semana. Esta frequência foi aumentada para três vezes a partir da 16ª semana, devido à maior perda de peso observada nesse período. Foram tomados os pesos dos animais até que eles fossem eutanasiados em consequência da severidade da ELA. Todas as pesagens foram realizadas entre 13:00 e 16:00 horas para evitar variações diurnas (Knippenberg et al. 2010).

Através das medidas correspondentes ao peso dos camundongos SOD1^{G93A}, foi possível determinar o início e o estágio sintomático da doença. O início da doença foi determinado retrospectivamente como a idade na qual os camundongos atingiram seu peso máximo. Já o estágio sintomático foi definido como o ponto em que houve perda de 10% do peso máximo, conforme previamente descrito (Corti et al. 2010). Adicionalmente, utilizou-se a diferença entre a semana em que ocorreu a eutanásia e a semana em que cada animal atingiu seu peso máximo como medida da progressão da doença.

3.7.2 Avaliação neuromotora por meio do teste de desempenho no Rotarod e avaliação neurofisiológica

A função motora dos animais foi determinada por meio do teste de desempenho no Rotarod. Este é um teste usado para avaliar equilíbrio e coordenação motora (Brooks and Dunnett 2009), sendo o mais sensível para detectar alterações motoras neste modelo de ELA (Knippenberg et al. 2010).

Para o teste do Rotarod, foi utilizado um aparelho automatizado (EFF 412, Insight, Brasil), instalado em uma sala fechada e mantida à temperatura de aproximadamente 24° C. O aparelho consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro instalado transversalmente, a aproximadamente 20 cm de altura, e que é mantido em rotação. O cilindro é flanqueado com proteções laterais para evitar que o animal escape, e há um sensor de queda sob o equipamento. A caixa é dividida em quatro baias, permitindo a análise de até quatro animais simultaneamente.

Os testes foram realizados semanalmente a partir da 11ª semana de vida dos animais. Para cada semana, foi realizado um teste no qual cada animal tinha um teto de até sete minutos para permanecer no cilindro a uma velocidade constante de 16 rpm. Os camundongos foram posicionados no cilindro em movimento na orientação oposta a da rotação, de maneira que a locomoção para frente fosse necessária. A latência de queda foi determinada através de um cronômetro que era acionado no momento em que o animal era posicionado no cilindro e automaticamente interrompido quando o sensor de queda do aparelho era ativado pelo peso do animal. Os animais que usaram as patas para se prender ao cilindro durante duas voltas consecutivas foram excluídos do experimento. Todos os animais foram habituados ao aparelho durante os dois dias anteriores ao primeiro teste.

Os camundongos também tiveram sua função neuromuscular avaliada através de eletromiografia. Esta foi realizada com eletrodo de agulha concêntrica descartável com 0,35mm de diâmetro e 0,07mm de área de registro que permitiu detectar sinais de desnervação e registrar os fenômenos de reinervação, pela análise do recrutamento motor e das características das unidades motoras. Foram avaliados qualitativamente a presença de atividade espontânea e recrutamento reduzido em músculo do membro inferior, superior e masseter. O exame foi realizado em um eletromiógrafo Viasys Synergy.

3.8 Detecção das células transplantadas por *Nested PCR*

Para verificar a presença das células administradas nos tecidos dos animais que receberam o transplante, utilizamos a técnica da *Nested PCR* (Venturin et al. 2011). A presença de EGFP ou do cromossomo Y – quando o transplante se deu de transgênicos machos SOD1^{G93A} para fêmeas SOD1^{G93A} – serviu de indicativo da presença das células da

MO do animal doador nos tecidos do animal receptor. Amostras da medula espinhal, músculo esquelético, fígado, baço, pulmões e coração foram coletadas. A coleta foi realizada após acompanhamento dos animais de acordo com delineamento nas figuras 4 e 5. Adicionalmente, foram coletadas amostras de dois animais por grupo transplantado 24h, sete dias ou 14 dias após a administração das CMMO.

As amplificações foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direto 5'-ttgaattcgccaccatggtgagc-3' e reverso 5'-ttgaattcttactgtacagctcgtcc-3' complementares a uma sequência de DNA da EGFP. A reamplificação foi realizada por técnica de *nested* PCR por meio dos primers direto 5'-gggcacaagctggagtaca-3' e reverso 5'-atgttggtggcggatcttga-3'. Para a detecção do cromossomo Y, foram utilizados os primers direto 5'-atggagaattctgaggaggaga-3' e reverso 5'attcacaagctgacctccagttg-3', sendo o produto reamplificado utilizando o *primer* direto 5'-cagagcccaggtgctcctgctg-3' e reverso 5'-ctcctccatttagatctgcgttc-3'.

Para controlar o funcionamento da reação, foi ensaiado, juntamente com cada bateria de DNA de amostras de animais transplantados, um controle positivo de reação que consistiu de DNA extraído a partir de CMMO obtidas de camundongo C57BL/6-EGFP ou transgênico SOD1^{G93A} macho, e um controle negativo de reação, com omissão de qualquer DNA.

Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1x, contendo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. As condições da corrida eletroforética foram de 100 V, com corrente de 400 mA por 30 minutos. O resultado foi considerado positivo para a presença de DNA quando visualizada a banda correspondente.

3.9 Ensaio Cometa Alcalino

Para verificar se o tratamento com CMMO previne ou mitiga a ocorrência de estresse oxidativo associada à mutação SOD1^{G93A} (Siciliano et al. 2002; Hervias et al. 2006; Liu et al. 2007; Igoudjil et al. 2011), foi conduzido o ensaio cometa alcalino. Foram coletadas amostras da medula espinhal, músculo esquelético, cerebelo e córtex cerebral (n = 4 por grupo).

Brevemente, as amostras de animais dos grupos SAL, ^{EGFP}CMMO-70 e ^{EGFP}CMMO-110 foram coletadas em solução de Hanks balanceada. A suspensão celular obtida foi embebida em *low melting* agarose 0,75%, espalhada em uma lâmina pré-coberta com agarose e coberta com lamínula. As lâminas foram colocadas em uma solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 1% Triton X-100, 10mM Tris, pH 10) por 48 horas a 4°C. Posteriormente foram lavadas com tampão enzima (40mM HEPES, 0,1M KCl, 0,5mM EDTA, 0,2mg/mL BSA com pH 8 ajustado com KOH). Após esta etapa, as lâminas foram colocadas na cuba para tratamento alcalino (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH >13) por 20 minutos. A eletroforese foi conduzida a 4°C por 20 minutos, a 25V e 300mA. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, expostas à temperatura ambiente para secagem e então fixadas e coradas com coloração de prata (Singh et al. 1988; Tice et al. 2000; Greggio et al. 2011).

Os cometas foram classificados em cinco classes de dano, denominadas de classe 0 a classe 4. A classe 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados pela exposição; classe 1, cometas com danos mínimos; classe 2, cometas com danos médios; classe 3, cometas com danos intensos; classe 4, cometas com danos máximos. O índice de dano representa a soma da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador correspondente, através da fórmula $ID = 1.(n^{\circ} \text{ de classe } 1) + 2.(n^{\circ} \text{ de classe } 2) + 3.(n^{\circ} \text{ de classe } 3) + 4.(n^{\circ} \text{ de classe } 4)$ e foi expresso em unidade arbitrária (0-400). A frequência de dano foi determinada como a porcentagem núcleos que não possuem a classe 0, através da fórmula $FD = 100 - (n^{\circ} \text{ de classe } 0)$.

3.10 Avaliação Quantitativa do Número de Motoneurônios

Grupos adicionais, cada um deles constituídos de 5 animais, foram perfundidos aos 120 dias de vida para análise histológica. Estes animais foram anestesiados e perfundidos transcardiamente com solução salina seguida de paraformaldeído 4% (PFA) diluído em tampão fosfato. As colunas vertebrais foram cuidadosamente dissecadas, e a medula espinhal lombar (entre L2 e L4) foi isolada. Este nível foi escolhido por conter os motoneurônios que inervam os membros posteriores, os primeiros a ser afetados no modelo experimental utilizado.

As amostras foram pós-fixadas em PFA por 1h, criopreservadas em sacarose 30% *overnight* e congeladas em isopentano. Foram mantidas a -70°C até serem incluídas em para a obtenção de cortes seriados de 20 μm em lâminas gelatinizadas, utilizando um criostato a -20°C .

Para avaliação por imunofluorescência, primeiramente as secções foram fixadas em PFA por dez minutos, lavadas três vezes com PBS por cinco minutos e pré-incubadas com solução de bloqueio por uma hora. A seguir, foram incubadas com o anticorpo primário (ChAT, policlonal coelho, 1:500; Abcam, EUA) em solução de bloqueio *overnight* a 4°C . Após três lavagens com PBS, foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado a Alexa 568 (IgG (H+L), 1:1000, Invitrogen, EUA) por duas horas a temperatura ambiente e protegidas da luz. A seguir, foram lavadas por três vezes com PBS e montadas em meio com DAPI (Vectashield[®]).

A co-localização de DAPI com ChAT foi detectada, analisada e fotografada em microscópio confocal (LSM 5 Exciter, Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera CCD de alto desempenho (Pro-Series High Performance CCD camera) e *software Zen 5.0* (Carl Zeiss, Inc.). O número de motoneurônios ChAT⁺ foi calculado para cada secção, e a média das secções foi utilizada como dado individual para a análise estatística, conforme previamente descrito (Tortarolo et al. 2006; Suzuki and Svendsen 2008; Bigini et al. 2011; Canzi et al. 2012). Quatro cortes seriados foram processados para cada animal.

3.11 Análise estatística

Curvas de Kaplan-Meier e teste logrank (Mantel-Cox) foram utilizados para a análise dos dados de sobrevida dos animais e avaliação do aparecimento dos primeiros sintomas, estabelecimento do estágio sintomático e progressão da ELA. As diferenças nos testes motores foram calculadas por ANOVA de duas vias usando o teste *post hoc* de Bonferroni. As diferenças no número de motoneurônios e na progressão da doença foram analisadas por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Para o ensaio do cometa alcalino foi utilizado o teste *t* de Student.

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do *software* estatístico *GraphPad Prism 5.0*.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das populações celulares presentes nas amostras obtidas de camundongos C57BL/6-EGFP ou transgênicos SOD1^{G93A}.

Para caracterizar as populações celulares empregamos a técnica de citometria de fluxo utilizando os seguintes anticorpos: CD8a, CD19, CD34, CD45, CD117 e Sca-1. Para doadores C57BL/6 os histogramas obtidos estão representados na Figura 7. Também foram avaliadas amostras da fração mononuclear da MO de camundongos SOD1^{G93A}. Os histogramas obtidos a partir desta análise estão representados na Figura 8.

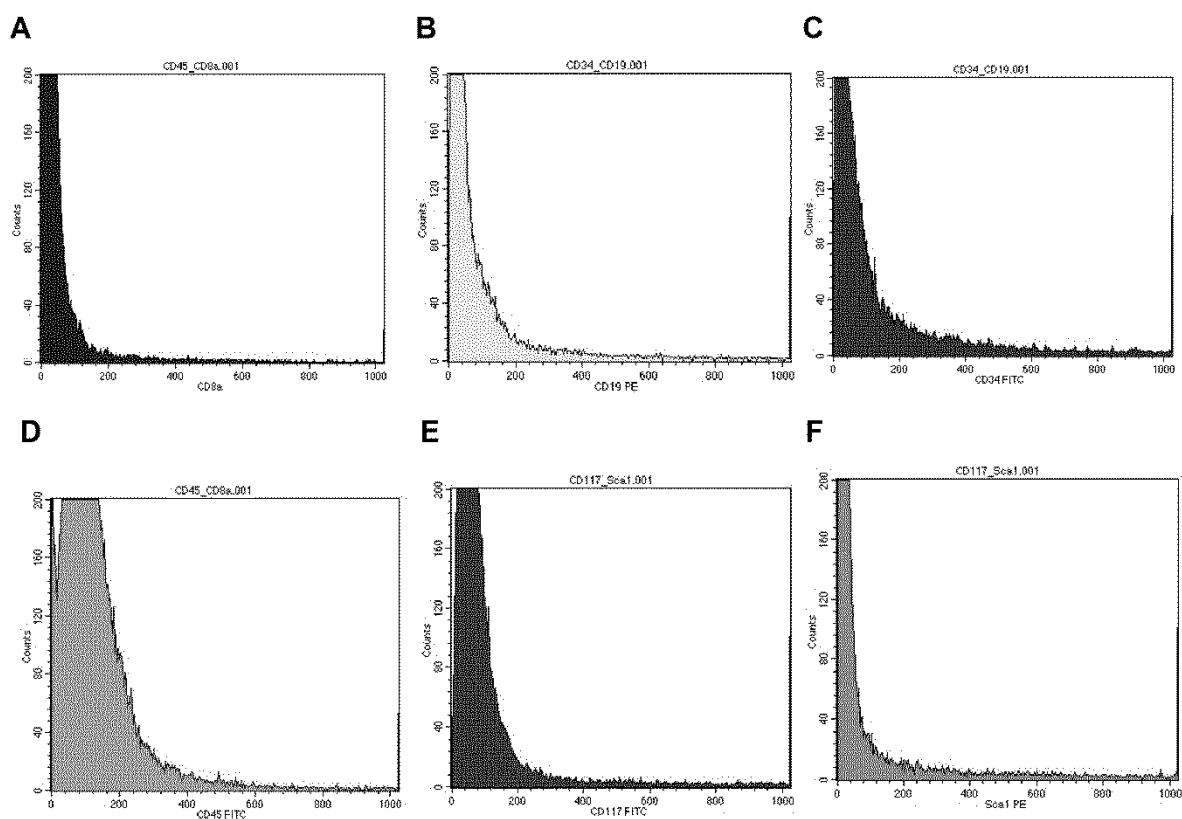


Figura 7. Expressão de marcadores de superfície para células da medula óssea de camundongos C57BL/6. Em (A) CD8a; (B) CD19; (C) CD34; (D) CD45; (E) CD117 e (F) Sca1.

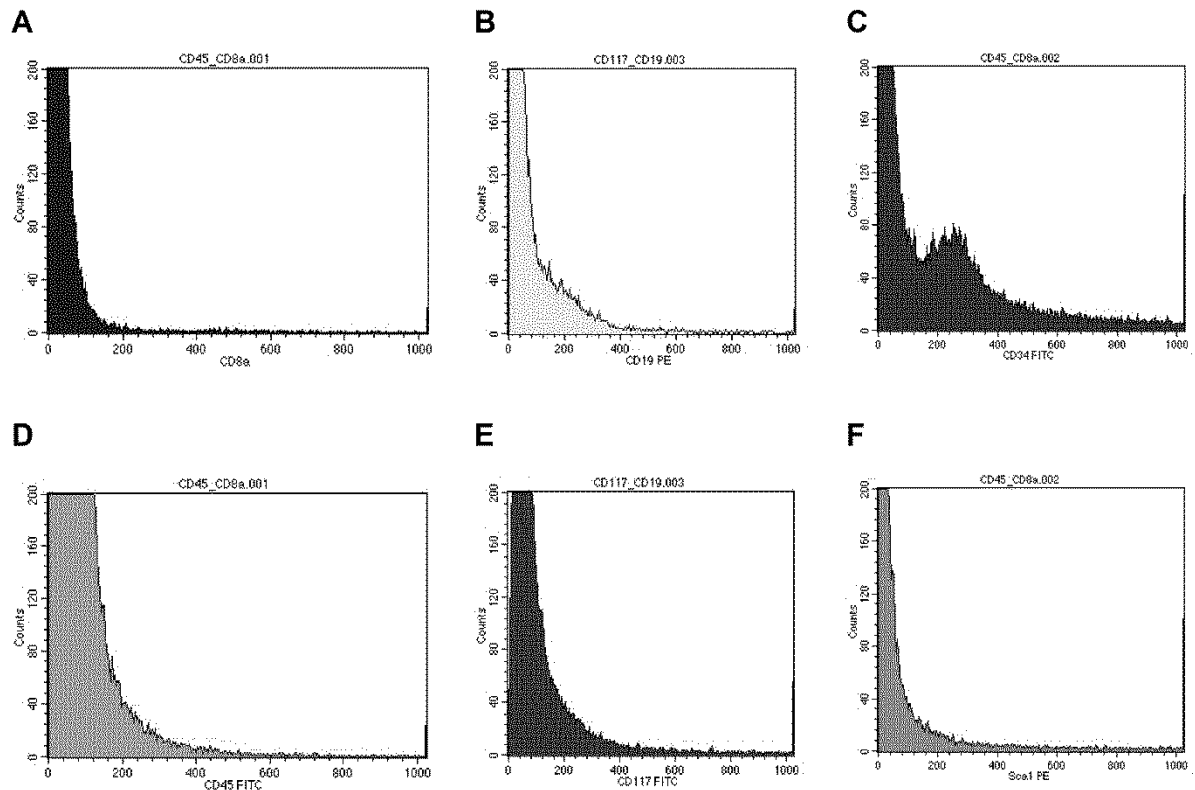


Figura 8. Expressão de marcadores de superfície para células da fração mononuclear da medula óssea de camundongos SOD1^{G93A}. Em (A) CD8a; (B) CD19; (C) CD34; (D) CD45; (E) CD117 e (F) Scal1.

4.2 O tratamento com CMMO promove aumento da sobrevida nos camundongos transgênicos SOD1^{G93A} tratados aos 70 ou 110 dias de vida.

Para verificar se as células obtidas da fração mononuclear da MO promovem aumento da sobrevida em animais com ELA, estes receberam um transplante pré-sintomático de 10^7 células pela veia da cauda. Inicialmente, um grupo de animais recebeu células obtidas de camundongos doadores C57BL/6-EGFP e outro grupo recebeu solução salina em igual volume. Estes animais foram acompanhados diariamente e eutanasiados quando incapazes de retornar à posição original ao serem submetidos ao teste do reflexo de endireitamento. A partir da idade do animal na data da eutanásia foram calculadas as sobrevidas dos animais de ambos os grupos.

Observou-se aumento significativo na sobrevida dos animais que receberam transplante de $^{EGFP}CMMO$ quando comparados com o grupo SAL (Figura 9; $p < 0,0001$; $\chi^2 = 21,84$). A sobrevida média dos animais do grupo $^{EGFP}CMMO-70$ foi de $142,3 \pm 3,3$ dias, enquanto a dos animais tratados com salina foi de $122,7 \pm 1,1$ dias. Assim, em animais pré-sintomáticos, as CMMO aumentaram em média 20 dias a sobrevida de camundongos $SOD1^{G93A}$, quando obtidas de animais não portadores da SOD1 mutada. A maior sobrevida para cada um dos grupos foi de 133 dias para um animal do grupo SAL e 157 dias para um animal do grupo $^{EGFP}CMMO-70$.

Um terceiro grupo ($^{mSOD1}CMMO-70$) foi acompanhado no intuito de se verificar se o mesmo efeito poderia ser observado quando são transplantadas células contendo a SOD1 mutante (mSOD1). Portanto, estes animais receberam 10^7 células obtidas a partir de camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$. Observou-se uma sobrevida média de $133,3 \pm 2,8$ dias, que foi significativamente maior do que a observada para o grupo SAL ($p < 0,001$; $\chi^2 = 11,27$). A maior sobrevida observada foi de 150 dias. Dessa forma, quando são transplantadas CMMO contendo mSOD1 o aumento na sobrevida foi intermediário, correspondendo a uma média de 11 dias em relação ao grupo tratado com salina.

Quando são comparadas as sobrevidas médias do grupo que recebeu $^{mSOD1}CMMO$ com a do grupo que recebeu $^{EGFP}CMMO$, observa-se que elas são diferentes. A sobrevida dos camundongos transplantados com $^{mSOD1}CMMO$ é significativamente menor do que a observada para o grupo de animais que recebeu células não-mutadas (Figura 9; $p < 0,01$; $\chi^2 = 7,8$).

Outro aspecto importante deste estudo, além de avaliar CMMO obtidas de diferentes origens, foi verificar se as CMMO possuem efeito terapêutico neste modelo de ELA quando administradas em estágios mais avançados (sintomáticos) da doença, (110 dias). Os resultados obtidos permitem observar que, mesmo aos 110 dias de vida, o tratamento com $^{EGFP}CMMO$ aumenta a sobrevida em relação aos animais do grupo salina ($127,8 \pm 1,69$ dias e $122,7 \pm 1,1$ para $^{EGFP}CMMO-110$ e SAL, respectivamente). A diferença é estatisticamente significativa: $p = 0,0117$ e $\chi^2 = 6,36$. Entretanto, quando a sobrevida do grupo $^{mSOD1}CMMO-110$ é avaliada, não é verificada nenhuma alteração na sobrevida em relação ao grupo SAL (Figura 10). Assim, o transplante de $^{mSOD1}CMMO$ teve efeito na sobrevida somente quando realizado em animais pré-sintomáticos.

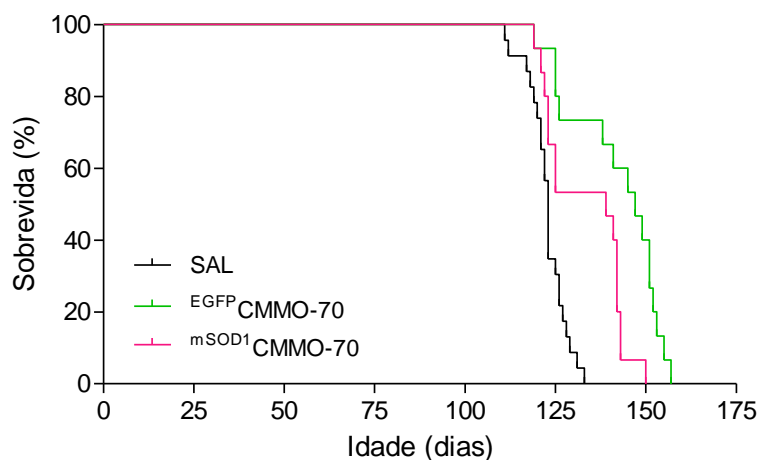


Figura 9. CMMO promovem aumento de sobrevida em camundongos SOD1^{G93A} tratados aos 70 dias de vida. Curvas de Kaplan-Meier para camundongos SOD1^{G93A} tratados com CMMO obtidas de camundongos C57BL/6-EGFP, de camundongos SOD1^{G93A} ou solução salina, aos 70 dias de vida. A sobrevida foi significativamente estendida para os camundongos tratados com CMMO quando comparados com o grupo salina. ($p < 0,0001$ vs EGFP e $p < 0,001$ vs mSOD1). Especificamente, ^{EGFP}CMMO promovem maior aumento na sobrevida do que ^{mSOD1}CMMO ($p < 0,01$).

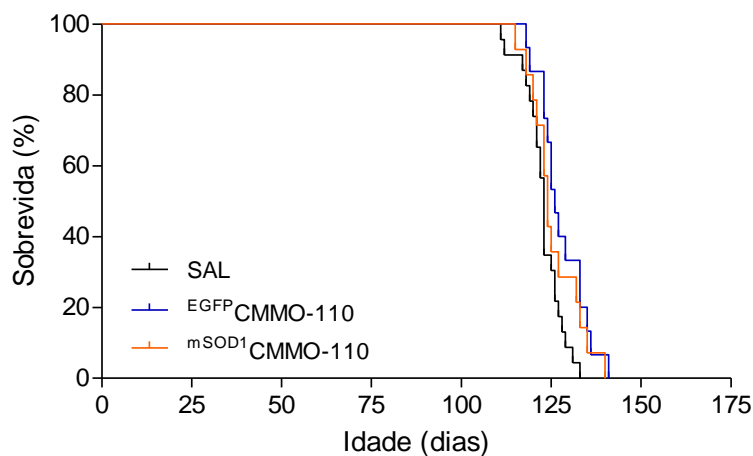


Figura 10. ^{EGFP}CMMO promovem aumento de sobrevida em camundongos SOD1^{G93A} sintomáticos tratados aos 110 dias de vida. Curvas de Kaplan-Meier para camundongos SOD1^{G93A} tratados com CMMO obtidas de camundongos C57BL/6-EGFP, de camundongos SOD1^{G93A} ou solução salina, aos 110 dias de vida. A sobrevida foi significativamente estendida para os camundongos tratados com ^{EGFP}CMMO quando comparados aos demais grupos; $p < 0,05$.

