

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

CAROLINE CALICE DA SILVA

**DISSOCIAÇÃO ENTRE A RESPOSTA DOPAMINÉRGICA E A FUNÇÃO MOTORA
PROMOVIDA PELO TRANSPLANTE INTRACEREBRAL, MAS NÃO
INTRAVENOSO, DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM
MODELO LESIONAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

Porto Alegre
2015

CAROLINE CALICE DA SILVA

**DISSOCIAÇÃO ENTRE A RESPOSTA DOPAMINÉRGICA E A FUNÇÃO MOTORA
PROMOVIDA PELO TRANSPLANTE INTRACEREBRAL, MAS NÃO
INTRAVENOSO, DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM
MODELO LESIONAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Neurociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Porto Alegre

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586d Silva, Caroline Calice da

Dissociação entre a resposta dopaminérgica e a função motora promovida pelo transplante intracerebral, mas não intravenoso, de células mononucleares da medula óssea em modelo lesional da doença de Parkinson. / Caroline Calice da Silva. – Porto Alegre, 2015.

127f. Gráf.; tab. il. Inclui artigo científico.

Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Neurociências) – Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

1. Doença de Parkinson. 2. Células-Tronco. 3. Transplantes.
4. Medula Óssea. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Título.

CDD 616.833

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

CAROLINE CALICE DA SILVA

**DISSOCIAÇÃO ENTRE A RESPOSTA DOPAMINÉRGICA E A FUNÇÃO MOTORA
PROMOVIDA PELO TRANSPLANTE INTRACEREBRAL, MAS NÃO
INTRAVENOSO, DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM
MODELO LESIONAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Neurociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 30 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Gianina Teribele Venturin – InsCer – PUCRS

Prof^a. Dra. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder – UFRGS

Prof. Dr. Marcelo Felipe Santiago - UFRJ

Porto Alegre

2015

*Ao meu noivo, Daniel, pelo apoio incondicional.
Aos meus pais, Luiz Antônio e Zuleica, pela eterna dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Jaderson Costa da Costa, por ter me recebido em seu laboratório e por todos esses anos de ensinamentos; pelo exemplo de profissional e pesquisador e por despertar em seus alunos o amor pela ciência.

I would like to thank Dr. D. Eugene Redmond Jr., for the opportunity to work in his lab, at Yale University. It was an honor to participate of such a renowned group. Thank you for the present of knowing the St. Kitts Research Foundation, this amazing institution, result of all your dedication to science.

To all my colleagues from the Yale Psychiatry Department, specially Dr. Brian Bauereis, for the cell culture and differentiation training and friendship, as well as, Ms. Dorothy Cameron, for the slicing classes. Also, I would like to thank Ms. Joanne Simiola, who was very supportive during my stay.

Aos meus queridos colegas do Neurolab, por todos esses anos de companheirismo e amizade. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para a conclusão desse trabalho. Agradeço em especial, aos funcionários Daniela Abreu, Ricardo Breda e Simone Salamoni pela disposição em ajudar. Obrigada, também, à secretária do InsCer, Nelcy Arndt, por todo apoio e carinho. À Pamela Azevedo e Gabriele Zanirati, minhas queridas amigas, obrigada pelos conselhos e por dividir comigo o dia-a-dia no laboratório, tornando-o muito mais agradável e divertido.

A todos os bolsista de Iniciação Científica do Neurolab, pelo auxílio na realização dos experimentos. Em especial, à Barbara Azevedo, pela sua incansável dedicação. Você foi fundamental para a realização desse trabalho. Obrigada pela responsabilidade, compromisso e amizade.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pelo auxílio na extração das células de medula óssea e na técnica de PCR.

Ao Tiago Giuliani Lopes, do Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas, por ceder o criostato para realização dos cortes histológicos.

À secretaria de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da saúde, em especial ao Ernesto e à Vanessa, por todo auxílio ao longo desses anos.

À PUCRS, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, e à CAPES pela bolsa de Doutorado, a qual me possibilitou realizar este curso. Agradeço também pela bolsa de PDSE, oportunidade que me proporcionou um grande crescimento profissional e pessoal.

À Fundação Lemann pela complementação da bolsa, durante o doutorado sanduíche.

À todos os meus amigos que me incentivaram e me apoiaram durante a realização desse curso, e ainda mais durante meu doutorado sanduíche. Agradeço, em especial, a amiga Natália Nicoletti, com quem dividi desde a graduação o sonho do doutorado, e Elisa Kaminski, grande amiga que o curso de mestrado me proporcionou conhecer.

Ao meu amor e melhor amigo, Daniel, por todo apoio ao longo desses anos. Obrigada por ser meu conselheiro e meu maior incentivador. Divido com você essa conquista. Obrigada por fazer New Haven parecer tão próximo de Passo Fundo.

À toda a minha família, pelo amor e apoio incondicionais. Aos meus amados pais, Luiz Antônio e Zuleica, por me ensinarem que o estudo é um dos bens mais preciosos que podemos adquirir e por possibilitar que eu me dedicasse integralmente a minha qualificação profissional. Aos meus irmãos, Eduardo e Viviane por todo o incentivo, amizade e companheirismo. Aos meus sobrinhos, Guilherme, Arthur, Julia e Matheus, por tornarem meus finais de semana mais alegres.

“O homem deve saber que de nenhum outro lugar, mas apenas do encéfalo, vem a alegria, o prazer, o riso e a diversão, o pesar, o luto, o desalento e a lamentação. E por isso, de uma maneira especial, nós adquirimos sabedoria e conhecimento e enxergamos e ouvimos e sabemos o que é justo e injusto, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que é insipido... E pelo mesmo órgão nos tornamos loucos e delirantes, e medos e terrores nos assombram... Todas essas coisas temos que suportar do encéfalo quando não está sadio... Nesse sentido, opino que é o encéfalo quem exerce o maior poder sobre o homem.”

Hipócrates (460 a.C – 377 a.C.), Sobre a Doença Sagrada

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, a qual leva a uma deficiência de dopamina no estriado. Essa deficiência é responsável pelo desenvolvimento de sintomas motores como tremor em repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural. Novas alternativas para o tratamento da DP têm sido estudadas e uma possibilidade promissora é o transplante de células-tronco. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico do transplante intravenoso e intracerebral de células mononucleares de medula óssea (CMMO) em um modelo lesional da DP. Os animais foram submetidos à estereotaxia e 1µl de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) foi injetado no feixe prosencefálico medial. Duas semanas após, os camundongos foram avaliados no teste de rotação induzida por apomorfina para confirmação da indução do modelo. Na semana seguinte, os animais foram submetidos à avaliação da função motora, pré-transplante, pelo teste de Rotarod. Em seguida, a injeção de CMMO ou salina foi realizada através da veia da cauda ou diretamente no estriado dos animais. A função motora pós-transplante foi avaliada através do teste de Rotarod e do teste de rotação induzida por apomorfina, 10 e 30 dias após o transplante. Nosso estudo demonstrou que as CMMO, transplantadas através da veia da cauda em camundongos parkinsonianos, não foram capazes de melhorar a função motora desses animais. Além disso, essas células foram encontradas no tecido encefálico, apenas 24h após o transplante. Por outro lado, o transplante intracerebral das CMMO impediu a progressão do déficit dopaminérgico induzido pela 6-OHDA, efeito observado através do teste de rotação induzida por apomorfina, apenas 10 dias após. Esse efeito não refletiu, entretanto, na melhora do desempenho dos animais no teste de Rotarod, demonstrando uma dissociação da resposta dopaminérgica e da função motora. Além disso, foi realizado também um transplante duplo de CMMO no estriado de camundongos parkinsoniano. Foi observado, porém, um aumento no número de rotações induzidas por apomorfina, 30 dias após o primeiro transplante, mesmo após uma segunda injeção de CMMO aos 20 dias. Foi demonstrado, também, que as CMMO podem ser detectadas por pelo menos 30 dias após o transplante intraestriatal. Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos no efeito das CMMO observados no modelo animal da DP.

ABSTRACT

Parkinson's disease is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra, a process that leads to a dopamine deficiency in the striatum. This deficiency is responsible for the development of motor symptoms, including resting tremor, bradykinesia, rigidity and postural instability. New alternatives to Parkinson's disease treatment have been studied, including cell-based therapies. The present study aimed to assess the therapeutic potential of intravenous and intrastriatal transplant of bone marrow mononuclear cells in a mouse model of Parkinson's disease. Animals underwent stereotaxic surgery and 1 μ l of 6-hydroxidopamine (6-OHDA) was injected into their medial forebrain bundle. Two weeks later, mice were evaluated in the apomorphine rotation test to confirm the model induction. In the next week, animals' pre-transplant motor function was assessed by Rotarod test. Then, BMNC or saline injection was carried out through the tail vein or directly into animals' striatum. Motor function was also assessed using the Rotarod and apomorphine-induced rotation tests, 10 and 30 days post-transplant. Our results showed that intravenous BMNC did not restore the motor function in PD mice. In addition, transplanted cells were found only 24h after transplant in the brain tissue. On the other hand, the BMNC intracerebral transplant prevented the dopaminergic deficit progress, induced by 6-OHDA injection, effect seen in apomorphine-induced rotation test, only 10 days post-transplant. This potential was not seen on Rotarod test, showing dissociation between dopaminergic response and motor function. In addition, it was carried out a BMNC double transplant into parkinsonian mice's striatum. It was shown, however, an increase in the apomorphine-induced rotations number, 30 days after the first transplant, even after a second injection of BMNC at 20 days. It was also shown, that, BMNC can be detected for at least 30 days after the intrastriatal transplant. Further experiments are needed to elucidate the mechanisms involved in these effects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| <i>Quadro 1 - Divisão dos grupos de acordo com cada experimento.</i> ----- | 35 |
| <i>Figura 1 - Indução do modelo de DP.</i> ----- | 36 |
| <i>Figura 2 - Obtenção de CMMO de camundongos C57Bl/6-EGFP.</i> ----- | 38 |
| <i>Figura 3 - Infusão das células mononucleares de medula óssea através da veia da cauda.</i> ----- | 39 |
| <i>Figura 4 - Teste de Rotarod.</i> ----- | 40 |
| <i>Figura 5 - Delineamento do experimento 1.</i> ----- | 44 |
| <i>Figura 6 - Delineamento do experimento 2.</i> ----- | 45 |
| <i>Figura 7 - Delineamento do experimento 3.</i> ----- | 46 |
| <i>Figura 8 – Imunofluorescência para TH.</i> ----- | 47 |
| <i>Figura 9 – Citometria de fluxo para imunofenotipagem das CMMO.</i> ----- | 48 |
| <i>Figura 10 – Comparação do desempenho no teste de Rotarod entre os grupos ao longo do tempo.</i> ----- | 49 |
| <i>Figura 11 – Comparação do nº de rotações contralaterais no teste da apomorfina entre grupos ao longo do tempo.</i> ----- | 50 |
| <i>Figura 12 – PCR pós-transplante intravenoso.</i> ----- | 50 |
| <i>Figura 13 - Imunofluorescência anti-GFP 24h pós-transplante.</i> ----- | 51 |
| <i>Figura 14 - Comparação do desempenho no teste de Rotarod entre os grupos.</i> ----- | 52 |
| <i>Figura 15 - Comparação do número de rotações no teste da apomorfina entre os grupos.</i> ----- | 53 |
| <i>Figura 16 – PCR pós-transplante intracerebral.</i> ----- | 54 |
| <i>Figura 17 - Imunofluorescência anti-GFP.</i> ----- | 55 |
| <i>Figura 18 - Comparação do desempenho no teste de Rotarod entre os grupos.</i> ----- | 56 |
| <i>Figura 19 - Comparação do número de rotações no teste da apomorfina entre os grupos.</i> ----- | 57 |
| <i>Figura 20 – PCR pós-transplante duplo. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.</i> ----- | 58 |
| <i>Figura 21 - Imunofluorescência anti-GFP.</i> ----- | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| 6-OHDA | 6-hidroxi-dopamina |
| ANOVA | Análise de variância |
| AP | Ântero-posterior |
| ATP | Trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate) |
| BBB | Barreira hematoencefálica (blood brain barrier) |
| BMMCs | Bone marrow stem cells |
| CD (nº) | Grupamento de diferenciação (nº) |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CMMO | Células mononucleares de medula óssea |
| CTMO | Células-tronco de medula óssea |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid) |
| DP | Doença de Parkinson |
| DV | Dorsoventral |
| E1 | Ubiquitina ligase 1 |
| E2 | Ubiquitina ligase 2 |
| E3 | Ubiquitina ligase 3 |
| EBs | Embryonic bodies |
| EGFP | Proteína verde fluorescente (enhanced green fluorescent protein) |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| ESCs | Células-tronco embrionárias (embryonic stem cell) |
| EUA | Estados Unidos da América |
| GDNF | Fator neurotrófico derivado da glia (glial cell-derived neurotrophic factor) |
| GFAP | Proteína glial fibrilar acídica (glial fibrillary acidic protein) |
| GFP | Green fluorescent protein |
| GVHD | Doença do enxerto versus hospedeiro (graft-versus-host disease) |
| hESCs | Células-tronco embrionárias humanas (human embryonic stem cells) |
| HLA | Antígeno leucocitário humano (human leukocyte antigen) |
| HSCs | Células-tronco hematopoiéticas (hematopoietic stem cells) |

| | |
|---------------------------------|--|
| hUCB | Sangue de cordão umbilical humano (human umbilical cord blood) |
| IC | Intracerebral |
| i.p. | Intraperitoneal |
| i.v. | Intravenoso |
| IF | Imunofluorescência |
| IFN- γ | Interferon-gama |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| iPSC | Células-tronco de pluripotência induzida (induced pluripotent stem cells) |
| LB | Corpos de Lewy (Lewy's body) |
| LRRK2 | Leucine-rich repeat kinase 2 |
| MAO-B | Monoamina oxidase- B |
| MFB | Feixe prosencefálico medial (medial forebrain bundle) |
| Micro-PET/CT | Micro-tomografia por emissão de pósitrons acoplada a tomografia computadorizada (Micro-positron emission tomography-computed tomography) |
| ML | Médio-lateral |
| MO | Medula óssea |
| MPTP | 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro (messenger ribonucleic acid) |
| MSA | Atrofia sistêmica múltipla (multiple systems atrophy) |
| MSCs | Células-tronco mesenquimais (mesenchymal stem cells) |
| NeuN | Núcleo neuronal (neuronal nuclei) |
| NGF | Fator de crescimento neuronal (nerve growth factor) |
| NK | Células NK (natural killers) |
| NSCs | Células-tronco neuronais (neural stem cells) |
| Nurr1 | Nuclear receptor related 1 protein |
| P-gp | Glicoproteína-P |
| PBS | Tampão fosfato (phosphate buffered saline) |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction) |
| PINK1 | PTEN-induced kinase 1 |
| PSP | Paralisia supranuclear progressiva (progressive supranuclear palsy) |

| | |
|----------------------------------|--|
| RE | Retículo endoplasmático |
| REM | Movimento rápido dos olhos (rapid eye movement) |
| RPM | Rotações por minuto |
| SDF -1 | Fator derivado do estroma (stromal cell-derived factor 1) |
| SGZ | Zona subgranular (subgranular zone) |
| SN | Substância negra |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNc | Substancia negra, parte compacta |
| SNCAIP | Synuclein alpha interacting protein |
| SVZ | Zona subventricular (subventricular zone) |
| TBE | Tampão Tris/Borato/EDTA |
| TH | Tirosina hidroxilase |
| TNF – α | Fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor)-alfa |
| UCB | Sangue de cordão umbilical (umbilical cord blood) |
| UCHL1 | Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 |
| UPDRS | Unified Parkinson's Disease Rating Scale |
| UPR | Unfolded protein responses |
| UPS | Sistema ubiquitina-proteossoma (ubiquitin-proteasome system) |
| USSC | Unrestricted somatic stem cells |
| VTA | Área tegmental ventral (ventral tegmental area) |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 16 |
| 1.1 DOENÇA DE PARKINSON----- | 16 |
| 1.1.1 Histórico----- | 16 |
| 1.1.2 Fisiopatologia ----- | 17 |
| 1.1.3 Genética ----- | 19 |
| 1.1.4 Manifestações Clínicas ----- | 22 |
| 1.1.5 Diagnóstico da DP e diagnóstico diferencial ----- | 23 |
| 1.1.6 Tratamento ----- | 24 |
| 1.2 CÉLULAS-TRONCO ----- | 25 |
| 1.2.1 Células-tronco embrionárias----- | 25 |
| 1.2.2 Células-tronco adultas----- | 26 |
| 1.3 DOENÇA DE PARKINSON E CÉLULAS-TRONCO ----- | 30 |
| 2 OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL ----- | 34 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ----- | 34 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 ANIMAIS ----- | 35 |
| 3.1.1 Lesão com 6-hidroxidopamina (6-OHDA)----- | 36 |
| 3.1.2 Aspectos éticos----- | 37 |
| 3.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA ----- | 37 |
| 3.2.1 Citometria de fluxo e fenotipagem ----- | 38 |
| 3.3 TRANSPLANTE ----- | 38 |
| 3.3.1 Transplante intravenoso----- | 38 |
| 3.3.2 Transplante intracerebral----- | 39 |
| 3.4 TESTES DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA ----- | 39 |
| 3.4.1 Teste de desempenho no Rotarod em aceleração ----- | 39 |
| 3.4.2 Teste de rotação induzida por apomorfina----- | 41 |
| 3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) ----- | 41 |

| | | |
|-------|---------------------------------|----|
| 3.6 | IMUNOFLOURESCÊNCIA (IF)----- | 42 |
| 3.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA ----- | 43 |
| 3.8 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ----- | 43 |
| 3.8.1 | Experimento 1 ----- | 43 |
| 3.8.2 | Experimento 2 ----- | 45 |
| 3.8.3 | Experimento 3 ----- | 46 |

4 RESULTADOS

| | | |
|-------|---|----|
| 4.1 | COMPROVAÇÃO DA EFICÁCIA DA LESÃO UNILATERAL COM 6-OHDA----- | 47 |
| 4.2 | CITOMETRIA DE FLUXO E FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA PARA TRANSPLANTE ----- | 47 |
| 4.3 | EXPERIMENTO 1 ----- | 47 |
| 4.3.1 | Testes de avaliação da função motora ----- | 47 |
| 4.3.2 | Reação em Cadeia da Polimerase----- | 49 |
| 4.3.3 | Imunofluorescência----- | 50 |
| 4.4 | EXPERIMENTO 2 ----- | 51 |
| 4.4.1 | Testes de avaliação da função motora ----- | 52 |
| 4.4.2 | Reação em Cadeia da Polimerase----- | 53 |
| 4.4.3 | Imunofluorescência----- | 54 |
| 4.5 | EXPERIMENTO 3: ----- | 54 |
| 4.5.1 | Testes de avaliação da função motora ----- | 55 |
| 4.5.2 | Reação em Cadeia da Polimerase----- | 57 |
| 4.5.3 | Imunofluorescência----- | 57 |

5 DISCUSSÃO

6 CONCLUSÕES

7 PERSPECTIVAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

| | |
|------------------------------------|------------|
| A – ARTIGO CIENTÍFICO ----- | 83 |
| Abstract ----- | 85 |
| Introction ----- | 86 |
| Material and methods ----- | 88 |
| Results ----- | 94 |
| Discussion ----- | 105 |
| Conclusion ----- | 109 |
| Acknowledgments ----- | 110 |
| References ----- | 111 |

| | |
|--|------------|
| A – CARTAS DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) ----- | 126 |
|--|------------|

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

1.1.1 Histórico

James Parkinson descreveu pela primeira vez, em 1817, a doença que posteriormente levaria seu nome: a Paralisia Agitante (do inglês *Shaking Palsy*), em sua monografia intitulada *An Essay on Shaking Palsy* (PARKINSON, 2002). Médico inglês, Parkinson era membro do colégio real de cirurgiões e teve contribuições em diversos campos, além da medicina, como política, reforma social, química e geologia. O estudo *An Essay on Shaking Palsy* é baseado em seis relatos de casos, dos quais metade dos pacientes não foi de fato examinada por Parkinson, mas observada nas ruas. (PARKINSON, 2002; GOLDMAN e GOETZ, 2005).

James Parkinson caracterizou a Paralisia Agitante como movimentos trêmulos involuntários, com perda da força muscular, propensão a inclinar o tronco para frente, e aceleração involuntária da marcha (festinação), onde o senso e o intelecto estão intactos (TEIVE, 1998; PARKINSON, 2002). Anos depois, em reconhecimento ao trabalho de James Parkinson, Jean Martin Charcot, propôs que a enfermidade se chamasse Doença de Parkinson (do francês *La maladie de Parkinson*; DP), como é conhecida até os dias de hoje. Charcot também teve importantes contribuições para a descrição da doença, definindo os quatro sinais cardinais: tremor, lentidão de movimentos (bradicinesia), rigidez e dificuldades do equilíbrio (TEIVE, 1998; JANKOVIC, 2008).

No estudo de James Parkinson chegou a ser proposto que a doença poderia ser causada por complicações na região cervical da medula espinhal e que, pela falta de prejuízo do intelecto, a morbidade não se estenderia ao encéfalo (PARKINSON, 2002). No entanto, em 1919, o pesquisador russo Konstantin Nikolaevich Tretiakoff defendeu sua tese na Salpêtrière, em Paris, introduzindo um novo conceito (LEES *et al.*, 2008).

Ao final da Primeira Guerra Mundial, a encefalite letárgica epidêmica assolava o mundo e Tretiakoff teve a oportunidade de examinar encéfalos com Parkinsonismo pós-encefálico. Em seis, dos nove casos de paralisia agitante que analisou, descreveu perda de neurônios pigmentados da substância negra (SN) e alterações neurofibrilares. Em alguns neurônios sobreviventes da SN observou corpos de inclusão, os quais chamou de corpos de

Lewy (LB, do inglês *Lewy's Body*) em reconhecimento a descrição de Friedrich Lewy de inclusões semelhantes no núcleo dorsal do vago (TEIVE, 1998; LEES *et al.*, 2008). O conceito de Tretiakoff, porém, não foi bem aceito entre os neuropatologistas e apenas em 1956, poucos meses antes da sua morte, Godwin Greenfield, o primeiro neuropatologista do *National Hospital for Nervous Diseases Queen Square*, finalmente reconheceu sua contribuição para o entendimento da doença de Parkinson (LEES *et al.*, 2008).

1.1.2 Fisiopatologia

Atualmente, sabe-se que a DP caracteriza-se pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos da SN, que leva a deficiência de dopamina no estriado (FAHN e SULZER, 2004; PARISH *et al.*, 2008; BANDOPADHYAY e DE BELLEROCHE, 2009). Além da perda seletiva desses neurônios que contêm neuromelanina da substância negra, parte compacta (SNc), pode ocorrer morte celular no *locus coeruleus*, núcleo dorsal do vago, núcleo da rafe, núcleo basal de Meynert e em outras estruturas catecolaminérgicas do tronco encefálico, como a área tegmental ventral (VTA) (DAMIER *et al.*, 1999; FAHN e SULZER, 2004; LEES *et al.*, 2009). Essa perda neuronal é acompanhada de um aumento das células gliais além do aparecimento de inclusões intracitoplasmáticas na SN e em outras regiões do cérebro, denominadas corpos de Lewy (FAHN e SULZER, 2004; LEES *et al.*, 2009). Essas estruturas apresentam um diâmetro de 5–25 μm , um núcleo densamente eosinofílico circundado por um halo mais claro e seu principal componente é a proteína α -sinucleína (SPILLANTINI *et al.*, 1998). Ainda não se sabe, porém, se os LB estão envolvidos na patologia da DP ou se são uma consequência dela (FAHN e SULZER, 2004).