Também é importante a observação de que o aumento na sobrevivência dos animais transplantados com $^{EGFP}CMMO$ foi mais discreto no grupo tratado aos 110 dias de vida do que aos 70. As curvas de sobrevivência comparativas dos dois períodos de intervenção demonstram claramente esta diferença ($p = 0,0271$; $\chi^2 = 4,88$), como mostra a Figura 11.

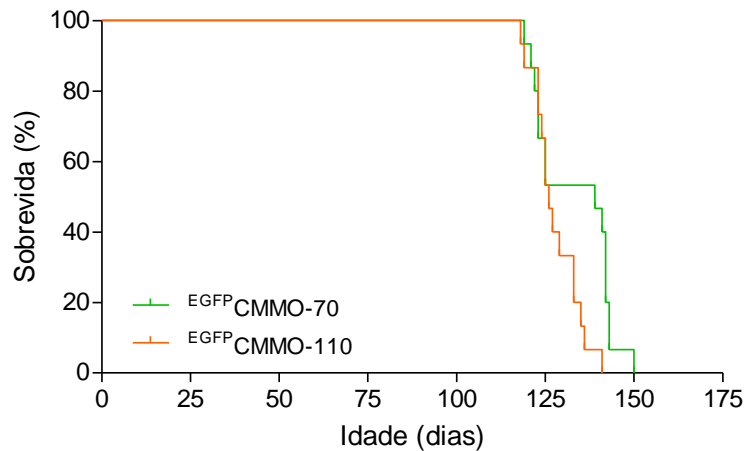


Figura 11. Curva comparativa da sobrevivência de camundongos $SOD1^{G93A}$ tratados com $^{EGFP}CMMO$ aos 70 ou 110 dias de vida. Curvas de Kaplan-Meier para camundongos $SOD1^{G93A}$ tratados com CMMO obtidas de camundongos C57BL/6-EGFP aos 70 ou 110 dias de vida. A sobrevivência foi significativamente maior os camundongos tratados aos 70 dias quando comparados com o grupo que recebeu o tratamento aos 110 dias de vida; $p < 0,05$.

4.3 O tratamento com CMMO retarda o início, estágio sintomático e a progressão da ELA em camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$ tratados pré-sintomaticamente.

Conforme previamente descrito, o acompanhamento do peso dos animais foi utilizado para detectar o aparecimento da ELA, assim como acompanhar a progressão para o estágio sintomático. Os critérios utilizados para estabelecer cada uma dessas etapas fenotípicas se basearam na data em que o animal apresentou seu peso máximo para o “início da doença”, e momento em que perdeu 10% do seu peso máximo para o “estágio sintomático”.

Avaliou-se o efeito do tratamento das CMMO em retardar o início da doença em animais tratados aos 70 dias de vida (grupos pré-sintomáticos: $^{EGFP}CMMO-70$ e

$mSOD1^{CMMO-70}$). Camundongos $SOD1^{G93A}$ tratados com salina (SAL) foram utilizados como controle. Estes atingiram seu peso máximo – início da doença – em torno da 12ª semana de vida ($11,8 \pm 0,21$).

Entretanto, quando os animais são transplantados com CMMO verifica-se que há um retardo no estabelecimento inicial da ELA em relação aos animais do grupo SAL. Animais que receberam CMMO provenientes de doadores EGFP-positivos tiveram o início da doença verificado a partir da 14ª semana de vida (média de $14,1 \pm 0,9$; $p < 0,0001$ vs SAL, $\chi^2 = 26,37$). Para os animais que receberam transplante de células $mSOD1$ também houve retardo no início da doença, com média de peso máximo observada em $13,4 \pm 0,9$ semanas ($p < 0,0001$ vs SAL, $\chi^2 = 15,81$). Entretanto, quando os dois grupos são comparados entre si, pode-se observar que o tratamento com $EGFP^{CMMO}$ foi mais eficaz em retardar o início da doença do que o transplante com $mSOD1^{CMMO}$ ($p < 0,05$, $\chi^2 = 4,44$). Esses dados estão representados na Figura 12.

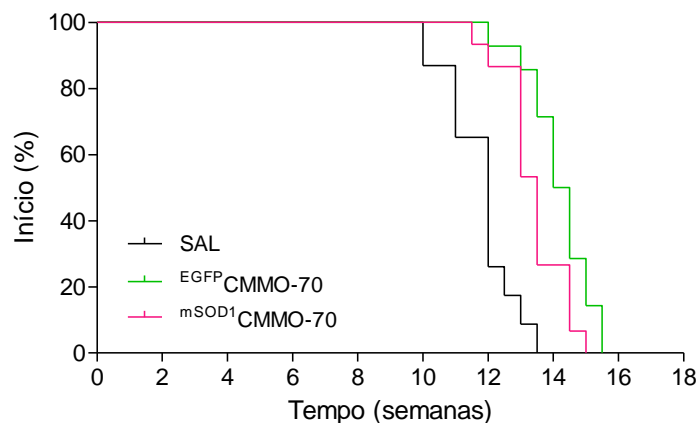


Figura 12. O tratamento com CMMO aos 70 dias de vida retarda o início da ELA em camundongos $SOD1^{G93A}$. O estabelecimento da ELA em animais transgênicos tratados com CMMO obtidas de camundongos C57BL/6-EGFP ou mutantes $SOD1^{G93A}$ foi tardio vs tratamento com salina ($p < 0,0001$, Logrank test). Camundongos tratados com $EGFP^{CMMO}$ apresentam início mais tardio quando comparados com animais tratados com $mSOD1^{CMMO}$ ($p < 0,05$).

O monitoramento do peso dos animais também permitiu avaliar o estabelecimento do estágio sintomático. Para os animais do grupo SAL, ele se deu em torno da 15ª semana ($15,5 \pm 0,76$) de vida do animal. A exemplo do que ocorre quando se avalia o início da doença, observa-se que o transplante de CMMO retarda o desenvolvimento do estágio

sintomático pelos camundongos $SOD1^{G93A}$. Como mostra a Figura 13, o estágio sintomático se dá mais tardiamente tanto para animais $EGFP^{CMMO-70}$ ($16,79 \pm 0,70$; $p < 0,0001$ vs SAL, $\chi^2 = 25,33$) quanto para o grupo $mSOD1^{CMMO-70}$ ($16,0 \pm 1,0$; $p = 0,0021$ vs SAL, $\chi^2 = 9,49$). Além disso, quando comparados os dois grupos que receberam o transplante, novamente os dados demonstram que células obtidas a partir de doadores não mutantes $EGFP^{CMMO}$ promovem maior atraso no estabelecimento do estágio sintomático do que as $mSOD1^{CMMO}$ ($p = 0,047$; $\chi^2 = 3,951$; Figura 13).

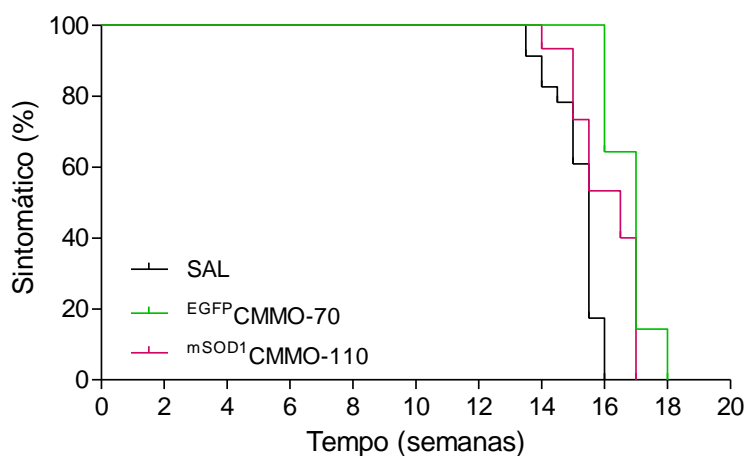


Figura 13. O tratamento com CMMO aos 70 dias de vida retarda o estabelecimento de estágio sintomático em camundongos $SOD1^{G93A}$. CMMO obtidas de camundongos C57BL/6-EGFP ou mutantes $SOD1^{G93A}$ atrasam o estabelecimento do estágio sintomático quando comparadas com salina ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$ vs $EGFP^{CMMO-70}$ e $mSOD1^{CMMO-70}$ respectivamente). Camundongos tratados com $EGFP^{CMMO}$ apresentam estágio sintomático mais tarde do que animais tratados com $mSOD1^{CMMO}$ ($p < 0,05$).

Os animais que foram tratados aos 110 dias de vida também tiveram seu peso acompanhado desde sua 9ª semana de vida. Esses animais foram tratados somente após o estabelecimento da ELA e do estágio sintomático. Como esperado, não houve diferença entre os animais dos grupos $EGFP^{CMMO-110}$, $mSOD1^{CMMO-110}$ e SAL (Figura 14). Observou-se que o início da doença para animais do grupo $EGFP^{CMMO-110}$ ocorre em $11,9 \pm 0,95$ semanas. Para o grupo $mSOD1^{CMMO-110}$, o período corresponde a $11,9 \pm 1,1$ semanas.

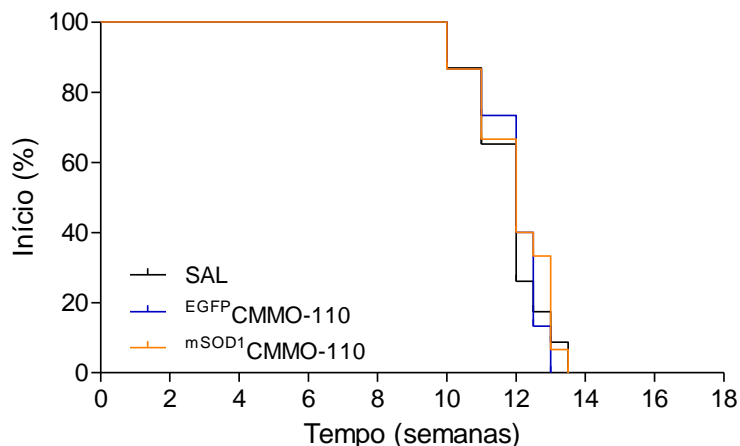


Figura 14. Início da ELA determinado para camundongos SOD1^{G93A} tratados aos 110 dias de vida. Curvas de peso não têm diferença estatística entre os grupos ^{EGFP}CMMO-110, ^{mSOD1}CMMO-110 e SAL.

Já o estágio sintomático foi determinado na semana $15,5 \pm 0,32$ e $15,5 \pm 0,37$ para grupos ^{EGFP}CMMO-110 e ^{mSOD1}CMMO-110, respectivamente (Figura 15). Esses dados corroboram a observação de que o início e o estágio sintomático da ELA, acompanhados por modificações do peso, se dão respectivamente em torno da 12^a e da 15^a semanas de vida. Além disso, os dados obtidos na análise da curva de peso desses animais reforçam a observação de que o transplante pré-sintomático de CMMO atrasa o início e o estágio sintomático da ELA.

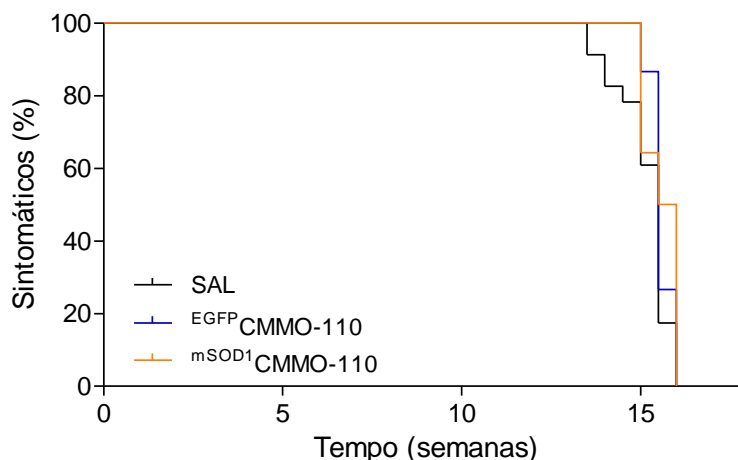


Figura 15. Estágio sintomático determinado para camundongos SOD1^{G93A} tratados aos 110 dias de vida. Curvas de peso não têm diferença estatística entre os grupos ^{EGFP}CMMO-110, ^{mSOD1}CMMO-110 e SAL.

Além disso, o conjunto de dados coletados a partir da análise da sobrevivência e do peso dos animais foi utilizado para determinar o tempo de progressão da doença nos animais estudados. Estabeleceu-se o tempo de progressão como a diferença obtida entre a idade do animal no momento em que apresentou o início da ELA e a idade em que foi eutanasiado. Para os animais tratados com solução salina, este tempo foi de $5,75 \pm 0,27$ semanas. Entretanto, em camundongos $SOD1^{G93A}$ que receberam o transplante de CMMO, foi observado um aumento no tempo de progressão (Figura 16A). Este aumento foi maior para o grupo $EGFP^{CMMO-70}$ ($8,46 \pm 0,46$ semanas; $p < 0,001$ vs SAL) do que para o grupo $mSOD1^{CMMO-70}$ ($7,11 \pm 0,38$; $p < 0,05$ vs SAL). De fato, quando são comparados os dois tratamentos celulares, também é observada diferença estatística entre eles ($p < 0,05$).

Porém, o mesmo efeito de retardo na progressão da doença não é observado quando os animais são tratados aos 110 dias de vida (Figura 16B). Para estes animais, o tempo médio de progressão observado foi de $6,32 \pm 0,39$ e $6,03 \pm 0,37$ para os grupos $EGFP^{CMMO-70}$ e $mSOD1^{CMMO-70}$, respectivamente. Não há diferença estatística entre estes tempos e o tempo de progressão observado para os animais do grupo SAL.

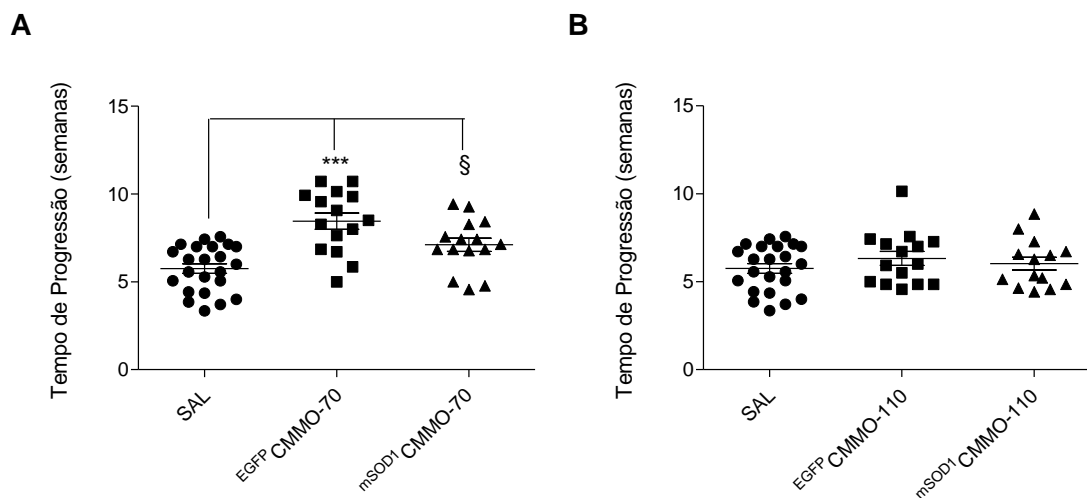


Figura 16. O tratamento com CMMO aos 70 dias de vida, mas não aos 110, aumenta o tempo de progressão da ELA em camundongos $SOD1^{G93A}$. Em (A) camundongos tratados aos 70 dias de vida têm progressão diminuída em relação ao grupo salina. *** $p < 0,001$ vs $EGFP^{CMMO-70}$ e § $p < 0,05$ vs $mSOD1^{CMMO-70}$. Em (B) progressão não é alterada quando o transplante é feito durante período sintomático.

4.4 O tratamento com $^{EGFP}CMMO$ promove melhora da função motora nos camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$ tratados pré-sintomaticamente.

Camundongos transgênicos $SOD1^{G93A}$, assim como pacientes com ELA, apresentam atrofia muscular progressiva, que está associada com um déficit motor também progressivo. Para avaliar se o transplante de $CMMO$ é eficiente em retardar o aparecimento deste déficit motor e/ou se consegue revertê-lo, os animais foram submetidos ao teste do Rotarod semanalmente a partir da 11ª semana de vida.

Quando os animais que receberam solução salina foram submetidos ao teste, observou-se comprometimento da função motora a partir da 15ª semana de vida (tempo de permanência no cilindro de $159,2 \pm 31,4s$ na 15ª semana vs $383,3 \pm 20,8s$ na 14ª). Da mesma forma, camundongos do grupo $^{mSOD1}CMMO-70$ tiveram queda de desempenho na tarefa com a mesma idade ($420 \pm 0s$ e $217,6 \pm 34,9s$, na 14ª e 15ª semanas, respectivamente).

Por outro lado, os animais transplantados com $^{EGFP}CMMO$ apresentam declínio significativo da função motora somente na 16ª semana de vida ($316,6 \pm 42,4s$ vs $344,3 \pm 35,6s$ na 15ª semana). Além disso, mesmo havendo comprometimento motor em relação à semana anterior, o grupo $^{EGFP}CMMO-70$ apresenta desempenho significativamente superior aos demais grupos avaliados. Esta superioridade de desempenho é observada ao longo da 15ª, 16ª e 17ª semanas em relação ao grupo SAL ($p < 0,001$) e na 15ª e 17ª semanas em relação ao grupo $^{mSOD1}CMMO-70$ ($p < 0,05$).

Estes dados demonstram que as $^{EGFP}CMMO$, mas não as $^{mSOD1}CMMO$, retardam o aparecimento de déficits motores detectados no Rotarod (semana 15 para SAL e $^{mSOD1}CMMO-70$ e semana 16 para $^{EGFP}CMMO-70$). Além disso, as $^{EGFP}CMMO$ promoveram a preservação da função motora, dado que os animais transplantados tiveram melhor desempenho nas semanas 15, 16 e 17 quando comparados a SAL (Figura 17). Os animais tratados com $^{mSOD1}CMMO$ também apresentam melhor desempenho quando comparados ao grupo SAL. Entretanto, esta melhora é observada somente na 16ª semana ($p < 0,01$), sendo transitória. Nas demais idades avaliadas, embora a curva do grupo

$mSOD1$ CMMO-70 esteja acima da do SAL, não foram encontradas diferenças entre os dois grupos.

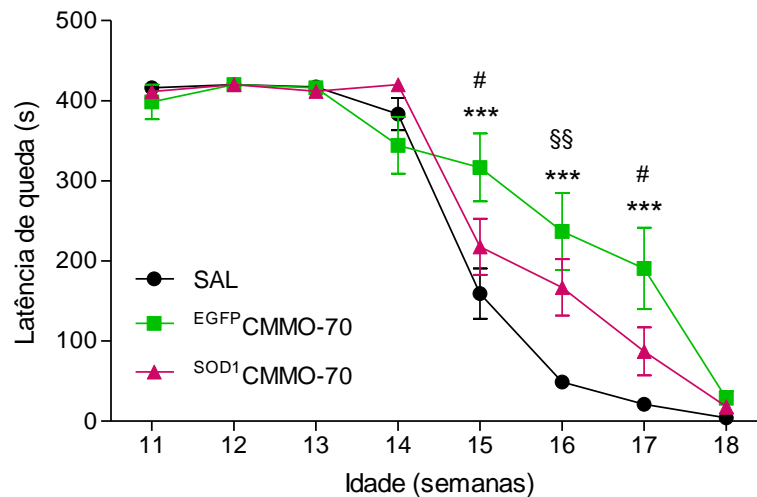


Figura 17. $EGFP$ CMMO promovem melhor desempenho motor em camundongos $SOD1^{G93A}$ transplantados aos 70 dias de vida. O gráfico apresenta curva acentuada de declínio motor para animais do grupo SAL e $mSOD1$ CMMO-70 a partir da semana 15. Nos animais do grupo $EGFP$ CMMO-70, o declínio é observado somente a partir da semana 16. CMMO obtidas de animais C57BL/6-EGFP promovem preservação da função motora, medida nas semanas 16, 17 e 18, enquanto que $SOD1$ CMMO promovem melhora transitória na semana 16. *** $p < 0,001$ para $EGFP$ CMMO-70 vs SAL e # $p < 0,05$ vs $mSOD1$ CMMO-70; §§ $p < 0,01$ para $mSOD1$ CMMO-70 vs SAL.

O número de animais que concluiu o teste semana a semana também foi diferente entre os grupos. Ele foi reduzido quando houve a necessidade de eutanásia, conforme critério previamente descrito. Até a 15ª semana de avaliação, todos os animais de todos os grupos conseguiram realizar o teste, embora com latências diferentes. Na 16ª semana este número foi de 91% dos animais do grupo SAL, caindo para 82,6% na 17ª semana. Ainda na 17ª semana, 93,3% dos animais $mSOD1$ CMMO-70 foram avaliados. Ao final da 18ª semana, somente 17% dos animais do grupo SAL havia sobrevivido e foram submetidos ao teste. Na mesma semana, nos grupos CMMO, este número foi de 78,6% dos animais $EGFP$ CMMO-70 e 57,1% dos animais do grupo $mSOD1$ CMMO-70.

Para os grupos transplantados com CMMO aos 110 dias de vida não foram observadas alterações benéficas, nem deletérias, no desempenho motor. Esta observação foi independente da origem das células transplantadas. Como mostra a Figura 18, o déficit motor foi novamente detectado na 15ª semana de vida dos animais. O número de animais que concluiu o teste semana a semana também foi diferente entre os grupos transplantados.

Até a 16ª semana de teste, todos os animais dos grupos $mSOD1^{G93A}$ CMMO-110 e $EGFP$ CMMO-110 foram avaliados. Na 17ª semana, realizaram o teste 86,7% dos animais do grupo $EGFP$ CMMO-110 e 85,7% dos animais $mSOD1^{G93A}$ CMMO-110. Ao final da 18ª semana haviam sobrevivido para o teste somente 46% dos animais $EGFP$ CMMO-110 e 35,7% dos animais do grupo $mSOD1^{G93A}$ CMMO-110.

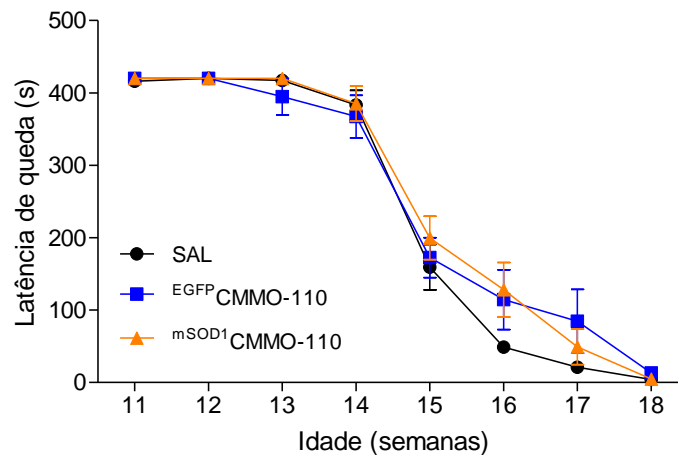


Figura 18. CMMO não alteram progressão do déficit motor quando administradas aos 110 dias de vida de camundongos $SOD1^{G93A}$.

Adicionalmente, a função neuromotora foi avaliada por meio de medida da atividade elétrica muscular durante eletroneuromiografia. Os animais foram examinados uma vez por semana a partir da 15ª semana de vida. Como mostra a figura 19, houve presença de atividade espontânea e recrutamento reduzido decorrente da desnervação muscular em todos os animais avaliados, independente do tratamento a que foram submetidos. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados.

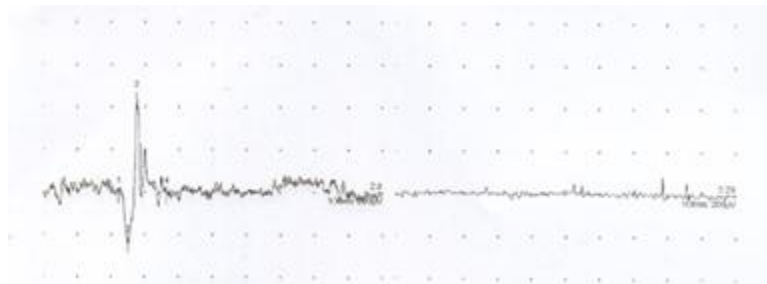


Figura 19. Registro eletroneuromiográfico de atividade espontânea na pata posterior de camundongo $SOD1^{G93A}$ do grupo SAL aos 115 dias de vida.

4.5 Fragmentos de DNA das CMMO administradas sistemicamente são identificados por PCR na medula espinhal dos animais transplantados.

Para detectar a presença das CMMO na medula espinhal dos animais transplantados foi utilizada a técnica de *nested* PCR. A técnica identificou fragmentos de DNA de EGFP para os grupos ^{EGFP}CMMO e fragmento do cromossomo Y para os grupos ^{SOD1}CMMO, em ambos os períodos de intervenção. Para a detecção do cromossomo Y, foram utilizadas somente amostras obtidas de fêmeas transplantadas. Esta análise foi conduzida para elucidar a associação entre os efeitos comportamentais benéficos do transplante e a migração das células para o tecido em degeneração.

Na medula espinhal, observou-se a amplificação tanto de DNA EGFP quanto do cromossomo Y proveniente dos machos ^{SOD1^{G93A}} doadores de MO. Esta observação se repetiu em amostras obtidas 24 horas, 7 e 14 dias após o transplante. O DNA foi detectado mesmo em amostras coletadas de animais em estágios terminais e eutanasiados conforme critério previamente descrito.

Adicionalmente, foram coletadas amostras do músculo esquelético, fígado, baço, coração e pulmões dos animais transplantados. Para estas amostras, detectaram-se DNA amplificado de ambas CMMO nos seguintes períodos de avaliação pós-transplante: 24 horas, 7 e 14 dias. Entretanto, quando avaliados os animais eutanasiados em estágio terminal, o DNA proveniente das CMMO foi detectado somente em amostras do baço e tecido muscular, além de na medula espinhal.

4.6 Transplante de ^{EGFP}CMMO não altera o grau de dano ao DNA medido por ensaio cometa alcalino em camundongos ^{SOD1^{G93A}}.

Pode-se verificar neste estudo que o transplante de ^{EGFP}CMMO promove aumento da sobrevida e preservação da função motora em camundongos ^{SOD1^{G93A}}. Por outro lado, também se observou que, quando as células transplantadas contêm a mSOD1, o efeito é mais discreto. Além disso, para animais tratados durante o período sintomático, não há efeito na sobrevida quando são administradas células expressando mSOD1.

Considerando esses achados, foi realizado o ensaio cometa alcalino em amostras obtidas a partir de animais transplantados com $EGFP^{CMMO}$ tanto aos 70 quanto aos 110 dias de vida. Este ensaio foi realizado para avaliar se o efeito comportamental observado após o transplante estava relacionado com a prevenção ou mitigação da ocorrência de estresse oxidativo no que se refere ao comprometimento da integridade do DNA nuclear. Entretanto, em nenhuma das amostras foram observadas diferenças de dano ao DNA entre os grupos $EGFP^{CMMO-70}$, $EGFP^{CMMO-110}$ e SAL, como mostram os dados da Figura 20.

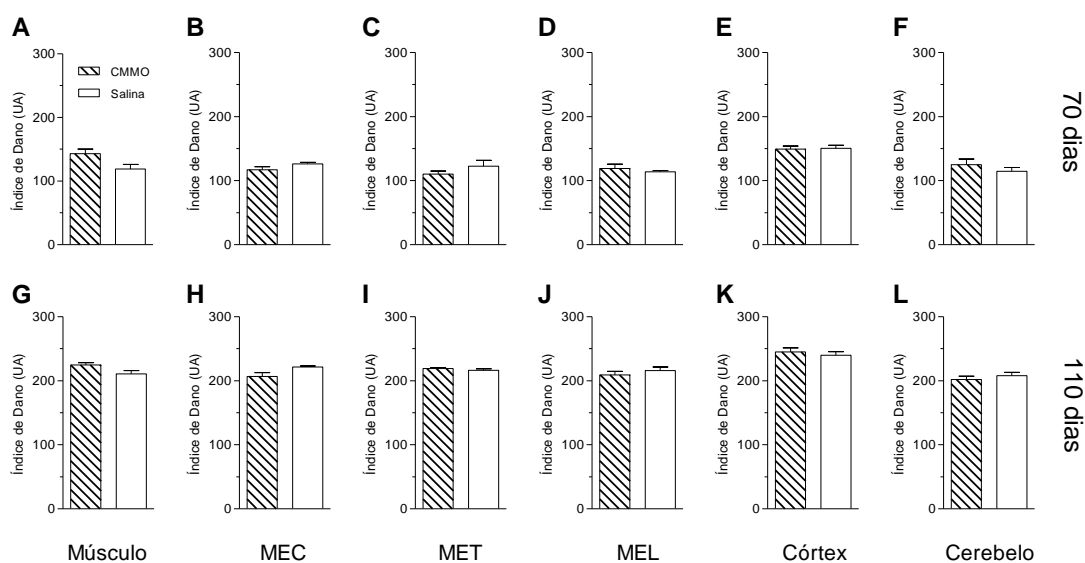


Figura 20. Transplante de $EGFP^{CMMO}$ não previne dano ao DNA medido por ensaio do cometa alcalino em camundongos $SOD1^{G93A}$. Dados observados para amostras de (A) músculo esquelético; (B) medula espinhal cervical; (C) medula espinhal torácica; (D) medula espinhal lombar; (E) córtex cerebral e (F) cerebelo, todas obtidas de animais tratados aos 70 dias de vida. Dados para as amostras coletadas após tratamento aos 110 dias estão representados em (G) músculo esquelético; (H) medula espinhal cervical; (I) medula espinhal torácica; (J) medula espinhal lombar; (K) córtex cerebral e (L) cerebelo. MEC: medula espinhal cervical; MET: medula espinhal torácica; e MEL: medula espinhal lombar.

4.7 Transplante pré-sintomático de $EGFP^{CMMO}$ promove a preservação dos motoneurônios da região lombar da medula espinhal em camundongos $SOD1^{G93A}$.

Grupos adicionais de animais foram tratados com $EGFP^{CMMO}$ ou $mSOD1^{CMMO}$ aos 70 e 110 dias de vida, ou receberam solução salina ($n = 5$ por grupo) e foram eutanasiados

aos 120 dias de vida para análise histológica da medula espinhal. Células positivas para colina acetiltransferase (ChAT⁺) foram identificadas no corno ventral da região lombar da medula espinhal e quantificadas. Com os dados obtidos a partir desta análise, pode ser avaliado o efeito do transplante de CMMO na proteção contra a perda de motoneurônios.

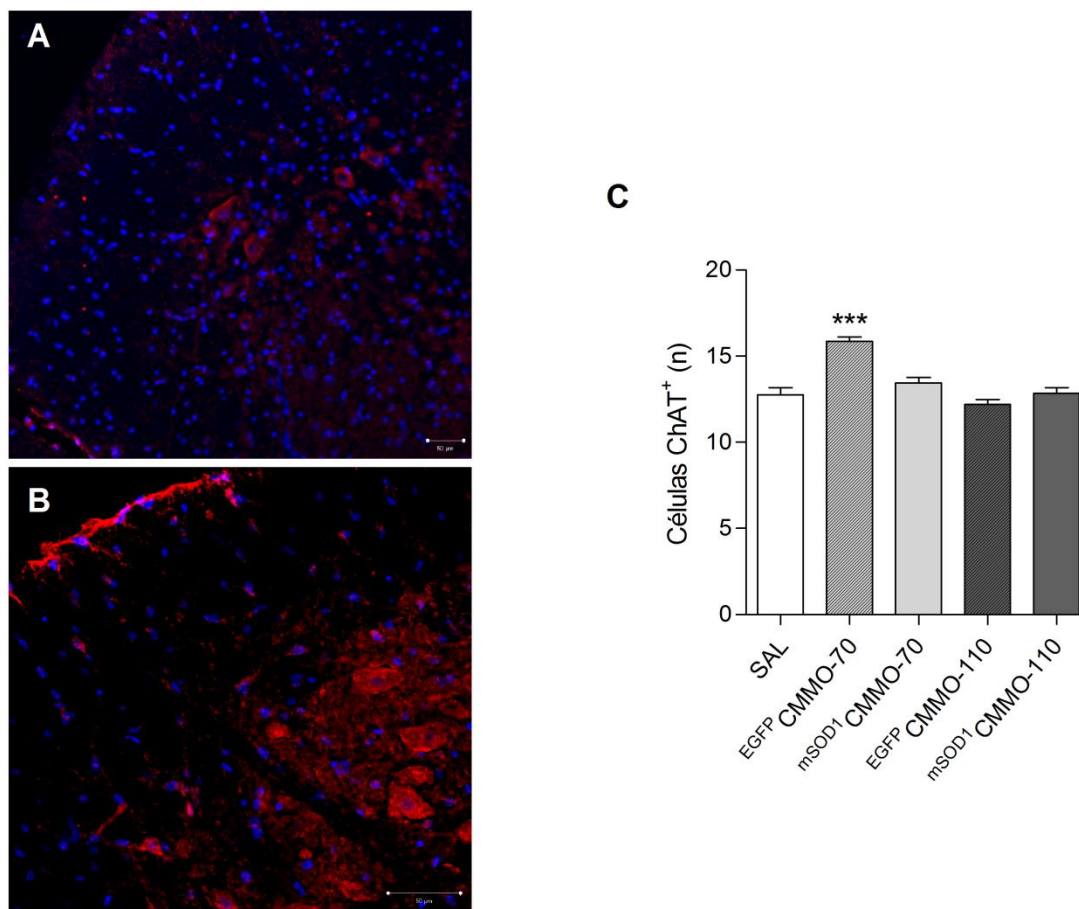


Figura 21. ^{EGFP}CMMO têm efeito neuroprotetor quando administradas pré-sintomaticamente a camundongos SOD1^{G93A}. Fotomicrografias comparativas da medula espinhal de animais (A) SAL, e (B) ^{EGFP}CMMO-70. (E) Número de motoneurônios observados na medula espinhal dos animais submetidos ao tratamento com ^{EGFP}CMMO, ^{mSOD1}CMMO ou salina, aos 70 ou 110 dias de vida. *** $p < 0,001$ vs SAL, ^{mSOD1}CMMO-70, ^{EGFP}CMMO-110, e ^{mSOD1}CMMO-110.

Aos 120 dias de vida, observaram-se em média $12,75 \pm 0,42$ células ChAT⁺ por secção da medula espinhal de camundongos SOD1^{G93A} administrados com solução salina. Entretanto, quando os animais foram tratados com ^{EGFP}CMMO aos 70 dias de vida, observou-se uma média de células ChAT⁺ de $15,85 \pm 0,26$ por secção. A diferença entre estas duas médias é estatisticamente significativa ($p < 0,001$) e indica que o transplante

precoce dessas células teve efeito neuroprotetor, diminuindo a perda progressiva de motoneurônios associada com a ELA (Figura 21). Contudo, quando as células transplantadas são ^{mSOD1}CMMO o efeito neuroprotetor não é observado ($13,45 \pm 0,31$ células ChAT⁺ por secção).

Além disso, a intervenção aos 110 dias de vida também não altera a perda de motoneurônios nem promove reposição celular. Independente do tipo de célula administrada, ^{mSOD1}CMMO ($12,85 \pm 0,32$ ChAT⁺ por secção) ou ^{EGFP}CMMO ($12,20 \pm 0,29$ ChAT⁺ por secção) não foram encontradas diferenças para o grupo SAL.

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo principal verificar se CMMO transplantadas sistemicamente em camundongos $SOD1^{G93A}$, que apresentam características fenotípicas e fisiopatológicas de ELA, são capazes de modificar o fenótipo ou mitigar a progressão da doença, aumentando a sobrevida dos animais. Todos os experimentos aqui apresentados foram delineados com uma abordagem translacional. O uso de CMMO, de via intravenosa e o estudo comparativo de dois períodos de intervenção e de duas fontes de células foram definidos com o intuito de aperfeiçoar a aplicação deste conhecimento em ensaios clínicos.

Nossos resultados indicam que o transplante intravenoso de $EGFP^{CMMO}$ aumenta a sobrevida de animais tratados aos 70 ou aos 110 dias de vida. Quando a intervenção é feita no período pré-sintomático, o aumento da sobrevida é acompanhado de preservação da função motora e de motoneurônios do corno ventral da medula espinhal. É provável que o ganho de sobrevida decorra do efeito das células em retardar a progressão da ELA. Observa-se efeito terapêutico mesmo quando as células transplantadas são $mSOD1^{CMMO}$, embora este efeito seja intermediário. Quando o transplante ocorre no período sintomático, somente as $EGFP^{CMMO}$ promovem aumento na sobrevida, embora discreto. A perda de função motora e a progressão não se modificam. Finalmente, embora as células tenham sido administradas sistemicamente, migram para a medula espinhal, onde foram identificados fragmentos de seu DNA.

A grande maioria dos estudos em modelos de ELA, incluindo também os que usam células-tronco de outras fontes como NSC, HUCB e outras precursoras, utiliza como via de administração a injeção direta das células na medula espinhal (vide dados apresentados na tabela 1). Entretanto, esta via de administração requer que o animal – e por consequência o paciente – seja submetido a processos invasivos como a laminectomia e abertura das meninges. Considerando que os pacientes com ELA já têm sua saúde bastante debilitada, expô-los a uma cirurgia dessa complexidade acarreta em risco que pode se sobrepor ao benefício do tratamento. A via intra-espinhal tem outra limitação importante: na ELA, a morte neuronal é difusa, e não atinge uma única região da medula espinhal, nem mesmo somente a medula espinhal. Embora haja migração celular a partir do implante, a distância

que essas células percorrem ao longo dos eixos medulares parece ser limitada a poucos milímetros (Corti et al. 2007; Suzuki et al. 2007; Lepore et al. 2008; Lepore et al. 2011; Pastor et al. 2012). Logo, o transplante focal pode ter resultados limitados em pacientes com ELA. É importante o estudo de vias de administração que permitam a disponibilização das células transplantadas a todas as regiões em que há morte celular, incluindo a medula espinha, tronco encefálico e córtex motor.

Quando a via intratecal é utilizada como alternativa, observa-se grande variabilidade de resultados. Alguns estudos indicam que a administração tanto de MSC (Boucherie et al. 2009; Kim et al. 2010), quanto de NSC modificadas geneticamente para produzir VEGF promovem melhora funcional e/ou histológico-molecular (Hwang et al. 2009). Em outros estudos, utilizando a mesma via para administrar MSC, o efeito na sobrevivência, na função motora e nas características histológicas dos animais tratados foi sutil (Vercelli et al. 2008) ou mesmo não observado (Habisch et al. 2007). A administração de precursores neurais por via intratecal também não promove ganho funcional ou morfológico (Park et al. 2009). Em outro estudo, o efeito terapêutico é observado somente quando são administradas múltiplas doses de células (Zhang et al. 2009). Aspectos relacionados com esta via de administração, a migração limitada das células para o SNC e distribuição no parênquima medular podem ter influenciado os resultados negativos que foram obtidos (Habisch et al. 2007).

Considerando que a via intravenosa é menos invasiva e que permite que células injetadas sistemicamente possam atingir todas as regiões do tecido nervoso onde há degeneração, utilizamos a veia da cauda como via de transplante das CMMO. De fato, a análise das amostras teciduais de camundongos SOD1^{G93A} injetados intravenosamente identificou DNA das CMMO na medula espinhal, no pulmão, fígado, coração, baço e tecido muscular esquelético. Na medula espinhal, estes fragmentos de DNA são identificados também *post mortem*, indicando a presença das células na medula por longos períodos de tempo. A análise do material obtido após eutanásia também mostra que elas deixam de ser detectáveis em outros tecidos como o pulmão, o coração e o fígado, mas continuam presentes em amostras do músculo esquelético e do baço. Estudos anteriores conduzidos em nosso laboratório já haviam demonstrado que CMMO ou HUCB injetadas intravenosamente migram a partir da corrente sanguínea para o parênquima do SNC em modelos animais de epilepsia (Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011; Costa-Ferro et

al. 2012) e hipóxia-isquemia neonatal (de Paula et al. 2009; de Paula et al. 2012). A mesma observação foi feita com inúmeros tipos celulares em animais com ELA (Garbuzova-Davis et al. 2003; Zhao et al. 2007; Garbuzova-Davis et al. 2008; Rizvanov et al. 2008; Corti et al. 2010; Mitrecic et al. 2010; Garbuzova-Davis et al. 2012; Uccelli et al. 2012). É possível que a migração dessas células para as áreas em neurodegeneração seja sinalizada por agentes quimioatrativos, como as citocinas secretadas a partir de células como microglia e linfócitos T (Elliott 2001).

Embora a integridade da barreira não tenha sido avaliada neste estudo, já foi previamente descrito que há modificação da permeabilidade da barreira sangue/cérebro e sangue/medula espinhal em animais mutantes SOD1 (Garbuzova-Davis et al. 2007; Garbuzova-Davis et al. 2007; Zhong et al. 2008; Nicaise et al. 2009). A quebra da barreira sangue/medula espinhal nas áreas de neurodegeneração é um fator que pode contribuir para a migração das CMMO para estas regiões a partir da corrente sanguínea. Esta quebra pode aumentar os níveis de MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1), e é possível que algumas populações celulares (como as MSC) que expressam receptores para essa citocina migrem para a medula espinhal como consequência da quebra da barreira nas regiões em que há morte celular (Choi et al. 2012). Além disso, animais transgênicos SOD1^{G93A} apresentam níveis elevados de SCF (fator de células-tronco) (Boucherie et al. 2009). O SCF é um fator quimiotático, que atrairia as células transplantadas até a medula em degeneração. Já as células presentes no baço, poderiam interagir com as células do hospedeiro e modular a resposta imunológica, como hipotetizado por Garbuzova-Davis e colaboradores (2012). Esta modulação reduziria a inflamação, preservando os motoneurônios na medula espinhal (Garbuzova-Davis et al. 2012).

O potencial terapêutico de células-tronco obtidas a partir da medula óssea tem sido relatado em inúmeros modelos experimentais de doenças que acometem o sistema nervoso (DaCosta 2012). Na ELA, Ende e colaboradores (2000) estão entre os primeiros a demonstrar que a fração mononuclear da MO promove aumento de sobrevivência em camundongos SOD1^{G93A} (Ende et al. 2000). Estudos posteriores reforçaram essa observação, ao acrescentar dados apontando que o transplante de CMMO também retarda o declínio da função motora (Ohnishi et al. 2009; Pastor et al. 2012), e promove a preservação de motoneurônios em camundongos SOD1^{G93A} (Corti et al. 2004; Ohnishi et

al. 2009). Ainda utilizando células obtidas a partir da medula óssea, demonstrou-se que a população de células-tronco hematopoiéticas promoveu melhora da função motora e preservação de motoneurônios (Cabanès et al. 2007). Resultados similares foram observados no modelo de mutação da SOD1 para uma população de células Lin-c-kit⁺ (Corti et al. 2010), para MSC murinas (Boucherie et al. 2009; Forostyak et al. 2011; Uccelli et al. 2012), MSC humanas (Zhao et al. 2007; Zhang et al. 2009; Choi et al. 2012), MSC humanas obtidas de pacientes com ELA (Kim et al. 2010) e MSC geneticamente modificadas para liberar GDNF (Suzuki et al. 2008). Entretanto, ainda há poucos dados disponíveis no que diz respeito à comparação de células obtidas a partir de portadores ou não de ELA.

Assim, comparamos os desfechos de animais tratados com células “saudáveis”, ^{EGFP}CMMO, ou “doentes”, ^{mSOD1}CMMO. A comparação só foi possível porque a medula óssea murina pode ser facilmente obtida, inclusive de animais com ELA. Para outros tipos celulares como sangue de cordão ou células-tronco neurais de culturas estabelecidas, seria mais difícil avaliar o impacto do transplante de células contendo a mutação.

A investigação dessas diferenças é importante porque uma das características fisiopatológicas da ELA é o papel das células não-neuronais no microambiente celular (Clement et al. 2003). Em conjunto com os próprios motoneurônios, astrócitos e microglia expressando a mutação da SOD1 também contribuem para a morte neuronal e progressão da doença (Yamanaka et al. 2008; Yamanaka et al. 2008). De fato, Boillee e colaboradores (2206) criaram um modelo quimérico de camundongos SOD1 em que se observa que à medida que aumenta o número de células não-neuronais saudáveis, há desaceleração da severidade da doença e aumento na sobrevivência dos animais (Boillee et al. 2006). Assim, a modificação do microambiente pela introdução de células não neurais ou de células saudáveis pode contribuir para a preservação neuronal. Ao mesmo tempo, células expressando mSOD1 poderiam acelerar o processo de neurodegeneração.

Nossos dados demonstram que mesmo o tratamento com ^{mSOD1}CMMO promove aumento da sobrevivência, retarda a progressão da doença e preserva transitóriamente a função motora. Entretanto, seu efeito é inferior ao observado para as ^{EGFP}CMMO em todos os parâmetros avaliados. Além disso, não é acompanhado de preservação de motoneurônios e é restrito ao tratamento no período pré-sintomático. Diferentemente, em seu estudo, Corti e

colaboradores (2004) demonstraram que quando são administradas (i.p.) $mSOD1$ CMMO, não se observam alterações na sobrevivência e na função motora (Corti et al. 2004). Usando a via de administração intra-medular óssea, Ohnishi e colaboradores (2009) observaram desfechos semelhantes. Neste estudo, foram avaliados animais tratados mais tardiamente, e não foram observadas diferenças histológicas entre os grupos tratados e salina (Ohnishi et al. 2009). Mais recentemente, utilizando uma população celular específica, células Lin-c-kit+, Corti e colaboradores (2010) também apresentaram dados indicando que o tratamento com células expressando $mSOD1$ não tem implicações sobre o fenótipo de camundongos $SOD1^{G93A}$.

Entretanto, em nenhum desses estudos foi relatada a presença de células obtidas a partir de doadores $mSOD1$ na medula espinhal dos animais transplantados. Por outro lado, nós identificamos o DNA dessas células no tecido nervoso. Corti e colaboradores (2004) e Ohnishi e colaboradores (2009) criaram quimeras com uso de irradiação e injeção das CMMO na cavidade abdominal ou na medula óssea. (Corti et al. 2004; Ohnishi et al. 2009), enquanto nós administramos as células por via intravenosa. Corti e colaboradores (2010) também utilizaram a via intravenosa, porém avaliaram a eficácia de outra população celular e injetaram dose celular mil vezes menor (Corti et al. 2010). Outros estudos já demonstraram que o efeito do transplante de células-tronco na ELA é dose-dependente (Garbuzova-Davis et al. 2008; Kim et al. 2010; Garbuzova-Davis et al. 2012). Dessa forma, é possível que o uso de via intravenosa, sem imunossuprimir ou irradiar os animais, e de uma dose maior de células favoreça a sua migração até o tecido nervoso. A migração das células para este tecido parece ter sido fundamental para a observação do aumento da sobrevivência e da função motora promovido pelas $mSOD1$ CMMO.

Por outro lado, nossos dados também demonstram que as $mSOD1$ CMMO tiveram eficácia inferior às $EGFP$ CMMO. De fato, não observamos preservação de motoneurônios nos animais tratados com $mSOD1$ CMMO. Esta observação pode ser um indicativo de que ao mesmo tempo em que as $mSOD1$ CMMO possam diminuir a inflamação ou elevar a secreção de fatores tróficos – com efeitos benéficos –, elas também possam exercer efeito tóxico direto sobre os motoneurônios pela expressão de $mSOD1$.