A causa dessa morte neuronal, assim como da seletividade a esses neurônios ainda não foi esclarecida. Inúmeras hipóteses estão sendo estudadas, como, a agregação proteica e alterações na degradação dessas proteínas, além de disfunções mitocondriais e estresse oxidativo (FAHN e SULZER, 2004; WANG e TAKAHASHI, 2007). Em diversas doenças neurodegenerativas ocorre a formação de proteínas anormais que, em geral, tendem a agregar. Esse acúmulo inapropriado de proteínas anormais pode causar dano ao sistema nervoso e para evitar esse processo as células possuem mecanismos de defesa como, por exemplo, produção de proteínas antioxidantes, respostas às proteínas mal estruturadas (mal enovelada) (UPR, do inglês *unfolded protein responses*) e o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS do inglês

ubiquitin-proteasome system), que é responsável pela degradação proteica (BANDOPADHYAY e DE BELLEROCHE, 2009).

Para compreender o papel desses sistemas na patogenia da DP é necessário entender seu funcionamento normal. A ubiquitina é uma proteína responsável pela marcação de proteínas que serão degradadas. Três enzimas, E1, E2 e E3, participam da reação de conjugação da ubiquitina às proteínas. Inicialmente, E1 liga-se a ubiquitina, reação que necessita de uma molécula de ATP (do inglês *adenosine triphosphate*), tornando-a ativa. A ubiquitina ativada é transferida, então, para E2. E3 reconhece a proteína-alvo, liga-se a ela e catalisa, então, a transferência da ubiquitina de E2 para a proteína-alvo. Em geral, as proteínas-alvo adquirem várias moléculas de ubiquitina, processo conhecido como poliubiquitinação. Após esse processo, a proteína poliubiquitinada é levada até o proteassoma, no citosol, onde será degradada (HOCHSTRASSER, 1996; STRYER, 1996; WANG e TAKAHASHI, 2007).

O retículo endoplasmático (RE) participa da síntese proteica e do plegamento de proteínas, além de outras funções pós-traducionais. Em diversos casos, como por exemplo, bloqueio do proteassoma ou mutações genéticas em que algumas proteínas não são corretamente plegadas, ocorre o acúmulo dessas proteínas mal enoveladas no RE, prejudicando sua função. Esse acúmulo pode induzir apoptose, se a função normal do RE não for restabelecida. O principal papel das UPR é remover esses substratos acumulados e restaurar o RE, por meio de duas vias principais: aumento da capacidade de enovelamento através da super-regulação de chaperonas do RE; e degradação de proteínas mal enoveladas através do sistema ubiquitina-proteassoma. Ainda, se o estresse do RE for muito severo ou prolongado pode ocorrer indução de apoptose (PLEMPER e WOLF, 1999a; b)

Na maioria dos casos de DP a neurodegeneração é idiopática e, sendo assim, a etiologia da doença ainda não é conhecida. Porém, nos últimos anos, a identificação de mutações genéticas em casos familiares de DP contribuiu para o entendimento dos mecanismos pelos quais pode ocorrer a degeneração celular (WANG e TAKAHASHI, 2007). O envolvimento de alguns genes, como PARK2 e UCHL1 (do inglês *Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1*), sugere associação do sistema ubiquitina-proteassoma na patologia da DP. O gene PARK2 codifica a proteína parkina, que possui função de ubiquitina ligase (E3) (SHIMURA *et al.*, 2000; WANG e TAKAHASHI, 2007). Além disso, a identificação da α -sinucleína como principal componente dos LB e a posterior descoberta de que mutações no gene dessa proteína podem causar DP, sugerem que a doença pode ser causada pela agregação

anormal de α -sinucleína (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1996; POLYMEROPOULOS *et al.*, 1997; LEROY *et al.*, 1998; SPILLANTINI *et al.*, 1998). Outro gene que contribuiu para a elucidação de causas da neurodegeneração foi o PARK6, que codifica a proteína PINK1 (do inglês *PTEN-induced kinase 1*) que, na forma *wild-type*, protege os neurônios de disfunções mitocondriais e da apoptose induzida por estresse oxidativo, fornecendo suporte para o envolvimento da mitocôndria na perda neuronal da DP (VALENTE, ABOU-SLEIMAN, *et al.*, 2004). Da mesma forma, a DP causada por uma mutação no gene DJ-1, cuja proteína tem um papel importante na resposta ao estresse oxidativo, atuando como um sensor de redox ou como proteína antioxidante, demonstra o possível envolvimento do estresse oxidativo na patologia da DP (BONIFATI *et al.*, 2003). Outros genes envolvidos na DP familiar, bem como tipos de herança e manifestações clínicas encontradas nessas mutações estão descritas a seguir (HEALY *et al.*, 2004).

1.1.3 Genética

A grande maioria dos casos de parkinsonismo primário é esporádica, mas observa-se um histórico familiar positivo em mais de 10% dos casos (FAHN e SULZER, 2004). Nas últimas décadas, houve um avanço muito grande no conhecimento sobre a genética da DP e de outros distúrbios parkinsonianos (HEALY *et al.*, 2004). Tanto heranças autossômicas dominantes quanto recessivas são descritas, sendo as dominantes mais comuns (MIZUNO *et al.*, 1999). Os principais genes envolvidos na DP familiar estão descritos a seguir.

1.1.3.1 Herança autossômica dominante

1.1.3.1.1 α -sinucleína (PARK1)

Golbe e colaboradores (1990, 1996) descreveram manifestações clínicas, muito semelhantes à DP idiopática, na família grego-italiana Contursi (GOLBE *et al.*, 1990; GOLBE *et al.*, 1996). Logo após, Polymeropoulos e colegas (1996, 1997) mapearam o gene responsável pela doença e identificaram a mutação sem sentido A53T na proteína α -sinucleína (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1996; POLYMEROPOULOS *et al.*, 1997). Os membros afetados da família respondiam bem a levodopa e diferiam dos pacientes com DP idiopática apenas pela idade de início da doença, cuja média era de 45,6 anos (GOLBE *et al.*, 1990). Outras duas mutações pontuais foram descritas, posteriormente, em uma família alemã

(A30P) (KRUGER *et al.*, 1998) e espanhola (E46K) (ZARRANZ *et al.*, 2004). Nessa, além das manifestações motoras, os pacientes apresentavam alucinações e demência, além de um grande número de LB corticais e subcorticais (ZARRANZ *et al.*, 2004).

Além das mutações na α -sinucleína, foi descrito que a duplicação ou triplicação do gene pode causar DP autossômica dominante, demonstrando que além da α -sinucleína anormal a proteína normal em excesso também é prejudicial (SINGLETON *et al.*, 2003; HEALY *et al.*, 2004).

1.1.3.1.2 LRRK2 (PARK8)

Em 2002, características patológicas muito similares a dos pacientes com DP idiopática foram descritas em uma família japonesa, forma familiar da DP que ficou conhecida como PARK8 (FUNAYAMA *et al.*, 2002; SEOL, 2010). Posteriormente, em 2004, identificou-se o gene responsável por esse tipo de DP, o qual codifica a proteína conhecida como LRRK2 (do inglês, *Leucine-rich repeat kinase 2*) ou dardarina (PAISAN-RUIZ *et al.*, 2004; ZIMPRICH *et al.*, 2004). Essa é uma das formas mais frequentes de herança com padrão autossômico dominante, mas mutações nesse gene podem estar presentes também em casos esporádicos de DP, além dos casos familiares (SEOL, 2010).

1.1.3.1.3 UCHL1 (PARK5)

Uma mutação sem sentido na enzima UCHL1, que está envolvida no sistema de degradação ubiquitina-proteassoma, foi descrita em uma família alemã. A mutação Ile93Met leva a uma perda parcial da atividade catalítica dessa enzima, que pode desencadear agregação de proteínas. Os familiares afetados pela mutação apresentam sintomas típicos da DP e respondem ao tratamento com levodopa (LEROY *et al.*, 1998).

1.1.3.1.4 Nurr1 (NR4A2)

Camundongos *knockout* para o gene NR4A2 não desenvolvem neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, demonstrando que o receptor nuclear codificado por esse gene, Nurr1, parece ter importante papel no desenvolvimento desses neurônios (ZETTERSTROM *et al.*, 1997). Duas mutações no gene da NR4A2 foram identificadas em

pacientes com DP familiar, que apresentam sintomas muito semelhantes à DP idiopática, bem como a idade de início da doença. Essas mutações resultam em uma diminuição dos níveis de mRNA (do inglês *messenger ribonucleic acid*) do NR4A2 (LE *et al.*, 2003; HEALY *et al.*, 2004).

1.1.3.1.5 Sinfilina-1 (SNCAIP)

A sinfilina-1 é uma proteína que interage com a α -sinucleína nos neurônios e está presente nos LB de pacientes com DP, sugerindo que essa proteína poderia estar envolvida na neurodegeneração da DP (ENGELENDER *et al.*, 1999; WAKABAYASHI *et al.*, 2000). Uma mutação R61C na sinfilina-1 foi identificada em dois indivíduos alemães com aparente DP esporádica, mas que apresentavam ancestralidade comum. Os autores sugerem uma interação da sinfilina-1 mutada com o sistema ubiquitina-proteassoma, porém a exata relação dessa mutação com a patogênese da DP ainda não foi esclarecida (MARX *et al.*, 2003; HEALY *et al.*, 2004).

1.1.3.2 Heranças autossômicas recessivas

1.1.3.2.1 Parkina (PARK2)

Yamamura e colaboradores (1973) descreveram pela primeira vez as manifestações clínicas dessa forma de DP familiar (YAMAMURA *et al.*, 1973apud; MIZUNO *et al.*, 1999). A maioria das mutações na parkina é de perda de função e, portanto, a proteína perde a capacidade de ubiquitinação, o que resulta no acúmulo de substratos e consequente toxicidade para as células (HEALY *et al.*, 2004). Mutações homozigotas na parkina são responsáveis por cerca de metade dos casos de DP autossômica recessiva com início precoce (< 21 anos), sendo essa doença mais conhecida como parkinsonismo juvenil. As manifestações clínicas incluem apresentação simétrica, evolução lenta da doença e sensibilidade a levodopa com desenvolvimento, em geral, de dramática discinesia (LUCKING *et al.*, 2000).

1.1.3.2.2 PINK1 (PARK6)

Mutações homozigotas no gene da PINK1 induzem DP autossômica recessiva com início precoce (VALENTE, SALVI, *et al.*, 2004). Essas mutações foram primeiramente encontradas em três famílias de origem italiana e espanhola e, posteriormente, outras famílias na Europa e na Ásia foram identificadas (HATANO *et al.*, 2004). As manifestações clínicas são semelhantes às associadas à parkina e incluem progressão lenta da doença e responsividade a levodopa (HEALY *et al.*, 2004; VALENTE, SALVI, *et al.*, 2004).

1.1.3.2.3 DJ-1 (PARK7)

Mutações autossômicas recessivas no gene DJ-1 podem causar DP com início precoce (BONIFATI *et al.*, 2003). As manifestações clínicas incluem responsividade a levodopa, progressão lenta da doença, sintomas psiquiátricos, e distonia focal, lembrando os sintomas associados com mutações na parkina (ABOU-SLEIMAN *et al.*, 2003).

Diferentes tipos de parkinsonismo também podem ser causados por alterações genéticas, tais como: parkinsonismo associado à proteína *tau*, distúrbios de repetições de trinucleotídeos, parkinsonismo distônico ligado ao X e parkinsonismo distônico de início rápido (ABOU-SLEIMAN *et al.*, 2003).

1.1.4 Manifestações Clínicas

Parkinsonismo é o nome dado a um conjunto de sintomas motores que inclui: tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. A DP é o tipo mais comum de parkinsonismo, podendo ser chamada também de parkinsonismo primário, ou idiopático. Outros tipos incluem parkinsonismo secundário (adquirido), parkinsonismo heredodegenerativo e degeneração sistêmica múltipla (parkinsonismo associado a outras síndromes) (JANKOVIC, 2008). Duas principais escalas são utilizadas para avaliar a evolução do comprometimento motor: a Escala Hoehn e Yahr, que varia do estágio 0 (sem sinais da doença) até o estágio 5 (cadeirantes ou acamados) e a Escala unificada de avaliação da doença de Parkinson, UPDRS (do inglês *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) (EBERSBACH *et al.*, 2006).

A bradicinesia é a principal manifestação clínica da DP e a marca dos distúrbios dos gânglios da base. Caracteriza-se pela lentidão de movimentos e dificuldades para planejar,

iniciar e executar o movimento (BERARDELLI *et al.*, 2001). Outros sintomas característicos da bradicinesia incluem perda de movimentos espontâneos, comprometimento da deglutição, perda de expressão facial e diminuição do balanço dos braços ao caminhar (BAGHERI *et al.*, 1999; JANKOVIC, 2008). A bradicinesia é o sintoma que mais se correlaciona com o grau de deficiência de dopamina (VINGERHOETS *et al.*, 1997). O tremor em repouso, por sua vez, é o sintoma mais característico e mais fácil de ser reconhecido da DP. Em geral, os tremores são unilaterais e proeminentes nas partes distais dos membros. Pode envolver também os lábios, o queixo e as pernas e, ao contrário do tremor essencial, raramente afeta o pescoço, a cabeça ou a voz. O tremor tende a desaparecer com uma ação ou durante o sono (JANKOVIC, 2008; RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009).

Outro sintoma característico da DP é a rigidez que ocorre devido ao aumento do tônus muscular, podendo acometer regiões axiais, como pescoço, ombros e quadris, ou regiões apendiculares, tais como pulsos e tornozelos (JANKOVIC, 2008). Já a instabilidade postural geralmente ocorre nos estágios avançados da doença e é a causa mais comum de queda na DP. A latência do início das quedas diferencia a DP de outras doenças como PSP (do inglês *progressive supranuclear palsy*) e MSA (do inglês *mutiple system atrophy*) (WILLIAMS *et al.*, 2006) e a frequência das quedas está correlacionada com a gravidade da doença (KOLLER *et al.*, 1989 apud JANKOVIC, 2008).

Algumas manifestações clínicas não-motoras podem ser encontradas, tais como, declínio cognitivo e demência. Um estudo demonstrou que pacientes com DP possuem cerca de seis vezes mais chances de desenvolver quadros de demência. Além disso, pode-se observar depressão, ansiedade e alucinações. Alguns pacientes com DP também podem apresentar comportamentos obsessivos compulsivos. Sabe-se, também, que distúrbios no sono, como o do sono REM (do inglês *rapid eye movement*) podem ser observados em pacientes parkinsonianos. Anteriormente, pensava-se que esses distúrbios ocorriam em consequência aos tratamentos farmacológicos, porém, atualmente, acredita-se que o distúrbio do sono REM é um fator de risco para o desenvolvimento de DP (LEES *et al.*, 2009).

1.1.5 Diagnóstico da DP e diagnóstico diferencial

O diagnóstico da DP é feito através da clínica, baseado na presença de sintomas cardinais motores e na resposta à levodopa (HUGHES *et al.*, 2001; HUGHES *et al.*, 2002; RAO *et al.*, 2003). Testes de movimentos de coordenação com os dedos podem ajudar no

diagnóstico. A bradicinesia precisa estar presente e pode ser confirmada pela observação de lentidão e redução progressiva da velocidade e amplitude na realização de tarefas motoras sequenciais (LEES *et al.*, 2009).

A doença de Parkinson pode ser confundida com outros distúrbios motores, como MSA, PSP e tremor essencial (LEES *et al.*, 2009). A MSA costuma aparecer na sexta década de vida com quadros de incontinência urinária e com disfunção erétil precoce em homens, porém pode ser difícil de diferenciá-la da DP quando os sintomas autonômicos não são proeminentes e os pacientes têm boa resposta a levodopa (QUINN, 2005). Já a PSP, geralmente, aparece na sétima ou oitava década de vida e é muito semelhante à DP, visto que não há disfunções do sistema autonômico. Sintomas axiais e bulbares podem ser mais proeminentes na PSP e alguns pacientes podem apresentar bradifrenia (lentidão mental) (WILLIAMS *et al.*, 2005). Tanto a MSA quanto a PSP tem uma progressão muito mais rápida do que a DP (O'SULLIVAN *et al.*, 2008). O tremor essencial, em geral, ocorre durante o movimento e não se observa sintomas de bradicinesia. Pode ser facilmente confundido com a DP quando de larga amplitude, tem início na velhice e está presente no repouso (LEES *et al.*, 2009).

1.1.6 Tratamento

Atualmente, o medicamento mais utilizado e o mais eficaz para o tratamento da DP é a levodopa, sendo que os pacientes, em geral, podem ser mantidos com 300-600mg/dia de levodopa durante os cinco primeiros anos, após o diagnóstico da doença. Os sintomas de fadiga, bradicinesia e rigidez costumam melhorar nos três primeiros meses após o tratamento (FAHN *et al.*, 2004). Já o tremor é mais difícil de ser tratado e em alguns pacientes ele desaparece apenas depois de anos de tratamento. Os distúrbios da fala e deglutição também são menos responsivos a levodopa (HELY *et al.*, 2008; KATZENSCHLAGER *et al.*, 2008). Efeitos adversos precoces incluem náusea, anorexia e desmaio e o uso prolongado da levodopa pode desencadear o aparecimento de flutuações motoras e movimentos involuntários conhecidos como discinesia (LEES *et al.*, 2009).

Agonistas dopaminérgicos não-ergolínicos, como ropinirol e pramipexol, também são eficazes e, ao contrário da levodopa, não provocam discinesia, porém, geralmente a levodopa é necessária dentro de três anos de diagnóstico. Essas são as drogas de escolha em pacientes com menos de 55 anos (LEES *et al.*, 2009). Além disso, inibidores seletivos da monoamina

oxidase B (MAO-B), como selegilina e rasagilina, são bem tolerados, mas menos eficazes que a levodopa e os agonistas da dopamina (SHOULSON, 1998; LEES *et al.*, 2009).

Além dos ajustes de doses, a combinação da levodopa com outras drogas como catecol-O-metil-transferase (entacapone) ou inibidores da MAO-B podem melhorar os movimentos involuntários. Substituições parciais com agonistas dopaminérgicos também podem ser úteis (RASCOL *et al.*, 2002; MIYASAKI, 2006).

Todos os tratamentos descritos acima apenas amenizam os sintomas da doença e melhoram a qualidade de vida dos pacientes, porém não regridem a degeneração neuronal nem impedem a progressão da doença. Em função disso, novas alternativas estão sendo estudadas e uma possibilidade promissora é o transplante de células-tronco.

1.2 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células mais imaturas que possuem a habilidade de se auto-renovar por um longo período e de se diferenciar, sob condições apropriadas, em células mais especializadas (FUCHS e SEGRE, 2000; LI e DING, 2009). De acordo com a sua capacidade de diferenciação essas células podem ser classificadas como pluripotentes e multipotentes. As células-tronco pluripotentes podem expandir-se indefinidamente e são capazes de dar origem a todos os tipos celulares do corpo. Testes de pluripotência incluem a formação de corpos embrionários *in vitro* que se diferenciam nas três camadas germinativas, denominadas ectoderme, mesoderme e endoderme, além do teste de formação de teratomas (LI e DING, 2009; BRIGNIER e GEWIRTZ, 2010; MASUI, 2010). Já as células-tronco multipotentes, geralmente, sobrevivem menos tempo em cultura e possuem uma capacidade de diferenciação mais restrita, podendo desenvolver, em sua maioria, apenas células da mesma linhagem celular (LI e DING, 2009; BRIGNIER e GEWIRTZ, 2010). Quanto à origem, as células-tronco podem ser divididas em dois grandes grupos: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas.

1.2.1 Células-tronco embrionárias

As ESCs (do inglês *embryonic stem cells*) foram primeiramente isoladas, em 1981, da massa celular interna do blastocisto de camundongos após 3,5 dias do coito (EVANS e KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Mais de uma década depois, Thomson e colaboradores

(1998) relataram o isolamento de células-tronco embrionárias humanas (hESCs, do inglês *human embryonic stem cells*) de blastocistos e a criação da primeira linhagem de hESCs para pesquisa (THOMSON *et al.*, 1998).

As ESCs são caracterizadas pela auto-renovação, imortalidade e pluripotência, sendo, então, capazes de diferenciar-se em células presentes nas três camadas germinativas embrionárias (BRIGNIER e GEWIRTZ, 2010). Normalmente, a diferenciação dessas células *in vitro* necessita do crescimento das mesmas em suspensão para a formação de agregados, conhecidos como corpos embrionários (do inglês *embryonic bodies*, EBs) que, posteriormente, diferenciam-se em diversos tipos celulares, por indução ou espontaneamente (LI e DING, 2009).

Pela sua grande capacidade de diferenciação as hESCs têm despertado grande interesse entre os cientistas que desejam estudar o potencial terapêutico dessas células em diversas doenças. Porém, o uso dessas células tem levantado discussões nos campos éticos e religiosos (LEIST *et al.*, 2008), uma vez que são obtidas de embriões gerados por fertilização *in vitro* que seriam descartados (BRIGNIER e GEWIRTZ, 2010). Dessa forma, opiniões contrárias sobre o uso das hESCs em pesquisa dificultam a realização de estudos nessa área. Em alguns países foram criadas linhagens de hESC para pesquisa, propiciando o estudo dessas células.

1.2.2 Células-tronco adultas

As células-tronco adultas são células multipotentes, conhecidas também como células-tronco somáticas ou células-tronco não-embrionárias. Essas células são responsáveis pela manutenção da homeostase de determinados tecidos, através da reposição de células, mesmo na ausência de lesão (BRIGNIER e GEWIRTZ, 2010). Dessa forma, essas células podem ser encontradas em diversos tecidos, tais como cérebro, medula óssea, fígado, pele, entre outros. Anteriormente, acreditava-se que essas células-tronco diferenciavam-se apenas em células do tecido que residiam, porém novas evidências vêm modificando esse pensamento (KORBLING *et al.*, 2003). As principais fontes de células-tronco adultas estão descritas a seguir.

1.2.2.1 Células de cordão umbilical

Dentre as células existentes no sangue de cordão umbilical estão: as células-tronco hematopoiéticas (HSCs, do inglês *hematopoietic stem cells*) (BROXMEYER *et al.*, 1989), células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês *mesenchymal stem cells*), (ERICES *et al.*, 2000), células-tronco somáticas irrestritas (USSC, do inglês *Unrestricted somatic stem cells*) (KOGLER *et al.*, 2005), entre outras. Kogler e colaboradores (2006) demonstraram que as USSC possuem características pluripotentes e *in vitro* podem diferenciar-se em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e células neurais. As células-tronco do sangue de cordão umbilical humano (hUCB, do inglês *human umbilical cord blood*) oferecem uma série de vantagens em relação às outras fontes de células-tronco adultas: maior tolerância a incompatibilidade de HLA (do inglês *human leukocyte antigen*) (WELTE *et al.*, 2010); maior disponibilidade devido aos bancos de criopreservação; menor incidência de doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD, do inglês *graft-versus-host disease*); menor risco de transmissão de infecções por vírus latentes, entre outras (Revisado por ROCHA e GLUCKMAN, 2006).

Em 1989, foi descrito o primeiro transplante de sucesso com hUCB criopreservado de doador relacionado em uma criança com anemia de Fanconi (GLUCKMAN *et al.*, 1989). Anos depois, Rubinstein e colegas (1994) realizaram o primeiro transplante de hUCB de doadores não-relacionados em duas crianças com leucemia (RUBINSTEIN *et al.*, 1994). Atualmente, estuda-se o uso de células do UCB (do inglês *umbilical cord blood*) em outras doenças que não as relacionados ao sistema hematopoiético, como erros inatos do metabolismo, doenças cardiovasculares e neurológicas (BUCHHEISER *et al.*, 2009; ZHONG *et al.*, 2010).

Estudos *in vivo* (KOGLER *et al.*, 2004) e *in vitro* (NISHIYAMA *et al.*, 2007) demonstraram que as células do UCB podem diferenciar-se em cardiomiócitos. Além disso, Kim e colaboradores (2005) demonstraram que células de cordão transplantadas em um modelo animal de infarto do miocárdio adotam fenótipo de célula cardíaca. Já em estudos de aplicação neurológica, Jang e colegas (2004) demonstraram que HSCs de UCB podem diferenciar-se, frente exposição a ácido retinóico, em neurônios e células gliais, que expressam marcadores como NeuN (do inglês *neuronal nuclei*) e GFAP (do inglês *glial fibrillary acidic protein*). Além disso, as células não-hematopoiéticas de cordão também apresentam capacidade de diferenciar-se em astrócitos e oligodendrócitos em cultura (BUZANSKA *et al.*, 2006). Estudos demonstram, ainda, que o transplante de células de UCB

promove melhora comportamental em modelos animais de isquemia, esclerose lateral amiotrófica, DP, paralisia cerebral e lesão de medula espinhal (Revisado por HARRIS e ROGERS, 2007).