Alguns pesquisadores descreveram recentemente que as células-tronco da medula óssea de pacientes com ELA podem apresentar diferença de comportamento molecular. Estas diferenças incluem menor capacidade de migração e expressão reduzida de inúmeros

fatores tróficos (Cho et al. 2010). A diminuição da capacidade de secretar fatores tróficos parece estar diretamente relacionada à taxa de progressão da doença (Koh et al. 2012).

Embora a relevância dos mecanismos patológicos mediados pela SOD1 ainda não esteja esclarecida em pacientes com ELA esporádica, é importante considerar as diferenças encontradas entre os tratamentos com células expressando ou não a mSOD1. Há pelo menos um estudo utilizando MSC de pacientes com ELA para avaliar o efeito dose-resposta em um modelo experimental da SOD1^{G93A} (Kim et al. 2010) Entretanto, estudos que comparem o efeito do transplante de células de pacientes (esporádicos) com células saudáveis ainda não estão disponíveis. Os dados recentes indicando que células provenientes de pacientes com ELA têm perda da sua “capacidade tronco” também devem ser considerados. Este conjunto de informações é importante no planejamento de ensaios clínicos e pode ser muito influente no sucesso ou não de transplantes autólogos para o manejo dessa doença.

Outro aspecto importante a ser estudado em modelos animais, e que tem repercussão nos ensaios clínicos, é a janela de intervenção. Muitos dos resultados positivos que foram obtidos ao longo dos anos em estudos experimentais que testaram células-tronco, ou mesmo uma grande variedade de drogas, não puderam ser reproduzidos em ensaios clínicos. Isso se deve em grande parte ao fato de que a esmagadora maioria desses estudos em animais foi feito durante as fases pré-sintomáticas da doença. A translação destes dados é limitada: não se pode prever quando um paciente desenvolverá ELA e tratá-lo preventivamente. Para estudos utilizando células-tronco, o volume de experimentos realizados em animais sintomáticos também ainda é muito inferior ao de testes realizados antes da manifestação dos sintomas.

Nossos dados indicam que a intervenção aos 110 dias de vida, quando o animal apresenta sinais de paralisia do membro posterior, prolonga a sobrevivência de camundongos SOD1^{G93A}. Contudo, indicam também que só há aumento da sobrevivência quando são administradas células “saudáveis”^{EGFP} CMMO, e que não há modificação de função motora ou morfológica.

Recentemente, foram publicados outros resultados de intervenções mais tardias em camundongos ou ratos SOD1^{G93A}. Utilizando ratos com 90 dias de vida – sintomáticos precoces – Boucherie e colaboradores (2009) demonstraram que a administração intratecal

de MSC preserva o desempenho motor e prolonga a sobrevida (Boucherie et al. 2009). Resultados similares foram obtidos quando as MSC são administradas por via intravenosa em camundongos (Uccelli et al. 2012) ou por via intravenosa em associação com implante na medula espinhal de ratos (Forostyak et al. 2011). Nos animais transplantados com MSC também foi observada maior migração celular para células modificadas para expressar Ngn1 (Neuroangénina 1) (Choi et al. 2012). Choi e colaboradores (2012) também avaliaram as diferenças entre transplante pré-sintomático, sintomático ou múltiplo. Os dados obtidos por esses pesquisadores revelaram aumento de sobrevida para animais tratados sintomaticamente apenas quando utilizadas Ngn1-MS (Choi et al. 2012). O efeito de células obtidas a partir de sangue de cordão também foi avaliado no mesmo modelo. O implante intra-espinhal dessas células em animais sintomáticos precoces, promove resultados comparáveis aos observados para as MSC, com aumento da sobrevida, preservação da função motora e de neurônios motores na medula espinhal (Knippenberg et al. 2012) Também, testou-se uma abordagem de múltiplos transplantes em que as células eram administradas semanalmente em animais pré-sintomáticos ou sintomáticos. Nestes animais foi observada sobrevida prolongada dose-dependente, acompanhada de preservação de neurônios motores (Garbuzova-Davis et al. 2012).

Em animais *mdf/mcd*, células-tronco hematopoiéticas promovem a melhora funcional e preservam os motoneurônios dos animais transplantados (Cabanés et al. 2007). Utilizando o mesmo modelo, Pastor e colaboradores (2012) transplantaram os animais sintomáticos com CMMO ou MSC. Observaram que embora ambas promovam melhora funcional, ela é mais expressiva para animais tratados com CMMO (Pastor et al. 2012).

A sobrevida dos animais não pode ser testada no modelo *mdf/mcd*, mas os resultados de Pastor e colaboradores (2012) apontam para uma vantagem no uso das CMMO frente às MSC (Pastor et al. 2012). O uso de CMMO tem outras vantagens na aplicação clínica, como a menor necessidade de manipulação dessas células em laboratório antecedendo o transplante. Apesar disso, os únicos a avaliar essas células em animais sintomáticos foram Ohnishi e colaboradores (2009). Neste estudo, as CMMO são administradas a animais com 12 semanas de vida (84 dias). Ohnishi e colaboradores administraram as células na medula óssea após irradiação com até duas doses de 5,5 Gy e observaram aumento da sobrevida e melhora da função motora (Ohnishi et al. 2009). Entretanto, os resultados são observados

somente para GFP^{CMMO} e não para $mSOD1^{CMMO}$, e não são acompanhados de modificações morfológicas (Ohnishi et al. 2009).

A principal limitação da aplicação translacional destes dados é a via de administração. A mieloablação de pacientes já extremamente fragilizados implica em um procedimento de alto risco. Além disso, a grande maioria desses estudos, incluindo o de Ohnishi e colaboradores (2009), administrou as células em estudo em torno do 90º dia de vida dos camundongos e em torno do 100-110º dia para ratos $SOD1^{G93A}$. Este período corresponde a um estágio sintomático precoce, em que os animais histologicamente já apresentam morte de motoneurônios e astrocitose/microgliose (Knippenberg et al. 2012). Mas, os sinais funcionais de comprometimento motor são sutis e ainda não há sinais de paralisia (Turner and Talbot 2008). Comparativamente, quando acompanhamos o peso dos animais em nosso estudo, verificamos que o início da ELA se dá em torno da 12ª semana de vida dos animais (após o 84º dia). Também observamos que o comprometimento motor só é detectado a partir da 15ª semana (105 dias). Transpondo estes dados para a realidade do paciente, o tratamento aos 90 dias ainda é muito precoce, mesmo esses animais sendo considerados sintomáticos.

Sendo a maioria dos pacientes com ELA portadores da forma esporádica da doença, a procura por auxílio médico só será feita após o aparecimento de sintomas. Somado o tempo necessário para diagnóstico, tem-se um paciente que em geral apresentará sintomas mais agravados da doença. Portanto, optou-se neste estudo por avaliar também a administração das CMMO aos 110 dias de vida do animal. Neste período os animais já apresentavam perda significativa do seu peso máximo, bem como sinais de paralisia do membro inferior.

O único estudo de nosso conhecimento que testa o potencial terapêutico de células-tronco em um estágio tão tardio da ELA é o desenvolvido por Choi e colaboradores (2012). Estes pesquisadores administraram MSC (em dose inferior – 1×10^6 células - à usada em nossos experimentos, que foi de 10^7 células) em animais com 14-16 semanas de vida e não observaram modificações na sobrevida dos animais. A sobrevida só foi prolongada quando as células administradas foram modificadas para expressar *Ngn1* (Choi et al. 2012). Assim, mesmo avaliando o tratamento em estágio sintomático tardio, este estudo também é limitado pela falta de eficácia das MSC. Utilizando o modelo mdf/mcd Pastor e colaboradores (2012) demonstraram que as CMMO apresentam um perfil de migração e

sobrevivência mais favorável. Por isso, essas células também promovem melhor desfecho funcional quando comparadas às MSC (Pastor et al. 2012). Por outro lado, a necessidade de manipulação das células, com o uso de transdução retroviral também limita o uso das Ngn1MSC por pacientes com ELA.

Apesar do aumento de sobrevida observado para os animais tratados sintomaticamente, também se verificou que ele era muito inferior ao observado para os animais tratados aos 70 dias de vida. O tratamento pré-sintomático teve desfechos diferentes para as duas fontes de células estudadas, mas ambas promoveram aumento de sobrevida maior do que o observado para as ^{EGFP}CMMO administradas sintomaticamente. Além disso, o tratamento precoce teve repercussões sobre a função motora, preservando-a por mais tempo nos grupos tratados. Já no tratamento tardio, não se verifica modificação do declínio motor dos animais. Estas diferenças provavelmente estão relacionadas com a observação de preservação de motoneurônios somente para o tratamento com ^{EGFP}CMMO aos 70 dias.

De fato, a observação dessas diferenças nos levou a hipotetizar que um dos mecanismos envolvidos na neuroproteção fornecida pelas ^{EGFP}CMMO foi a modulação do estresse oxidativo. Essa hipótese se baseou nos achados apontando diferenças para o tratamento com células expressando a mSOD1, uma enzima que está relacionada com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Outros autores observaram modificações nas medidas de dano oxidativo após transplante celular (Uccelli et al. 2012). No entanto, nossos dados não indicam que esse mecanismo esteja envolvido no efeito observado.

Os mecanismos subjacentes à neuroproteção, e aos efeitos funcionais observados ainda não estão bem esclarecidos. Um grande número de estudos demonstrou a expressão de marcadores neurais por células da MO (Eglitis and Mezey 1997; Brazelton et al. 2000; Mezey et al. 2000; Corti et al. 2004; Zhao et al. 2007). Entretanto, é pouco provável que os efeitos das CMMO estejam relacionados com a transdiferenciação e reposição dos neurônios em degeneração. É mais provável que o mecanismo de ação dessas células esteja relacionado com um conjunto de mecanismos moleculares e celulares. Estes modificariam o microambiente em degeneração, promovendo a proteção do tecido e retardando o avanço da doença. Assim, o efeito das CMMO deve estar relacionado com a indução de

neurogênese, liberação de fatores tróficos ou modulação da atividade anti-inflamatória (Corti et al. 2007; Bigini et al. 2011; Nicaise et al. 2011).

A secreção de fatores tróficos pelas células transplantadas vem sendo extensamente estudada nos modelos experimentais de ELA (Suzuki and Svendsen 2008). A administração de células expressando fatores tróficos como GDNF, IGF-1 e VEGF (Suzuki et al. 2007; Suzuki et al. 2008; Hwang et al. 2009; Park et al. 2009), produz respostas mistas. Enquanto para as que expressam GDNF parece não haver alteração do fenótipo (Park et al. 2009), células expressando VEGF aumentam a sobrevida, diminuindo a expressão de Bax e caspase-3, e aumentando Bcl-2 e BclXL (Hwang et al. 2009). Os estudos também têm se concentrado em avaliar a secreção de inúmeros fatores pelas células transplantadas. Para células obtidas a partir da MO, parecem estar envolvidos nos mecanismos de neuroproteção e aumento da sobrevida fatores tróficos como o VEGF, Ang2 (Corti et al. 2010) e GDNF (Cabanes et al. 2007; Pastor et al. 2012). Resultados semelhantes foram observados após o transplante de HUCB (Bigini et al. 2011) e células-tronco neurais (Xu et al. 2006; Corti et al. 2007; Wyatt et al. 2011). Por outro lado, em pelo menos dois estudos, HUCB ou progenitores gliais promoveram melhora funcional e morfológica aumentar a secreção de BDNF, CTNF, GDNF, IGF-1 e VEGF (Lepore et al. 2008; Knippenberg et al. 2012).

A modulação da resposta também parece contribuir para o efeito neuroprotetor das células administradas. Além de diminuir a proliferação microglial, o transplante de células da MO diminui a expressão de TNF α (Uccelli et al. 2012) e NOX-2 e COX-2 (Boucherie et al. 2009). Alguns autores também demonstraram que as HUCB secretam citocinas (Bigini et al. 2011), aumentam a resposta Th2 e linfócitos no plasma (Garbuzova-Davis et al. 2008) e que células originárias do músculo esquelético podem atuar aumentando níveis de IL-10 e IL-13 (Canzi et al. 2012).

Outros fatores também podem influenciar o benefício terapêutico do transplante celular. Um deles pode estar relacionado com a manutenção dos níveis de GLT1, observados somente quando há aumento da sobrevida e neuroproteção tecidual (Lepore et al. 2008; Lepore et al. 2011; Uccelli et al. 2012). Além disso, interações célula-célula entre células saudáveis e células em degeneração também poderiam ter impacto nos efeitos observados (Boillee et al. 2006; Lindvall et al. 2012).

Dessa maneira, ensaios clínicos delineados com o objetivo de promover melhora por neuroproteção provavelmente tenham maior aplicação na ELA do que os baseados na substituição dos neurônios perdidos. Os resultados deste trabalho têm implicação direta no planejamento destes ensaios clínicos. De fato, a diferença de impacto sobre a funcionalidade de CMMO administradas precoce ou tardiamente pode explicar a grande variabilidade observadas nos estudos clínicos conduzidos com pacientes com ELA (Lindvall et al. 2012). É mais difícil determinar a influência do transplante autólogo nos desfechos observados nos estudos clínicos conduzidos até o momento. De qualquer forma, novos estudos que avaliem a eficácia de populações celulares de pacientes com ELA esporádica serão importantes para esclarecer estes aspectos.

Considerando, as diferenças que observamos para os dois períodos de tratamento, torna-se claro que o ideal em uma aplicação clínica é tratar pacientes com evolução recente da doença. Para aqueles em que há agravamento dos sintomas, o ganho limitado de sobrevida e a ausência de benefício funcional observados neste estudo devem ser ponderados. Além disso, mesmo as células portadoras da mutação produziram efeito terapêutico quando transplantadas neste período. Isto representa uma importante vantagem porque reduz as dificuldades de ser encontrado um doador compatível.

Por outro lado, mesmo discreto o aumento da sobrevida observado para o tratamento sintomático representa um avanço frente ao tratamento medicamentoso disponível – o riluzole. Além disso, estas observações abrem caminho para que outros estudos sejam realizados, utilizando doses maiores ou mesmo aplicações múltiplas de células-tronco, podendo trazer maior benefício terapêutico.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo foram investigados os efeitos da administração intravenosa da fração mononuclear da MO obtida a partir de doadores EGFP⁺ ou doadores que expressam a mSOD1 em camundongos SOD1^{G93A} aos 70 ou 110 dias de vida.

Esta investigação possibilitou as seguintes conclusões:

- 1) EGFP⁺CMMO e mSOD1⁺CMMO transplantadas em animais pré-sintomáticos prolongam a sobrevida, embora o efeito seja maior para o transplante de EGFP⁺CMMO. Por outro lado, em animais sintomáticos somente o transplante de EGFP⁺CMMO prolonga a sobrevida. O tratamento no período pré-sintomático leva a um aumento na sobrevida significativamente maior do que o observado para o transplante no período sintomático.
- 2) EGFP⁺CMMO e mSOD1⁺CMMO transplantadas em animais pré-sintomáticos preservam o desempenho motor os animais tratados no período pré-sintomático. Além disso, as EGFP⁺CMMO retardam o aparecimento de déficit motor. Por outro lado, o tratamento no período sintomático não alterou o curso de comprometimento motor os animais transplantados.
- 3) EGFP⁺CMMO e mSOD1⁺CMMO retardam o início e o estabelecimento do estágio sintomático da ELA em animais tratados no período pré-sintomático;
- 4) EGFP⁺CMMO e mSOD1⁺CMMO transplantadas intravenosamente em ambos os períodos de intervenção estudados migram até a medula espinhal dos animais transplantados.
- 5) A reversão dos danos de DNA associados com estresse oxidativo e medidos pelo ensaio do cometa alcalino não está relacionada com o efeito terapêutico observado para as CMMO.
- 6) Somente o transplante de EGFP⁺CMMO no período pré-sintomático promove preservação de motoneurônios do corno ventral da medula espinhal.

7 REFERÊNCIAS

- Almer, G., C. Guegan, P. Teismann, et al. (2001). "Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **49**(2): 176-185.
- Anand, P., A. Parrett, J. Martin, et al. (1995). "Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease." Nat Med **1**(2): 168-172.
- Appel, S. H., J. I. Engelhardt, J. S. Henkel, et al. (2008). "Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis." Neurology **71**(17): 1326-1334.
- Azzouz, M., G. S. Ralph, E. Storkebaum, et al. (2004). "VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model." Nature **429**(6990): 413-417.
- Beal, M. F., R. J. Ferrante, S. E. Browne, et al. (1997). "Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **42**(4): 644-654.
- Bensimon, G., L. Lacomblez, V. Meininger, et al. (1994). "A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic-Lateral-Sclerosis." New England Journal of Medicine **330**(9): 585-591.
- Bento-Abreu, A., P. Van Damme, L. Van Den Bosch, et al. (2010). "The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis." Eur J Neurosci **31**(12): 2247-2265.
- Bettini, M., G. M. Gargiulo-Monachelli, G. Rodriguez, et al. (2011). "Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis patients in a centre in Buenos Aires." Arquivos De Neuro-Psiquiatria **69**(6): 867-870.
- Bigini, P., P. Veglianese, G. Andriolo, et al. (2011). "Intracerebroventricular administration of human umbilical cord blood cells delays disease progression in two murine models of motor neuron degeneration." Rejuvenation Res **14**(6): 623-639.
- Blanquer, M., J. M. Moraleda, F. Iniesta, et al. (2012). "Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study." Stem Cells **30**(6): 1277-1285.
- Boillee, S., K. Yamanaka, C. S. Lobsiger, et al. (2006). "Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia." Science **312**(5778): 1389-1392.

- Borchelt, D. R., M. K. Lee, H. S. Slunt, et al. (1994). "Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8292-8296.
- Boucherie, C., S. Schafer, P. Lavand'homme, et al. (2009). "Chimerization of Astroglial Population in the Lumbar Spinal Cord after Mesenchymal Stem Cell Transplantation Prolongs Survival in a Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." Journal of Neuroscience Research **87**(9): 2034-2046.
- Brazelton, T. R., F. M. Rossi, G. I. Keshet, et al. (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." Science **290**(5497): 1775-1779.
- Brignier, A. C. and A. M. Gewirtz (2010). "Embryonic and adult stem cell therapy." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S336-344.
- Bristol, L. A. and J. D. Rothstein (1996). "Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex." Ann Neurol **39**(5): 676-679.
- Brooks, B. R. (1994). "El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors." J Neurol Sci **124 Suppl**: 96-107.
- Brooks, B. R. (2009). "Managing amyotrophic lateral sclerosis: slowing disease progression and improving patient quality of life." Ann Neurol **65 Suppl 1**: S17-23.
- Brooks, B. R., R. G. Miller, M. Swash, et al. (2000). "El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis." Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord **1**(5): 293-299.
- Brooks, S. P. and S. B. Dunnett (2009). "Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide." Nat Rev Neurosci **10**(7): 519-529.
- Brujin, L. I., M. K. Houseweart, S. Kato, et al. (1998). "Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1." Science **281**(5384): 1851-1854.
- Brujin, L. I., T. M. Miller and D. W. Cleveland (2004). "Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS." Annu Rev Neurosci **27**: 723-749.
- Cabanes, C., S. Bonilla, L. Tabares, et al. (2007). "Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration." Neurobiol Dis **26**(2): 408-418.

- Canzi, L., V. Castellaneta, S. Navone, et al. (2012). "Human Skeletal Muscle Stem Cell Antiinflammatory Activity Ameliorates Clinical Outcome in Amyotrophic Lateral Sclerosis Models." Molecular Medicine **18**(3): 401-411.
- Carney, B. J. and K. Shah (2011). "Migration and fate of therapeutic stem cells in different brain disease models." Neuroscience.
- Chance, P. F., B. A. Rabin, S. G. Ryan, et al. (1998). "Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34." Am J Hum Genet **62**(3): 633-640.
- Chio, A., G. Benzi, M. Dossena, et al. (2005). "Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players." Brain **128**(Pt 3): 472-476.
- Chio, A., G. Restagno, M. Brunetti, et al. (2012). "ALS/FTD phenotype in two Sardinian families carrying both C9ORF72 and TARDBP mutations." J Neurol Neurosurg Psychiatry **83**(7): 730-733.
- Cho, G. W., M. Y. Noh, H. Y. Kim, et al. (2010). "Bone Marrow-Derived Stromal Cells from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients Have Diminished Stem Cell Capacity." Stem Cells Dev **19**(7): 1035-1042.
- Choi, C. I., Y. D. Lee, H. Kim, et al. (2012). "Neural Induction with Neurogenin 1 Enhances the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in an ALS Mouse Model." Cell Transplant.
- Clement, A. M., M. D. Nguyen, E. A. Roberts, et al. (2003). "Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice." Science **302**(5642): 113-117.
- Cleveland, D. W. and J. D. Rothstein (2001). "From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS." Nat Rev Neurosci **2**(11): 806-819.
- Cogle, C. R., A. T. Yachnis, E. D. Laywell, et al. (2004). "Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study." Lancet **363**(9419): 1432-1437.
- Conti, L., T. Cataudella and E. Cattaneo (2003). "Neural stem cells: a pharmacological tool for brain diseases?" Pharmacol Res **47**(4): 289-297.
- Cordes, A. L., K. Jahn, R. Hass, et al. (2011). "Intramedullary spinal cord implantation of human CD34(+) umbilical cord-derived cells in ALS." Amyotrophic Lateral Sclerosis **12**(5): 325-330.
- Corti, S., F. Locatelli, C. Donadoni, et al. (2004). "Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues." Brain **127**(Pt 11): 2518-2532.

- Corti, S., F. Locatelli, D. Papadimitriou, et al. (2007). "Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model." Brain **130**(Pt 5): 1289-1305.
- Corti, S., M. Nizzardo, M. Nardini, et al. (2010). "Systemic transplantation of c-kit+ cells exerts a therapeutic effect in a model of amyotrophic lateral sclerosis." Hum Mol Genet **19**(19): 3782-3796.
- Costa-Ferro, Z. S., B. S. Souza, M. M. Leal, et al. (2012). "Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats." Neurobiol Dis **46**(2): 302-313.
- Costa-Ferro, Z. S., A. S. Vitola, M. F. Pedroso, et al. (2010). "Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy." Seizure **19**(2): 84-92.
- DaCosta, J. V., GT (2012). Aplicações de Células -Tronco nas Doenças do Sistema Nervoso Central. Células-Tronco - Ciência, Tecnologia e Ética. A. T. F. J. P. d. F. K. S. Ogliari. Rio de Janeiro, Revinter. **1**: 138-173.
- de Matos, S. E., M. T. R. P. Conde, F. M. Favero, et al. (2011). "Mortality rates due to amyotrophic lateral sclerosis in Sao Paulo City from 2002 to 2006." Arquivos De Neuro-Psiquiatria **69**(6): 861-866.
- de Paula, S., S. Greggio, D. R. Marinowic, et al. (2012). "The dose-response effect of acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells on brain damage and spatial memory deficits in neonatal hypoxia-ischemia." Neuroscience **210**: 431-441.
- de Paula, S., A. S. Vitola, S. Greggio, et al. (2009). "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." Pediatr Res **65**(6): 631-635.
- Deda, H., M. C. Inci, A. E. Kurekci, et al. (2009). "Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up." Cytotherapy **11**(1): 18-25.
- DeJesus-Hernandez, M., I. R. Mackenzie, B. F. Boeve, et al. (2011). "Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS." Neuron **72**(2): 245-256.
- Deng, H. X., W. Chen, S. T. Hong, et al. (2011). "Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia." Nature **477**(7363): 211-215.

- Di Giorgio, F. P., M. A. Carrasco, M. C. Siao, et al. (2007). "Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model." Nat Neurosci **10**(5): 608-614.
- Diaz-Amarilla, P., S. Olivera-Bravo, E. Trias, et al. (2011). "Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(44): 18126-18131.
- Dietrich-Neto, F., D. Callegaro, E. Dias-Tosta, et al. (2000). "Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: 1998 national survey." Arq Neuropsiquiatr **58**(3A): 607-615.
- Dion, P. A., H. Daoud and G. A. Rouleau (2009). "Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms." Nat Rev Genet **10**(11): 769-782.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Eglitis, M. A. and E. Mezey (1997). "Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4080-4085.
- Elliott, J. L. (2001). "Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis." Molecular Brain Research **95**(1-2): 172-178.
- Ende, N., F. Weinstein, R. Chen, et al. (2000). "Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis)." Life Sci **67**(1): 53-59.
- Ferrante, R. J., S. E. Browne, L. A. Shinobu, et al. (1997). "Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." J Neurochem **69**(5): 2064-2074.
- Fischer, L. R., D. G. Culver, P. Tennant, et al. (2004). "Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man." Exp Neurol **185**(2): 232-240.
- Frostyakov, S., P. Jendelova, M. Kapcalova, et al. (2011). "Mesenchymal stromal cells prolong the lifespan in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis." Cytotherapy **13**(9): 1036-1046.
- Fuchs, E. and J. A. Segre (2000). "Stem cells: a new lease on life." Cell **100**(1): 143-155.
- Gamez, J., F. Carmona, N. Ragner, et al. (2010). "Cellular transplants in amyotrophic lateral sclerosis patients: an observational study." Cytotherapy **12**(5): 669-677.
- Garbuzova-Davis, S., E. Haller, S. Saporta, et al. (2007). "Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS." Brain Res **1157**: 126-137.

- Garbuzova-Davis, S., M. C. Rodrigues, S. Mirtyl, et al. (2012). "Multiple intravenous administrations of human umbilical cord blood cells benefit in a mouse model of ALS." PLoS One **7**(2): e31254.
- Garbuzova-Davis, S., C. D. Sanberg, N. Kuzmin-Nichols, et al. (2008). "Human umbilical cord blood treatment in a mouse model of ALS: optimization of cell dose." PLoS One **3**(6): e2494.
- Garbuzova-Davis, S. and P. R. Sanberg (2009). "Feasibility of cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis." Exp Neurol **216**(1): 3-6.
- Garbuzova-Davis, S., S. Saporta, E. Haller, et al. (2007). "Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS." PLoS One **2**(11): e1205.
- Garbuzova-Davis, S., A. E. Willing, M. Milliken, et al. (2001). "Intraspinal implantation of hNT neurons into SOD1 mice with apparent motor deficit." Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord **2**(4): 175-180.
- Garbuzova-Davis, S., A. E. Willing, M. Milliken, et al. (2002). "Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis." Exp Neurol **174**(2): 169-180.
- Garbuzova-Davis, S., A. E. Willing, S. Saporta, et al. (2006). "Multiple transplants of hNT cells into the spinal cord of SOD1 mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis." Amyotroph Lateral Scler **7**(4): 221-226.
- Garbuzova-Davis, S., A. E. Willing, T. Zigova, et al. (2003). "Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation." J Hematother Stem Cell Res **12**(3): 255-270.
- Gitcho, M. A., R. H. Baloh, S. Chakraverty, et al. (2008). "TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease." Ann Neurol **63**(4): 535-538.
- Glass, J. D., N. M. Boulis, K. Johe, et al. (2012). "Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients." Stem Cells **30**(6): 1144-1151.
- Goodall, E. F. and K. E. Morrison (2006). "Amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease): proposed mechanisms and pathways to treatment." Expert Rev Mol Med **8**(11): 1-22.
- Gouveia, L. O. and M. de Carvalho (2007). "Young-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a distinct nosological entity?" Amyotroph Lateral Scler **8**(6): 323-327.
- Greggio, S., S. de Paula, I. M. de Oliveira, et al. (2011). "NAP prevents acute cerebral oxidative stress and protects against long-term brain injury and cognitive

- impairment in a model of neonatal hypoxia-ischemia." Neurobiol Dis **44**(1): 152-159.
- Gurney, M. E., H. Pu, A. Y. Chiu, et al. (1994). "Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation." Science **264**(5166): 1772-1775.
- Haas, S., N. Weidner and J. Winkler (2005). "Adult stem cell therapy in stroke." Curr Opin Neurol **18**(1): 59-64.
- Habisch, H. J., M. Janowski, D. Binder, et al. (2007). "Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects." J Neural Transm **114**(11): 1395-1406.
- Hall, E. D., J. A. Oostveen and M. E. Gurney (1998). "Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS." Glia **23**(3): 249-256.
- Hefferan, M. P., K. Johe, T. Hazel, et al. (2011). "Optimization of immunosuppressive therapy for spinal grafting of human spinal stem cells in a rat model of ALS." Cell Transplant **20**(8): 1153-1161.
- Henkel, J. S., J. I. Engelhardt, L. Siklos, et al. (2004). "Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue." Ann Neurol **55**(2): 221-235.
- Hervias, I., M. F. Beal and G. Manfredi (2006). "Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis." Muscle Nerve **33**(5): 598-608.
- Hwang, D. H., H. J. Lee, I. H. Park, et al. (2009). "Intrathecal transplantation of human neural stem cells overexpressing VEGF provide behavioral improvement, disease onset delay and survival extension in transgenic ALS mice." Gene Therapy **16**(10): 1234-1244.
- Igoudjil, A., J. Magrane, L. R. Fischer, et al. (2011). "In vivo pathogenic role of mutant SOD1 localized in the mitochondrial intermembrane space." J Neurosci **31**(44): 15826-15837.
- Janson, C. G., T. M. Ramesh, M. J. During, et al. (2001). "Rapid communication - Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis." J Hematother Stem Cell Res **10**(6): 913-915.
- Johnston, C. A., B. R. Stanton, M. R. Turner, et al. (2006). "Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London." J Neurol **253**(12): 1642-1643.

- Julien, J. P. (2001). "Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded." Cell **104**(4): 581-591.
- Kabashi, E., P. N. Valdmanis, P. Dion, et al. (2008). "TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." Nat Genet **40**(5): 572-574.
- Kaji, E. H. and J. M. Leiden (2001). "Gene and stem cell therapies." JAMA **285**(5): 545-550.
- Karussis, D., C. Karageorgiou, A. Vaknin-Dembinsky, et al. (2010). "Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis." Arch Neurol **67**(10): 1187-1194.
- Kaspar, B. K., J. Llado, N. Sherkat, et al. (2003). "Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model." Science **301**(5634): 839-842.
- Kieran, D., B. Kalmar, J. R. Dick, et al. (2004). "Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice." Nat Med **10**(4): 402-405.
- Kim, H., H. Y. Kim, M. R. Choi, et al. (2010). "Dose-dependent efficacy of ALS-human mesenchymal stem cells transplantation into cisterna magna in SOD1-G93A ALS mice." Neurosci Lett **468**(3): 190-194.
- Knippenberg, S., N. Thau, R. Dengler, et al. (2010). "Significance of behavioural tests in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." Behav Brain Res **213**(1): 82-87.
- Knippenberg, S., N. Thau, K. Schwabe, et al. (2012). "Intraspinal Injection of Human Umbilical Cord Blood-Derived Cells Is Neuroprotective in a Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." Neurodegenerative Diseases **9**(3): 107-120.
- Koda, M., S. Okada, T. Nakayama, et al. (2005). "Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice." Neuroreport **16**(16): 1763-1767.
- Koh, S. H., W. Baik, M. Y. Noh, et al. (2012). "The functional deficiency of bone marrow mesenchymal stromal cells in ALS patients is proportional to disease progression rate (vol 233, pg 472, 2012)." Exp Neurol **234**(2): 527-527.
- Korbling, M. and Z. Estrov (2003). "Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?" N Engl J Med **349**(6): 570-582.
- Krabbe, C., J. Zimmer and M. Meyer (2005). "Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review." APMIS **113**(11-12): 831-844.

- Krasnianski, A., M. Deschauer, S. Neudecker, et al. (2005). "Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies." Brain **128**(Pt 8): 1870-1876.
- Lacomblez, L., G. Bensimon, P. N. Leigh, et al. (2002). "Long-term safety of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis." Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders **3**(1): 23-29.
- Lambrechts, D., K. Poesen, R. Fernandez-Santiago, et al. (2009). "Meta-analysis of vascular endothelial growth factor variations in amyotrophic lateral sclerosis: increased susceptibility in male carriers of the -2578AA genotype." J Med Genet **46**(12): 840-846.
- Lepore, A. C., J. O'Donnell, A. S. Kim, et al. (2011). "Human glial-restricted progenitor transplantation into cervical spinal cord of the SOD1 mouse model of ALS." PLoS One **6**(10): e25968.
- Lepore, A. C., J. O'Donnell, A. S. Kim, et al. (2011). "Human Glial-Restricted Progenitor Transplantation into Cervical Spinal Cord of the SOD1(G93A) Mouse Model of ALS." PLoS One **6**(10).
- Lepore, A. C., B. Rauck, C. Dejea, et al. (2008). "Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease." Nat Neurosci **11**(11): 1294-1301.
- Levy, Y. S., M. Bahat-Stroomza, R. Barzilay, et al. (2008). "Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease." Cytotherapy **10**(4): 340-352.
- Lindvall, O., R. A. Barker, O. Brustle, et al. (2012). "Clinical translation of stem cells in neurodegenerative disorders." Cell Stem Cell **10**(2): 151-155.
- Lindvall, O. and Z. Kokaia (2006). "Stem cells for the treatment of neurological disorders." Nature **441**(7097): 1094-1096.
- Lindvall, O. and Z. Kokaia (2010). "Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation?" J Clin Invest **120**(1): 29-40.
- Liu, D., F. Bao, J. Wen, et al. (2007). "Mutation of superoxide dismutase elevates reactive species: comparison of nitration and oxidation of proteins in different brain regions of transgenic mice with amyotrophic lateral sclerosis." Neuroscience **146**(1): 255-264.
- Logroscino, G., E. Beghi, S. Zoccolella, et al. (2005). "Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in southern Italy: a population based study." J Neurol Neurosurg Psychiatry **76**(8): 1094-1098.

- Logroscino, G., B. J. Traynor, O. Hardiman, et al. (2008). "Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues." J Neurol Neurosurg Psychiatry **79**(1): 6-11.
- Majounie, E., A. E. Renton, K. Mok, et al. (2012). "Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study." Lancet Neurol **11**(4): 323-330.
- Martinez, H. R., M. T. Gonzalez-Garza, J. E. Moreno-Cuevas, et al. (2009). "Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients." Cytotherapy **11**(1): 26-34.
- Maruyama, H., H. Morino, H. Ito, et al. (2010). "Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis." Nature **465**(7295): 223-226.
- Mazzini, L., F. Fagioli, R. Boccaletti, et al. (2003). "Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans." Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord **4**(3): 158-161.
- Mazzini, L., I. Ferrero, V. Luparello, et al. (2010). "Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial." Exp Neurol **223**(1): 229-237.
- Mazzini, L., I. Ferrero, V. Luparello, et al. (2010). "Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial." Exp Neurol **223**(1): 229-237.
- Mazzini, L., K. Mareschi, I. Ferrero, et al. (2012). "Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study." Cytotherapy **14**(1): 56-60.
- Mazzini, L., K. Mareschi, I. Ferrero, et al. (2008). "Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis." J Neurol Sci **265**(1-2): 78-83.
- Mezey, E., K. J. Chandross, G. Harta, et al. (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science **290**(5497): 1779-1782.
- Millecamps, S., S. Boillee, I. Le Ber, et al. (2012). "Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes." J Med Genet **49**(4): 258-263.
- Miller, R. G., F. Anderson, B. R. Brooks, et al. (2009). "Outcomes research in amyotrophic lateral sclerosis: lessons learned from the amyotrophic lateral sclerosis clinical assessment, research, and education database." Ann Neurol **65** Suppl 1: S24-28.

- Miller, R. G., J. D. Mitchell, M. Lyon, et al. (2007). "Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND)." Cochrane Database Syst Rev(1): CD001447.
- Mitchell, J. D. and G. D. Borasio (2007). "Amyotrophic lateral sclerosis." Lancet **369**(9578): 2031-2041.
- Mitne-Neto, M., M. Machado-Costa, M. C. Marchetto, et al. (2011). "Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients." Hum Mol Genet **20**(18): 3642-3652.
- Mitrecic, D., C. Nicaise, S. Gajovic, et al. (2010). "Distribution, differentiation, and survival of intravenously administered neural stem cells in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis." Cell Transplant **19**(5): 537-548.
- Mitsumoto, H. and J. G. Rabkin (2007). "Palliative care for patients with amyotrophic lateral sclerosis: "prepare for the worst and hope for the best"." JAMA **298**(2): 207-216.
- Morita, E., Y. Watanabe, M. Ishimoto, et al. (2008). "A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model." Exp Neurol **213**(2): 431-438.
- Morrison, S. J., N. M. Shah and D. J. Anderson (1997). "Regulatory mechanisms in stem cell biology." Cell **88**(3): 287-298.
- Moviglia, G. A., M. T. Moviglia-Brandolino, G. S. Varela, et al. (2012). "Feasibility, Safety and Preliminary Proof of Principles of Autologous Neural Stem Cell Treatment Combined with T Cell Vaccination for ALS Patients." Cell Transplant.
- Mulder, D. W., L. T. Kurland, K. P. Offord, et al. (1986). "Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis." Neurology **36**(4): 511-517.
- Nagai, M., D. B. Re, T. Nagata, et al. (2007). "Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons." Nat Neurosci **10**(5): 615-622.
- Neary, D., J. S. Snowden and D. M. Mann (2000). "Cognitive change in motor neurone disease/amyotrophic lateral sclerosis (MND/ALS)." J Neurol Sci **180**(1-2): 15-20.
- Nicaise, C., D. Mitrecic, P. Demetter, et al. (2009). "Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat." Brain Res **1301**: 152-162.
- Nicaise, C., D. Mitrecic and R. Pochet (2011). "Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells." Neuropathology and Applied Neurobiology **37**(2): 179-188.

- Ohnishi, S., H. Ito, Y. Suzuki, et al. (2009). "Intra-bone marrow-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis." Brain Res **1296**: 216-224.
- Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, et al. (1997). "'Green mice' as a source of ubiquitous green cells." FEBS Lett **407**(3): 313-319.
- Oosthuyse, B., L. Moons, E. Storkebaum, et al. (2001). "Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration." Nat Genet **28**(2): 131-138.
- Park, S., H. T. Kim, S. Yun, et al. (2009). "Growth factor-expressing human neural progenitor cell grafts protect motor neurons but do not ameliorate motor performance and survival in ALS mice." Experimental and Molecular Medicine **41**(7): 487-500.
- Pasinelli, P. and R. H. Brown (2006). "Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics." Nat Rev Neurosci **7**(9): 710-723.
- Pasinelli, P., M. K. Houseweart, R. H. Brown, Jr., et al. (2000). "Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13901-13906.
- Pastor, D., M. C. Viso-Len, J. Jones, et al. (2012). "Comparative Effects between Bone Marrow and Mesenchymal Stem Cell Transplantation in GDNF Expression and Motor Function Recovery in a Motorneuron Degenerative Mouse Model." Stem Cell Reviews and Reports **8**(2): 445-458.
- Phinney, D. G. and D. J. Prockop (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views." Stem Cells **25**(11): 2896-2902.
- Renton, A. E., E. Majounie, A. Waite, et al. (2011). "A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD." Neuron **72**(2): 257-268.
- Riley, J., T. Federici, M. Polak, et al. (2012). "Intraspinal Stem Cell Transplantation in ALS: A Phase I Safety Trial, Technical Note & Lumbar Safety Outcomes." Neurosurgery.
- Rizvanov, A. A., A. P. Kiyasov, I. M. Gaziziov, et al. (2008). "Human umbilical cord blood cells transfected with VEGF and L(1)CAM do not differentiate into neurons but transform into vascular endothelial cells and secrete neuro-trophic factors to support neuro-genesis-a novel approach in stem cell therapy." Neurochemistry International **53**(6-8): 389-394.

- Roberts, B. R., J. A. Tainer, E. D. Getzoff, et al. (2007). "Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS." J Mol Biol **373**(4): 877-890.
- Robertson, J., J. M. Beaulieu, M. M. Doroudchi, et al. (2001). "Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha." J Cell Biol **155**(2): 217-226.
- Rosen, D. R. (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." Nature **364**(6435): 362.
- Rothstein, J. D. (2009). "Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **65 Suppl 1**: S3-9.
- Rothstein, J. D., M. Van Kammen, A. I. Levey, et al. (1995). "Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **38**(1): 73-84.
- Rowland, L. P. and N. A. Shneider (2001). "Amyotrophic lateral sclerosis." N Engl J Med **344**(22): 1688-1700.
- Sathasivam, S. and P. J. Shaw (2005). "Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis--what is the evidence?" Lancet Neurol **4**(8): 500-509.
- Sejvar, J. J., R. C. Holman, J. S. Bresee, et al. (2005). "Amyotrophic lateral sclerosis mortality in the United States, 1979-2001." Neuroepidemiology **25**(3): 144-152.
- Selmani, Z., A. Naji, I. Zidi, et al. (2008). "Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells." Stem Cells **26**(1): 212-222.
- Shaw, P. J., V. Forrest, P. G. Ince, et al. (1995). "CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients." Neurodegeneration **4**(2): 209-216.
- Shook, S. J. and E. P. Piro (2009). "Racing against the clock: recognizing, differentiating, diagnosing, and referring the amyotrophic lateral sclerosis patient." Ann Neurol **65 Suppl 1**: S10-16.
- Siciliano, G., C. D'Avino, A. Del Corona, et al. (2002). "Impaired oxidative metabolism and lipid peroxidation in exercising muscle from ALS patients." Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord **3**(2): 57-62.
- Siddique, T., D. A. Figlewicz, M. A. Pericak-Vance, et al. (1991). "Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity." N Engl J Med **324**(20): 1381-1384.

- Silani, V., L. Cova, M. Corbo, et al. (2004). "Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis." Lancet **364**(9429): 200-202.
- Simpson, E. P., A. A. Yen and S. H. Appel (2003). "Oxidative Stress: a common denominator in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis." Curr Opin Rheumatol **15**(6): 730-736.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice, et al. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Exp Cell Res **175**(1): 184-191.
- Souayah, N., K. M. Coakley, R. Chen, et al. (2012). "Defective neuromuscular transmission in the SOD1 G93A transgenic mouse improves after administration of human umbilical cord blood cells." Stem Cell Rev **8**(1): 224-228.
- Spreux-Varoquaux, O., G. Bensimon, L. Lacomblez, et al. (2002). "Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients." J Neurol Sci **193**(2): 73-78.
- Sreedharan, J., I. P. Blair, V. B. Tripathi, et al. (2008). "TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis." Science **319**(5870): 1668-1672.
- Sutedja, N. A., J. H. Veldink, K. Fischer, et al. (2007). "Lifetime occupation, education, smoking, and risk of ALS." Neurology **69**(15): 1508-1514.
- Suzuki, M., J. McHugh, C. Tork, et al. (2008). "Direct Muscle Delivery of GDNF With Human Mesenchymal Stem Cells Improves Motor Neuron Survival and Function in a Rat Model of Familial ALS." Molecular Therapy **16**(12): 2002-2010.
- Suzuki, M., J. McHugh, C. Tork, et al. (2007). "GDNF Secreting Human Neural Progenitor Cells Protect Dying Motor Neurons, but Not Their Projection to Muscle, in a Rat Model of Familial ALS." PLoS One **2**(8).
- Suzuki, M. and C. N. Svendsen (2008). "Combining growth factor and stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis." Trends Neurosci **31**(4): 192-198.
- Tice, R. R., E. Agurell, D. Anderson, et al. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." Environ Mol Mutagen **35**(3): 206-221.
- Turner, B. J. and K. Talbot (2008). "Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS." Progress in Neurobiology **85**(1): 94-134.
- Uccelli, A., M. Milanese, M. C. Principato, et al. (2012). "Intravenous Mesenchymal Stem Cells Improve Survival and Motor Function in Experimental Amyotrophic Lateral Sclerosis." Molecular Medicine.

- Uccelli, R., A. Binazzi, P. Altavista, et al. (2007). "Geographic distribution of amyotrophic lateral sclerosis through motor neuron disease mortality data." Eur J Epidemiol **22**(11): 781-790.
- Van Deerlin, V. M., J. B. Leverenz, L. M. Bekris, et al. (2008). "TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis." Lancet Neurol **7**(5): 409-416.
- Vance, C., B. Rogelj, T. Hortobagyi, et al. (2009). "Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6." Science **323**(5918): 1208-1211.
- Venturin, G. T., S. Greggio, D. R. Marinovic, et al. (2011). "Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats." Life Sci **89**(7-8): 229-234.
- Vercelli, A., O. M. Mereuta, D. Garbossa, et al. (2008). "Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." Neurobiol Dis **31**(3): 395-405.
- Wang, L., I. Tran, K. Seshareddy, et al. (2009). "A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering." Tissue Eng Part A **15**(8): 2259-2266.
- Wang, L. J., Y. Y. Lu, S. Muramatsu, et al. (2002). "Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis." J Neurosci **22**(16): 6920-6928.
- Wang, Y., X. O. Mao, L. Xie, et al. (2007). "Vascular endothelial growth factor overexpression delays neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice." J Neurosci **27**(2): 304-307.
- Weiss, M. L. and D. L. Troyer (2006). "Stem cells in the umbilical cord." Stem Cell Rev **2**(2): 155-162.
- Weisskopf, M. G., E. J. O'Reilly, M. L. McCullough, et al. (2005). "Prospective study of military service and mortality from ALS." Neurology **64**(1): 32-37.
- Weydt, P., S. Y. Hong, M. Kliot, et al. (2003). "Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS." Neuroreport **14**(7): 1051-1054.
- Wijesekera, L. C. and P. N. Leigh (2009). "Amyotrophic lateral sclerosis." Orphanet J Rare Dis **4**: 3.

- Williamson, T. L. and D. W. Cleveland (1999). "Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons." Nat Neurosci **2**(1): 50-56.
- Willing, A. E., S. Garbuzova-Davis, S. Saporta, et al. (2001). "hNT neurons delay onset of motor deficits in a model of amyotrophic lateral sclerosis." Brain Res Bull **56**(6): 525-530.
- Worms, P. M. (2001). "The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies." J Neurol Sci **191**(1-2): 3-9.
- Wyatt, T. J., S. L. Rossi, M. M. Siegenthaler, et al. (2011). "Human motor neuron progenitor transplantation leads to endogenous neuronal sparing in 3 models of motor neuron loss." Stem Cells Int **2011**: 207230.
- Xu, L., D. K. Ryugo, T. Pongstaporn, et al. (2009). "Human neural stem cell grafts in the spinal cord of SOD1 transgenic rats: differentiation and structural integration into the segmental motor circuitry." J Comp Neurol **514**(4): 297-309.
- Xu, L., J. Yan, D. Chen, et al. (2006). "Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats." Transplantation **82**(7): 865-875.
- Xu, Z., L. C. Cork, J. W. Griffin, et al. (1993). "Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease." Cell **73**(1): 23-33.
- Yamanaka, K., S. Boillee, E. A. Roberts, et al. (2008). "Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(21): 7594-7599.
- Yamanaka, K., S. J. Chun, S. Boillee, et al. (2008). "Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis." Nat Neurosci **11**(3): 251-253.
- Yan, J., L. Xu, A. M. Welsh, et al. (2006). "Combined immunosuppressive agents or CD4 antibodies prolong survival of human neural stem cell grafts and improve disease outcomes in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice." Stem Cells **24**(8): 1976-1985.
- Yoshida, S., D. W. Mulder, L. T. Kurland, et al. (1986). "Follow-up study on amyotrophic lateral sclerosis in Rochester, Minn., 1925 through 1984." Neuroepidemiology **5**(2): 61-70.
- Zhang, C., C. Zhou, J. J. Teng, et al. (2009). "Multiple administrations of human marrow stromal cells through cerebrospinal fluid prolong survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." Cytherapy **11**(3): 299-306.