1.2.2.2 Células-tronco neurais

A geração de novos neurônios no cérebro adulto foi descrito pela primeira vez por Altam e colaboradores (1965) no giro denteado do hipocampo de ratos. Atualmente, sabe-se que em condições normais, a neurogênese ocorre em duas regiões do cérebro de mamíferos: na zona subventricular (SVZ, do inglês *subventricular zone*) do ventrículo lateral e na zona subgranular (SGZ, do inglês *subgranular zone*) do giro denteado do hipocampo (IMAYOSHI *et al.*, 2009). As células-tronco neurais (NSCs, do inglês *neural stem cells*) da SVZ, *in vivo*, dividem-se lentamente e possuem características de astrócitos da glia radial, incluindo a expressão de GFAP (MA *et al.*, 2009).

As NSCs são auto-renováveis e multipotentes e, dessa forma, despertam interesse sobre seu potencial terapêutico, especialmente em doenças neurodegenerativas (MA *et al.*, 2009). Kelly e colaboradores (2004) demonstraram que as NSCs fetais humanas sobrevivem, migram em direção a região lesada e expressam o marcador de neuroblasto, doblecortina, quando transplantadas em ratos com isquemia cortical. Além disso, foi demonstrado que as NSCs de ratos adultos têm a capacidade de reparar neurônios dopaminérgicos do hospedeiro, após transplante em camundongos parkinsonianos, além de diferenciar-se em neurônios TH⁺ (tirosina hidroxilase), contribuindo para a reconstrução nigroestriatal (OUREDNIK *et al.*, 2002). Outros estudos utilizando modelos animais de trauma raquimedular e hipóxia-isquemia também sugerem recuperação parcial do tecido lesado, após transplante de NSCs associadas à *scaffolds* (PARK *et al.*, 2002; TENG *et al.*, 2002).

Os dados disponíveis na literatura sugerem que o transplante de NSCs facilite a auto-reparação do tecido encefálico do hospedeiro, ao invés de contribuir para a reposição celular através de transdiferenciação das células transplantadas (EINSTEIN e BEN-HUR, 2008). Apesar dos resultados otimistas das pesquisas experimentais, a obtenção dessas células em humanos dificulta a aplicação clínica desse tipo de terapia.

1.2.2.3 Células-tronco de medula óssea

As células-tronco de medula óssea (CTMO) são classificadas em dois grandes grupos: HSCs e MSCs. As HSCs caracterizam-se pela expressão de marcadores de superfície, o que permite seu isolamento. O fenótipo presente em células humanas incluem CD34⁺, CD38⁻, CD133⁺, entre outros (BRIGNIER e GEWIRTZ, 2010). Essas células, originalmente, são capazes de diferenciar-se na linhagem linfóide, que dá origem aos linfócitos B e T, e na linhagem mielóide, que origina basófilos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, plaquetas e eritrócitos (FUCHS e SEGRE, 2000). Porém, estudos sugerem que as HSCs são capazes de se diferenciar em linhagens não-hematopoiéticas (BRIGNIER e GEWIRTZ, 2010).

Krause e colaboradores (2001) demonstraram que o transplante de HSC promove, além da restauração do tecido hematopoiético, a geração de células epiteliais no fígado, pulmões, trato gastrointestinal e pele (KRAUSE *et al.*, 2001). Além disso, estudos demonstram que as células da medula óssea podem diferenciar-se em células neurais *in vivo* e *in vitro* (BRAZELTON *et al.*, 2000; TERADA *et al.*, 2002; COGLE *et al.*, 2004). Pesquisadores da Universidade de Stanford (EUA) encontraram células pertencentes ao animal doador no encéfalo de camundongos, que receberam células derivadas da MO, através da veia da cauda. Essas células expressavam marcadores neurais, como NeuN e NF-H, e não mais possuíam os marcadores de superfície, CD45 e CD11b, presentes em células sanguíneas (BRAZELTON *et al.*, 2000). Além disso, um estudo *post-mortem* com pacientes que receberam transplante de medula óssea por via sistêmica demonstrou a presença de células do enxerto expressando marcadores neurais e gliais no tecido encefálico desses pacientes (COGLE *et al.*, 2004). Terada *et al* (2002) sugeriu, ainda, que as CMMO são capazes de assumir genótipo de pluripotência e diferenciar-se em neurônios, e outros tipos celulares, quando colocadas em cultura juntamente com células-tronco embrionárias.

As MSCs expressam, em geral, os marcadores de superfície CD29, CD44, CD49a-f, CD51, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD166 (PHINNEY e PROCKOP, 2007). Porém, para ser considerada MSCs a célula precisa ser aderente e diferenciar-se em osteoblasto, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2006). As MSCs, 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 e GEWIRTZ, 2010).

Atualmente, estuda-se a possibilidade dessas células se diferenciarem em outros tipos celulares, que não os pertencentes à linhagem mesoderma. Kopen e colaboradores (1999) foram os primeiros a demonstrar que MSCs injetadas do sistema nervoso central (SNC) de camundongos neonatos podem adotar características fenotípicas e morfológicas de astrócitos e neurônios. Além disso, foi demonstrado *in vitro* que MSCs humanas e de ratos podem diferenciar-se em neurônios (WOODBURY *et al.*, 2000). Bahat-Stroomza e colaboradores (2009) demonstraram, ainda, que as MSCs, em cultura, podem diferenciar-se em astrócitos que, quando transplantados no estriado de animais com DP, promovem recuperação da função motora (BAHAT-STROOMZA *et al.*, 2009).

Além disso, o potencial terapêutico da fração mononuclear da medula óssea (MO) também tem sido estudado (COSTA-FERRO *et al.*, 2012). Essa fração é formada por progenitores hematopoiéticos e endoteliais (WEISSMAN *et al.*, 2001), além de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, presentes nas concentrações de 1% e 1:10.000 a 1:100.000, respectivamente (JONES e MCGONAGLE, 2008) (ORKIN, 2000; WEISSMAN *et al.*, 2001). As CMMO são pouco estudadas na doença de Parkinson. Capitelli e colaboradores (2014) demonstraram que o transplante intravenoso de CMMO não melhora, nem previne, a lesão causada pela administração de MPTP em ratos. O presente estudo foi o primeiro a investigar o potencial terapêutico das CMMO no modelo da 6-OHDA da doença de Parkinson.

1.3 DOENÇA DE PARKINSON E CÉLULAS-TRONCO

Em decorrência das limitações dos tratamentos disponíveis até o momento para a DP, novas opções terapêuticas estão sendo estudadas. Primeiramente, estudo com animais demonstraram que células-tronco fetais poderiam restaurar a via nigroestriatal lesada por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Em 1979, Bjorklund e Steveni mostraram que o transplante de mesencéfalo ventral fetal no neocórtex ou ventrículo de ratos lesionados com 6-OHDA promove crescimento neuronal e integração funcional, avaliados pela redução da rotação induzida por drogas (BJORKLUND e STENEVI, 1979). Em 1980, a técnica de neurotransplante experimental foi padronizada, estabelecendo protocolos para coleta e separação das células do mesencéfalo (BJORKLUND *et al.*, 1980). Alguns anos depois, Madrazo e colaboradores (1988) realizaram o primeiro transplante com células fetais humanas em pacientes com DP (MADRAZO *et al.*, 1988). Os pacientes que receberam transplante de mesencéfalo ventral fetal no núcleo caudado apresentaram melhora significativa dos sintomas

de bradicinesia, rigidez, instabilidade postural, expressão facial e distúrbio da marcha. Já os pacientes que foram transplantados com tecido adrenal fetal na mesma região tiveram melhora apenas da rigidez e bradicinesia (MADRAZO *et al.*, 1988; MADRAZO *et al.*, 1990).

A partir destes estudos realizados no México, inúmeras pesquisas começaram a ser realizadas, ao redor do mundo, sobre o potencial terapêutico das células fetais. Estudos realizados com pacientes parkinsonianos que receberam neurônios dopaminérgicos mesencefálicos fetais no estriado demonstraram que o transplante foi capaz de diminuir a flutuação motora e os sintomas de rigidez e bradicinesia, bem como restaurar a síntese e a liberação de dopamina no estriado (LINDVALL *et al.*, 1990; SPENCER *et al.*, 1992; PICCINI *et al.*, 1999). Além disso, observou-se a diminuição da dose de levodopa necessária para controlar os sintomas motores em comparação ao grupo controle (FREED *et al.*, 1992; SPENCER *et al.*, 1992). Demonstrou-se, também, melhora desses pacientes nas escalas de avaliação da função motora, UPDRS, Hoehn-Yahr e *Activities of Daily Living Scale* e diminuição da duração e severidade de períodos “off” e dos episódios de discinesia (FREED *et al.*, 1992; HAUSER *et al.*, 1999). Freed e colaboradores (2001) demonstraram ainda, em um estudo duplo-cego controlado, que o transplante de tecido mesencefálico fetal no estriado de pacientes com DP na fase avançada melhorou o score na UPDRS em pacientes com 60 anos ou menos, mas não foi efetivo em pacientes mais velhos, indicando influência da idade e da fase da doença na terapia celular .

Embora os estudos com células fetais tenham fornecido resultados otimistas para o tratamento da doença de Parkinson, a aplicação dessa terapia na prática clínica não ocorreu. Além das inúmeras questões éticas levantadas pelo uso terapêutico das células fetais, eram necessários vários fetos humanos para que se conseguisse um volume celular adequado para o transplante (4 – 8 fetos por paciente) (LINDVALL *et al.*, 1990; HAGELL *et al.*, 1999; HAUSER *et al.*, 1999; PICCINI *et al.*, 1999) o que acabou inviabilizando esse tipo de terapia. Dessa forma, outras fontes de células-tronco passaram a ser estudadas em modelos experimentais da DP.

Em função de sua pluripotência, as células-tronco embrionárias passaram a ser estudadas por diversos grupos. Barberi e colaboradores (2003) cultivaram e diferenciaram ESCs de camundongos em neurônios dopaminérgicos que apresentavam, além dos marcadores característicos, como TH, atividade eletrofisiológica e formação de sinapses *in vitro* . Eles demonstraram também, que o transplante dessas células diferenciadas no estriado de camundongos parkinsonianos promove importante diminuição da assimetria rotacional

induzida por apomorfina e anfetamina. Resultados semelhantes foram encontrados por Kim e colegas (2002), que observaram que neurônios TH⁺ derivados de ESCs de camundongos apresentam atividade eletrofisiológica *in vitro* e *in vivo*, após transplante em ratos lesionados com 6-OHDA. Além disso, a análise histológica demonstrou que não houve formação de teratomas no tecido transplantado. Os animais transplantados apresentaram também diminuição da rotação induzida pelas drogas, bem como melhora no desempenho nos testes do cilindro, *adjusting step* e *paw-reaching*.

Apesar dos resultados serem favoráveis ao uso de ESCs para tratamento da DP, a obtenção dessas células para uso terapêutico ainda gera diversos questionamentos éticos e religiosos. Dessa forma, o potencial terapêutico de células-tronco adultas também está sendo investigado. Dados da literatura indicam que, o transplante intraestriatal de neuroesferas derivadas de camundongos melhora o comportamento rotacional de roedores parkinsonianos. Estudos sugerem, também, que essas células sobrevivem e integram o estriado do hospedeiro, além de expressarem marcadores de neurônios dopaminérgicos, como TH (MEISSNER *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2007).

Dentre as células adultas, as MSCs derivadas da MO também vêm sendo pesquisadas. Hellmann *et al.* (2006) descreveram pela primeira vez que MSCs transplantadas no estriado de camundongos com DP sobrevivem e migram para a região lesada no lado contralateral ao transplante. Além disso, dados da literatura demonstram que o transplante de MSCs humanas no estriado de ratos parkinsonianos não é capaz de restaurar a função motora desses animais. No entanto, quando essas células foram transplantadas em combinação com microesferas liberadoras de neurotrofina-3, que estimula neurodiferenciação, ocorreu uma diminuição acentuada do comportamento rotacional dos animais, além de um aumento de fibras e neurônios dopaminérgicos no estriado e SN (DELCROIX *et al.*, 2011). Pesquisadores demonstraram também que o transplante de MSCs expressando TH e GDNF no estriado de ratos com DP promoveu melhora significativa da função motora desses animais (SHI *et al.*, 2011). Danielyan e colaboradores (2011) observaram ainda que o transplante intranasal de MSCs é capaz de aumentar os níveis de TH no estriado e na SN de ratos parkinsonianos, além de melhorar a função motora desses animais.

Outra fonte de células-tronco adultas é o cordão umbilical humano. Estudos demonstram que essas células podem ser diferenciadas em neurônios dopaminérgicos *in vitro* que quando transplantados, em associação ao NGF (do inglês, *nerve growth factor*) ou

isoladamente, em ratos lesionados com 6-OHDA, induzem melhora da rotação lateral induzida por apomorfina e anfetamina (FU *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2010).

Diversas outras fontes de células-tronco estão sendo pesquisadas, como por exemplo, células-tronco da polpa dentária (NESTI *et al.*, 2010) e células-tronco de pluripotência induzida (iPSC, do inglês *induced pluripotent stem cells*) derivadas, geralmente, de fibroblastos reprogramados (WERNIG *et al.*, 2008; CAI *et al.*, 2010; HARGUS *et al.*, 2010). Deleidi e colaboradores (2011) demonstraram que o transplante de iPSC no estriado de ratos parkinsonianos promove melhora da função motora desses animais. Da mesma forma essa melhora funcional foi demonstrada por Rhee *et al.* (2011), que em contra partida demonstraram também que o transplante de grandes volumes celulares podem promover formação de tumores. Outras células que estão sendo estudadas são as MSCs derivadas do tecido endometrial. O transplante de MSCs endometriais no estriado de camundongos parkinsonianos promoveu melhora dos níveis de dopamina no estriado (WOLFF *et al.*, 2011).

Apesar dos resultados otimistas disponíveis na literatura, o potencial terapêutico das células adultas ainda é pouco estudado (DE PAULA *et al.*, 2005; CARRION *et al.*, 2009). Dentre essas células, as células mononucleares de medula óssea (CMMO) oferecem grandes vantagens devido à fácil obtenção e por não necessitarem de cultura. Logo, faz-se necessária uma maior investigação dos efeitos do transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO) no tratamento da DP.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico das células mononucleares da medula óssea em modelo lesional da doença de Parkinson.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o efeito do transplante intravenoso de CMMO sobre a função motora dos animais parkinsonianos;
2. Verificar a sobrevivência e migração das CMMO transplantadas em camundongos parkinsonianos por via intravenosa até a região encefálica lesada;
3. Avaliar a função motora de animais parkinsonianos transplantados com CMMO intracerebral;
4. Determinar o efeito do transplante duplo intracerebral de CMMO na manutenção da função motora em camundongos parkinsonianos e,
5. Analisar a sobrevivência das CMMO após transplante intracerebral em modelo lesional da doença de Parkinson;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 60 camundongos C57BL/6 (60 dias) que sofreram lesão do feixe prosencefálico medial (MFB) pela 6 – hidroxidopamina através de cirurgia estereotáxica. Além disso, seis camundongos C57BL/6 (60 dias) sadios foram utilizados como grupo controle.

Todos os animais tiveram livre acesso à comida e à água. A temperatura ambiente do biotério foi mantida em torno de 22°C e o ciclo claro/escuro foi de 12 horas. Todos os procedimentos a seguir obedeceram às normas de conduta ética para experimentação animal.

Os animais foram divididos em três grupos e subdivididos de acordo com cada experimento (Quadro 1): Experimento (1) – Animais transplantados com CMMO por via intravenosa (i.v.; Grupo CMMO-IV) e animais transplantados com salina IV (Grupo Salina-IV); Experimento (2) – Animais transplantados com CMMO intracerebral (IC; Grupo CMMO-IC) e animais transplantados com salina IC (Grupo Salina-IC) e Experimento (3) – Animais submetidos a transplante duplo de CMMO IC (Grupo CMMO + CMMO) e animais transplantados com salina + salina IC (Grupo Salina + Salina).

Quadro 1- Divisão dos grupos de acordo com cada experimento.

| EXPERIMENTO 1 | |
|-----------------------|---|
| CMMO-IV | Transplante intravenoso de CMMO |
| Salina-IV | Transplante intravenoso de salina |
| EXPERIMENTO 2 | |
| CMMO-IC | Transplante intracerebral de CMMO |
| Salina-IC | Transplante intracerebral de salina |
| EXPERIMENTO 3 | |
| CMMO + CMMO | Transplante intracerebral duplo de CMMO |
| Salina+ Salina | Transplante intracerebral duplo de salina |

3.1.1 Lesão com 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

Para produzir a lesão unilateral do feixe prosencefálico medial, cada camundongo foi anestesiado com uma combinação de Xilazina (Syntec, Brasil; 16mg/kg), e cetamina (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Brasil; 80mg/kg) intraperitoneal (i.p.). Após a fixação dos animais no aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, EUA), foi feita uma incisão mediana no escalpo e a fáscia que cobre o crânio foi afastada, expondo as suturas cranianas. Após limpeza com água oxigenada e a identificação do bregma, infundiu-se unilateralmente no núcleo prosencefálico medial direito 1 μ L de 6-OHDA (Sigma-Aldrich, EUA; 3 μ g/ μ L). As coordenadas utilizadas, em relação ao bregma foram: ântero-posterior (AP) -1,2mm, médio-lateral (ML) -1,1 mm e dorsoventral (DV) -4,80 mm, de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001). Para a infusão, utilizou-se uma microseringa Hamilton de 10 μ L acoplada por um tubo de polietileno a uma agulha de infusão (25G) fixada ao estereotáxico. A agulha foi posicionada no ponto de cada infusão, e no local foi feita uma pequena trepanação utilizando-se uma broca odontológica. A agulha foi baixada até o ponto alvo e a 6-OHDA infundida a uma velocidade constante de 0,5 μ L/min com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil). Após o término de cada infusão, a agulha foi mantida no local por 5 minutos, a fim de evitar refluxo da droga e permitir sua total dispersão pela área. Após, a ferida operatória foi limpa e suturada com fio de seda 4.0 (Figura 1).



Figura 1- Indução do modelo de DP. A) Feixe Prosencefálico Medial - local da injeção de 6-OHDA (Paxinos, 2003). B) Cirurgia de estereotaxia para lesão do MFB com 6-OHDA. C) Microseringa Hamilton, acoplada a tubo de polietileno, utilizada para infusão.

3.1.2 Aspectos éticos

Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS, conforme registros CEUA 09/00121 e CEUA 12/00280 (ANEXO A), 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.

3.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA

Para a obtenção das células mononucleares de MO foram utilizados camundongos transgênicos da linhagem C57BL/6-EGFP. Esses animais expressam uma proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*) e todos os tecidos e as células desses animais são verdes sob excitação da luz, exceto eritrócitos e pelos (OKABE *et al.*, 1997). Essa característica permite o rastreamento dessas células após o transplante, tanto por imunofluorescência, como pela identificação do gene que codifica essa proteína, através de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). Os animais foram anestesiados, com cetamina e xilazina, e dissecados para o isolamento dos ossos longos (úmero, fêmur e tíbia). As epífises foram cortadas, permitindo a lavagem das cavidades ósseas e a obtenção do aspirado de MO. Esse material foi processado entre etapas de suspensão, centrifugação e lavagem. A camada de células mononucleares foi separada por gradiente de ficoll-paque 1.083 g/mL (Sigma Aldrich, EUA) e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Por fim, separaram-se alíquotas de 200 μ L contendo 10^7 CMMO-EGFP, para o transplante intravenoso e 1 μ L contendo 10^5 células para o transplante intracerebral (Figura 2). As concentrações celulares para o transplante foram determinadas em estudos prévios do grupo (DE PAULA *et al.*, 2012).

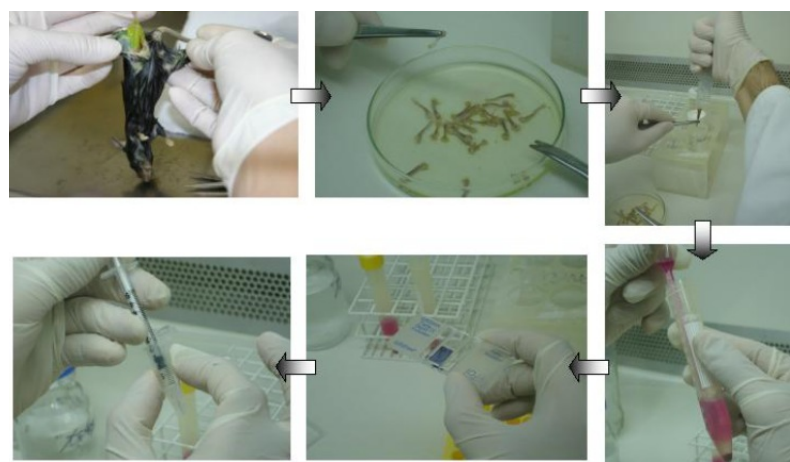


Figura 2 - Obtenção de CMMO de camundongos C57Bl/6-EGFP. Animais são anestesiados e dissecados, isolam-se os ossos longos, e procede-se a lavagem das cavidades ósseas. O material coletado é processado em centrifugações e ressuspensões. Por fim, a camada de células mononucleares é obtida por gradiente de ficoll, e as células são contadas em câmara de Neubauer e aliqüotadas.

3.2.1 Citometria de fluxo e fenotipagem

Uma das alíquotas foi avaliada com os seguintes anticorpos: CD8a, CD19, CD34, CD45, CD117, Sca-1, diluídos na concentração de um 1:10 em PBS. Após incubação a 5° C no escuro por pelo menos 15 minutos, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com 1 ml de paraformaldeído 4% (em PBS), para análise. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, EUA). Os dados obtidos correspondem a pelo menos 50.000 eventos.

3.3 TRANSPLANTE

3.3.1 Transplante intravenoso

Os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina para facilitar a infusão das células. A cauda dos camundongos era fixada na mesa com micropore e limpa com solução de álcool 70%. Após visualização macroscópica de uma das veias da cauda, foi injetado um volume de 200µ/ L contendo 10⁷ CMMO-EGFP ou solução salina (200µL), com uma seringa

(BD Ultra-Fine 0,5 mL). Logo após o transplante, os animais eram devolvidos para sua gaiolas e mantidos em observação até o término da sedação (Figura 3).

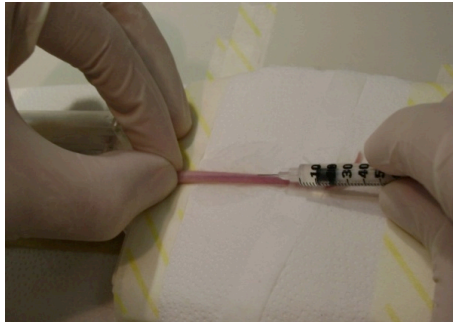


Figura 3 - Infusão das células mononucleares de medula óssea através da veia da cauda.

3.3.2 Transplante intracerebral

Um novo grupo de animais foi anestesiado com Xilazina (16mg/kg) e cetamina (80mg/kg) intraperitoneal (IP), fixado no aparelho estereotáxico e, então, um microlitro de CMMO ou salina foi infundido unilateralmente no estriado direito usando as seguintes coordenadas em relação ao bregma: ântero-posterior (AP) -0,1 mm, médio-lateral (ML) -2,4 mm e dorsoventral (DV) -3,6 mm (PAXINOS e FRANLKLING, 2003). Para a infusão das células no estriado foi utilizada uma bomba de infusão na velocidade constante de 0,5 μ L/min, assim como na injeção de 6-OHDA.

3.4 TESTES DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

3.4.1 Teste de desempenho no Rotarod em aceleração

Foi utilizado um aparelho de Rotarod 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 que é mantido em rotação. A caixa é dividida em 4 baias, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente (Figura 4). Para o teste, cada animal foi colocado sobre o cilindro já em movimento, e media-se o tempo que o mesmo conseguia se equilibrar até cair (latência de queda), sendo que quanto maior a latência de queda, melhor a função motora do animal. Na queda, o cronômetro que verificava o tempo de equilíbrio era automaticamente parado, já que o equipamento possui um sistema instalado no chão de cada baia que detecta o impacto da queda. A velocidade de rotação do cilindro era ajustada conforme cada protocolo empregado:

3.4.1.1 Protocolo com velocidade constante (habituação)

Os animais foram colocados sobre o cilindro mantido a uma velocidade constante de 16 RPM pelo tempo máximo de 7 minutos. Este protocolo foi realizado para habituação dos animais ao equipamento, um dia antes do teste com o protocolo acelerado.

3.4.1.2 Protocolo Acelerado

No dia seguinte à habituação, os animais foram submetidos ao protocolo acelerado em que a velocidade do cilindro aumentava gradativamente, variando de 16 a 37 RPM. O aparelho possui um indicador luminoso que mostra a evolução das fases (velocidade) e a transição entre todas levava 6 minutos. O tempo máximo de permanência do animal no cilindro era de 7 minutos por ensaio. Cada sessão de teste consistia em 3 ensaios, separados por intervalos de cerca de 10 minutos entre eles. Em cada sessão, calculou-se a média da latência de queda nos 3 ensaios. Sempre que o animal agarrava-se ao cilindro sem caminhar por duas voltas completas consecutivas, era considerada queda do animal.

O protocolo acelerado foi realizado após a lesão com a 6-OHDA (pré-transplante) e 10 e 30 dias após o(s) transplante (s), sendo que a habituação ao aparelho foi realizada apenas na primeira vez em que o animal foi submetido teste.



Figura 4 - Teste de Rotarod. Animais são colocados no cilindro em movimento e a latência de queda do animal é avaliada.

3.4.2 Teste de rotação induzida por apomorfina

Duas semanas após a lesão unilateral com 6-OHDA, os camundongos foram avaliados no teste de rotação induzida por apomorfina (Sigma-Aldrich, EUA). A droga foi diluída no dia do experimento em água destilada para injeção (1mg/ml) e protegida da luz durante os testes. Os animais receberam uma injeção i.p. da droga e, após dez minutos de habituação, o número de rotações contralaterais à lesão passou a ser avaliado, durante 30 minutos. Devido a alta variabilidade da lesão induzida por esse modelo (IANCU *et al.*, 2005), apenas os animais que rotaram entre 50-500 vezes/30 min foram incluídos no estudo. O teste de rotação induzida por apomorfina foi realizado novamente 10 e 30 dias após o(s) transplante(s) para comparação da função motora dos animais entre os grupos, ao longo do tempo (ZHANG, X. *et al.*, 2008; NILSSON *et al.*, 2009)

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para identificar se as células transplantadas migram em direção a região lesada e sobrevivem após o transplante intravenoso, foi realizada a infusão de CMMO-EGFP, através da veia da cauda, e os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, em diferentes tempos pós-transplante, de acordo com cada experimento. Esses animais tiveram seus encéfalos dissecados e coletados para posterior análise pela técnica de PCR. A presença do gene da GFP serve de indicativo de que as células encontradas no tecido são derivadas da medula óssea do animal doador.

Após a extração de DNA (do inglês deoxyribonucleic acid) dos encéfalos, a amplificação foi realizada em termociclador (PTC-200/MJ Research) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direto 5'-TTGAATCGCCACCATGGTGAGC-3' e reverso 5'- TTGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTC-3' complementares à sequência de DNA correspondente a uma sequência específica do gene que codifica a proteína GFP, gerando um produto de PCR de 1000 pb, e uma nova amplificação utilizando o *primer* direto 5'-GGGCACAAGCTGGAGTACA-3' e reverso 5'-ATGTTGTGGCGGATCTTGA-3' gerando um produto de PCR de 100 pb, caracterizando a técnica de *Nested-PCR*.

Para controlar o funcionamento da reação, foram ensaiados, juntamente com cada bateria de DNA de amostras de animais transplantados, um controle positivo de reação que consistirá de DNA extraído de camundongo C57BL/6-EGFP, e um controle negativo de

reação, com omissão de qualquer DNA, além de amostras de animais que não receberam CMMO.

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 de células EGFP quando visualizada a banda correspondente.

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF)

A migração e sobrevivência das CMMO foi confirmada através do método de imunofluorescência direta, 24h e 7 dias após o transplante intravenoso, além de 10 e 30 dias após o transplante intracerebral. Os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (240mg/kg i.p.) (IANCU *et al.*, 2005; GREALISH *et al.*, 2010) e perfundidos transcardiacamente com solução salina seguido de paraformaldeído 4% (PFA) em 0,1M de tampão fosfato (PBS, pH 7,4). Os cérebros foram removidos do crânio, pós-fixados, criopreservados em sacarose (30%) e congelados em nitrogênio líquido (-196°C). Secções coronais (8 µm) foram obtidas usando um criostato (Leica Biosystems) a -20°C. A ligação de proteínas não-específicas foi bloqueada com 0,3% de albumina por 30 minutos. Para a detecção das células EGFP, as secções foram incubadas a 4°C com anticorpo anti-GFP conjugado com Alexa Fluor 488[®] produzido em coelho (Life Technologies, EUA; diluição 1:400) na ausência da luz por 24h. As secções foram então, lavadas com PBS 0,1 M e montadas com lamínulas de vidro usando meio de montagem ProLong[®] Gold com DAPI (Life Technologies, EUA) para visualizar o núcleo das células. A reatividade do anticorpo foi confirmada em secções de controle positivo e negativo.

Da mesma forma, para confirmar a eficácia da injeção de 6-OHDA na indução da doença de Parkinson em camundongos uma imunofluorescência indireta para tirosina hidroxilase (TH) foi realizada. Brevemente, um animal parkinsoniano (não tratado) foi anestesiados e perfundido transcardiacamente, como descrito acima. Após, seu encéfalo foi dissecado e congelado em nitrogênio líquido e, secções coronais (20 µm) foram obtidas usando um criostato (Leica Biosystems) a -20°C. Após o bloqueio de proteínas inespecíficas, as secções foram incubadas com o anticorpo anti-TH produzido em coelho (Millipore, EUA; diluição 1:500), *overnight* a 4°C. Em seguida, as secções foram lavadas em PBS e incubadas

com o anticorpo secundário Alexa Fluor[®] 568 anti-coelho produzido em cabra (Life Technologies, EUA; diluição 1:400) por 2h em temperatura ambiente e protegidas da luz. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro usando meio de montagem ProLong[®] Gold com DAPI (Life Technologies, EUA).

A co-localização do DAPI com o marcador específico de GFP/TH foi detectada, analisada e fotografada, qualitativamente, usando um microscópio confocal laser (LSM 5 Exciter, Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera de alta performance Pro-Series CCD e ao software Zen 5.0 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi feita através do programa IBM SPSS Statistics (versão 22.0) e foi utilizado um intervalo de confiança de 95% e significância $\alpha = 0,05$. Os dados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão da média. Foi utilizado o teste de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) com ajuste de *post hoc* de Sidak para comparação dos grupos nos diferentes tempos analisados.

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.8.1 Experimento 1

A barreira hematoencefálica (BBB, do inglês *Blood Brain Barrier*) é formada por células endoteliais responsáveis pelo fornecimento de nutrientes ao encéfalo, bem como pela sua proteção, constituindo um obstáculo para diversas toxinas (WOLBURG e LIPPOLDT, 2002; PERSIDSKY *et al.*, 2006). A mudança na permeabilidade da barreira hematoencefálica pode ser observada em muitas desordem inflamatórias e em doenças neurodegenerativas, como na doença de Parkinson (WOLBURG e LIPPOLDT, 2002). Embora a quebra da BBB em pacientes com doença de Parkinson ainda seja questionável (KORTEKAAS *et al.*, 2005; BARTELS *et al.*, 2008) essa alteração está presente nos modelos animais para a doença, que utilizam as toxinas MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) e 6-OHDA (CARVEY *et al.*, 2005; CHAO *et al.*, 2009). Logo, a via intravenosa parece ser uma opção promissora para entrega de agentes terapêuticos que naturalmente não conseguiriam atravessar a BBB. Além disso, as células-tronco de medula óssea têm demonstrado um elevado potencial terapêutico em diversas doenças, mesmo sem origem hematológica

(BAHAT-STROOMZA *et al.*, 2009; BLANDINI *et al.*, 2010; BRIGNIER e GEWIRTZ, 2010; DELCROIX *et al.*, 2011). Sendo assim, o experimento 1 teve por objetivo avaliar o potencial terapêutico do transplante intravenoso de CMMO em camundongos parkinsonianos.

Para isso 17 camundongos C57BL/6 foram submetidos à lesão com 6-OHDA para indução do modelo animal da doença de Parkinson. Duas semanas após a lesão os animais foram submetidos ao teste de rotação induzida por apomorfina para confirmar o desenvolvimento da DP. Os animais considerados parkinsonianos foram, então, submetidos ao teste de desempenho no Rotarod em aceleração e, em seguida, ao transplante intravenoso de CMMO (Grupo CMMO-IV; n = 10) ou solução salina (Grupo Salina-IV; n = 7) pela veia da cauda. Ambos os grupos foram reavaliados nos testes de rotação induzida por apomorfina e de Rotarod em aceleração, 10 e 30 dias após o transplante.

Um subgrupo (n=8) de animais foi submetido à lesão com 6-OHDA e transplantado com CMMO IV para avaliação da migração e sobrevivência das células transplantadas. Esses animais foram eutanasiados 1h, 24h, 7, 15 e 30 dias após o transplante, por deslocamento cervical, e seus encéfalos dissecados para avaliar a presença do gene que codifica a GFP pela técnica de PCR. Além disso, para confirmação dos resultados do PCR, outro subgrupo (n=2) de camundongos parkinsonianos foram transplantados com CMMO, anestesiados e submetidos a perfusão transcardíaca, 24h e 7 dias pós-transplante. A presença das CMMO-EGFP no encéfalos desses animais foi identificada através da imunofluorescência para GFP. Um esquema do delineamento experimental está ilustrado na Figura 5.

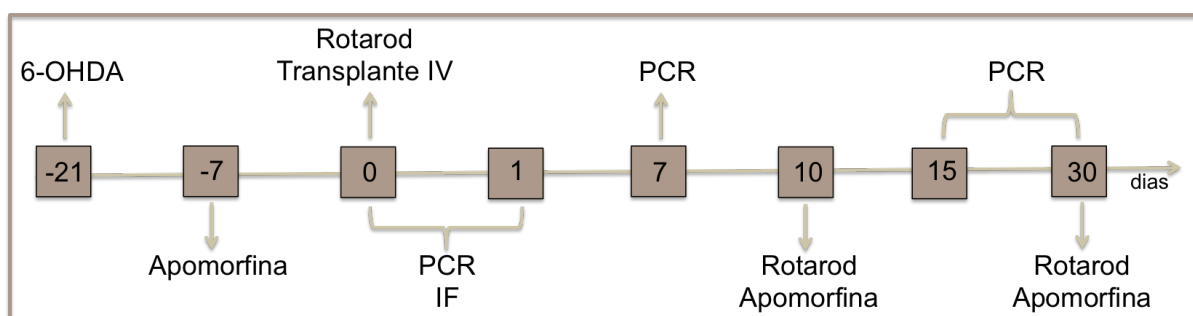


Figura 5 - Delineamento do experimento 1.

3.8.2 Experimento 2

Atualmente, os estudos que visam a terapia celular na doença de Parkinson são focados, principalmente, no uso de hESC ou MSC de diversas fontes. No entanto, essas células exigem expansão e/ou diferenciação em cultura, o que dificulta a sua aplicação clínica. As CMMO por sua vez, são de fácil obtenção e possibilitam o transplante autólogo. Logo, o experimento 2 avaliou a eficácia do transplante intraestriatal das CMMO em animais parkinsonianos.

Camundongos C57BL/6 (n=15) foram submetidos à lesão com 6-OHDA do MFB e, após duas semanas, foi realizado o teste de rotação induzida por Apomorfina. Somente os animais que realizaram entre 50 - 600 rotações durante o período avaliado foram incluídos no estudo. Posteriormente, os animais foram avaliados no teste de desempenho no Rotarod acelerado e, então, receberam transplante intracerebral de CMMO (grupo CMMO-IC; n = 9) ou solução salina (grupo Salina-IC; n = 6). Tanto o teste de rotação induzida por apomorfina quanto o protocolo acelerado do teste de rotarod foram repetidos 10 e 30 dias pós-transplante para monitoramento da função motora desses animais.

30 dias após o transplante, os animais foram anestesiados, perfundidos e seus encéfalos dissecados para posterior avaliação por imunofluorescência para GFP. Além disso, um subgrupo (n=2) foi realizado para avaliar a presença das CMMO-EGFP no encéfalo dos animais, 10 dias após o transplante. Um subgrupo de camundongos parkinsonianos também foi realizado para avaliação da sobrevivência das CMMO-EGFP. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical 10 e 30 dias após o transplante (n=4). Os encéfalos foram dissecados e a presença do gene que codifica a GFP foi avaliada pela técnica de PCR. (Figura 6).

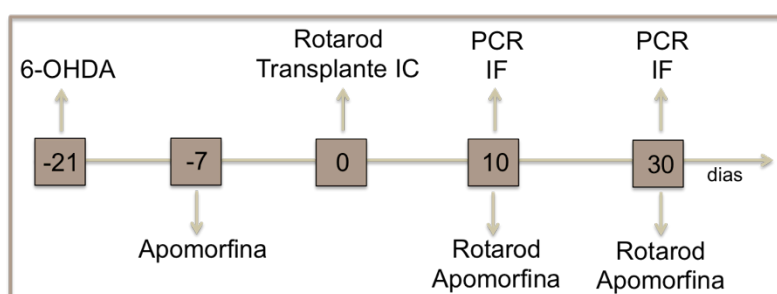


Figura 6 - Delineamento do experimento 2.

3.8.3 Experimento 3

Um dos desafios encontrados na terapia com células-tronco em diversas doenças refere-se a sobrevivência das células transplantadas e manutenção de seu efeito terapêutico. Kefalopoulou e colaboradores (2014) demonstraram que o transplante duplo de neurônios dopaminérgicos derivados de hESC proporciona melhora significativa e contínua da escala motora UPDRS em pacientes com DP. A partir desses resultados, postulou-se a possibilidade de manutenção do efeito das CMMO transplantadas no estriado de camundongos parkinsonianos, através de um segundo transplante.

Da mesma forma que nos experimentos anteriores, o modelo lesional da DP foi induzido em camundongos C57BL/6 e validado, posteriormente, através do teste de rotação induzida por apomorfina. Os animais foram, então, transplantados com CMMO (grupo CMMO + CMMO; n = 7) ou solução salina (grupo Salina + Salina; n = 5) diretamente no estriado direito. O primeiro transplante ocorreu no dia zero e o segundo no dia 20. Os camundongos foram avaliados nos testes comportamentais 10 e 30 dias após o primeiro transplante e 10 dias após o segundo transplante.

Ao final do estudo, alguns animais foram anestesiados e perfundidos transcárdiacamente e seus encéfalos dissecados para avaliação da presença das CMMO-EGFP por imunofluorescência para GFP. Os demais animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus encéfalos coletados para pesquisa do gene que codifica a GFP, por PCR. (Figura 7).

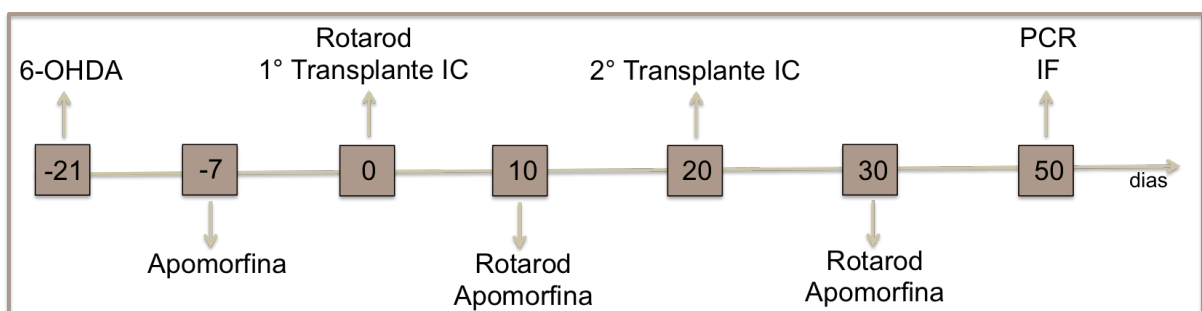


Figura 7 - Delineamento do experimento 3.

4 RESULTADOS

4.1 COMPROVAÇÃO DA EFICÁCIA DA LESÃO UNILATERAL COM 6-OHDA

Para demonstrar a destruição dos neurônios dopaminérgicos da SN, decorrente da lesão do MFB pela 6-OHDA, foi realizada a imunofluorescência para TH. Na figura 8 observa-se depleção dos neurônios dopaminérgicos da SN no hemisfério direito (HD), enquanto que o hemisfério esquerdo (HE) apresenta-se normal, demonstrando a eficácia do modelo de DP. Além disso, podemos observar também que a VTA permanece intacta, em ambos os hemisférios, indicando a precisão da injeção.



Figura 8 – Imunofluorescência para TH. Eficácia da lesão unilateral com 6-OHDA demonstrada pela depleção neurônios dopaminérgicos na SN do hemisfério direito (HD). O hemisfério esquerdo permanece intacto (HE).

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

A fração mononuclear isolada para o transplante apresentou positividade para os marcadores CD8a, CD19, CD34, CD45, CD117 e Sca1 (Figura 9).

4.3 EXPERIMENTO 1

4.3.1 Testes de avaliação da função motora

4.3.1.1 Teste de desempenho do Rotarod em aceleração

Para avaliar a função motora dos animais, utilizamos o teste do Rotarod em aceleração. O teste GEE não revelou interação significativa entre os grupos e os tempos, na

latência de queda ($P = 0,29$; Figura 10) . Também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Salina-IV e CMMO-IV ($P= 0,22$), nem entre os tempos analisados ($P= 0,50$), indicando que as CMMO, quando transplantadas por via intravenosa, não restauram a função motora dos animais parkinsonianos.

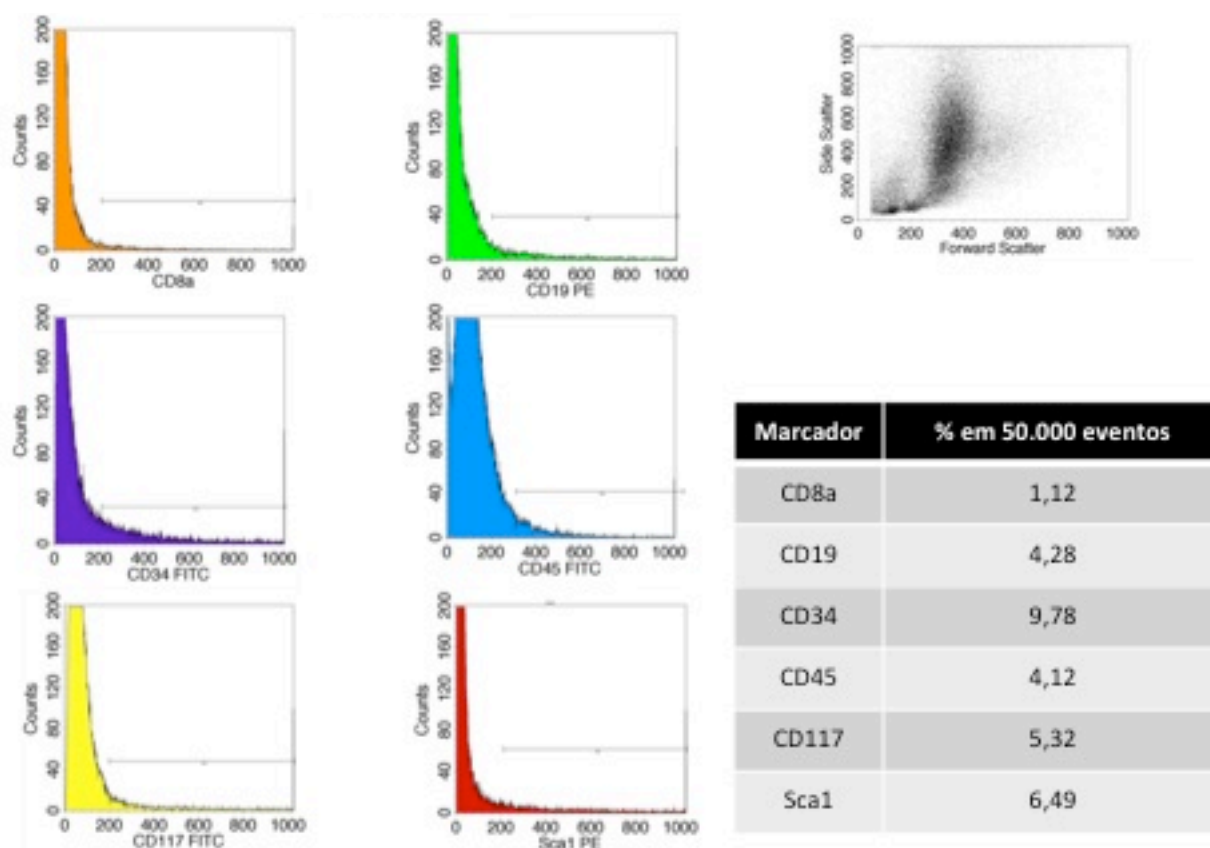


Figura 9 – Citometria de fluxo para imunofenotipagem das CMMO. As células extraídas da medula óssea de camundongos C57BL/6-EGFP apresentaram os seguintes marcadores CD8a, CD19, CD34, CD45, CD117 e Sca1.

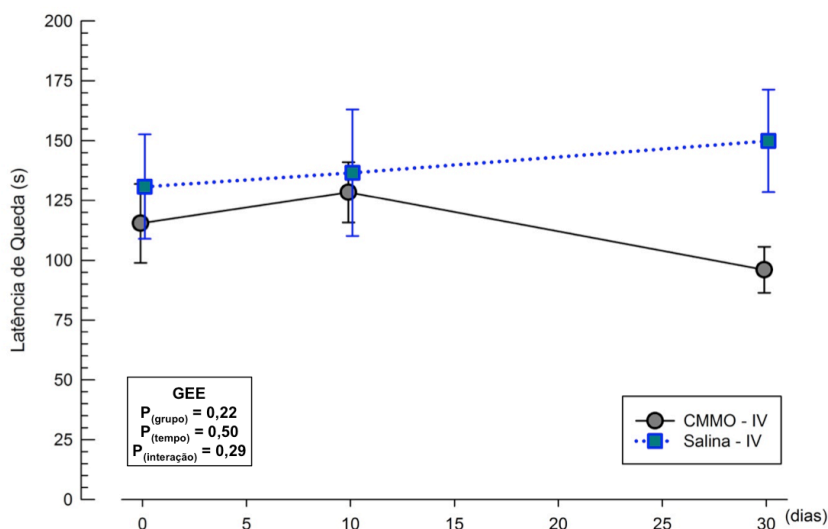


Figura 10 – Comparação do desempenho no teste de Rotarod entre os grupos ao longo do tempo. Latência de queda (segundos) observada no tempo zero (pré-transplante), 10 e 30 dias pós-transplante. Dados expressos em média \pm SEM (GEE). Grupo CMMO – IV (N=10); grupo Salina – IV (N=7).

4.3.1.2 Teste de Rotação Induzida por apomorfina

Outro teste utilizado para comparar a função motora dos animais entre os grupos, foi o teste de rotação induzida por apomorfina. No entanto, não se verificou interação significativa entre os grupos e o tempo ($P = 0,90$ em GEE; Figura 11). Também não foi observada diferença significativa entre os grupos CMMO-IV e Salina-IV ($P = 0,51$), nem no desempenho dos animais nos diferentes tempos analisados ($P = 0,88$).