- Zhang, C., C. Zhou, J. J. Teng, et al. (2009). "Multiple administrations of human marrow stromal cells through cerebrospinal fluid prolong survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (vol 11, pg 299, 2009)." Cytherapy **11**(6): 807-807.
- Zhao, C. P., C. Zhang, S. N. Zhou, et al. (2007). "Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice." Cytherapy **9**(5): 414-426.
- Zhong, Z., R. Deane, Z. Ali, et al. (2008). "ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration." Nat Neurosci **11**(4): 420-422.

8 ANEXOS

ANEXO I – Artigo Científico Submetido à Experimental Neurology

Manuscript Number:

Title: Transplantation of bone marrow mononuclear cells prolongs survival, delays disease onset and progression and mitigates neuronal loss in pre-symptomatic-treated ALS mice, and prolongs survival in late symptomatic-treated animals

Article Type: Regular Paper

Section/Category: Transplantation and Repair

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis; bone marrow stem cells; SOD1 transgenic mice.

Corresponding Author: Dr Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Laboratório de Neurociências e de Sinalização Celular, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)

First Author: Gianina T Venturin, MSc

Order of Authors: Gianina T Venturin, MSc; Samuel Greggio, MSc; Gabriele Zanirati; Daniel R Marinowic; Iuri M Oliveira; João Antonio P Henriques, PhD; Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Abstract: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of upper and lower motoneurons. Motoneuron loss leads to progressive paralysis and death in 2-5 years. Cell-based therapy can provide novel strategies aiming to restore lost neurons or modulate the degenerating microenvironment providing neuroprotection. This study verified the therapeutic potential of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) on SOD1G93A mice treated either before disease onset or at a late symptomatic stage. BMMCs were obtained from enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic C57BL/6 mice (EGFPBMMC) or from SOD1G93A transgenic mice (mSOD1BMMC). Cell migration was observed with PCR analysis. Survival, body weight and motor performance were followed after transplantation. DNA integrity was evaluated by the alkaline comet assay. Additionally, spinal cords were collected to assess motoneuron preservation using immunofluorescence. Our data show that both EGFPBMMC and mSOD1BMMC transplantation to pre-symptomatic SOD1G93A mice prolongs survival and delays disease progression. However, the effects were more significant for EGFPBMMC-transplanted mice. Also, EGFPBMMC was neuroprotective to degenerating motoneurons. When administered to late symptomatic mice, only EGFPBMMC prolonged survival. However, survival increase was more discrete and not accompanied of body weight or motor performance preservation. DNA from either EGFPBMMC or mSOD1BMMC was found in the spinal cord of transplanted animals. Additionally, DNA damage was not modified by BMMC in any of the studied groups. The positive behavioral effects observed in our study indicate that BMMCs could represent a promising therapeutic option in the management of ALS. Nonetheless, the limited results we observed for late transplanted mice call for caution before clinical application.

Transplantation of bone marrow mononuclear cells prolongs survival, delays disease onset and progression and mitigates neuronal loss in pre-symptomatic-treated ALS mice, and prolongs survival in late symptomatic-treated animals

Gianina Teribele Venturin¹, Samuel Greggio¹, Gabriele Zanirati¹, Daniel Rodrigo Marinowic², Iuri Marques de Oliveira³, João Antonio Pêgas Henriques³, Jaderson Costa DaCosta^{1*}

¹Laboratório de Neurociências, ²Laboratório de Terapia Celular, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding Author: Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD.

Instituto do Cérebro (Inscer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 60, 2º andar, sala 07, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +5551 33203250

Fax: +5551 33203312

E-mail: jcc@pucrs.br

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of upper and lower motoneurons. Motoneuron loss leads to progressive paralysis and death in 2-5 years. Cell-based therapy can provide novel strategies aiming to restore lost neurons or modulate the degenerating microenvironment providing neuroprotection. This study verified the therapeutic potential of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) on SOD1^{G93A} mice treated either before disease onset or at a late symptomatic stage. BMMCs were obtained from enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic C57BL/6 mice (^{EGFP}BMMC) or from SOD1^{G93A} transgenic mice (^{mSOD1}BMMC). Cell migration was observed with PCR analysis. Survival, body weight and motor performance were followed after transplantation. DNA integrity was evaluated by the alkaline comet assay. Additionally, spinal cords were collected to assess motoneuron preservation using immunofluorescence. Our data show that both ^{EGFP}BMMC and ^{mSOD1}BMMC transplantation to pre-symptomatic SOD1^{G93A} mice prolongs survival and delays disease progression. However, the effects were more significant for ^{EGFP}BMMC-transplanted mice. Also, ^{EGFP}BMMC was neuroprotective to degenerating motoneurons. When administered to late symptomatic mice, only ^{EGFP}BMMC prolonged survival. However, survival increase was more discrete and not accompanied of body weight or motor performance preservation. DNA from either ^{EGFP}BMMC or ^{mSOD1}BMMC was found in the spinal cord of transplanted animals. Additionally, DNA damage was not modified by BMMC in any of the studied groups. The positive behavioral effects observed in our study indicate that BMMCs could represent a promising therapeutic option in the management of ALS. Nonetheless, the limited results we observed for late transplanted mice call for caution before clinical application.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis; bone marrow stem cells; SOD1 transgenic mice.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), also known as Lou Gehrig's disease, is a fatal neurodegenerative disorder characterized by the progressive loss of both upper and lower motoneurons (Bruijn, et al., 2004, Cleveland and Rothstein, 2001, Julien, 2001). Clinically, patients show a combination of signs due to the impairment of inferior and superior motoneuron function. The main symptoms include weakness, muscle atrophy, fasciculations and spasticity (Mulder, et al., 1986, Rowland and Shneider, 2001). Symptoms progress to complete paralysis of lower and upper limbs, leading to death in 2-5 years (Bento-Abreu, et al., 2010, Rowland and Shneider, 2001).

Most cases of ALS are sporadic (sALS – sporadic ALS), but in about 5-10% there is family history of the disease (fALS – familial ALS) (Mulder, et al., 1986, Pasinelli and Brown, 2006). Most cases of fALS (about 20%) are due to mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) gene (Rosen, 1993). The ethiopathology of both fALS and sALS has not been fully elucidated to time. Several mechanisms have been proposed to underlie the disease, including oxidative damage (Beal, et al., 1997, Ferrante, et al., 1997, Simpson, et al., 2003), glutamate-mediated excitotoxicity (Shaw, et al., 1995, Spreux-Varoquaux, et al., 2002), protein aggregation (Bruijn, et al., 1998, Xu, et al., 1993), mitochondrial dysfunction (Krasnianski, et al., 2005), impaired axonal transport (Williamson and Cleveland, 1999), insufficient production of trophic factors (Oosthuysen, et al., 2001, Wang, et al., 2007) and the involvement of glial cells, suggesting a non-cell-autonomous nature for ALS (Clement, et al., 2003, Di Giorgio, et al., 2007, Nagai, et al., 2007, Yamanaka, et al., 2008).

Most clinical trials to test new drugs or interventions have been unsuccessful. To date, the only drug available to treat ALS is riluzole, which has limited efficacy (Bensimon, et al., 1994, Miller, et al., 2007). Hence, palliative measures are still the basis of ALS therapy. Alternatively, cell therapy has emerged as a promising approach to treat neurodegenerative diseases. Transplanted cells could change the disease course either by restoring lost

motoneurons and dysfunctional glia, or stimulating the endogenous proliferation, the secretion of trophic factors or modulating inflammation (Garbuzova-Davis and Sanberg, 2009, Silani, et al., 2004). Motoneuron replacement is more difficult to achieve due to the diffuse characteristics of motor neuron death in ALS (Lindvall, et al., 2012). Thus, restoration of the neuronal microenvironment by supporting transplanted cells may protect motoneurons from dying and represent a more effective strategy in the treatment of ALS.

A number of strategies have been studied in experimental models of ALS that include transplantation of genetically modified cells to secrete trophic factors (Suzuki, et al., 2007), human umbilical cord blood cells (HUCB) (Garbuzova-Davis, et al., 2012, Knippenberg, et al., 2012), neural stem cells (Xu, et al., 2006), mesenchymal stem cells (MSC)(Choi, et al., 2012, Uccelli, et al., 2012) and other cellular populations of the bone marrow (Cabanès, et al., 2007, Corti, et al., 2010), including bone marrow mononuclear cells (BMMCs) (Corti, et al., 2004, Ohnishi, et al., 2009, Pastor, et al., 2012). Nevertheless, reported efficacy from clinical studies using cell therapy approaches in ALS is still controversial (Appel, et al., 2008, Deda, et al., 2009, Gamez, et al., 2010, Martinez, et al., 2009). Even if the procedure was shown to be safe, more preclinical studies need to be made in order to determine best cell source and dosage, route of administration, use of autologous or heterologous donors and time of intervention. All of the above factors could be determinant in the success of future cellular-therapy-based clinical trials.

It has been reported that BMMCs promote beneficial effects in SOD1 mice when administered intravenously to pre-symptomatic animals (Corti, et al., 2004, Ende, et al., 2000), or after intra-bone marrow or intra-spinal administration to early symptomatic mice (Ohnishi, et al., 2009, Pastor, et al., 2012). However, the therapeutic potential of intravenously transplanted BMMCs in late symptomatic ALS mice remains unknown. Furthermore, additional studies are needed to clarify aspects related to the use of autologous or heterologous bone marrow transplantation and therapeutic window. To explore these

possibilities, we intravenously injected SOD1^{G93A} with the mononuclear cell fraction of the bone marrow of enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic C57BL/6 mice or SOD1^{G93A} donors. In addition, transplantation was performed at either pre-symptomatic or late symptomatic mice bearing SOD1^{G93A} transgene. BMMCs effects on survival, motor performance, disease progression and motoneuron protection were evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Transgenic B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J mice, overexpressing human SOD1 carrying the Gly93 → Ala mutation, were used in this study. Breeding pairs were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Colony was maintained by mating heterozygote males with B6SLF females. Offspring were genotyped using polymerase chain reaction, as previously described (Gurney, et al., 1994, Rosen, 1993). Transgenic eGFP⁺ C57BL/6 mice (60 days old, 25-30 g) were also used in this study. All animals were kept under environmentally controlled conditions (12-hour light/dark cycle; 22-24°C) and were given free access to food and water. This study was approved by the Animal Care and Ethics Committee at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (ID 09/00091). Experimental groups were balanced with regard to gender, age and body weight of the animals. All procedures were conducted by experimenters blind to treatment.

BMMC preparation

BMMCs were obtained from C57BL/6 mice expressing eGFP or SOD1^{G93A} transgenic male mice. Both eGFP or the Y chromosome were used as reporters of transplanted cells. Fresh bone marrow was extracted from humeri, femora and tibiae with a 26G needle containing heparin (10,000 U in 50 ml of DPBS). The material was centrifuged at 400 × g for 10 minutes. The cell pellet was resuspended with Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium and fractionated on a density gradient generated by centrifugation at 400 × g over a Ficoll-Paque solution (Histopaque 11191 Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The mononuclear fraction over the Ficoll-Paque layer was collected and washed twice with DPBS. Cell concentrations were determined with a Neubauer-counting chamber, and the number of viable cells was determined by Trypan Blue exclusion. For the detection of surface antigen, BMMCs

were incubated with conjugated antibodies against CD34, CD19, CD117, CD45 e Sca1. Labeled cells were collected and analyzed using a FACSCalibur cytometer. Cell viability was evaluated by Trypan Blue exclusion.

Transplantation of BMSCs

Mice were equally distributed into five experimental groups: (1)^{EGFP}BMSC-70 group: SOD1^{G93A} mice transplanted at 70 days (pre-symptomatic) with BMSCs from C57BL/6-EGFP mice (n = 14); (2) ^{mSOD1}BMSC-70 group: SOD1^{G93A} mice transplanted at 70 days (pre-symptomatic) with BMSCs from male SOD1^{G93A} mice (n = 15); (3) ^{EGFP}BMSC-110 group: SOD1^{G93A} mice transplanted at 110 days (late symptomatic) with BMSCs from C57BL/6-EGFP mice (n = 15); (4) ^{mSOD1}BMSC-110 group: SOD1^{G93A} transplanted at 110 days (late symptomatic) with BMSCs from male SOD1^{G93A} mice (n = 14); and (5) SAL group: SOD1^{G93A} mice treated with saline (n = 23). The ^{EGFP}BMSCs or ^{mSOD1}BMSC suspension was prepared for transplantation in saline at a concentration of 1×10^7 cells in 100 μ L total volume. The cells or saline were administered via tail vein injection. An additional cohort of two animals per transplantation group were injected with BMSCs as described above but were sacrificed 24 h, 1 week or 2 weeks after transplantation, and tissue samples were collected for PCR. Other cohorts of animals was treated as described and euthanized at 120 days of life for histological analysis (n=5 per group) or for the alkaline comet assay (n=4).

Clinical evaluation

Clinical evaluation was performed every week starting when the mice were nine weeks old. This evaluation included body weight, motor performance measured on the Rotarod test, ages of onset, symptomatic stage, disease duration and endpoint.

Survival

Endpoint was determined as the age when the mouse was unable to right itself within 30s when placed on its back in a supinated position, as previously described (Corti, et al., 2010). The ages collected were used to plot Kaplan-Meier survival curves for all treated groups.

Body Weight

Body weight measures allow detecting muscle atrophy and progression, and were used to determine the onset and the symptomatic stage of ALS mice. All mice were weighed weekly beginning on the 9th week. After they turned 11 weeks old, mice were weighed twice a week. The weighing frequency increased to three times a week when the mice reached the age of 16 weeks, due to increased weight loss. Body weight was measured until animals reached endpoint. All measures were taken from 1 p.m. to 4 p.m. to avoid diurnal variations (Knippenberg, et al., 2010). Disease onset was defined as the maximum weight recorded for each animal retrospectively. Animals were considered to have reached the symptomatic stage once they had lost 10% of their maximum weight (Corti, et al., 2010). In addition, the difference between the age at onset and the age at endpoint was used as a measure of disease progression.

Motor performance

The Rotarod test was used to evaluate the motor function of treated mice. This test is used to measure balance and motor coordination and is the most sensitive to detect motor changes in the SOD1^{G93A} model of ALS (Brooks and Dunnett, 2009, Knippenberg, et al., 2010). We used an automated Rotarod (EFF 412, Insight, Brazil). Tests were conducted weekly starting when the animals were 11 weeks old to endpoint. Each week the mouse had up to seven minutes to remain in the rotating cylinder at 16 rpm. All mice were placed in the direction opposite to the rotation, making forward locomotion mandatory. The animals which used the paws to hold

themselves to the cylinder for two consecutive laps were excluded from the experiment. All animals were habituated to the Rotarod two days before the first test. The latency (in seconds) until the mouse dropped from the cylinder was counted.

EGFP detection using Polymerase Chain Reaction (PCR)

We performed nested PCR analysis to identify the presence of transplanted BMNCs in the tissues of transplanted animals, as previously described (Venturin, et al., 2011). In order to detect BMNCs from SOD1^{G93A} donors, samples were collected from female recipients. Tissue samples were collected from the spinal cord, muscle, liver, spleen, lungs and heart at 1, 7 and 14 days after transplantation, as well as at endpoint.

Determination of DNA Damage

In order to evaluate if BMNCs prevents or mitigates the occurrence of oxidative stress associated to the SOD1^{G93A} mutation (Hervias, et al., 2006, Igoudjil, et al., 2011, Liu, et al., 2007, Siciliano, et al., 2002), the alkaline comet assay was performed. Samples from the groups SAL, EGFP^{BMMC-70} and EGFP^{BMMC-110} were collected. The alkaline comet assay was performed, with minor modifications, as described by Singh (Singh, et al., 1988). Aliquots of the spinal cord, muscle, cerebellum and cerebral cortex were collected and processed as previously described (de Melo, et al., 2011, Greggio, et al., 2011).

Immunofluorescence

A cohort of five animals per group was euthanized at 120 days for histological analysis. After deeply anesthetized with ketamine and xylazine (90:10 mg/ml; i.p.), animals were transcardially perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). The vertebral column was carefully dissected and the lumbar spinal cord (L2-L4) was isolated. The spinal cord was post-fixed in PFA for 1 h, and cryoprotected by immersion in a 30% sucrose

solution at 4 °C for 24 h. The spinal cords were then quickly frozen in isopentane that was cooled in liquid nitrogen. Transversal sections (20 µm) were obtained using a cryostat.

The sections were fixed in PFA for ten minutes, then rinsed in PBS. Non specific protein binding was blocked with 3% albumin serum bovine (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) for 1 h. For the detection of Choline Acetyltransferase (ChAT), the sections were incubated overnight with a primary rabbit anti-ChAT antibody (1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA). The sections were then washed with 0.1 M PBS and incubated with Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody (1:1.000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C in the absence of light for 2 h. Glass coverslips were mounted with DAPI using Vectashield® to visualize cell nuclei. Colocalization of DAPI with ChAT was detected, analyzed, and photographed using a confocal laser scanning microscope (LSM 5 Exciter, Carl Zeiss, Germany) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Zen 5.0 software (Carl Zeiss, Inc.). Four serial sections were processed for each animal. The number of ChAT+ cells was calculated for each section, and the mean of the sections was used as an individual data for the statistical analysis, as previously described (Suzuki and Svendsen 2008; Bigini et al. 2011; Canzi et al. 2012).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm standard error of the mean (S.E.M.). Kaplan-Meier survival curves and the logrank (Mantel-Cox) test were used to analyze survival, onset and symptomatic stage of disease. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post hoc test was used to analyze motor performance. Disease progression and the data obtained in the motoneuron quantification were analyzed using a one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. Differences in the alkaline comet assay were analyzed using the Student's t test. Analyses were performed using PrismGraph 5.0 software (Graph-

Pad Software, San Diego, CA). A statistical significance level of $\alpha = 0.05$ and $p < 0.05$ was applied to all tests.

RESULTS

BMMCs prolong survival in SOD1^{G93A} mice, but survival is longer in pre-symptomatic or EGFP BMMC-treated mice

To analyze whether intravenous BMMC improved survival in SOD1^{G93A} mice, we monitored endpoint dates of animals treated at either 70 or 110 days. Survival periods were compared with those obtained for animals treated with saline. Mice administered with EGFP BMMC at the pre-symptomatic stage of the disease (70 days) survived longer than SAL animals (Figure 1A; $p < 0.0001$; $\chi^2 = 21.84$). Medium survival was about 20 days longer for EGFP BMMC versus SAL groups (142.3 ± 3.3 days and 122.7 ± 1.1 days, respectively). Figure 1A shows that mice transplanted with mSOD1 BMMC also survived a mean of 11 days longer than saline-treated animals (133.3 ± 2.8 days, $p < 0.001$; $\chi^2 = 11.27$). However, when we compare EGFP BMMC and mSOD1 BMMC treated animals we verify that survival is significantly longer in mice receiving EGFP BMMC (Figure 1A; $p < 0.01$; $\chi^2 = 7.8$). Longest observed survivals were 133 days for saline-administered animals, 150 for mice receiving mSOD1 BMMC and 157 days for EGFP BMMC-transplanted mice.

Furthermore, we analyzed the survivals for SOD1^{G93A} mice treated at a late symptomatic stage (110 days). Figure 1B shows that mSOD1 BMMC did not change survival (125.7 ± 1.9 days; $p = 0.2586$; $\chi^2 = 2.46$) of transplanted animals. Conversely, EGFP BMMC improved survival in 5 days (127.8 ± 1.69 days) compared to SAL group ($p = 0.0117$ and $\chi^2 = 6.36$). But when we compare survival curves for EGFP BMMC administered at either pre-symptomatic or symptomatic animals, we can observe that earlier treatment induces better survival outcomes ($p = 0.0271$; $\chi^2 = 4.88$), as shown in figure 1C.

BMMCs delay onset and the symptomatic stage in SOD1^{G93A} mice transplanted at 70 days, delaying disease progression

Nine-week-old mice were weighed weekly, twice or three times a week until endpoint. As previously described, weight monitoring was used to detect disease onset and settlement of the symptomatic stage in SOD1^{G93A} mice. In our colony, disease onset for SAL control animals was observed around the 12th week (11.8 ± 0.21 weeks). On the other hand, ^{EGFP}BMMC transplantation at 70 days delayed onset in about two weeks (14.1 ± 0.9 weeks; $p < 0.0001$ vs SAL, $\chi^2 = 26.37$). When BMMC were obtained from mSOD1 donors, disease onset was delayed in one week (13.4 ± 0.9 weeks; $p < 0.0001$ vs SAL, $\chi^2 = 15.81$). However, figure 2A shows that ^{EGFP}BMMC transplantation was more effective in delaying onset than ^{mSOD1}BMMC ($p < 0.05$, $\chi^2 = 4.44$).

Additionally, the loss of 10% of maximal body weight allowed us to identify the establishment of the symptomatic stage. For control SAL mice, symptomatic stage was observed at 15th week-old animals (15.5 ± 0.76 weeks). Again, both ^{EGFP}BMMC and ^{mSOD1}BMMC delay the symptomatic stage, but with more expressive results for ^{EGFP}BMMC transplantation (16.79 ± 0.70 weeks; $p < 0.0001$ vs SAL, $\chi^2 = 25.33$) than for ^{mSOD1}BMMC (16.0 ± 1.0 weeks; $p = 0.0021$ vs SAL, $\chi^2 = 9.49$). Also, a significant difference is observed when both BMMC groups are compared ($p = 0,047$; $\chi^2 = 3,951$; Figure 2B). Despite the fact that treatment was provided after the symptomatic stage, animals that were treated at 110 days old also had body weight measured. No differences were observed for disease onset and symptomatic stage between SAL, ^{EGFP}BMMC-110 and ^{mSOD1}BMMC-110 groups (data not shown).

We also used the difference between endpoint and onset to determine the time of disease progression. In SAL animals, calculated disease progression was 5.75 ± 0.27 weeks. However, 70-day old mice injected with ^{EGFP}BMMC showed longer progression from onset to endpoint (8.46 ± 0.46 weeks; $p < 0.001$ vs SAL), as shown in figure 2C. As expected, animals

receiving BMMC expressing mSOD1 also showed increased progression time (7.11 ± 0.38 weeks; $p < 0.05$ vs SAL). However, the difference in progression of these animals was less expressive when compared to the EGFP BMMC-70 group ($p < 0.05$). Conversely, when the same measure was applied to late symptomatically treated animals, no changes were observed for either EGFP BMMC-110 or mSOD1 BMMC-110 groups (Figure 2D). Medium progression time observed for EGFP BMMC-110 was 6.32 ± 0.39 weeks and 6.03 ± 0.37 weeks for mSOD1 BMMC-110 mice. These values were similar to the ones observed for disease progression in control saline-treated animals.

EGFP BMMCs delay motor decline and preserve motor function in pre-symptomatic $SOD1^{G93A}$ mice, but not in late symptomatic transplantation

Similarly to what is observed in ALS patients, ALS mice show progressive muscle atrophy (which reflects in body weight), and is associated to motor deficit. In order to evaluate whether BMMC transplantation could delay or recover motor function in transplanted mice, they were submitted to the Rotarod test. Mice in the SAL group first showed impaired motor function in this test when they were 15 weeks old (latency to fall was 159.2 ± 31.4 s on the 15th week vs 383.3 ± 20.8 s on the 14th). Likewise, mSOD1 BMMC-70 failed to complete the task at the same age (420 ± 0 s and 217.6 ± 34.9 s, on the 14th and 15th week, respectively). On the other hand, as figure 2E shows, animals in the EGFP BMMC-70 group showed longer preservation of motor function. For these animals, significant motor decline was observed a week later, on the 16th week (316.6 ± 42.4 s vs 344.3 ± 35.6 s on the 15th). Furthermore, EGFP BMMC-70 animals continue to show better performance in the task throughout the 15th, 16th and 17th week when compared to SAL ($p < 0.001$), as well as weeks 15 and 17 when compared to mSOD1 BMMC-70 ($p < 0.05$). These data show that EGFP BMMC, but not mSOD1 BMMC, delay motor deficits and preserve motor function in $SOD1^{G93A}$ mice. mSOD1 BMMC-treated mice also show improved motor performance when compared to SAL

animals. But this improvement is transient and observed only at the 16th week ($p < 0.01$). No differences between ^{mSOD1}BMMC-70 and SAL were found during the following evaluated weeks.