4.3.2 **Reação em Cadeia da Polimerase**

Para avaliar a migração das CMMO-EGFP, transplantadas através da veia da cauda, para o encéfalo dos camundongos, rastreou-se o gene da GFP através da técnica de PCR. Observou-se, então, a presença desse gene no encéfalo dos animais parkinsonianos 1h (Figura 12A), 24h (Figura 12B) e 7 dias (Figura 12C) após o transplante. A análise feita 15 e 30 dias pós-transplante foi negativa para a presença do gene *EGFP* no encéfalo dos animais (dados não mostrados).

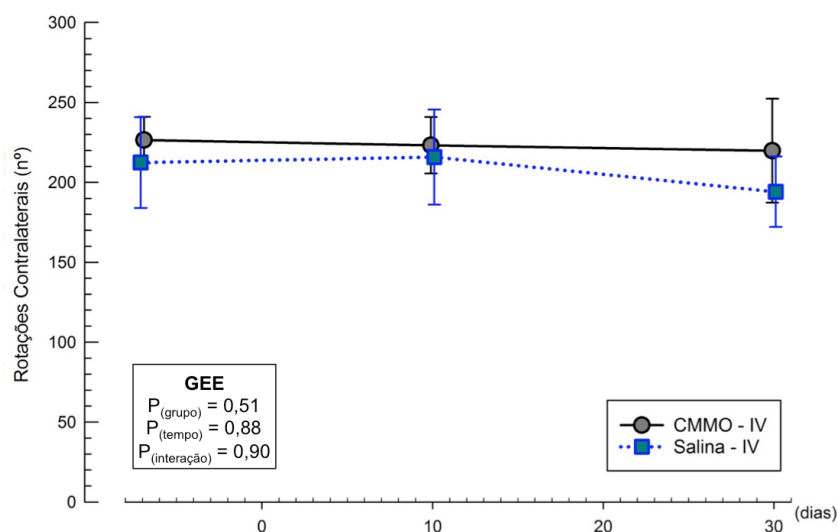


Figura 11 – Comparação do nº de rotações contralaterais no teste da apomorfina entre grupos ao longo do tempo. Número de rotações observado antes do transplante (-7 dias), 10 e 30 dias pós-transplante, sendo que o transplante foi realizado no dia zero. Dados expressos em média \pm SEM (GEE). Grupo CMMO – IV (N=10); grupo Salina – IV (N=7).

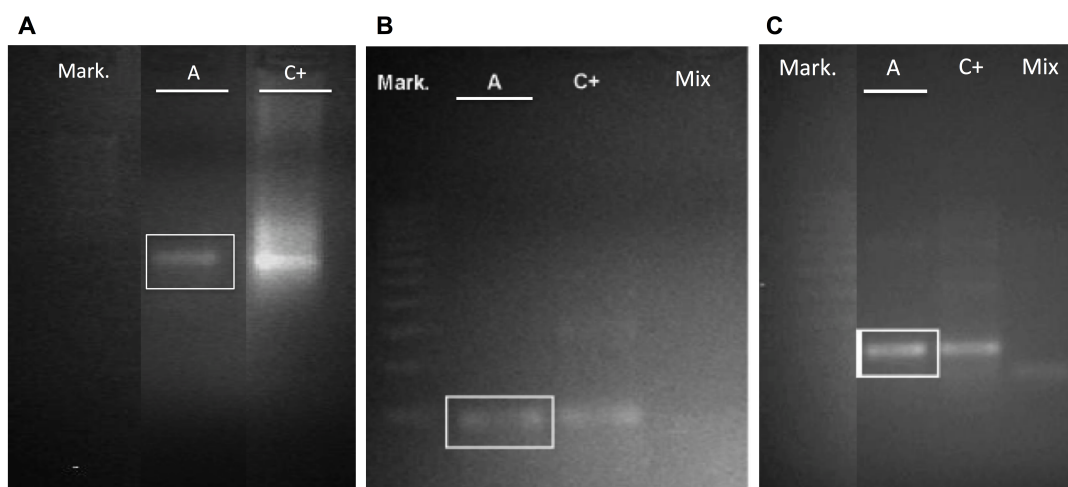


Figura 12 – PCR pós-transplante intravenoso. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. A) 1h pós infusão de CMMO. B) 24h pós infusão de CMMO e C) 7 dias pós infusão de CMMO. Canaleta A: amostras de encéfalo. Canaleta Mark.: marcador de peso molecular (100 pb); Canaleta C+: controle EGFP+; Canaleta Mix: controle negativo.

4.3.3 Imunofluorescência

Para avaliar a sobrevivência e migração das células transplantadas por via sistêmica, para o encéfalo dos animais, também foi realizada análise por imunofluorescência 24h e 7 dias pós-transplante. Apenas duas CMMO-EGFP foram encontradas no encéfalo de animais

parkinsonianos 24h pós-transplante, confirmando os achados da técnica de PCR. Porém, nenhuma célula foi encontrada 7 dias após (Figura 13).

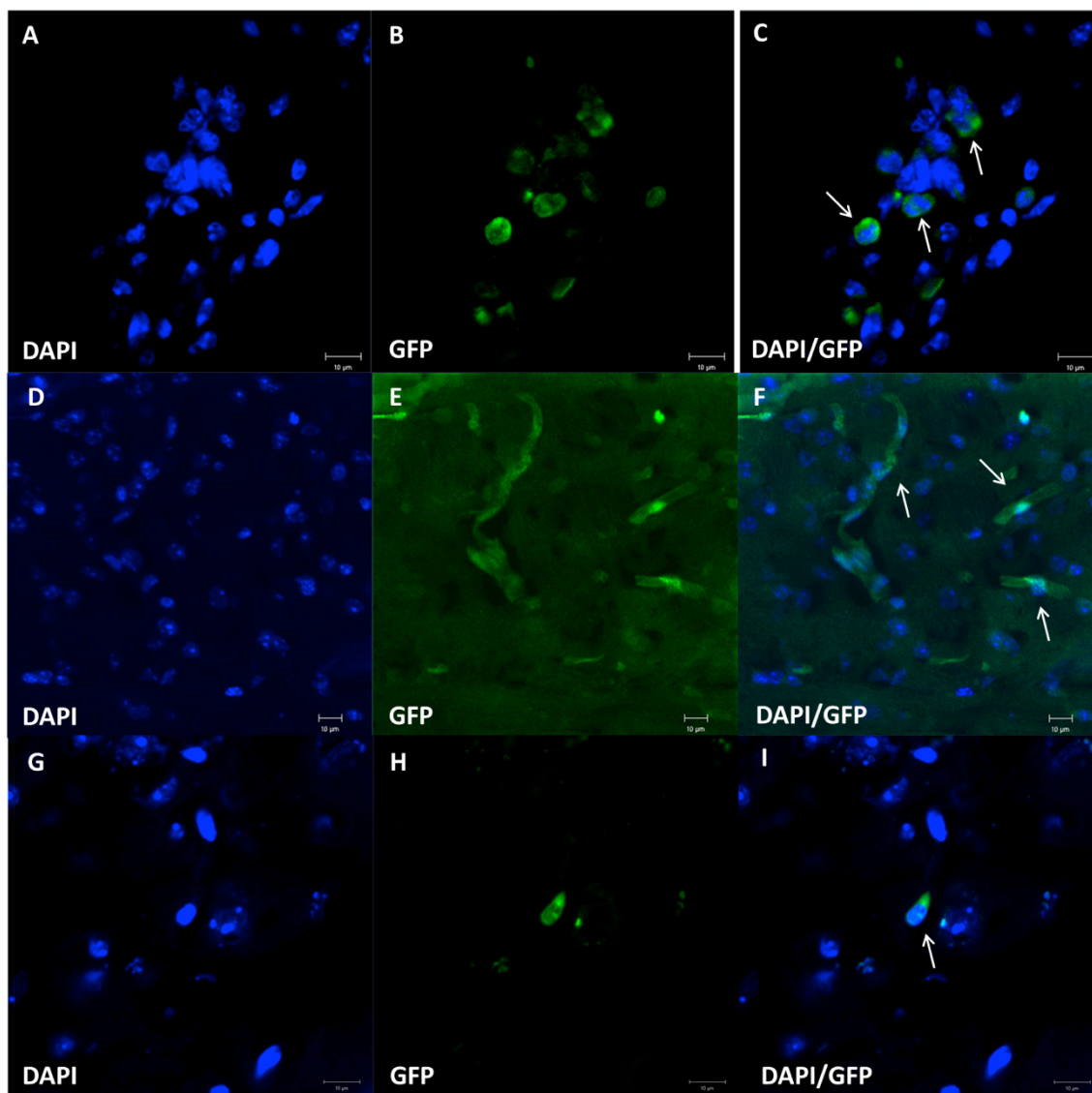


Figura 13 - Imunofluorescência anti-GFP 24h pós-transplante. Controle positivo 1 (A – C): CMMO-EGFP transplantadas diretamente no encéfalo de um camundongo. Controle positivo 2 (D – E): encéfalo de animal transgênico que expressa GFP (animal doador das CMMO). Amostra (G – I): encéfalo de animal parkinsoniano transplantado pela veia da cauda. As setas apontam células EGFP co-localizadas com DAPI (marcador de núcleo celular).

4.4 EXPERIMENTO 2

Tendo em vista que o transplante intravenoso de CMMO não teve efeito sobre a função motora dos camundongos parkinsonianos, avaliou-se os efeitos do transplante das

CMMO no estriado direito de camundongos induzidos ao modelo lesional da DP com 6-OHDA.

4.4.1 Testes de avaliação da função motora

4.4.1.1 Teste de desempenho do Rotarod em aceleração

A figura 14 mostra a comparação da latência de queda entre os grupos, antes, 10 dias e 30 dias após o transplante. Não se observou interação significativa entre os grupos e o tempo ($P=0,33$ em GEE). O teste GEE demonstrou, porém, efeito significativo do tempo ($p = 0,04$) quando analisado separadamente. Quando aplicado o *post hoc* Sidak, no entanto, não foi observada diferença significativa no desempenho dos animais entre os tempos testados.

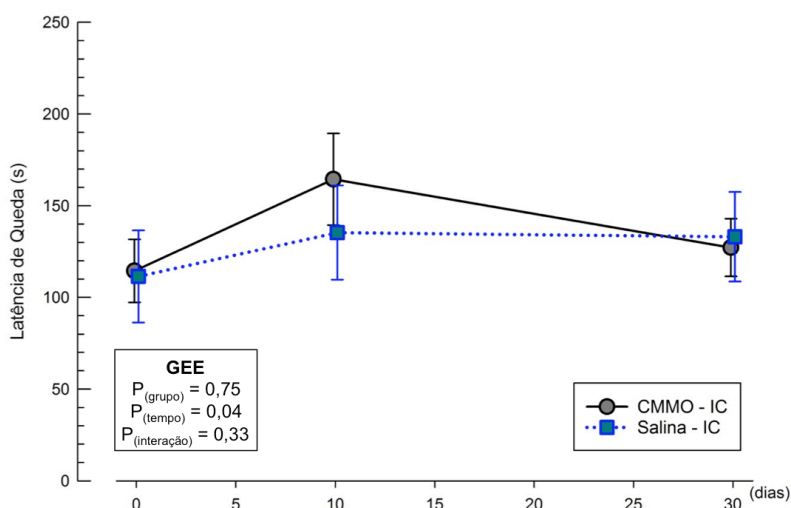


Figura 14 - Comparação do desempenho no teste de Rotarod entre os grupos. Latência de queda (segundos) dos animais observada antes (tempo zero), 10 e 30 dias depois do transplante. Dados expressos em média \pm SEM (GEE). CMMO-IC (N=9); Salina-IC (N=6).

4.4.1.2 Teste de Rotação Induzida por Apomorfina

Outra forma de avaliar o déficit causado pela injeção de 6-OHDA no MFB de camundongos C57BL/6 é através da análise indireta da resposta dopaminérgica do animal, utilizando um análogo da dopamina, a apomorfina. Através do teste GEE verificou-se um efeito significativo do tempo ($P= 0,001$) no número de rotações contralaterais realizadas pelos animais. O *post hoc* Sidak revelou que o grupo Salina – IC realizou um maior número de rotações contralaterais 10 ($172,57 \pm 15,09$ rotações; $P = 0,027$) e 30 dias após o transplante

($170,43 \pm 10,54$ rotações; $P = 0,035$) quando comparado ao teste realizado antes do transplante ($115,86 \pm 15,7$ rotações). Esses dados demonstram uma piora do grupo Salina-IC, em 10 dias após o transplante, que se mantem aos 30 dias. Já o grupo CMMO – IC apresentou desempenho semelhante antes ($150,33 \pm 17,202$ rotações) e 10 dias após o transplante ($142,56 \pm 20,16$; $P > 0,99$). No teste realizado 30 dias pós-transplante, houve um aumento, embora não significativo, no número de rotações ($198 \pm 24,08$ rotações) em comparação ao período pré ($P=0,22$) e 10 dias pós-transplante ($P=0,062$). Esses resultados sugerem que as CMMO impedem, mesmo que temporariamente, a progressão da morte neuronal induzida pela 6-OHDA, avaliada indiretamente pelo teste da apomorfina. Não se observou, no entanto, uma interação significativa entre os fatores grupo e tempo ($P=0,081$ em GEE; Figura 15), nem uma diferença significativa entre os grupos ($P=0,56$ em GEE).

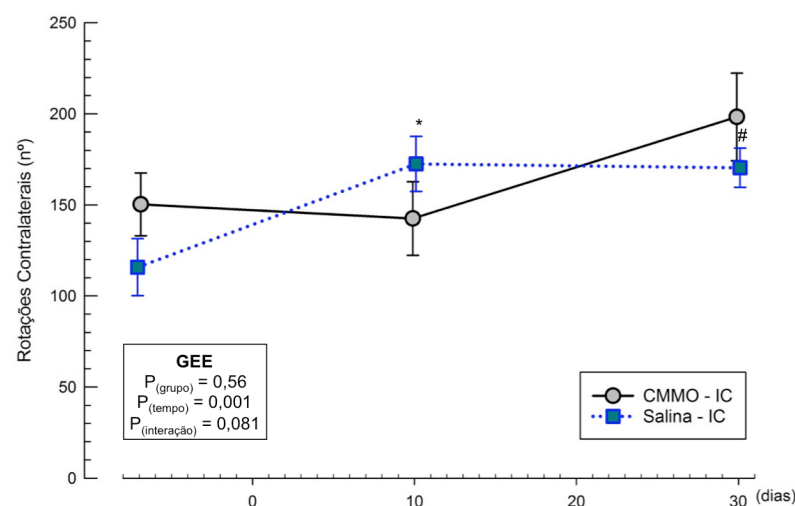


Figura 15 - Comparação do número de rotações no teste da apomorfina entre os grupos. Número de rotações observado antes do transplante (-7 dias), 10 e 30 dias após o transplante, sendo que o transplante foi realizado no dia zero. Dados expressos em média \pm SEM. * $P=0,027$ vs. Salina – IC pré-transplante; # $P=0,035$ vs. Salina – IC pré-transplante, no post hoc Sidak, após GEE. CMMO-IC (N=9); Salina-IC (N=6).

4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Para avaliar a sobrevivência das CMMO-EGFP, transplantadas no estriado direito de camundongos com DP, rastreou-se o gene da GFP através da técnica de PCR. Observou-se, então, a presença desse gene no encéfalo dos animais parkinsonianos 10 e 30 dias após o transplante (Figura 16).

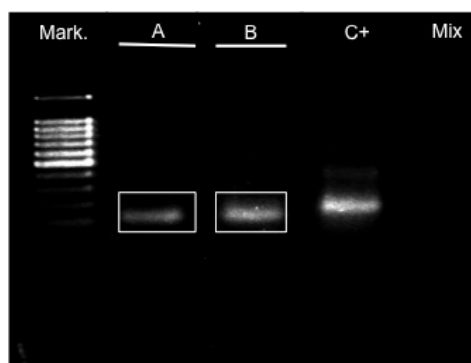


Figura 16 – PCR pós-transplante intracerebral. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Canaleta A: 10 dias pós infusão de CMMO. Canaleta B: 30 dias pós infusão de CMMO. Canaleta Marc.: marcador de peso molecular (100 pb); Canaleta C+: controle EGFP+; Canaleta Mix: controle negativo.

4.4.3 Imunofluorescência

Para confirmação dos resultados do PCR e verificação da presença das CMMO-EGFP no encéfalo dos animais, também foi realizada análise por imunofluorescência 10 e 30 dias após o transplante. Diversas células EGFP foram encontradas no estriado desses animais, em ambos os tempos analisados (Figura 17).

4.5 EXPERIMENTO 3:

O transplante intraestriatal de CMMO em camundongos submetidos ao modelo lesional da DP parece ter um efeito benéfico, embora fraco, sobre a resposta dopaminérgica desses animais, visualizada através do teste de rotação induzida por apomorfina. Esse efeito, no entanto, parece não refletir na melhora da função motora como um todo, avaliada pelo teste de Rotarod em aceleração. Kefalopoulou e colaboradores (2014) demonstraram que o duplo transplante de neurônios dopaminérgicos derivados de hESC em pacientes com DP melhora a escala motora UPDRS, por até 18 anos em que foram acompanhados. Sendo assim, hipotetizou-se que seria possível potencializar o efeito das CMMO, realizando um segundo transplante no estriado dos camundongos parkinsonianos. Para tanto, um grupo de animais parkinsonianos foi submetido a um segundo transplante de CMMO ou solução salina, 20 dias após o primeiro, e avaliados quanto a função motora.

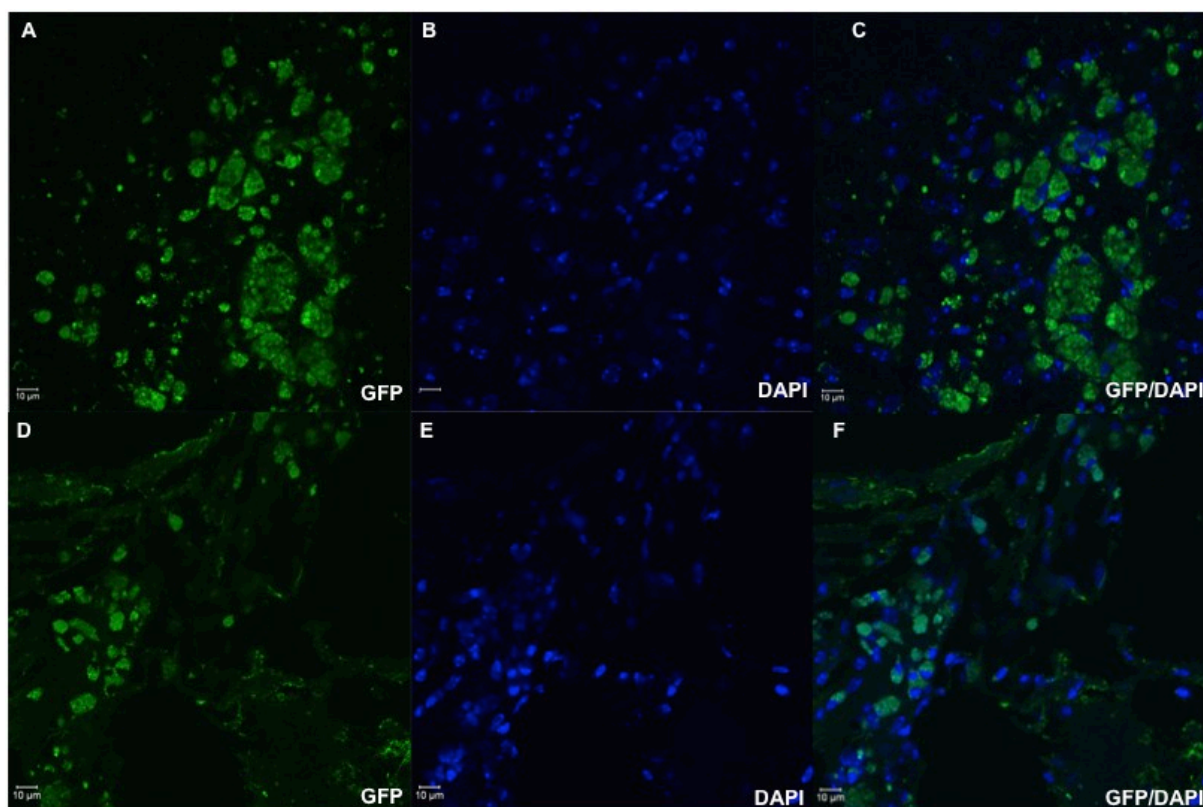


Figura 17 - Imunofluorescência anti-GFP. 10 dias pós-transplante IC (A – C); 30 dias pós-transplante IC (D – E). C e D representam as CMMO – EGFP co-localizadas com DAPI (marcador de núcleo celular).

4.5.1 Testes de avaliação da função motora

4.5.1.1 Teste de desempenho do Rotarod em aceleração

O teste GEE não mostrou interação significativa entre os fatores grupo e tempo ($P=0,35$; Figura 18). Também não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos ($P=0,80$), nem no desempenho dos animais nos diferentes tempos analisados ($P=0,15$). O duplo transplante de CMMO não foi capaz de melhorar a função motora dos animais, avaliada pelo teste de Rotarod em aceleração.

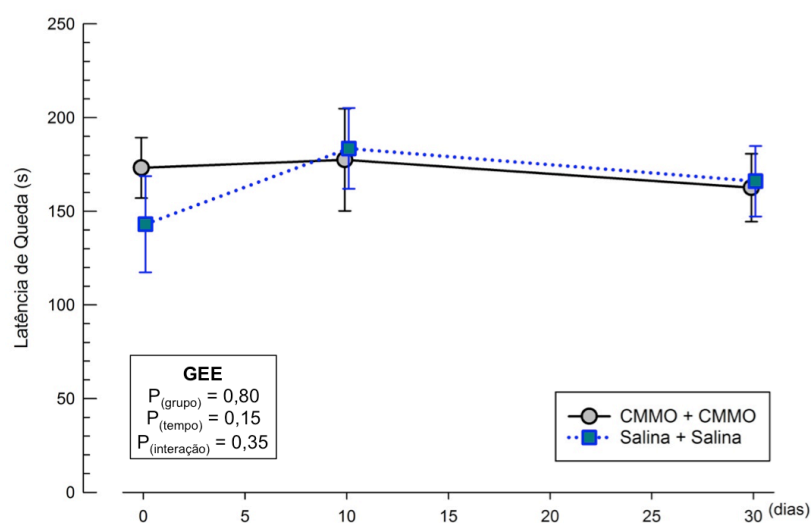


Figura 18 - Comparação do desempenho no teste de Rotarod entre os grupos. Latência de queda dos animais observada antes (tempo zero), 10 e 30 dias depois do 1º transplante, sendo que o primeiro transplante foi realizado no dia zero e o 2º no dia 20. Dados expressos em média \pm SEM (GEE). CMMO-IC (N=7); Salina-IC (N=5).

4.5.1.2 Teste de Rotação Induzida por Apomorfina

A fim de verificar se um segundo transplante poderia potencializar o efeito das CMMO sobre a resposta dopaminérgica dos camundongos parkinsonianos, esses animais receberam novamente uma injeção de CMMO no estriado direito, 20 dias após o primeiro transplante. Foi observada uma interação significativa entre os fatores grupo e tempo ($P=0,006$ em GEE; Figura 19), embora não tenha sido verificada diferença significativa entre os grupos ($P=0,29$). O teste GEE revelou, ainda, diferença significativa do desempenho dos animais nos diferentes tempos estudados ($P=0,004$). O post hoc Sidak apontou uma piora do grupo Salina + Salina em 10 dias pós-transplante ($371,2 \pm 41,82$ rotações), verificada pelo aumento no número de rotações, em comparação ao período pré-transplante ($244,2 \pm 26,86$ rotações; $P=0,001$) e comparado ao grupo CMMO + CMMO pré-transplante ($203 \pm 27,37$ rotações; $P=0,011$). Já o grupo CMMO + CMMO manteve constante o número de rotações em 10 dias pós-transplante ($235,62 \pm 47,22$ rotações) em comparação ao período pré-transplante ($203 \pm 27,37$ rotações; $P>0,99$). Foi verificado, no entanto, um aumento significativo no número de rotações, 30 dias após o transplante ($346,78 \pm 33,08$ rotações; $P<0,001$) em comparação ao teste realizado pré-transplante. Esses dados confirmam o resultado obtido anteriormente, com a injeção intracerebral única, demonstrando que as CMMO protegem temporariamente o animal da morte neuronal induzida pela 6-OHDA,

avaliada indiretamente pelo teste da apomorfina. No entanto, o segundo transplante de CMMO não foi eficaz na manutenção desse efeito.

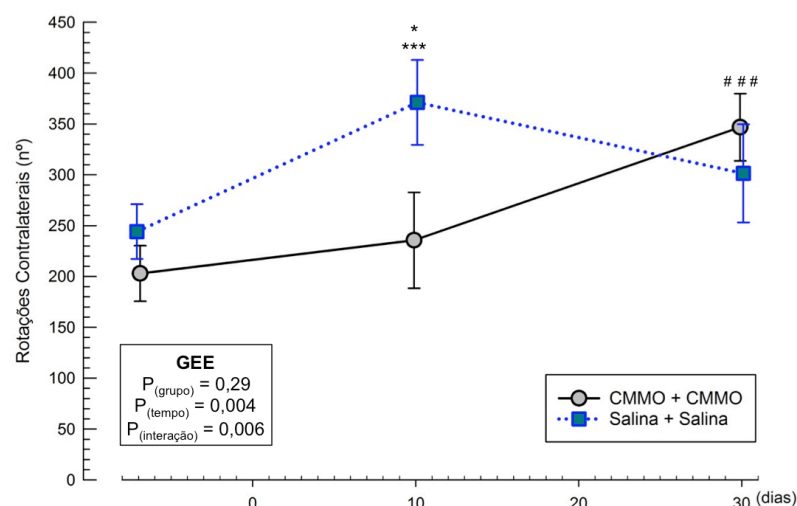


Figura 19 - Comparação do número de rotações no teste da apomorfina entre os grupos. Número de rotações observado antes do transplante (-7 dias), 10 e 30 dias após o primeiro transplante, sendo que o 10 transplante foi realizado no dia zero e o segundo no dia 20. Dados expressos em média \pm SEM. * $P = 0,011$ vs. CMMO + CMMO pré-transplante; *** $P = 0,001$ vs. Salina + Salina pré-transplante; ### $P < 0,001$ vs. CMMO + CMMO pré-transplante, no post hoc Sidak, após GEE. CMMO-IC (N=7); Salina-IC (N=5).

4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Para avaliar a sobrevivência das CMMO-EGFP, transplantadas no estriado direito de camundongos com DP, rastreou-se o gene da GFP através da técnica de PCR. Observou-se, então, a presença desse gene no encéfalo dos animais parkinsonianos 30 dias após o segundo transplante (Figura 20).

4.5.3 Imunofluorescência

Para confirmação dos resultados do PCR e verificação da presença das CMMO-EGFP no encéfalo dos animais, também foi realizada análise por imunofluorescência 30 dias após o segundo transplante. Diversas células EGFP foram encontradas nesse período (Figura 21).

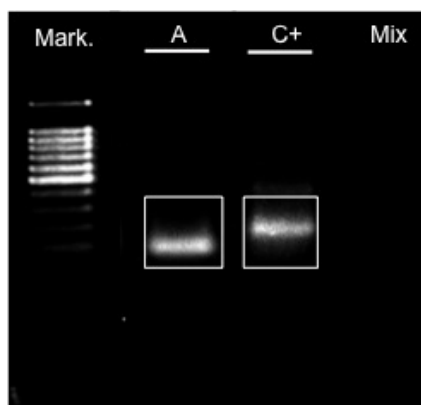


Figura 20 – PCR pós-transplante duplo. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Canaleta A: 30 dias após segunda infusão de CMMO. Canaleta Marc.: marcador de peso molecular (100 pb); Canaleta C+: controle EGFP+; Canaleta Mix: controle negativo.

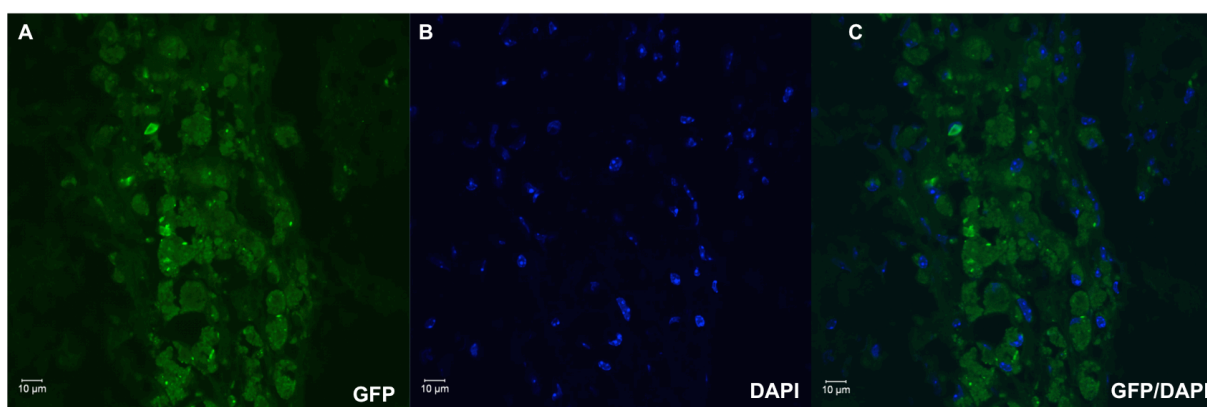


Figura 21 - Imunofluorescência anti-GFP. 30 dias após o segundo transplante IC (A – C); C representa as CMMO – EGFP co-localizadas com DAPI (marcador de núcleo celular).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito do transplante intravenoso de CMMO sobre a função motora de animais com DP, analisada através dos testes de Rotarod e rotação induzida por apomorfina. A maioria dos estudos pré-clínicos envolvendo células-tronco na DP realiza transplante diretamente no encéfalo dos animais estudados (CAPITELLI *et al.*, 2014). Tendo em vista que alterações na BBB foram descritas em pacientes com DP (KORTEKAAS *et al.*, 2005; PERSIDSKY *et al.*, 2006), a via intravenosa para a terapia celular passou a ser de grande interesse, devido a sua facilidade de aplicação clínica. Kortekaas *et al.* (2006) observaram dano da BBB causado pela disfunção da glicoproteína-P (P-gp), em pacientes com DP. O transportador de P-gp, encontrado em altas concentrações na BBB (DEMEULE *et al.*, 2001), impede a entrada de substâncias exógenas no tecido encefálico (BARTELS *et al.*, 2008). Porém, quando se trata da DP em estágio inicial, o aumento na permeabilidade da BBB não é observado (BARTELS *et al.*, 2008). Já em modelos animais da DP, foram descritas alterações na BBB tanto após o tratamento de roedores com MPTP, quanto em ratos lesionados pela 6-OHDA (CARVEY *et al.*, 2005; CHAO *et al.*, 2009; CAPITELLI *et al.*, 2014).

A latência de queda de camundongos parkinsonianos, no teste de Rotarod, foi avaliada, por nosso grupo, antes e, 10 e 30 dias após o transplante intravenoso de CMMO. Não houve, porém, diferença significativa no desempenho do animal tratado (CMMO-IV) em comparação ao grupo Salina-IV (SILVA, 2011). Bahat-Stroomza e colaboradores (2009) demonstraram que o transplante de células que expressam marcadores de astrócitos, derivados de MSCs humanas, no estriado de ratos parkinsonianos promove aumento da latência de queda desses animais. Entretanto, além do tipo celular utilizado, o protocolo do teste de Rotarod aplicado foi diferente nos dois estudos. Bahat-Stroomza e colaboradores (2009) utilizaram um protocolo constante, na velocidade de 16 RPM, enquanto que em nosso estudo a velocidade de rotação varia de 16 – 37 RPM. Foi demonstrada, também, melhora da função motora avaliada pelo teste de Rotarod, após o transplante intracerebral de MSCs em camundongos submetidos ao modelo da DP com MPTP. O teste foi realizado em duas frequências diferentes, 16 e 20 RPM (LI *et al.*, 2001). Diferenças no delineamento dos estudos, como quantidade/tipo de células-tronco transplantadas e vias de administração, podem justificar os resultados contrários encontrados por nosso grupo no teste de Rotarod, além da discrepância entre os protocolos empregados nessa avaliação.

Outra tarefa utilizada, no presente estudo, para avaliar a função motora dos animais foi o número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina. As CMMO, entretanto, não foram capazes de modificar a assimetria rotacional em comparação ao grupo Salina-IV. Poucos dados estão disponíveis na literatura a respeito do transplante intravenoso de células-tronco para o tratamento da DP. Wang e colaboradores (2010), por sua vez, demonstraram que o transplante de MSCs na veia femoral de ratos parkinsonianos, 2h após lesão com 6-OHDA, promove diminuição do número de rotações induzidas por anfetamina, até 4 semanas pós-transplante. Além do tipo celular utilizado, nosso estudo se difere quanto ao tempo pós-lesão em que a injeção das células foi realizada, o qual parece crucial para o efeito terapêutico das células-tronco. Nesse sentido, o transplante agudo dessas células parece ser mais eficaz.

Para avaliar a sobrevivência e a migração das CMMO transplantadas pela veia da cauda em camundongos parkinsonianos, a presença do gene da GFP no encéfalo dos animais foi investigada por PCR, 1h, 24h, 7, 15 e 30 dias após o transplante. Foi demonstrado, então, que as CMMO-EGFP, transplantadas 3 semanas após a lesão com 6-OHDA, são detectadas até 7 dias pós-transplante. No entanto, apenas uma quantidade mínima das células alcança o tecido encefálico e pode ser observada, apenas 24h pós-transplante, através da marcação por imunofluorescência para GFP. A diferença nos achados das duas técnicas justifica-se pois o PCR, além de ser um teste mais sensível, utiliza o tecido a fresco, possibilitando encontrar material genético tanto no tecido encefálico quanto na circulação sanguínea, diferente da imunofluorescência em que o encéfalo é perfundido. Esses resultados sugerem que as CMMO sobrevivem por mais tempo na circulação do que no cérebro dos animais parkinsonianos. Além disso, podem refletir uma maior concentração sistêmica de células, tendo em vista a sua via de administração. Dados na literatura mostram que o transplante de MSCs que expressam marcadores neuronais, no estriado de ratos parkinsonianos, sobrevivem por até 3 semanas após o transplante (SUON *et al.*, 2006; GLAVASKI-JOKSIMOVIC *et al.*, 2009). No entanto, a injeção intraestriatal pode facilitar a integração e a sobrevivência dessas células.

Além disso, pesquisadores encontraram CMMO e/ou MSCs até 7 dias após o transplante i.v. no encéfalo de ratos parkinsonianos (WANG *et al.*, 2010; CAPITELLI *et al.*, 2014). Essa diferença pode ser justificada pelo período em que as células-tronco foram administradas. Embora a quebra na BBB possa ser observada até, pelo menos, 34 dias, após a injeção de 6-OHDA no MFB (CARVEY *et al.*, 2005), as nossas CMMO, transplantadas 3 semanas após a lesão, falharam em migrar até o encéfalo em grandes quantidades. Já Wang (2010) e Capitelli (2014) e colaboradores injetaram as células no máximo 24h após a indução

do modelo. Uma vez que a lesão é considerada aguda nesse período, a mesma pode ter atraído um maior número de células para si, promovendo maior aderência e sobrevivência dessas células.

A migração das células transplantadas para a região lesada pode ocorrer devido a um processo inflamatório desencadeado pela injeção de 6-OHDA ou MPTP, que promove a proliferação de micróglia ativada na substância negra, parte compacta (SNc) (GRUNBLATT *et al.*, 2000). Essa micróglia, por sua vez, libera fatores quimiotáticos, como o SDF-1 (do inglês, *stromal cell-derived factor 1*) que estimula a migração de progenitores hematopoiéticos e neuronais durante o desenvolvimento embrionário (HELLMANN *et al.*, 2006) Esses dados sugerem que a inflamação induzida pela lesão funciona como estímulo para o recrutamento das células transplantadas (HELLMANN *et al.*, 2006).

O fato das CMMO terem sido detectadas no encéfalo de camundongos com DP apenas em pequena quantidade, até 24h após o transplante intravenoso, talvez explique porque não foi observado efeito dessas células sobre a função motora dos animais. Não conseguimos, portanto, avaliar o efeito terapêutico das CMMO na DP. A grande maioria dos estudos nessa área utilizam hESC ou MSC de diversas fontes, as quais necessitam de expansão e/ou diferenciação em cultura. Já as CMMO são de fácil obtenção e permitem o transplante autólogo. Apenas um estudo a respeito do uso de CMMO no modelo animal do MPTP está disponível na literatura (CAPITELLI *et al.*, 2014). Sendo assim, os experimentos 2 e 3 avaliaram a eficácia do transplante intraestriatal das CMMO em camundongos submetidos ao modelo da 6-OHDA de DP.

O presente estudo demonstrou importantes diferenças ao longo do tempo no teste de apomorfina, sendo que os grupos tratados com salina apresentaram um comportamento rotacional diverso daquele verificado nos grupos transplantados com CMMO, nos diferentes tempos avaliados. Não houve, no entanto, diferença significativa quando comparado o grupo CMMO-IC com o Salina-IC, ou o CMMO + CMMO com o Salina + Salina, em cada um dos tempos analisados. Esses achados podem ser justificados pela variabilidade da lesão dopaminérgica induzida pela 6-OHDA. Estudos demonstram que esse modelo de DP pode promover uma redução entre 12 e 97% dos neurônios dopaminérgicos (IANCU *et al.*, 2005). Nesse sentido, a avaliação intragrupo ao longo do tempo, parece ser mais eficaz para demonstrar os efeitos das diferentes intervenções terapêuticas utilizadas.

No experimento 2, camundongos parkinsonianos foram submetidos, 3 semanas após da lesão do MFB com 6-OHDA, à infusão intraestriatal de CMMO ou solução salina. Não foi

observada diferença entre os grupos na função motora avaliada através do teste de Rotarod, 10 e 30 dias após o transplante, nem diferença significativa intragrupo nos tempos analisados. Já no teste da apomorfina, o grupo Salina-IC apresentou, nas avaliações 10 e 30 dias pós-transplante, um aumento significativo da assimetria rotacional em comparação ao período pré-transplante. Por outro lado, o grupo CMMO-IC manteve constante o número de rotações contralaterais, 10 dias pós-transplante, quando comparado ao período pré-transplante, demonstrando um aumento, não significativo, dessas rotações apenas 30 dias após o transplante.

Esses dados sugerem uma interessante dissociação entre a resposta dopaminérgica e a função motora do animal, demonstrando que o efeito observado 10 dias após o transplante de CMMO, no teste da apomorfina, não reflete na melhoria da função motora como um todo. A apomorfina é um agonista da dopamina que atua sobre os receptores dopaminérgicos que encontram-se hipersensibilizados após destruição da via nigroestriatal (UNGERSTEDT, 1971; HEFTI *et al.*, 1980) A injeção de apomorfina promove rotações contralaterais à lesão e esse número está relacionado com o grau de lesão do circuito nigroestriatal (BOVE e PERIER, 2012). Já o Rotarod, segundo Iauncu e colaboradores (2005), é o teste motor espontâneo que melhor reflete a perda neuronal da SN. No entanto, esse teste avalia a coordenação motora do animal (BAHAT-STROOMZA *et al.*, 2009), e não depende apenas do controle dopaminérgico. Logo, outras vias motoras podem ser ativadas durante a execução desse teste e mascarar a disfunção e/ou recuperação dos núcleos da base. Sendo assim, as CMMO transplantadas diretamente no estriado de camundongos parkinsonianos parecem atuar sobre a resposta dopaminérgica nesses animais, efeito que não se traduz na melhora da função motora no teste de Rotarod.

Para elucidar os mecanismos envolvidos nesse efeito dissociado das CMMO, novos estudos precisam ser realizados. Um efeito semelhante foi observado quando comparada a diminuição dos níveis de dopamina, após a injeção de 6-OHDA no estriado de ratos, e o desempenho desses animais no *lateral stepping test*. Na e colaboradores (2010) demonstraram que a 6-OHDA induz a redução de mais de 80% nos níveis de dopamina no estriado, nos três primeiros dias pós-lesão e, essa diminuição permanece estável até 4 semanas após a indução do modelo. Por outro lado, embora o desempenho no *stepping test* esteja prejudicado logo após a lesão do estriado, uma melhora nesse teste pode ser evidenciada a partir de 7 dias, continuando por pelo menos 4 semanas (maior tempo avaliado) (NA *et al.*, 2010).

Nosso estudo demonstrou ainda que o aumento da assimetria rotacional observado nos grupos tratados com salina, em 10 dias após o transplante, ocorre apenas em 30 dias nos grupos tratados com CMMO. Esses resultados sugerem que as CMMO impedem a progressão da morte neuronal e/ou da redução nos níveis de dopamina causados pela 6-OHDA, avaliadas indiretamente pelo teste da apomorfina, porém esse efeito parece ser de curta duração. Acreditamos que a micróglia e o processo inflamatório possam estar envolvidos no mecanismo de ação das CMMO.

Estudos demonstram que a micróglia parece estar envolvida na patogenia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (CAGNIN *et al.*, 2001) e a DP (MCGEER *et al.*, 1988; KIM *et al.*, 2009apud). A micróglia corresponde à célula de defesa do cérebro (CICCHETTI *et al.*, 2002) e expressa diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- α e IFN- γ (Revisado por GEHRMANN *et al.*, 1995). Essas células, quando ativas, são responsáveis pela remoção de restos celulares do tecido encefálico, mas também podem promover morte neuronal (CICCHETTI *et al.*, 2002). Marinova-Mutafchieva e colaboradores (2009) demonstraram que a micróglia ativada participa da morte celular causada pela injeção de 6-OHDA no MFB . Pesquisadores descrevem, ainda, que a ativação da micróglia ocorre antes da morte dos neurônios dopaminérgicos e que, uma vez ativada, promove continuamente essa neurodegeneração (GAO *et al.*, 2002; CHO *et al.*, 2006). Além disso, Kim e colaboradores (2009) comprovaram que o transplante de MSCs reduz a morte de neurônios TH+ através da diminuição da micróglia ativada e TNF- α . Sendo assim, podemos postular que o efeito protetor das CMMO observado, 10 dias após o transplante, no teste da apomorfina, ocorre devido ao atraso na ativação na micróglia, que conseqüentemente impede a progressão da neurodegeneração. O transplante dessas células, no entanto, parece apenas protelar, mas não bloquear em definitivo a ativação da micróglia, o que explicaria o déficit na resposta dopaminérgica observado 30 dias após o transplante, através do aumento da assimetria rotacional.

Baseado em um estudo clínico que, demonstrou que o transplante duplo de neurônios dopaminérgicos derivados de hESC em pacientes com DP melhora a escala motora UPDRS, por até 18 anos, nesses pacientes (KEFALOPOULOU *et al.*, 2014) , delineamos o experimento 3. Na tentativa de potencializar o efeito das CMMO no estriado de camundongos parkinsonianos, realizamos o transplante duplo dessas células. O primeiro transplante foi realizado no tempo zero e o segundo no dia 20. Como nos experimentos anteriores, os animais foram avaliados nos testes de Rotarod e rotação induzida por apomorfina, 10 e 30

dias após o primeiro transplante. O segundo transplante, entretanto, falhou em manter o efeito observado 10 dias pós-transplante, no teste de apomorfina, não impedindo o aumento rotacional observado no grupo tratado com CMMO, 30 dias após o transplante. O desempenho no teste de Rotarod, continuou não demonstrando diferença significativa entre os grupos, nem ao longo do tempo.

Novamente, a resposta imuno-inflamatória, mediada pela micróglia, parece estar envolvida no efeito do transplante intraestriatal de CMMO em camundongos parkinsonianos. Dados da literatura descreveram que o pico da inflamação causada pela injeção de 6-OHDA no estriado, ocorre três semanas após a indução do modelo (CICCHETTI *et al.*, 2002). Dessa forma, o primeiro transplante foi realizado exatamente nesse período, o que garantiu o funcionamento, mesmo que temporário, dessas células. O segundo transplante, entretanto, foi realizado em torno de 40 dias após a lesão com 6-OHDA. Sugerimos, então, que o transplante tardio de CMMO não é capaz de impedir a ativação da micróglia induzida pela 6-OHDA.

Além disso, de Vasconcelos dos Santos e colaboradores (2010) avaliaram a janela terapêutica para o tratamento da isquemia em ratos. Foi observado que o transplante intravenoso de CMMO promove melhora do desempenho animal no teste do cilindro, apenas quando realizado 1 e 7 dias após a isquemia, mas não aos 14 ou 30 dias. Esses dados estão de acordo com os nossos achados, confirmando que o transplante tardio de CMMO não possui efeito terapêutico, ao menos para as patologias e testes comportamentais em questão. Isso nos leva a crer que o período em que o transplante é realizado, é fundamental para que as CMMO possam ter um efeito terapêutico na DP. Esses dados vem ao encontro da hipótese de que as CMMO restauram ou impedem o déficit da resposta dopaminérgica causada pela 6-OHDA, funcionando como um obstáculo para ativação da micróglia. Uma vez ativa, as CMMO parecem não ser capazes de restaurar a morte neuronal induzida pela micróglia. Estudos mais aprofundados envolvendo a avaliação da dopamina, neurônios TH+ e micróglia devem ser realizados para comprovação dessas hipóteses.

Nosso estudo avaliou, também, a sobrevivência das CMMO injetadas diretamente no estriado de camundongos parkinsonianos. As células transplantadas foram detectadas, tanto por PCR quanto por IF, até, pelo menos, 30 dias após o primeiro e o segundo transplante. Esses dados sugerem que, mesmo presentes no tecido encefálico, essas células possuem um limiar de funcionamento e parecem não conseguir deter definitivamente a ativação da micróglia e a conseqüente morte neuronal. Achados semelhantes foram publicados por Webber e colaboradores (2007) a respeito do transplante de progenitores neurais para

recuperação da lesão medular em ratos. Os pesquisadores demonstraram que essas células sobrevivem por 6 semanas, embora a melhora comportamental tenha sido evidenciada apenas até 35 dias pós-transplante. Esses resultados reforçam, também, que a presença das CMMO no tecido lesado não é suficiente para induzir a recuperação do tecido e que o microambiente em que essas células se encontram é fundamental para o seu efeito terapêutico. Além disso, nossos resultados indicam que a resposta inflamatória pode ser crucial para o tratamento dos animais com DP, mas não para a sobrevivência das células transplantadas no tecido encefálico, ao menos quando injetadas diretamente na região de interesse.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo avaliou o efeito do transplante de CMMO, por diferentes vias de administração e diferentes tempos, no modelo lesional da doença de Parkinson e, permitiu as seguintes conclusões:

1. O transplante intravenoso de CMMO não foi capaz de melhorar a função motora de camundongos parkinsonianos, avaliada pelos testes de Rotarod e rotação induzida por apomorfina;
2. Demonstramos que as células injetadas migram em pequena quantidade para o cérebro e são detectadas por apenas 24h pós-transplante, no tecido;
3. Quando as CMMO foram transplantadas diretamente no estriado desses animais, observamos que o número de rotações contralaterais à lesão se manteve constante no grupo CMMO-IC, 10 dias após o transplante, quando comparado ao período pré-transplante. Ao contrário, o grupo Salina-IC apresentou um aumento no número de rotações nesse período;
4. No entanto, um aumento, não significativo, no número de rotações induzidas por apomorfina foi observado no grupo transplantado com CMMO, 30 dias após o transplante.
5. No teste de Rotarod, não foi observada diferença entre os grupos com DP, nem entre os tempos avaliados;
6. O transplante duplo de CMMO não foi capaz de potencializar o efeito dessas células observado no teste de rotação induzida por apomorfina, nem induzir melhora do desempenho do animal no teste de Rotarod.
7. O presente estudo demonstrou, também, que tanto após o transplante simples quanto o duplo de CMMO diretamente no estriado de camundongos parkinsonianos, as células podem ser detectadas por pelo menos até 30 dias pós-transplante.