Animals treated at late symptomatic stage were also trained in the Rotarod test. As observed for SAL, both ^{EGFP}BMMC-110 and ^{mSOD1}BMMC-110 first showed significant motor decline at the 15th week. However, as the graph in figure 2F shows, BMMCs transplantation did not restore motor function in compromised mice.

EGFP or Y chromosome were detected in samples obtained from BMMC-transplanted animals

We employed a nested PCR analysis to verify whether EGFP or Y chromosome (from ^{mSOD1}) DNA from BMMCs could be detected in the spinal cords of transplanted animals. This analysis was performed to elucidate whether the observed beneficial behavioral effects were associated with the migration of cells to the injured spinal cord. Amplified EGFP DNA or Y chromosome DNA was found in the spinal cord of animals 24 h, 1 week and 2 weeks post-transplantation. BMMCs DNA was also found in samples collected after euthanasia at endpoint. Additionally, we analyzed samples obtained from the liver, spleen, heart, lungs and muscle at the same time points mentioned above. BMMC DNA was detected in all samples up to 2 weeks post-transplantation. At endpoint, BMMC DNA was found only in the spleen and the muscle, other than in the spinal cord.

Damage to DNA integrity is not prevented or reversed after BMMC transplantation

In order to evaluate whether the more prominent beneficial effects of ^{EGFP}BMMC transplantation versus ^{mSOD1}BMMC transplantation were due to modulation of oxidative stress, we performed the alkaline comet assay. Samples from the spinal cord, muscle, cerebellum and brain cortex were obtained from animals transplanted with ^{EGFP}BMMC in

both the pre-symptomatic and the symptomatic periods. Samples from saline-treated animals were also examined. However, we did not observe significant differences in DNA damage for any of the analyzed samples, as shown in figure 3.

*Pre-symptomatic, but not late symptomatic-administered, ^{EGFP}BMMC promotes motoneuron preservation in *SOD1^{G93A}* mice.*

An additional cohort of animals was treated with either ^{EGFP}BMMC or ^{mSOD1}BMMC and euthanized when they reached 120 days for histological evaluation of the lumbar spinal cord. Data obtained with this analysis were used to assess if BMMC are neuroprotective against progressive motoneuron loss associated to ALS. SAL animals showed a mean of 12.75 ± 0.42 ChAT⁺ cells per section. As shown in figure 4, pre-symptomatic transplantation of ^{EGFP}BMMC was protective of motoneurons (15.85 ± 0.26 ChAT⁺ cells per section in ^{EGFP}BMMC-70 animals; $p < 0.001$ vs SAL). However, motoneuron counting for ^{mSOD1}BMMC-70 was not different from the one observed for SAL (13.45 ± 0.31 ChAT⁺ cells per section). Furthermore, late symptomatic transplantation did not change the fate of dying motoneurons either. No effect on motoneuron preservation was observed for 110-day-old treated animals for either ^{EGFP}BMMC (12.20 ± 0.29 ChAT⁺ cells per section) or ^{mSOD1}BMMC (12.85 ± 0.32 ChAT⁺ cells per section) vs saline-treated animals.

DISCUSSION

A number of studies have shown clinical and morphological benefits associated with the injection of stem cells in experimental models of ALS. But, these studies rarely examine the therapeutic potential of cell-based therapy on symptomatic animals. When they do, intervention is made in mild symptomatic animals. To our knowledge, only one study verified the potential of stem cell administration on late symptomatic paralytic animals (Choi, et al., 2012). Nonetheless, effect was observed mainly for genetically-modified cells. In the present study, we show for the first time that intravenous transplantation of BMNC prolongs the survival of late symptomatic-treated SOD1^{G93A} mice. We also show that animals receiving BMNC at earlier stages had longer survivals when compared to late-treated animals. In addition, early treatment delays onset, symptomatic stage and progression. At the same time, only pre-symptomatic BMNC injection preserves motor function and is neuroprotective to degenerating motoneurons. Further, we observed that BMNC obtained from mSOD1 donors have therapeutic effect, but only when administered to pre-symptomatic mice. Nevertheless, we also show that therapeutic benefits are most expressive when non-mSOD1 BMNC were injected. More pronounced effects observed for the pre-symptomatic treatment could also be correlated to the preservation of motoneurons in the spinal cord of transplanted animals. The positive outcomes observed in our study might be associated to the presence of transplanted cells into the injured spinal cord.

The majority of experimental studies of stem cell therapy in ALS use the intra-spinal implantation of cells. However, the invasive nature of this procedure limits its application to ALS patients, whose health is often already very fragile. Also, in ALS, degeneration of motoneurons is diffuse, that is, it affects more than a single region of the spinal cord, as well as the brain. Although migration of intra-spinally injected cells

have been reported, it seems to be limited to a few millimeters (Corti, et al., 2007, Lepore, et al., 2011, Lepore, et al., 2008, Pastor, et al., 2012, Suzuki, et al., 2007), and transplanted cells are not able to reach the degenerating areas. Alternatively, intrathecal administration has been studied, with variability in the results. While some show that intrathecally administered cells promote behavioral and/or histological improvement (Boucherie, et al., 2009, Hwang, et al., 2009, Kim, et al., 2010), others show either that there is only marginal improvement of survival and morphology or that there are no therapeutic effects (Habisch, et al., 2007, Park, et al., 2009, Vercelli, et al., 2008). Zhang and collaborators (2009) show that beneficial effects are observed only for multiple cell administrations (Zhang, et al., 2009). It is possible that the intrathecal route offers limited migration and distribution of injected cells into the spinal cord parenchyma (Habisch, et al., 2007).

Conversely, the intravenous administration is advantageous because it can both deliver transplanted cells to all degenerating sites and is less invasive. We have previously shown that intravenously injected BMNC or HUCB migrate from the blood stream into injured sites of the central nervous system in models of epilepsy and neonatal hypoxia-ischemia (Costa-Ferro, et al., 2012, Costa-Ferro, et al., 2010, Venturin, et al., 2011). In experimental models of ALS, similar demonstrations were made (Corti, et al., 2010, Garbuzova-Davis, et al., 2012, Garbuzova-Davis, et al., 2008, Garbuzova-Davis, et al., 2003, Mitrecic, et al., 2010, Rizvanov, et al., 2008, Uccelli, et al., 2012, Zhao, et al., 2007). Despite the fact that mechanisms underlying migration and neuroprotection need further elucidation, our results show that BMNC reach the spinal cord and promote behavioral and histological improvement. Damage and leakage for both the blood/brain barrier and the blood/spinal cord barrier in SOD1 mutant mice have already been described (Garbuzova-Davis, et al., 2007, Garbuzova-Davis, et al., 2007, Nicaise, et al.,

2009, Zhong, et al., 2008). Choi and collaborators (2012) hypothesized that the breakdown of blood-spinal cord barrier increases the levels of MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). In turn, cells which express receptors to this cytokine would migrate spinal cord regions where there is neuronal loss and breakdown of the barrier (Choi, et al., 2012). Elevated levels of SCF (stem cells factor), a chemoattractant expressed by transgenic SOD1 mice, could also contribute to cellular chemotaxis into degenerating sites (Boucherie, et al., 2009). We also observed that BMDC migrate and/or are trapped into the spleen, where they can also be found at endpoint analysis. BMDC in the spleen could interact with host cells and modulate the inflammatory cascade, as proposed by Garbuzova-Davis and collaborators (2012).

Ende and collaborators (2000) are among the first authors to show that bone marrow derived stem cells could prolong survival of ALS mice (Ende, et al., 2000). Later, others reported that BMDC also delay motor function impairment (Ohnishi, et al., 2009, Pastor, et al., 2012), and is neuroprotective to degenerating motoneurons (Corti, et al., 2004, Ohnishi, et al., 2009). Similar results were obtained for particular bone marrow populations such as hematopoietic stem cells (Cabanes, et al., 2007), Lin-c-kit⁺ cells (Corti, et al., 2010), or MSC, including murine MSC (Boucherie, et al., 2009, Forostyak, et al., 2011, Uccelli, et al., 2012), human MSC (Choi, et al., 2012, Zhang, et al., 2009, Zhao, et al., 2007), human MSC from an ALS patient (Kim, et al., 2010) and genetically modified MSC that express glial derived neurotrophic factor – GDNF (Suzuki, et al., 2008). However, few studies compare the therapeutic potential of non-mutant versus mSOD1 expressing cells. Investigating differences between an autologous and an allogeneic bone marrow transplant is important since non-neuronal cells are involved in the pathophysiology of ALS (Clement, et al., 2003). Furthermore, astrocytes or microglia that express mSOD1, contribute to neuronal death and disease

progression (Yamanaka, et al., 2008, Yamanaka, et al., 2008). Importantly, Boillee and collaborators (2006) reported that limiting mutant damage to non-neuronal cells slowed the disease course, even when all motor neurons were expressing high levels of mSOD1 (Boillee, et al., 2006). This study validates the use of strategies that aim to modify the neural microenvironment by the introduction of non-neural cells. But it also points out the importance of determining whether the introduction of cells carrying the mSOD1 would be beneficial or deleterious to the patient.

Our data shows that ^{mSOD1}BMMC have moderate effect on survival, disease progression and prevention of motor decline. Conversely, Corti and collaborators (2004) showed that intraperitoneally injected ^{mSOD1}BMMC do not change any of these behavioral parameters (Corti, et al., 2004). Similar results were observed for intra-bone marrow administration of ^{mSOD1}BMMC (Ohnishi, et al., 2009), and intravenous administration of Lin-c-kit+ cells expressing mSOD1 (Corti, et al., 2010). None of these authors reported the presence of transplanted cells in the spinal cord of host mice. On the contrary, we identified ^{mSOD1}BMMC DNA in the nervous tissue of transplanted mice. While two of the previous studies injected the cells either into the abdominal cavity or into the bone marrow (Corti, et al., 2004, Ohnishi, et al., 2009), Corti and collaborators (2010) injected cells intravenously. Still, they used a different cell population and a thousand times less cells (Corti, et al., 2010). Dose-dependent response of stem cells treatment in ALS models has been demonstrated (Garbuzova-Davis, et al., 2012, Garbuzova-Davis, et al., 2008, Kim, et al., 2010). Cellular migration, on the other hand, appears to be fundamental for the observed outcomes. Intravenously injected cells in high dose, without previous irradiation, seem to favor migration to the nervous tissue.

Nonetheless, ^{mSOD1}BMMC promote inferior therapeutic effects than ^{EGFP}BMMC. Therefore, it is possible that the stem effect of ^{mSOD1}BMMC is counterbalanced by the

presence of mSOD1 transgene. Both a beneficial effect that could be mediated by immunomodulation or trophic factor secretion, and a deleterious mSOD1-mediated effect on motoneurons might be present. Also, it has been recently described that bone marrow cells from patients with ALS show less migratory activity and reduced expression of trophic factors (Cho, et al., 2010, Koh, et al., 2012). These findings have important implications for autologous cellular therapy in ALS patients. Although SOD1 mutations are not present in sALS, this form of the disease share many pathophysiological characteristics with fALS (Bento-Abreu, et al., 2010). The single experimental study using stem cells obtained from a patient with ALS assessed only the dose-response effect (Kim, et al., 2010).

Another important aspect addressed here is the window for therapeutic intervention. Despite of many reported effective therapies in experimental models, clinical trials have failed to offer an effective treatment for patients. In part, this is due to the fact that most experimental studies use pre-symptomatic animals. That factor could actually explain the variability observed in the clinical studies using cellular therapy for ALS (Lindvall, Barker et al. 2012). Interventions must also be extensively studied in symptomatic rodents, since patients can hardly predict the development of ALS and will not seek medical attention before disease onset. We demonstrate here that intravenous BMBC prolongs survival to late symptomatic SOD1^{G93A} mice. However, improved survival is restricted to animals receiving ^{EGFP}BMBC and is not associated to motor or morphological improvements. Others have reported beneficial effects of stem cell transplantation to early symptomatic SOD1^{G93A} mice or rats using MSC (Boucherie, et al., 2009, Forostyak, et al., 2011, Uccelli, et al., 2012) and HUCB (Garbuzova-Davis, et al., 2012, Knippenberg, et al., 2012). In addition, mdf/mcd mice showed improved motor performance and decreased loss of motoneurons after hematopoietic stem cells

transplantation (Cabanés, et al., 2007). In the same experimental model, Pastor and collaborators (2012) showed that BMNC promote more expressive improvement than MSC (Pastor, et al., 2012).

BMNC transplantation to symptomatic SOD1^{G93A} mice was tested only by Ohnishi and collaborators (2009). These authors treat 12-week-old animals (84 days old) with an intra-bone marrow injection of BMNC following irradiation. This study has two main limitations for clinical application: first is the use of myeloablation, which is very aggressive to already fragile patients; second, similar to the above mentioned studies on symptomatic animals using MSC or HUCB, intervention was conducted at an early symptomatic stage. Although this stage is histologically characterized by motoneuron death and astrogliosis/ microgliosis, functional impairment is still mild (Knippenberg, et al., 2012, Turner and Talbot, 2008). For comparison, we detected disease onset by body weight measures around the 12th week, but motor impairment only at the 15th. Transposed to the clinical practice these observations would mean that the patient needs to get treated soon after onset. That is unrealistic, among other reasons due to the long time needed for an ultimate diagnosis.

To our knowledge, the only study to assess the therapeutic potential of stem cells on late symptomatic mice is that of Choi and collaborators (2012). These authors injected 10⁶ MSC into the tail vein of 14- to 16-week-old mice and did not observe changes in the survival. When MSC were genetically modified to express Ngn1 (neurogenin 1) survival was prolonged (Choi, et al., 2012). The need to use retroviruses to genetically manipulate cells in order to obtain clinical benefit impairs the application of this procedure to ALS patients. Also, Pastor and collaborators (2012) showed that BMNC have a better migration profile and promote better functional outcomes than MSC (Pastor, et al., 2012).

Also, we verified that ^{EGFP}BMSC were more effective in pre-symptomatic mice. In these animals, other than increasing survival, ^{EGFP}BMSC hindered motor decline and preserved motoneurons. This observation led us to analyze if this effect was mediated by the modulation of oxidative stress-related DNA damage. The hypothesis was based on the different outcomes observed for mSOD1 or EGFP⁺ transplanted cells. Although others have shown that stem cell transplantation modifies oxidative stress, our results do not indicate the involvement of this mechanism (Uccelli, et al., 2012). The mechanisms that underlie neuroprotection and improved behavior for stem cell transplantation are not fully understood. Transdifferentiation and direct restoration of lost motoneurons probably does not play a central role in the observed outcomes. It is more likely that BMSC change the degenerating microenvironment leading to tissue protection and delayed disease progression. There is probably a group of mechanisms acting simultaneously such as the induction of endogenous cells proliferation, secretion of trophic factors and modulation of the anti-inflammatory activity (Bigini, et al., 2011, Corti, et al., 2007, Nicaise, et al., 2011). Trophic factor secretion by transplanted cells in experimental models of ALS has been extensively studied (Suzuki and Svendsen, 2008). Changes in the levels of trophic factors such as GDNF, VEGF and Ang2 have been implied to modulate the effect of bone marrow stem cells (Cabanes, et al., 2007, Corti, et al., 2010, Pastor, et al., 2012), HUCB (Bigini, et al., 2011) and neural stem cells (Corti, et al., 2007, Wyatt, et al., 2011, Xu, et al., 2006). Conversely, at least in two studies, behavioral effects were observed in the absence of increased secretion of BDNF, CTNF, GDNF, IGF-1 e VEGF (Knippenberg, et al., 2012, Lepore, et al., 2008). It is likely that immunomodulation also plays an important role. It has been demonstrated that MSC transplantation reduces microglial activation and the expression of TNF α (Uccelli, et al., 2012), NOX-2 and COX-2 (Boucherie, et al., 2009). Recent

reports also indicate that HUCB secrete cytokines (Bigini, et al., 2011) and increase Th2 and plasma lymphocytes (Garbuzova-Davis, et al., 2008). In addition, the effect of skeletal muscle derived stem cells seems to be associated to increased levels of IL-10 e IL-13 (Canzi, et al., 2012). Other factors, such as the maintenance of GLT1 levels might take part (Lepore, et al., 2011, Lepore, et al., 2008, Uccelli, et al., 2012). Furthermore, cell-cell interactions between healthy donor cells and host degenerating neurons could also explain the observed therapeutic effects (Boillee, et al., 2006, Lindvall, et al., 2012).

CONCLUSIONS

The results we obtained in this study are relevant to the design of future clinical trials for cell-therapy in ALS. According to them, patients with early ALS progression are the ones who could benefit from the procedure. For those whom present advanced disease symptoms, the limited survival improvement that we observed and the lack of other functional benefits should be taken into account. Conversely, even if discrete, the increased survival obtained for BMMC transplantation in late symptomatic mice might represent an advance when compared to limited riluzole efficacy. Furthermore, our observations can stimulate studies that assess the effects of multiple dose regimens. The impact of autologous transplantation on these results is harder to assess. Studies that evaluate the efficacy of cell populations from sALS sources will be important to enlighten these aspects.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and Pandurata SA. J.C. da Costa, and J.A.P.

Henriques are researchers of the CNPq. G.T. Venturin , S. Greggio and I.M. de Oliveira are recipients of PhD degree fellowships from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) or CNPq (Brazil). G. Zanirati is recipient of MSc degree fellowship from CNPq.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors have no conflict of interest to declare.

ROLE OF THE FUNDING SOURCES

Funding sources did not have any role in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit this study for publication.

REFERENCES

1. Appel, S. H., Engelhardt, J. I., Henkel, J. S., Siklos, L., Beers, D. R., Yen, A. A., Simpson, E. P., Luo, Y., Carrum, G., Heslop, H. E., Brenner, M. K., and Popat, U., 2008. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 71, 1326-1334.
2. Beal, M. F., Ferrante, R. J., Browne, S. E., Matthews, R. T., Kowall, N. W., and Brown, R. H., Jr., 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 42, 644-654.
3. Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V., Bouche, P., Delwaide, C., Couratier, P., Blin, O., Viader, F., Peyrospaul, H., David, J., Maloteaux, J. M., Hugon, J., Laterre, E.C., Rascol, A., Clanet, M., Vallat, J. M., Dumas, A., Serratrice, G., Lechevallier, B., Peuch, A. J., Nguyen, T., Shu, C., Bastien, P., Papillon, C., Durrleman, S., Louvel, E., Guillet, P., Ledoux, L., Orvoenfrija, E., and Dib, M., 1994. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic-Lateral-Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 330, 585-591.
4. Bento-Abreu, A., Van Damme, P., Van Den Bosch, L., and Robberecht, W., 2010. The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 31, 2247-2265.
5. Bigini, P., Veglianese, P., Andriolo, G., Cova, L., Grignaschi, G., Caron, I., Daleno, C., Barbera, S., Ottolina, A., Calzarossa, C., Lazzari, L., Mennini, T., Bendotti, C., and Silani, V., 2011. Intracerebroventricular administration of human umbilical cord blood cells delays disease progression in two murine models of motor neuron degeneration. *Rejuvenation Res* 14, 623-639.
6. Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D. W., 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389-1392.
7. Boucherie, C., Schafer, S., Lavand'homme, P., Maloteaux, J. M., and Hermans, E., 2009. Chimerization of Astroglial Population in the Lumbar Spinal Cord after Mesenchymal Stem Cell Transplantation Prolongs Survival in a Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience Research* 87, 2034-2046.
8. Brooks, S. P., and Dunnett, S. B., 2009. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 10, 519-529.
9. Bruijn, L. I., Houseweart, M. K., Kato, S., Anderson, K. L., Anderson, S. D., Ohama, E., Reaume, A. G., Scott, R. W., and Cleveland, D. W., 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851-1854.
10. Bruijn, L. I., Miller, T. M., and Cleveland, D. W., 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27, 723-749.
11. Cabanes, C., Bonilla, S., Tabares, L., and Martinez, S., 2007. Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis* 26, 408-418.
12. Canzi, L., Castellaneta, V., Navone, S., Nava, S., Dossena, M., Zucca, I., Mennini, T., Bigini, P., and Parati, E. A., 2012. Human Skeletal Muscle Stem Cell Antiinflammatory Activity Ameliorates Clinical Outcome in Amyotrophic Lateral Sclerosis Models. *Molecular Medicine* 18, 401-411.
13. Cho, G. W., Noh, M. Y., Kim, H. Y., Koh, S. H., Kim, K. S., and Kim, S. H., 2010. Bone Marrow-Derived Stromal Cells from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients Have Diminished Stem Cell Capacity. *Stem Cells Dev* 19, 1035-1042.
14. Choi, C. I., Lee, Y. D., Kim, H., Kim, S. H., Suh-Kim, H., and Kim, S. S., 2012. Neural Induction with Neurogenin 1 Enhances the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in an ALS Mouse Model. *Cell Transplant*.
15. Clement, A. M., Nguyen, M. D., Roberts, E. A., Garcia, M. L., Boillee, S., Rule, M., McMahon, A. P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R. J., Brown, R. H., Jr., Julien, J.P., Goldstein, L. S., and Cleveland, D. W., 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice.

16. Cleveland, D. W., and Rothstein, J. D., 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2, 806-819.
17. Corti, S., Locatelli, F., Donadoni, C., Guglieri, M., Papadimitriou, D., Strazzer, S., Del Bo, R., and Comi, G. P., 2004. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 127, 2518-2532.
18. Corti, S., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Del Bo, R., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Salani, S., Fortunato, F., Strazzer, S., Bresolin, N., and Comi, G. P., 2007. Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain* 130, 1289-1305.
19. Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Salani, S., Simone, C., Falcone, M., Riboldi, G., Govoni, A., Bresolin, N., and Comi, G. P., 2010. Systemic transplantation of c-kit+ cells exerts a therapeutic effect in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 19, 3782-3796.
20. Costa-Ferro, Z. S., Souza, B. S., Leal, M. M., Kaneto, C. M., Azevedo, C. M., da Silva, I. C., Soares, M. B., Ribeiro-dos-Santos, R., and Dacosta, J. C., 2012. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. *Neurobiol Dis* 46, 302-313.
21. Costa-Ferro, Z. S., Vitola, A. S., Pedroso, M. F., Cunha, F. B., Xavier, L. L., Machado, D. C., Soares, M. B., Ribeiro-dos-Santos, R., and DaCosta, J. C., 2010. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure* 19, 84-92.
22. de Melo, F. T., de Oliveira, I. M., Greggio, S., Dacosta, J. C., Guecheva, T. N., Saffi, J., Henriques, J. A., and Rosa, R. M., 2011. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food Chem Toxicol*.
23. Deda, H., Inci, M. C., Kurekci, A. E., Sav, A., Kayihan, K., Ozgun, E., Ustunsoy, G. E., and Kocabay, S., 2009. Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up. *Cytotherapy* 11, 18-25.
24. Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T., and Eggan, K., 2007. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10, 608-614.
25. Ende, N., Weinstein, F., Chen, R., and Ende, M., 2000. Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life Sci* 67, 53-59.
26. Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., Kowall, N. W., Brown, R. H., Jr., and Beal, M. F., 1997. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 69, 2064-2074.
27. Forostyak, S., Jendelova, P., Kapcalova, M., Arboleda, D., and Sykova, E., 2011. Mesenchymal stromal cells prolong the lifespan in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy* 13, 1036-1046.
28. Gamez, J., Carmona, F., Ragner, N., Ferrer-Sancho, J., Martin-Henao, G. A., Marti-Beltran, S., Badia, M., Gratacos, M., Rodriguez-Gonzalez, E., Seoane, J. L., Pallero-Castillo, M., Burgos, R., Puiggros, C., Pasarin, A., and Bori-Fortuny, I., 2010. Cellular transplants in amyotrophic lateral sclerosis patients: an observational study. *Cytotherapy* 12, 669-677.
29. Garbuzova-Davis, S., Haller, E., Saporta, S., Kolomey, I., Nicosia, S. V., and Sanberg, P. R., 2007. Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Res* 1157, 126-137.
30. Garbuzova-Davis, S., Rodrigues, M. C., Mirtyl, S., Turner, S., Mitha, S., Sodhi, J., Suthakaran, S., Eve, D. J., Sanberg, C. D., Kuzmin-Nichols, N., and Sanberg, P. R., 2012. Multiple intravenous administrations of human umbilical cord blood cells benefit in a mouse model of ALS. *PLoS One* 7, e31254.