Com essa pesquisa, podemos concluir que as CMMO, quando transplantadas no estriado de camundongos parkinsonianos, possuem um efeito terapêutico de curta duração, sobre a resposta dopaminérgica avaliada através do teste de apomorfina. Esses resultados são de grande relevância e podem, no futuro, contribuir para a terapia celular na doença de Parkinson, na prática clínica. No entanto, experimentos adicionais são necessários a fim de elucidar os mecanismos envolvidos nesses efeitos.

7 PERSPECTIVAS

Para avaliar os mecanismos por trás dos efeitos das CMMO transplantadas diretamente no estriado de animais parkinsonianos, experimentos adicionais serão realizados.

Será avaliada a presença de micróglia ativada, diversos tempos após a lesão com a 6-OHDA e após o transplante de CMMO em camundongos parkinsonianos, através Micro-PET-CT, utilizando a marcação do PK11195 com carbono 11 (^{11}C -PK11195). Além disso, a expressão do mRNA para os receptores dopaminérgicos e transportador da dopamina (DAT) será avaliada, quantitativamente, por PCR em tempo real. A expressão desses receptores e do DAT será analisada por ELISA.

Considerando a hipótese do envolvimento da micróglia e da resposta imune no efeito das CMMO sobre a resposta dopaminérgica, sugerimos, ainda, que um segundo transplante seja realizado antes de 20 dias após o primeiro, na tentativa de manter o efeito das CMMO por um período mais longo. Além disso, considerando que a diminuição nos níveis de dopamina observada no estriado, após a injeção de 6-OHDA, ocorre como consequência da morte neuronal induzida na SN, seria interessante realizar um transplante de CMMO diretamente na SN dos animais parkinsonianos, para comparar com os resultados encontrados no transplante intraestriatal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-SLEIMAN, P. M. et al. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 54, n. 3, p. 283-6, Sep 2003. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

BAGHERI, H. et al. A study of salivary secretion in Parkinson's disease. **Clin Neuropharmacol**, v. 22, n. 4, p. 213-5, Jul-Aug 1999. ISSN 0362-5664 (Print) 0362-5664 (Linking).

BAHAT-STROOMZA, M. et al. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. **J Mol Neurosci**, v. 39, n. 1-2, p. 199-210, Sep 2009. ISSN 1559-1166 (Electronic) 0895-8696 (Linking).

BANDOPADHYAY, R.; DE BELLEROCHE, J. Pathogenesis of Parkinson's disease: emerging role of molecular chaperones. **Trends Mol Med**, v. 16, n. 1, p. 27-36, Jan 2009. ISSN 1471-499X (Electronic) 1471-4914 (Linking).

BARBERI, T. et al. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 10, p. 1200-7, Oct 2003. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking).

BARTELS, A. L. et al. Blood-brain barrier P-glycoprotein function is not impaired in early Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14, n. 6, p. 505-8, Aug 2008. ISSN 1353-8020 (Print) 1353-8020 (Linking).

BERARDELLI, A. et al. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. **Brain**, v. 124, n. Pt 11, p. 2131-46, Nov 2001. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking).

BJORKLUND, A. et al. Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. **Brain Res**, v. 199, n. 2, p. 307-33, Oct 20 1980. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

BJORKLUND, A.; STENEVI, U. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. **Brain Res**, v. 177, n. 3, p. 555-60, Nov 30 1979. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

BLANDINI, F. et al. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. **Cell Transplant**, v. 19, n. 2, p. 203-17, 2010. ISSN 1555-3892 (Electronic) 0963-6897 (Linking).

BONIFATI, V. et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. **Science**, v. 299, n. 5604, p. 256-9, Jan 10 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

BOVE, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51-76, Jun 1 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking).

BRAZELTON, T. R. et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1775-9, Dec 1 2000. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

BRIGNIER, A. C.; GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S336-44, Feb 2010. ISSN 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking).

BROXMEYER, H. E. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 10, p. 3828-32, May 1989. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

BUCHHEISER, A. et al. Cord blood for tissue regeneration. **J Cell Biochem**, v. 108, n. 4, p. 762-8, Nov 1 2009. ISSN 1097-4644 (Electronic) 0730-2312 (Linking).

BUZANSKA, L. et al. Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. **Stem Cells Dev**, v. 15, n. 3, p. 391-406, Jun 2006. ISSN 1547-3287 (Print) 1547-3287 (Linking).

CAGNIN, A. et al. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. **Lancet**, v. 358, n. 9280, p. 461-7, Aug 11 2001. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking).

CAI, J. et al. Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats. **Stem Cells Dev**, v. 19, n. 7, p. 1017-23, Jul 2010. ISSN 1557-8534 (Electronic) 1547-3287 (Linking).

CAPITELLI, C. S. et al. Opposite effects of bone marrow-derived cells transplantation in MPTP-rat model of Parkinson's disease: a comparison study of mononuclear and mesenchymal stem cells. **Int J Med Sci**, v. 11, n. 10, p. 1049-64, 2014. ISSN 1449-1907 (Electronic) 1449-1907 (Linking).

CARRION, M. J. M.; VENTURIN, G. T.; DACOSTA, J. C. Potencial terapêutico das células-tronco de medula óssea no tratamento da epilepsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2009.

CARVEY, P. M. et al. 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 1158-68, Sep 2005. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking).

CHAO, Y. X.; HE, B. P.; TAY, S. S. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. **J Neuroimmunol**, v. 216, n. 1-2, p. 39-50, Nov 30 2009. ISSN 1872-8421 (Electronic) 0165-5728 (Linking).

- CHO, B. P. et al. Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. **Glia**, v. 53, n. 1, p. 92-102, Jan 1 2006. ISSN 0894-1491 (Print) 0894-1491 (Linking).
- CICCHETTI, F. et al. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. **Eur J Neurosci**, v. 15, n. 6, p. 991-8, Mar 2002. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking).
- COGLE, C. R. et al. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. **Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1432-7, May 1 2004. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).
- DAMIER, P. et al. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. **Brain**, v. 122 (Pt 8), p. 1437-48, Aug 1999. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking).
- DANIELYAN, L. et al. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. **Rejuvenation Res**, v. 14, n. 1, p. 3-16, Feb 2011. ISSN 1557-8577 (Electronic) 1549-1684 (Linking).
- DE PAULA, S. et al. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica** v. 15, n. 4, p. 263 - 269, 2005.
- DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A. et al. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Res**, v. 1306, p. 149-58, Jan 8 2010. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).
- DELCROIX, G. J. et al. The therapeutic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells combined with pharmacologically active microcarriers transplanted in hemiparkinsonian rats. **Biomaterials**, v. 32, n. 6, p. 1560-73, Feb 2011. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking).
- DELEIDI, M. et al. Development of histocompatible primate-induced pluripotent stem cells for neural transplantation. **Stem Cells**, v. 29, n. 7, p. 1052-63, Jul 2011. ISSN 1549-4918 (Electronic) 1066-5099 (Linking).
- DEMEULE, M. et al. Isolation of endothelial cells from brain, lung, and kidney: expression of the multidrug resistance P-glycoprotein isoforms. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 281, n. 3, p. 827-34, Mar 2 2001. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking).
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249 (Print) 1465-3249 (Linking).
- EBERSBACH, G. et al. Scales in Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 253 Suppl 4, p. IV32-5, Aug 2006. ISSN 0340-5354 (Print) 0340-5354 (Linking).

EINSTEIN, O.; BEN-HUR, T. The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases. **Arch Neurol**, v. 65, n. 4, p. 452-6, Apr 2008. ISSN 1538-3687 (Electronic) 0003-9942 (Linking).

ENGELENDER, S. et al. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. **Nat Genet**, v. 22, n. 1, p. 110-4, May 1999. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking).

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, v. 109, n. 1, p. 235-42, Apr 2000. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking).

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-6, Jul 9 1981. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

FAHN, S. et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 351, n. 24, p. 2498-508, Dec 9 2004. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking).

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 139-54, Jan 2004. ISSN 1545-5343 (Print) 1545-5343 (Linking).

FREED, C. R. et al. Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 327, n. 22, p. 1549-55, Nov 26 1992. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

FREED, C. R. et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 344, n. 10, p. 710-9, Mar 8 2001. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

FU, Y. S. et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. **Stem Cells**, v. 24, n. 1, p. 115-24, Jan 2006. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099 (Linking).

FUCHS, E.; SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 143-55, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).

FUNAYAMA, M. et al. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. **Ann Neurol**, v. 51, n. 3, p. 296-301, Mar 2002. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

GAO, H. M. et al. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 782-90, Feb 1 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking).

GEHRMANN, J.; MATSUMOTO, Y.; KREUTZBERG, G. W. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 20, n. 3, p. 269-87, Mar 1995.

GLAVASKI-JOKSIMOVIC, A. et al. Reversal of dopaminergic degeneration in a parkinsonian rat following micrografting of human bone marrow-derived neural progenitors. **Cell Transplant**, v. 18, n. 7, p. 801-14, 2009. ISSN 1555-3892 (Electronic) 0963-6897 (Linking).

GLUCKMAN, E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **N Engl J Med**, v. 321, n. 17, p. 1174-8, Oct 26 1989. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

GOLBE, L. I. et al. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 27, n. 3, p. 276-82, Mar 1990. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

GOLBE, L. I. et al. Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. **Ann Neurol**, v. 40, n. 5, p. 767-75, Nov 1996. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

GOLDMAN, J. G.; GOETZ, C. G. James Parkinson. In: EBADI, M. S. (Ed.). **Parkinson's Disease**: CRC Press, 2005. cap. 1, p.1050.

GREALISH, S. et al. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 31, n. 12, p. 2266-78, Jun 2010. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking).

GRUNBLATT, E.; MANDEL, S.; YODIM, M. B. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 262-73, 2000. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking).

HAGELL, P. et al. Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. **Brain**, v. 122 (Pt 6), p. 1121-32, Jun 1999. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking).

HARGUS, G. et al. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 36, p. 15921-6, Sep 7 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).

HARRIS, D. T.; ROGERS, I. Umbilical cord blood: a unique source of pluripotent stem cells for regenerative medicine. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 2, n. 4, p. 301-9, Dec 2007. ISSN 1574-888X (Print).

HATANO, Y. et al. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. **Ann Neurol**, v. 56, n. 3, p. 424-7, Sep 2004. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

HAUSER, R. A. et al. Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 56, n. 2, p. 179-87, Feb 1999. ISSN 0003-9942 (Print) 0003-9942 (Linking).

- HEALY, D. G.; ABOU-SLEIMAN, P. M.; WOOD, N. W. PINK, PANK, or PARK? A clinicians' guide to familial parkinsonism. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 11, p. 652-62, Nov 2004. ISSN 1474-4422 (Print) 1474-4422 (Linking).
- HEFTI, F.; MELAMED, E.; WURTMAN, R. J. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. **Brain Res**, v. 195, n. 1, p. 123-37, Aug 11 1980. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).
- HELLMANN, M. A. et al. Increased survival and migration of engrafted mesenchymal bone marrow stem cells in 6-hydroxydopamine-lesioned rodents. **Neurosci Lett**, v. 395, n. 2, p. 124-8, Mar 6 2006. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking).
- HELY, M. A. et al. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. **Mov Disord**, v. 23, n. 6, p. 837-44, Apr 30 2008. ISSN 1531-8257 (Electronic) 0885-3185 (Linking).
- HOCHSTRASSER, M. Protein degradation or regulation: Ub the judge. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 813-5, Mar 22 1996. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).
- HUGHES, A. J. et al. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. **Brain**, v. 125, n. Pt 4, p. 861-70, Apr 2002. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking).
- HUGHES, A. J.; DANIEL, S. E.; LEES, A. J. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. **Neurology**, v. 57, n. 8, p. 1497-9, Oct 23 2001. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878 (Linking).
- IANCU, R. et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behav Brain Res**, v. 162, n. 1, p. 1-10, Jul 1 2005. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking).
- IMAYOSHI, I. et al. Continuous neurogenesis in the adult brain. **Dev Growth Differ**, v. 51, n. 3, p. 379-86, Apr 2009. ISSN 1440-169X (Electronic) 0012-1592 (Linking).
- JANG, Y. K. et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. **J Neurosci Res**, v. 75, n. 4, p. 573-84, Feb 15 2004. ISSN 0360-4012 (Print) 0360-4012 (Linking).
- JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368-76, Apr 2008. ISSN 1468-330X (Electronic) 0022-3050 (Linking).
- KATZENSCHLAGER, R. et al. Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. **Neurology**, v. 71, n. 7, p. 474-80, Aug 12 2008. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking).
- KEFALOPOULOU, Z. et al. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. **JAMA Neurol**, v. 71, n. 1, p. 83-7, Jan 2014. ISSN 2168-6157 (Electronic) 2168-6149 (Linking).

KELLY, S. et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 32, p. 11839-44, Aug 10 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

KIM, B. O. et al. Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. **Circulation**, v. 112, n. 9 Suppl, p. I96-104, Aug 30 2005. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking).

KIM, J. H. et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 50-6, Jul 4 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

KIM, Y. J. et al. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. **Glia**, v. 57, n. 1, p. 13-23, Jan 1 2009. ISSN 1098-1136 (Electronic) 0894-1491 (Linking).

KOGLER, G. et al. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. **Exp Hematol**, v. 33, n. 5, p. 573-83, May 2005. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking).

KOGLER, G. et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **J Exp Med**, v. 200, n. 2, p. 123-35, Jul 19 2004. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking).

KOGLER, G.; SENSKEN, S.; WERNET, P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. **Exp Hematol**, v. 34, n. 11, p. 1589-95, Nov 2006. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking).

KOPEN, G. C.; PROCKOP, D. J.; PHINNEY, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 19, p. 10711-6, Sep 14 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

KORBLING, M.; ESTROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. **Bone Marrow Transplant**, v. 32 Suppl 1, p. S23-4, Aug 2003. ISSN 0268-3369 (Print) 0268-3369 (Linking).

KORTEKAAS, R. et al. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. **Ann Neurol**, v. 57, n. 2, p. 176-9, Feb 2005. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

KRAUSE, D. S. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v. 105, n. 3, p. 369-77, May 4 2001. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).

- KRUGER, R. et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Nat Genet**, v. 18, n. 2, p. 106-8, Feb 1998. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking).
- LE, W. D. et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. **Nat Genet**, v. 33, n. 1, p. 85-9, Jan 2003. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking).
- LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055-66, Jun 13 2009. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).
- LEES, A. J. et al. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. **Mov Disord**, v. 23, n. 6, p. 777-83, Apr 30 2008. ISSN 1531-8257 (Electronic) 0885-3185 (Linking).
- LEIST, M. et al. The biological and ethical basis of the use of human embryonic stem cells for in vitro test systems or cell therapy. **ALTEX**, v. 25, n. 3, p. 163-90, 2008. ISSN 1868-596X (Print) 1868-596X (Linking).
- LEROY, E. et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. **Nature**, v. 395, n. 6701, p. 451-2, Oct 1 1998. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).
- LI, M. et al. Human umbilical vein-derived dopaminergic-like cell transplantation with nerve growth factor ameliorates motor dysfunction in a rat model of Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 35, n. 10, p. 1522-9, Oct 2010. ISSN 1573-6903 (Electronic) 0364-3190 (Linking).
- LI, W.; DING, S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 1, p. 36-45, Jan 2009. ISSN 1873-3735 (Electronic) 0165-6147 (Linking).
- LI, Y. et al. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 316, n. 2, p. 67-70, Dec 2001. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking).
- LINDVALL, O. et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. **Science**, v. 247, n. 4942, p. 574-7, Feb 2 1990. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).
- LUCKING, C. B. et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. **N Engl J Med**, v. 342, n. 21, p. 1560-7, May 25 2000. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).
- MA, D. K. et al. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. **Cell Res**, v. 19, n. 6, p. 672-82, Jun 2009. ISSN 1748-7838 (Electronic) 1001-0602 (Linking).

MADRAZO, I. et al. Fetal homotransplants (ventral mesencephalon and adrenal tissue) to the striatum of parkinsonian subjects. **Arch Neurol**, v. 47, n. 12, p. 1281-5, Dec 1990. ISSN 0003-9942 (Print)
0003-9942 (Linking).

MADRAZO, I. et al. Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 318, n. 1, p. 51, Jan 7 1988. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking).

MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L. et al. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 110, n. 3, p. 966-75, Aug 2009. ISSN 1471-4159 (Electronic)
0022-3042 (Linking).

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 12, p. 7634-8, Dec 1981. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking).

MARX, F. P. et al. Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 11, p. 1223-31, Jun 1 2003. ISSN 0964-6906 (Print)
0964-6906 (Linking).

MASUI, S. Pluripotency maintenance mechanism of embryonic stem cells and reprogramming. **Int J Hematol**, v. 91, n. 3, p. 360-72, Apr 2010. ISSN 1865-3774 (Electronic)
0925-5710 (Linking).

MCGEER, P. L. et al. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1285-91, Aug 1988. ISSN 0028-3878 (Print)
0028-3878 (Linking).

MEISSNER, A.; WERNIG, M.; JAENISCH, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 10, p. 1177-81, Oct 2007. ISSN 1087-0156 (Print)
1087-0156 (Linking).

MIYASAKI, J. M. New practice parameters in Parkinson's disease. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 2, n. 12, p. 638-9, Dec 2006. ISSN 1745-834X (Print)
1745-834X (Linking).

MIZUNO, Y.; HATTORI, N.; MORI, H. Genetics of Parkinson's disease. **Biomed Pharmacother**, v. 53, n. 3, p. 109-16, Apr 1999. ISSN 0753-3322 (Print)
0753-3322 (Linking).

NA, S. J. et al. Molecular profiling of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 35, n. 5, p. 761-72, May 2010. ISSN 1573-6903 (Electronic) 0364-3190 (Linking).

NESTI, C. et al. Human dental pulp stem cells protect mouse dopaminergic neurons against MPP(+) or rotenone. **Brain Res**, v. 1367, p. 94-102, Sep 18 ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

NILSSON, A. et al. Striatal Alterations of Secretogranin-1, Somatostatin, Prodynorphin, and Cholecystokinin Peptides in an Experimental Mouse Model of Parkinson Disease. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, p. 1094-1104, 2009.

NISHIYAMA, N. et al. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Stem Cells**, v. 25, n. 8, p. 2017-24, Aug 2007. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099 (Linking).

O'SULLIVAN, S. S. et al. Clinical outcomes of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy. **Brain**, v. 131, n. Pt 5, p. 1362-72, May 2008. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking).

OKABE, M. et al. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. **FEBS Lett**, v. 407, n. 3, p. 313-9, May 5 1997. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking).

OUREDNIK, J. et al. Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. **Nat Biotechnol**, v. 20, n. 11, p. 1103-10, Nov 2002. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking).

PAISAN-RUIZ, C. et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. **Neuron**, v. 44, n. 4, p. 595-600, Nov 18 2004. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking).

PARISH, C. L. et al. Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 1, p. 149-60, Jan 2008. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).

PARK, K. I.; TENG, Y. D.; SNYDER, E. Y. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. **Nat Biotechnol**, v. 20, n. 11, p. 1111-7, Nov 2002. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking).

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 223-36; discussion 222, Spring 2002. ISSN 0895-0172 (Print) 0895-0172 (Linking).

PAXINOS, G.; FRANKLING, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2nd. Academic Pr, 2003.

PERSIDSKY, Y. et al. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 1, n. 3, p. 223-36, Sep 2006. ISSN 1557-1904 (Electronic) 1557-1890 (Linking).

PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2896-902, Nov 2007. ISSN 1549-4918 (Electronic) 1066-5099 (Linking).

PICCINI, P. et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 12, p. 1137-40, Dec 1999. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking).

PLEMPER, R. K.; WOLF, D. H. Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. **Mol Biol Rep**, v. 26, n. 1-2, p. 125-30, Apr 1999a. ISSN 0301-4851 (Print) 0301-4851 (Linking).

_____. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. **Trends Biochem Sci**, v. 24, n. 7, p. 266-70, Jul 1999b. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking).

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science**, v. 274, n. 5290, p. 1197-9, Nov 15 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2045-7, Jun 27 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

QUINN, N. P. How to diagnose multiple system atrophy. **Mov Disord**, v. 20 Suppl 12, p. S5-S10, Aug 2005. ISSN 0885-3185 (Print) 0885-3185 (Linking).

RAO, G. et al. Does this patient have Parkinson disease? **JAMA**, v. 289, n. 3, p. 347-53, Jan 15 2003. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484 (Linking).

RASCOL, O. et al. Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. **Lancet**, v. 359, n. 9317, p. 1589-98, May 4 2002. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking).

RHEE, Y. H. et al. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2326-35, Jun 2011. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking).

ROCHA, V.; GLUCKMAN, E. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 12, n. 1 Suppl 1, p. 34-41, Jan 2006. ISSN 1083-8791 (Print) 1083-8791 (Linking).

RODRIGUEZ-OROZ, M. C. et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 12, p. 1128-39, Dec 2009. ISSN 1474-4465 (Electronic) 1474-4422 (Linking).

RUBINSTEIN, P. et al. Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. **Blood Cells**, v. 20, n. 2-3, p. 587-96; discussion 596-600, 1994. ISSN 0340-4684 (Print) 0340-4684 (Linking).

SELMANI, Z. et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 212-22, Jan 2008. ISSN 1549-4918 (Electronic) 1066-5099 (Linking).

SEOL, W. Biochemical and molecular features of LRRK2 and its pathophysiological roles in Parkinson's disease. **BMB Rep**, v. 43, n. 4, p. 233-44, Apr 2010. ISSN 1976-670X (Electronic) 1976-6696 (Linking).

SHI, D. et al. The effect of lentivirus-mediated TH and GDNF genetic engineering mesenchymal stem cells on Parkinson's disease rat model. **Neurol Sci**, v. 32, n. 1, p. 41-51, Feb 2011. ISSN 1590-3478 (Electronic) 1590-1874 (Linking).

SHIMURA, H. et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nat Genet**, v. 25, n. 3, p. 302-5, Jul 2000. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking).

SHOULSON, I. DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. **Ann Neurol**, v. 44, n. 3 Suppl 1, p. S160-6, Sep 1998. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

SINGLETON, A. B. et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. **Science**, v. 302, n. 5646, p. 841, Oct 31 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

SPENCER, D. D. et al. Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 327, n. 22, p. 1541-8, Nov 26 1992. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking).

SPILLANTINI, M. G. et al. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 6469-73, May 26 1998. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking).

STRYER, L. **Bioquímica**. 4ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SUON, S.; YANG, M.; IACOVITTI, L. Adult human bone marrow stromal spheres express neuronal traits in vitro and in a rat model of Parkinson's disease. **Brain Res**, v. 1106, n. 1, p. 46-51, Aug 23 2006. ISSN 0006-8993 (Print)
0006-8993 (Linking).

TEIVE, H. A. G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 56, n. 1, p. 141 - 145, 1998.

TENG, Y. D. et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3024-9, Mar 5 2002. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking).

TERADA, N. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 542-5, Apr 4 2002. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking).

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-7, Nov 6 1998. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking).

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 367, p. 69-93, 1971. ISSN 0302-2994 (Print)
0302-2994 (Linking).

VALENTE, E. M. et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. **Science**, v. 304, n. 5674, p. 1158-60, May 21 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking).

VALENTE, E. M. et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. **Ann Neurol**, v. 56, n. 3, p. 336-41, Sep 2004. ISSN 0364-5134 (Print)
0364-5134 (Linking).

VINGERHOETS, F. J. et al. Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion? **Ann Neurol**, v. 41, n. 1, p. 58-64, Jan 1997. ISSN 0364-5134 (Print)
0364-5134 (Linking).

WAKABAYASHI, K. et al. Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 47, n. 4, p. 521-3, Apr 2000. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

WANG, F. et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian model of rats: focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1alpha. **BMC Neurosci**, v. 11, p. 52, 2010. ISSN 1471-2202 (Electronic) 1471-2202 (Linking).

WANG, H. Q.; TAKAHASHI, R. Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 5, p. 553-61, May 2007. ISSN 1523-0864 (Print) 1523-0864 (Linking).