31. Garbuzova-Davis, S., Sanberg, C. D., Kuzmin-Nichols, N., Willing, A. E., Gemma, C., Bickford, P. C., Miller, C., Rossi, R., and Sanberg, P. R., 2008. Human umbilical cord blood treatment in a mouse model of ALS: optimization of cell dose. *PLoS One* 3, e2494.
32. Garbuzova-Davis, S., and Sanberg, P. R., 2009. Feasibility of cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 216, 3-6.
33. Garbuzova-Davis, S., Saporta, S., Haller, E., Kolomey, I., Bennett, S. P., Potter, H., and Sanberg, P. R., 2007. Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS. *PLoS One* 2, e1205.
34. Garbuzova-Davis, S., Willing, A. E., Zigova, T., Saporta, S., Justen, E. B., Lane, J. C., Hudson, J. E., Chen, N., Davis, C. D., and Sanberg, P. R., 2003. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 12, 255-270.
35. Greggio, S., de Paula, S., de Oliveira, I. M., Trindade, C., Rosa, R. M., Henriques, J. A.P., and DaCosta, J. C., 2011. NAP prevents acute cerebral oxidative stress and protects against long-term brain injury and cognitive impairment in a model of neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis* 44, 152-159.
36. Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., and et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.
37. Habisch, H. J., Janowski, M., Binder, D., Kuzma-Kozakiewicz, M., Widmann, A., Habich, A., Schwalenstocker, B., Hermann, A., Brenner, R., Lukomska, B., Domanska-Janik, K., Ludolph, A. C., and Storch, A., 2007. Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *J Neural Transm* 114, 1395-1406.
38. Hervias, I., Beal, M. F., and Manfredi, G., 2006. Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 33, 598-608.
39. Hwang, D. H., Lee, H. J., Park, I. H., Seok, J. I., Kim, B. G., Joo, I. S., and Kim, S. U., 2009. Intrathecal transplantation of human neural stem cells overexpressing VEGF provide behavioral improvement, disease onset delay and survival extension in transgenic ALS mice. *Gene Therapy* 16, 1234-1244.
40. Igoudjil, A., Magrane, J., Fischer, L. R., Kim, H. J., Hervias, I., Dumont, M., Cortez, C., Glass, J. D., Starkov, A. A., and Manfredi, G., 2011. In vivo pathogenic role of mutant SOD1 localized in the mitochondrial intermembrane space. *J Neurosci* 31, 15826-15837.
41. Julien, J. P., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104, 581-591.
42. Kim, H., Kim, H. Y., Choi, M. R., Hwang, S., Nam, K. H., Kim, H. C., Han, J. S., Kim, K. S., Yoon, H. S., and Kim, S. H., 2010. Dose-dependent efficacy of ALS-human mesenchymal stem cells transplantation into cisterna magna in SOD1-G93A ALS mice. *Neurosci Lett* 468, 190-194.
43. Knippenberg, S., Thau, N., Dengler, R., and Petri, S., 2010. Significance of behavioural tests in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Behav Brain Res* 213, 82-87.
44. Knippenberg, S., Thau, N., Schwabe, K., Dengler, R., Schambach, A., Hass, R., and Petri, S., 2012. Intraspinial Injection of Human Umbilical Cord Blood-Derived Cells Is Neuroprotective in a Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Diseases* 9, 107-120.
45. Koh, S. H., Baik, W., Noh, M. Y., Cho, G. W., Kim, H. Y., Kim, K. S., and Kim, S. H., 2012. The functional deficiency of bone marrow mesenchymal stromal cells in ALS patients is proportional to disease progression rate (vol 233, pg 472, 2012). *Exp Neurol* 234, 527-527.

46. Krasnianski, A., Deschauer, M., Neudecker, S., Gellerich, F. N., Muller, T., Schoser, B. G., Krasnianski, M., and Zierz, S., 2005. Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain* 128, 1870-1876.
47. Lepore, A. C., O'Donnell, J., Kim, A. S., Williams, T., Tuteja, A., Rao, M. S., Kelley, L. L., Campanelli, J. T., and Maragakis, N. J., 2011. Human glial-restricted progenitor transplantation into cervical spinal cord of the SOD1 mouse model of ALS. *PLoS One* 6, e25968.
48. Lepore, A. C., O'Donnell, J., Kim, A. S., Williams, T., Tuteja, A., Rao, M. S., Kelley, L. L., Campanelli, J. T., and Maragakis, N. J., 2011. Human Glial-Restricted Progenitor Transplantation into Cervical Spinal Cord of the SOD1(G93A) Mouse Model of ALS. *PLoS One* 6.
49. Lepore, A. C., Rauck, B., Dejea, C., Pardo, A. C., Rao, M. S., Rothstein, J. D., and Maragakis, N. J., 2008. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat Neurosci* 11, 1294-1301.
50. Lindvall, O., Barker, R. A., Brustle, O., Isacson, O., and Svendsen, C. N., 2012. Clinical translation of stem cells in neurodegenerative disorders. *Cell Stem Cell* 10, 151-155.
51. Liu, D., Bao, F., Wen, J., and Liu, J., 2007. Mutation of superoxide dismutase elevates reactive species: comparison of nitration and oxidation of proteins in different brain regions of transgenic mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 146, 255- 264.
52. Martinez, H. R., Gonzalez-Garza, M. T., Moreno-Cuevas, J. E., Caro, E., Gutierrez- Jimenez, E., and Segura, J. J., 2009. Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cytherapy* 11, 26-34.
53. Miller, R. G., Mitchell, J. D., Lyon, M., and Moore, D. H., 2007. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*, CD001447.
54. Mitrecic, D., Nicaise, C., Gajovic, S., and Pochet, R., 2010. Distribution, differentiation, and survival of intravenously administered neural stem cells in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Transplant* 19, 537-548.
55. Mulder, D. W., Kurland, L. T., Offord, K. P., and Beard, C. M., 1986. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 36, 511-517.
56. Nagai, M., Re, D. B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T. M., Wichterle, H., and Przedborski, S., 2007. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10, 615-622.
57. Nicaise, C., Mitrecic, D., Demetter, P., De Decker, R., Authelet, M., Boom, A., and Pochet, R., 2009. Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1- linked ALS rat. *Brain Res* 1301, 152-162.
58. Nicaise, C., Mitrecic, D., and Pochet, R., 2011. Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 37, 179-188.
59. Ohnishi, S., Ito, H., Suzuki, Y., Adachi, Y., Wate, R., Zhang, J., Nakano, S., Kusaka, H., and Ikehara, S., 2009. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 1296, 216-224.
60. Oosthuyse, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., Theilmeier, G., Dewerchin, M., Laudénbach, V., Vermeylen, P., Raat, H., Acker, T., Vlemingckx, V., Van Den Bosch, L., Cashman, N., Fujisawa, H., Drost, M. R., Sciot, R., Bruyninckx, F., Hicklin, D. J., Ince, C., Gressens, P., Lupu, F., Plate, K. H., Robberecht, W., Herbert, J. M., Collen, D., and Carmeliet, P., 2001. Deletion

- of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28, 131-138.
61. Park, S., Kim, H. T., Yun, S., Kim, I. S., Lee, J., Lee, I. S., and Park, K. I., 2009. Growth factor-expressing human neural progenitor cell grafts protect motor neurons but do not ameliorate motor performance and survival in ALS mice. *Experimental and Molecular Medicine* 41, 487-500.
 62. Pasinelli, P., and Brown, R. H., 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7, 710-723.
 63. Pastor, D., Viso-Len, M. C., Jones, J., Jaramillo-Merchan, J., Toledo-Aral, J. J., Moraleda, J. M., and Martinez, S., 2012. Comparative Effects between Bone Marrow and Mesenchymal Stem Cell Transplantation in GDNF Expression and Motor Function Recovery in a Motorneuron Degenerative Mouse Model. *Stem Cell Reviews and Reports* 8, 445-458.
 64. Rizvanov, A. A., Kiyasov, A. P., Gaziziov, I. M., Yilmaz, T. S., Kaligin, M. S., Andreeva, D. I., Shafigullina, A. K., Guseva, D. S., Kiselev, S. L., Matin, K., Palotas, A., and Islamov, R. R., 2008. Human umbilical cord blood cells transfected with VEGF and L(1)CAM do not differentiate into neurons but transform into vascular endothelial cells and secrete neuro-trophic factors to support neuro-genesis-a novel approach in stem cell therapy. *Neurochemistry International* 53, 389-394.
 65. Rosen, D. R., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364, 362.
 66. Rowland, L. P., and Shneider, N. A., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344, 1688-1700.
 67. Shaw, P. J., Forrest, V., Ince, P. G., Richardson, J. P., and Wastell, H. J., 1995. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4, 209-216.
 68. Siciliano, G., D'Avino, C., Del Corona, A., Barsacchi, R., Kusmic, C., Rocchi, A., Pastorini, E., and Murri, L., 2002. Impaired oxidative metabolism and lipid peroxidation in exercising muscle from ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 3, 57-62.
 69. Silani, V., Cova, L., Corbo, M., Ciammola, A., and Polli, E., 2004. Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 364, 200-202.
 70. Simpson, E. P., Yen, A. A., and Appel, S. H., 2003. Oxidative Stress: a common denominator in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 15, 730-736.
 71. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
 72. Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P. F., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M., and Meininger, V., 2002. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci* 193, 73- 78.
 73. Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Hayes, A., Bellantuono, I., Aebischer, P., and Svendsen, C. N., 2008. Direct Muscle Delivery of GDNF With Human Mesenchymal Stem Cells Improves Motor Neuron Survival and Function in a Rat Model of Familial ALS. *Molecular Therapy* 16, 2002-2010.
 74. Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Klein, S. M., Aebischer, P., and Svendsen, C. N., 2007. GDNF Secreting Human Neural Progenitor Cells Protect Dying Motor Neurons, but Not Their Projection to Muscle, in a Rat Model of Familial ALS. *PLoS One* 2.
 75. Suzuki, M., and Svendsen, C. N., 2008. Combining growth factor and stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Neurosci* 31, 192-198.
 76. Turner, B. J., and Talbot, K., 2008. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Progress in Neurobiology* 85, 94-134.
 77. Uccelli, A., Milanese, M., Principato, M. C., Morando, S., Bonifacino, T., Vergani, L., Giunti, D., Voci, A., Carminati, E., Giribaldi, F., Caponnetto, C., and Bonanno, G.,

2012. Intravenous Mesenchymal Stem Cells Improve Survival and Motor Function in Experimental Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Medicine*.
78. Venturin, G. T., Greggio, S., Marinowic, D. R., Zanirati, G., Cammarota, M., Machado, D. C., and DaCosta, J. C., 2011. Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats. *Life Sci* 89, 229- 234.
 79. Vercelli, A., Mereuta, O. M., Garbossa, D., Muraca, G., Mareschi, K., Rustichelli, D., Ferrero, I., Mazzini, L., Madon, E., and Fagioli, F., 2008. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 31, 395-405.
 80. Wang, Y., Mao, X. O., Xie, L., Banwait, S., Marti, H. H., Greenberg, D. A., and Jin, K., 2007. Vascular endothelial growth factor overexpression delay neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* 27, 304-307.
 81. Williamson, T. L., and Cleveland, D. W., 1999. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2, 50-56.
 82. Wyatt, T. J., Rossi, S. L., Siegenthaler, M. M., Frame, J., Robles, R., Nistor, G., and Keirstead, H. S., 2011. Human motor neuron progenitor transplantation leads to endogenous neuronal sparing in 3 models of motor neuron loss. *Stem Cells Int* 2011, 207230.
 83. Xu, L., Yan, J., Chen, D., Welsh, A. M., Hazel, T., Johe, K., Hatfield, G., and Koliatsos, V. E., 2006. Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation* 82, 865-875.
 84. Xu, Z., Cork, L. C., Griffin, J. W., and Cleveland, D. W., 1993. Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73, 23-33.
 85. Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E. A., Garcia, M. L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O. R., Cleveland, D. W., and Goldstein, L. S. B., 2008. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7594-7599.
 86. Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., Takahashi, R., Misawa, H., and Cleveland, D. W., 2008. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11, 251-253.
 87. Zhang, C., Zhou, C., Teng, J. J., Zhao, R. L., and Song, Y. Q., 2009. Multiple administrations of human marrow stromal cells through cerebrospinal fluid prolong survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy* 11, 299-306.
 89. Zhao, C. P., Zhang, C., Zhou, S. N., Xie, Y. M., Wang, Y. H., Huang, H., Shang, Y. C., Li, W. Y., Zhou, C., Yu, M. J., and Feng, S. W., 2007. Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice. *Cytotherapy* 9, 414-426.
 90. Zhong, Z., Deane, R., Ali, Z., Parisi, M., Shapovalov, Y., O'Banion, M. K., Stojanovic, K., Sagare, A., Boillee, S., Cleveland, D. W., and Zlokovic, B. V., 2008. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci* 11, 420-422.

Figure 1. Kaplan-Meier survival curves for SOD1^{G93A} mice transplanted with either ^{EGFP}BMMC or ^{mSOD1}BMMC (A) at 70 days (pre-symptomatic), and (B) at 110 days (late symptomatic). (C) Comparative Kaplan-Meier survival curves of SOD1^{G93A} mice transplanted with ^{EGFP}BMMC at 70 days or 110 days.

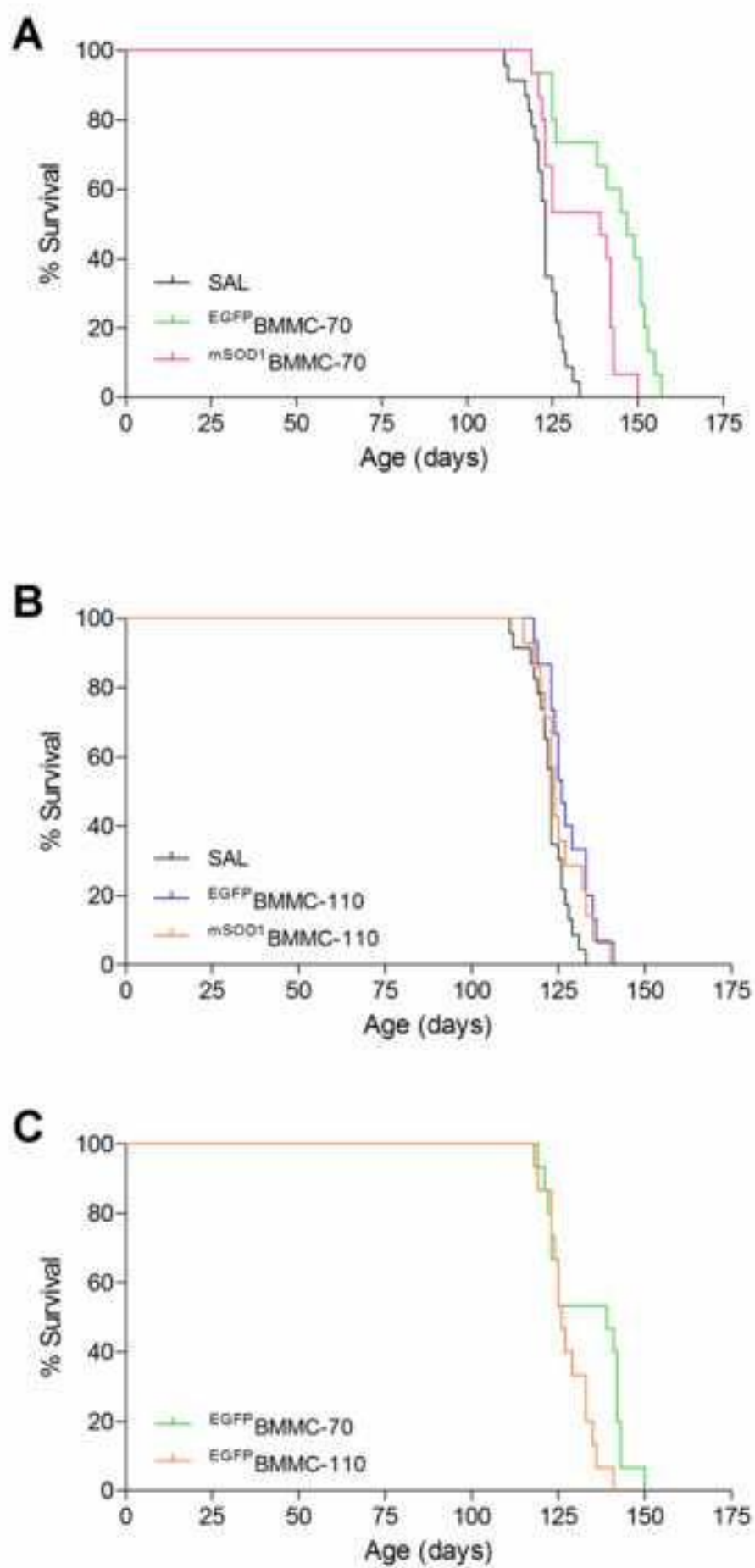
Figure 2. BMMC transplantation delay disease onset (A) and development of the symptomatic stage (B) in pre-symptomatic-treated animals. Also, BMMC change progression time in pre-symptomatic-treated animals, but not in (C) symptomatic BMMC-administered SOD1^{G93A} mice. Panels (E) and (F) show BMMCs effect on the Rotarod performance of mice treated pre-symptomatically or symptomatically, respectively. *** $p < 0.001$ for ^{EGFP}BMMC-70 vs SAL and # $p < 0,05$ vs ^{mSOD1}BMMC-70; §§ $p < 0.01$ for ^{mSOD1}BMMC-70 vs SAL.

Figure 3. ^{EGFP}BMMC transplantation does not prevent DNA damage assessed by the alkalyne comet assay in SOD1^{G93A} mice. Data observed from samples collected from (A) muscle; (B) cervical spinal cord; (C) thoracic spinal cord; (D) lumbar spinal cord; (E) brain cortex and (F) cerebellum, collected from 70 days old treated-mice. Data of samples collected from mice treated at 110 days are shown in (G) muscle; (H) cervical spinal cord; (I) thoracic spinal cord; (J) lumbar spinal cord; (K) brain cortex and (L) cerebellum. CSC: cervical spinal cord; TSC: thoracic spianl cord; and LSC: lombar spinal cord.

Figure 4. ^{EGFP}BMMC are neuroprotective when pré-symptomatically administered in SOD1^{G93A} mice. Photomicrographies show motoneurons observed in the spinal cord of (A) SAL and (B) ^{EGFP}BMMC-70 groups. In (C) Mean of observed motoneurons per section. *** $p < 0.001$ vs SAL, ^{mSOD1}BMMC-70, ^{EGFP}BMMC-110, and ^{mSOD1}BMMC-110.

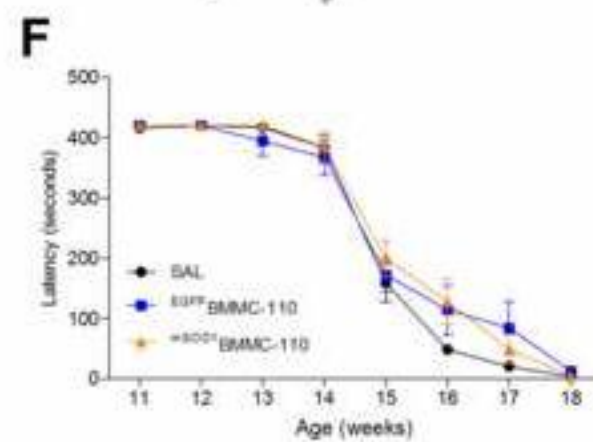
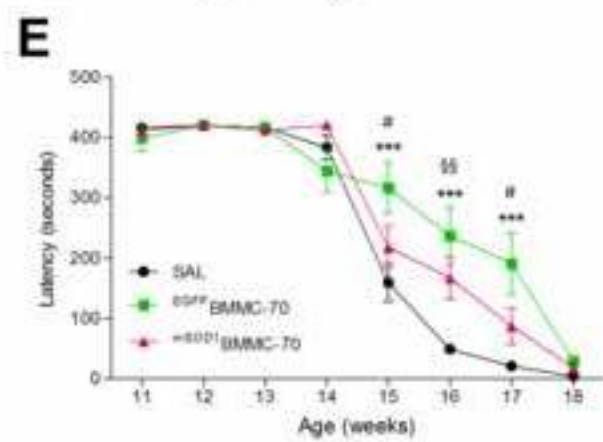
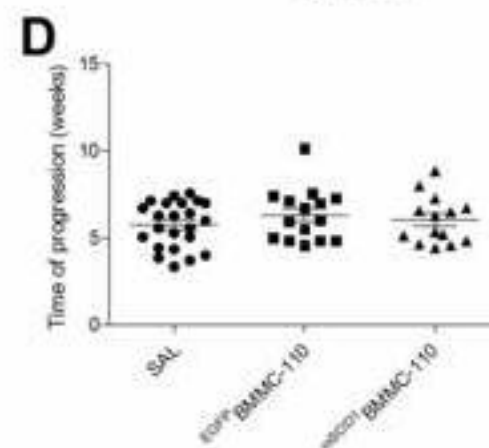
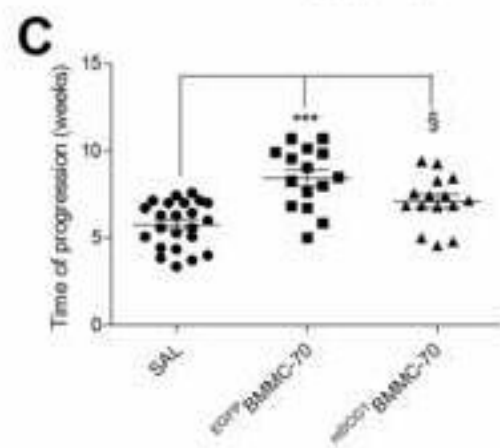
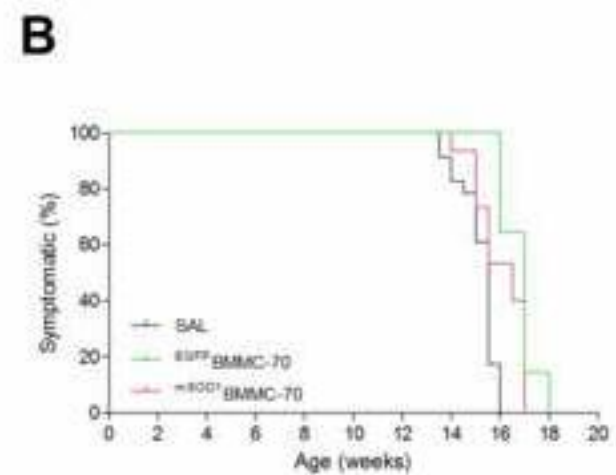
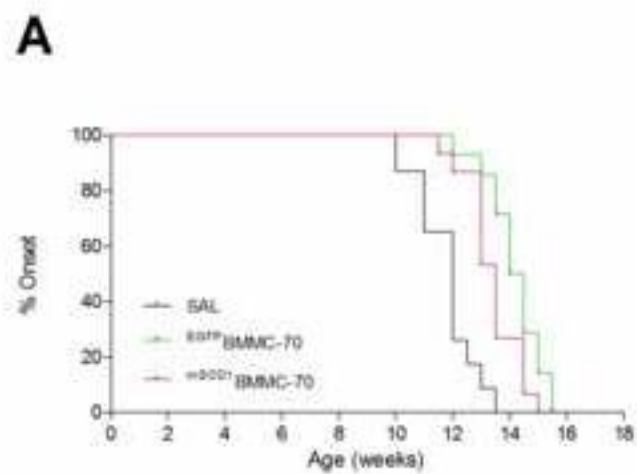
Figure

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



Figure

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



Figure

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