WEBBER, D. J. et al. Transplanted neural progenitor cells survive and differentiate but achieve limited functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. **Regen Med**, v. 2, n. 6, p. 929-45, Nov 2007. ISSN 1746-076X (Electronic) 1746-0751 (Linking).

WEI, P. et al. Effects of engrafted neural stem cells derived from GFP transgenic mice in Parkinson's diseases rats. **Neurosci Lett**, v. 419, n. 1, p. 49-54, May 23 2007. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking).

WELTE, K. et al. International exchange of cord blood units: the registry aspects. **Bone Marrow Transplant**, v. 45, n. 5, p. 825-31, May 2010. ISSN 1476-5365 (Electronic) 0268-3369 (Linking).

WERNIG, M. et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 15, p. 5856-61, Apr 15 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).

WILLIAMS, D. R. et al. Characteristics of two distinct clinical phenotypes in pathologically proven progressive supranuclear palsy: Richardson's syndrome and PSP-parkinsonism. **Brain**, v. 128, n. Pt 6, p. 1247-58, Jun 2005. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking).

WILLIAMS, D. R.; WATT, H. C.; LEES, A. J. Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 77, n. 4, p. 468-73, Apr 2006. ISSN 0022-3050 (Print) 0022-3050 (Linking).

WOLBURG, H.; LIPPOLDT, A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. **Vascul Pharmacol**, v. 38, n. 6, p. 323-37, Jun 2002. ISSN 1537-1891 (Print) 1537-1891 (Linking).

WOLFF, E. F. et al. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. **J Cell Mol Med**, v. 15, n. 4, p. 747-55, Apr 2011. ISSN 1582-4934 (Electronic)
1582-1838 (Linking).

WOODBURY, D. et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J Neurosci Res**, v. 61, n. 4, p. 364-70, Aug 15 2000. ISSN 0360-4012 (Print)
0360-4012 (Linking).

YAMAMURA, Y. et al. Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. **Neurology**, v. 23, n. 3, p. 239-44, Mar 1973. ISSN 0028-3878 (Print)
0028-3878 (Linking).

ZARRANZ, J. J. et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. **Ann Neurol**, v. 55, n. 2, p. 164-73, Feb 2004. ISSN 0364-5134 (Print)
0364-5134 (Linking).

ZETTERSTROM, R. H. et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. **Science**, v. 276, n. 5310, p. 248-50, Apr 11 1997. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking).

ZHANG, X. et al. Evidence for a role of the 5-HT1B receptor and its adaptor protein, p11, in L-DOPA treatment of an animal model of Parkinsonism. **PNAS**, v. 105, n. 6, p. 2163–2168, 2008.

ZHONG, X. Y. et al. Umbilical cord blood stem cells: what to expect. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1205, p. 17-22, Sep 2010. ISSN 1749-6632 (Electronic)
0077-8923 (Linking).

ZIMPRICH, A. et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. **Neuron**, v. 44, n. 4, p. 601-7, Nov 18 2004. ISSN 0896-6273 (Print)
0896-6273 (Linking).

APÊNDICE A – Artigo científico

Dissociation between dopaminergic response and motor function following intrastriatal, but not intravenous, transplant of bone marrow mononuclear stem cells in a mouse model of Parkinson's disease

Caroline Calice da Silva^{1,2}, Bárbara Nunes Azevedo², Denise Cantarelli Machado^{1,3}, Jaderson Costa da Costa^{1,2,*}

¹Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, 90619-900, Brazil

²Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, 90619-900, Brazil

³Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, 90619-900, Brazil.

*Corresponding author at: Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690, Prédio 63, sala 205, Jardim Botânico, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203250; fax: +55 51 3320 3312. E-mail address: jcc@puers.br

The authors declare no conflicts of interests.

Highlights:

- Intravenous BMMC did not restore parkinsonian mice's motor function.
- Intrastriatal BMMC improved dopaminergic response, 10 days post-transplant.
- BMMC did not improve motor function evaluated by rotarod test.
- BMMC survived for up to 30 days after intrastriatal transplant.

Abstract

Parkinson's disease is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra, a process that leads to a dopamine deficiency in the striatum. This deficiency is responsible for the development of motor symptoms, including resting tremor, bradykinesia, rigidity and postural instability. Based on the observation of substantial neuronal death, alternatives to Parkinson's disease treatment have been studied, including cell-based therapies. The present study aimed to assess the therapeutic potential of intravenous and intrastriatal transplant of bone marrow mononuclear cells in a mouse model of Parkinson's disease. Animals underwent stereotaxic surgery and received an injection of 6-hydroxydopamine into their medial forebrain bundle. Three weeks later, mice were injected with bone marrow mononuclear cells or saline through the caudal vein or directly into their striatum. In addition, some animals received a double intrastriatal transplant. Motor function was assessed using the rotarod and apomorphine-induced rotation tests. Our results show that intrastriatal bone marrow mononuclear cells, but not intravenous, have a short-term therapeutic effect on dopaminergic response of parkinsonian mice assessed by the apomorphine-induced rotation test. This potential is not seen on rotarod test, showing dissociation between dopaminergic response and motor function. Further experiments are needed to elucidate the mechanisms involved in these effects.

Key words

Parkinson's disease; mouse; stem cell; intravenous; intrastriatal; motor function.

ABBREVIATION LIST:

AP: ateroposterior

ML: mediolateral

DV: dorsal-ventral

IS: intrastriatal

IF: immunofluorescence

LH: Left hemisphere

RH: Right hemisphere

Introduction

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases and is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN), leading to a dopamine deficiency in the striatum (FAHN e SULZER, 2004; PARISH *et al.*, 2008; BANDOPADHYAY e DE BELLEROCHE, 2009). This neuronal loss is accompanied by an increased number of glial cells and the appearance of Lewy's body (FAHN e SULZER, 2004; LEES *et al.*, 2009). The dopamine deficiency in Parkinson's disease is responsible for the development of motor symptoms, such as resting tremor, bradykinesia, rigidity and postural instability (FAHN e SULZER, 2004; PARISH *et al.*, 2008; BANDOPADHYAY e DE BELLEROCHE, 2009). The cause of the neuronal death, as well as the selectively to dopaminergic neurons, is not completely clear. Many hypotheses have being studied, as protein aggregation and changes in their degradation, besides mitochondrial dysfunction and oxidative stress (FAHN e SULZER, 2004; WANG e TAKAHASHI, 2007). In addition, microglia seems to be involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, as PD (apud MCGEER *et al.*, 1988; KIM *et al.*, 2009). Marinova-Mutafchieva *et al.* (2009) have also shown that activated microglia participates of the neuronal loss induced by the injection of the 6-OHDA on the medial forebrain bundle (MFB), a broadly used rodent PD model.

Pharmacological therapies, such as monoamine oxidase-B inhibitors and levodopa are widely used, the latter being the most effective for controlling motor symptoms (LEES *et al.*, 2009). Surgical interventions, including deep brain stimulation (LIMOUSIN e MARTINEZ-TORRES, 2008), can also be used. However, these approaches do not prevent disease progression or neuronal degeneration. Furthermore, the continued use of levodopa may have side effects, including motor fluctuations ("ON/OFF" periods), with sudden episodes of rigidity and involuntary movements (dyskinesia) (ISACSON, 2004). Thus, other alternatives have been studied, and one promising possibility is stem cell transplant.

Many pre-clinical and clinical studies have used fetal (MADRAZO *et al.*, 1988; LINDVALL *et al.*, 1990; MADRAZO *et al.*, 1990; FREED *et al.*, 1992; SPENCER *et al.*, 1992; HAUSER *et al.*, 1999; PICCINI *et al.*, 1999; KEFALOPOULOU *et al.*, 2014), neural (MEISSNER *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2007) or embryonic (KIM *et al.*, 2002; BARBERI *et al.*, 2003) cells as possible treatments for PD and have shown optimistic results. Ethical and religious concerns, however, make the use of these cellular sources inappropriate in clinical practice (LEIST *et al.*, 2008). Conversely, bone marrow-derived stem cells are easy to obtain in substantial

quantity and allow for autologous transplant (MINGUELL *et al.*, 2000; ZHANG, Z. *et al.*, 2008). Some studies have successfully treated parkinsonian rodents with intracerebral mesenchymal stem cells (MSCs) transplant (BAHAT-STROOMZA *et al.*, 2009; BLANDINI *et al.*, 2010; DANIELYAN *et al.*, 2011; DELCROIX *et al.*, 2011). The potential of bone marrow mononuclear cells (BMMCs), however, is poorly investigated in the field of PD. Unlike MSCs, BMMCs do not require expansion and/or differentiation in culture (Capitelli, 2014). Whereas that the blood brain barrier (BBB) seems to be disrupted in PD (WOLBURG e LIPPOLDT, 2002; KORTEKAAS *et al.*, 2005; BARTELS *et al.*, 2008), as well as in PD animals' models using 6-OHDA and MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (CARVEY *et al.*, 2005; CHAO *et al.*, 2009), the intravenous pathway could also be useful to the delivery of therapeutic agents that, naturally, could not cross the BBB. The present study aimed to assess the therapeutic potential of BMMC intravenous and intrastriatal transplant in a mouse model of PD.

Material and methods

Animals:

Sixty male C57BL/6 mice (60-90 days of age) were housed four-five to a cage, were given food and water ad libitum, and kept at 22-24°C under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). BMBCs were extracted from 16 male C57BL/6-EGFP adult mice. Animals were randomly assigned in groups, depending on the experiment (as follow).

All procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and use of Laboratory Animals and with EU Directive 2010/63/EU. The study was approved by the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Experimental Animal Commission.

Stereotaxic Surgery:

Animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brazil; 80 mg/kg) and xylazine (Syntec, Brazil; 16 mg/kg) and were held fixed in a stereotaxic alignment system (David Kopf Instruments, USA) The scalp was opened through a midline incision, the skull was exposed and a small burr hole was drilled. One microliter of 6-hydroxydopamine (H4381- Sigma Aldrich, USA; 6-OHDA) was unilaterally infused into the right medial forebrain bundle (MFB). Coordinates from bregma were the following: AP = -1.2 mm, ML = -1.2 mm and DV = -5.00 mm (PAXINOS e FRANLKLING, 2003). Infusions were performed with a 25-gauge (G) needle linked by a polyethylene tube to a 10- μ L Hamilton syringe. The infusion was performed at a flow rate of 0.5 μ L/min with the aid of a pump (Insight, Brazil). Following 6-OHDA injection, the needle was kept in place for five minutes and then removed slowly to avoid reflux and to optimize toxin diffusion. Finally, the surgical wound was cleaned, and the skin closed with silk sutures.

Obtaining bone marrow mononuclear cells:

BMBCs were obtained from C57BL/6 mice expressing a green fluorescent protein (GFP), which was used as a reporter of transplanted cells (OKABE *et al.*, 1997). Fresh bone marrow was extracted from humeri, femora and tibiae with a 26G needle containing heparin (10,000

U in 50 ml of DPBS). Material was centrifuged at $400 \times g$ 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 $400 \times g$ over a Ficoll-Paque solution (Histopaque 1083, Sigma Aldrich, USA). The mononuclear fraction above 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. Extracted cells were distributed in 200 μ L aliquots, which contained 10^7 BMBCs for the systemic transplant, and in 1 μ L aliquots with 10^5 cells for the intrastriatal injection. Cell concentrations to the transplant were determined in our previous studies {de Paula, 2012 #356}. For the detection of surface antigen, BMBCs were analyzed using a FACSCalibur cytometer (BD Bioscience) and were positive for CD8a, CD19, CD34, CD45 and CD117 and Sca1 expression (data not shown).

Intravenous Transplant:

Three weeks following 6-OHDA injection, some animals with MFB lesions were randomly assigned to receive an intravenous (i.v.) infusion of 200 μ L of a solution containing 10^7 BMBCs (BMBC-IV group, n = 12) or saline (Saline-IV group, n = 11). Prior to the i.v. infusion, animals were anesthetized with ketamine and xylazine. The solution was infused through one of the caudal veins using a syringe (BD Ultra-Fine 0.5 mL).

Intrastriatal (IS) Transplant:

Other group of animals was deeply anesthetized with ketamine and xylazine, were held fixed in a stereotaxic alignment system and, then, one microliter of BMBC or saline were infused unilaterally into the right striatum. Coordinates from bregma were the following: AP = -0,1 mm, ML = -2,4 mm and DV = -3,6 mm (PAXINOS e FRANLKLING, 2003). The infusion was performed at a flow rate of 0.5 μ L/min with the aid of a pump (Insight, Brazil).

Rotarod test:

Motor function was analyzed using a rotarod apparatus (EFF 411, Insight, Brazil), three weeks after PD model induction (pre-transplant), as well as 10 and 30 days post-transplant.

Following an adaptation trial on the previous day, mice were tested three weeks post-lesion as well as 10 and 30 days post-transplant. Adaptation consisted of placing the mouse on the cylinder for 420 s at a constant rotation rate of 16 RPM. If the animal fell, it was placed back onto the rod. The test was performed on an accelerating rotarod with an initial speed of 16 RPM, which was gradually increased to 37 rpm over ten phases. Each animal underwent three trials of 420 s each at 30-minute intervals. For each session, the mean drop latency for the three trials were calculated.

Apomorphine-induced rotation test:

Apomorphine-induced rotation was measured two weeks post-lesion as well as 10 and 30 days post-transplant. Mice received 1 mg/kg of apomorphine (i.p.; A4393 - Sigma Aldrich, USA) and were placed in individual acrylic bowls with a diameter of 20 cm. Mice were allowed to adapt to their environment for 10 min before the 30 min period during which turns contralateral to the lesion were counted. Ipsilateral turns, if present, were deducted from the total number of contralateral turns (ZHANG, X. *et al.*, 2008; NILSSON *et al.*, 2009). Because of the lesion variability induced by this PD model (Iauncu, 2005), only animals with proven rotational behavior between 50 – 500 rotation/30 min were kept in the study.

Nested polymerase chain reaction analysis

DNA was obtained from the brains of transplanted animals, at different times after BMNC administration, depending on each experiment. To evaluate BMNC migration, we used the forward primer 5'- TTGAATCGCCACCATGGTGAGC -3' and the reverse primer 5'- TTGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTC -3' complementary to the EGFP DNA sequence, and reamplified with the forward primer 5'- GGGCACAAGCTGGAGTACA -3' and the reverse primer 5'- ATGTTGTGGCGGATCTTGA -3' using a nested PCR technique. Amplified products were detected using gel electrophoresis (2% agarose containing ethidium bromide) and visualized under ultraviolet light (OKABE *et al.*, 1997).

Immunofluorescence (IF)

To assess the presence of the BMMC in mice brain, animals were deeply anesthetized with ketamine and xylazin and perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde at 4 °C, at different times post-transplant. The brains were removed from the skulls, post-fixed in the same solution for 24 h and cryoprotected by immersion in a 30% sucrose solution in phosphate buffer at 4 °C until they sank. The brains were then quickly frozen in isopentane that was cooled in liquid nitrogen (− 70 °C). Coronal sections of the brain (8 µm) were cut using a cryostat (Leica, USA). To identify grafted BMMC-EGFP section were incubated with rabbit anti-GFP Alexa 488-conjugated antibody (A21311 – Life Technologies; dilution 1:400) overnight at 4°C. To specifically stain the nuclei, 4,6-diamino-2-phenylindole (ProLong[®] Gold Antifade Mountant with DAPI, P-36931 – Life Technologies, USA) was used. To detect grafted cells in mouse brain, double-stained sections were examined to identify those GFP positive cells that colabeled with DAPI. Similarly, to confirm the efficacy of PD model induction, mice brains were obtained by transcardiac perfusion and frozen in isopentane that was cooled in liquid nitrogen (− 70 °C). Coronal sections were obtained (20 µm) using a cryostat (Leica Biosystems) and incubated with rabbit anti-TH antibody (AB152 – Millipore, USA; dilution 1:500) overnight at 4°C. After washing in 0.1 M PBS, Alexa Fluor 568 (A11011 – Life Technologies; dilution 1:400) was added and incubated at room temperature in the absence of light for 2 h. The nuclei were stained with DAPI (Prolong[®] Gold Antifade Mountant with DAPI, P-36931 - Life Technologies, USA). Reactivity of these antibodies had been confirmed in positive and negative control sections. Slides were examined qualitatively in a confocal microscope (LSM 5 Exciter, Carl Zeiss, Germany) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Zen 5.0 Software (Carl Zeiss, Germany).

Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM), as indicated in the figure legends. A Generalized Estimating Equation (GEE) followed by the Sidak post hoc test was used to analyze the effect of BMMC transplant on the rotarod and apomorphine tests. Analyses were performed using IBM SPSS Statistics software (22.0 version). A statistical significance level of $\alpha = 0.05$ and $p < 0.05$ was applied to all tests.

Experimental design

Experiment 1

To assess the therapeutic potential of the intravenous transplant of BMMC, 17 C57BL/6 mice underwent stereotaxic surgery to induce PD. Two weeks following surgery, animals were tested in the apomorphine-induced rotation to confirm the model efficacy. In the next week, parkinsonian mice were tested in rotarod and, then, received intravenous transplant of BMMC (BMMC-IV group, n= 10) or saline (Saline-IV group, n = 7). Groups were assessed again on rotarod and apomorphine-induced rotation tests, 10 and 30 days post-transplant. Migration and survival of BMMC was evaluated, in a subgroup, (n=10) 1h, 24h, 7, 15 and 30 days after transplantation by PCR, as well as 24h and 7 day post-transplant by IF.

Experiment 2

This experiment aimed to evaluate the effect of BMMC intrastriatal transplant on the motor function of parkinsonian mice. After model induction, apomorphine-induced rotation and rotarod tests assay, animals underwent intrastriatal transplant of BMMC (BMMC-IS group; n = 9) or saline (Saline-IS group, n= 6), as described above. Animal's performance on rotarod and apomorphine-induced rotation test was assessed again, 10 and 30 days after transplantation. The presence of BMMC-EGFP cells into mice brain was assessed by IF, 10 (n=2) and 30 (n=2) days after transplantation. Furthermore, the survival of the transplanted cells was also verified by PCR, 10 (n=2) and 30 days post-transplant.

Experiment 3

We also aimed to verify the effect of BMMC double transplant in parkinsonian animals' motor function. PD-induced mice were evaluated in apomorphine-induced rotation and rotarod tests, and then, transplanted with BMMC (BMMC + BMMC group; n = 7) or saline (Saline + Saline group; n = 5), directly in the striatum. The first transplant was done at day zero and the second at day 20. Mice were assessed in the motor function tests 10 and 30 days after the first transplant. At the end of the study, some animals were deeply anesthetized, perfused and BMMC-EGFP identified in their brains, by IF. The other animals were sacrificed by cervical dislocation and their brains collected to verify the presence of GFP gene, by PCR. The time line of the experimental design for each experiment was showed in Figure 1.

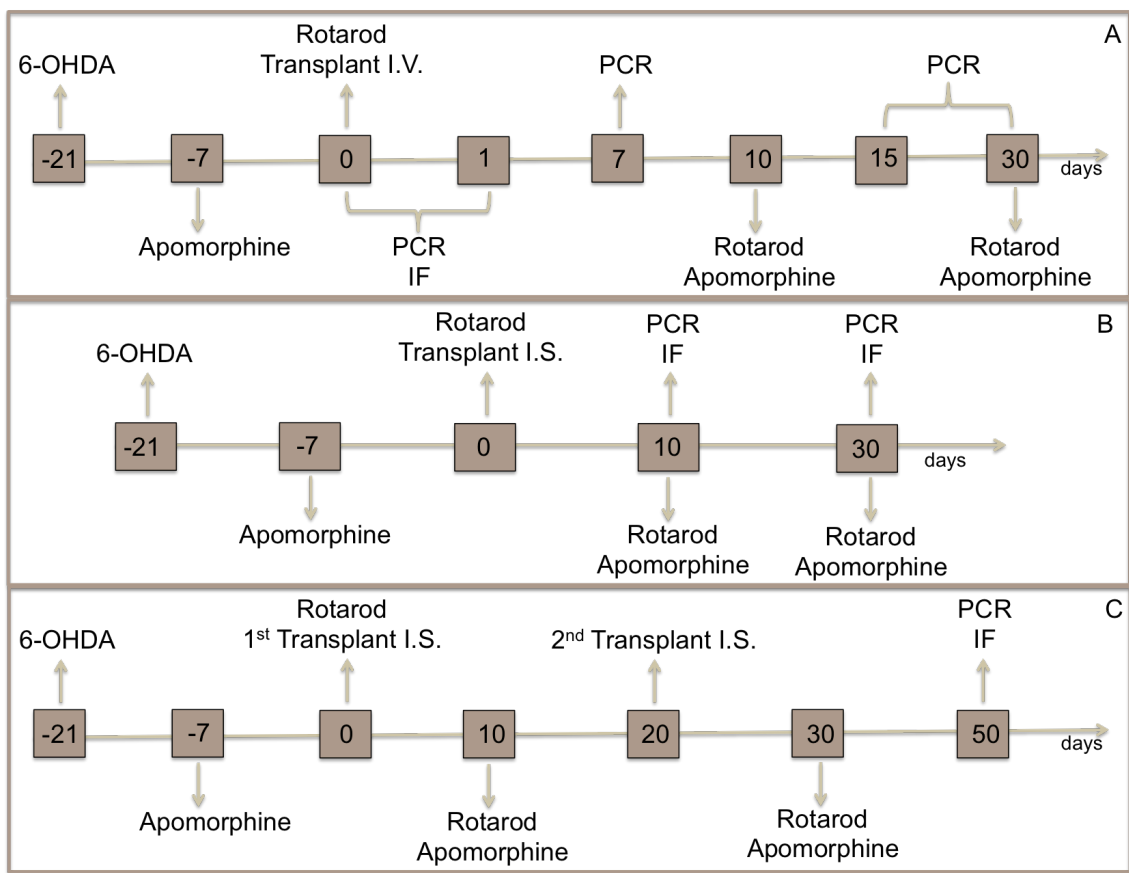


Figure 1 – time line of each experimental design: A) Experiment 1 – intravenous BMMC transplant; B) Experiment 2 – intrastriatal BMMC transplant and C) Experiment 3 – double intrastriatal BMMC transplant.

Results

6-OHDA injection into MFB promoted dopaminergic neurons' degeneration in mice SN

The efficacy of the unilateral 6-OHDA injection, into mice MFB, degenerating dopaminergic neurons from SNc was assessed by TH-IF. Figure 2 shows the neuronal loss in the right hemisphere's (RH) SNc, while the left hemisphere (LH) is intact.

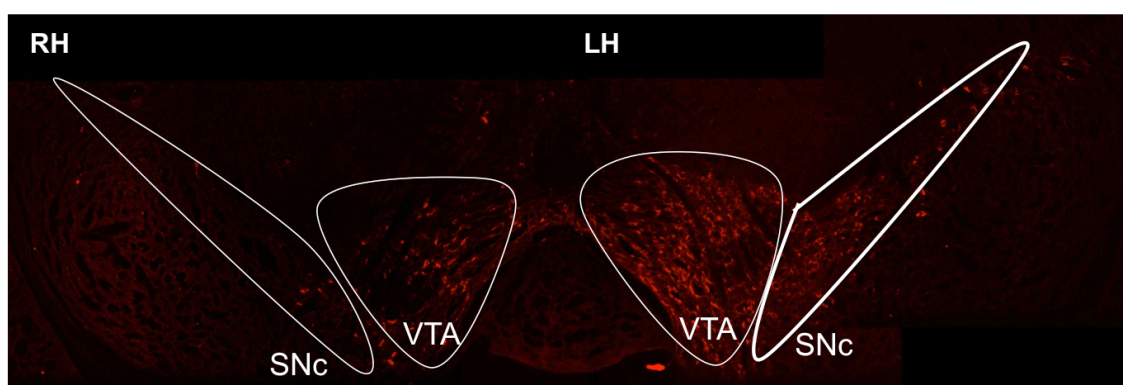


Figure 2 – Immunofluorescence to TH: Efficacy of the unilateral lesion with 6-OHDA showed by the loss of dopaminergic neurons in SNc of the right hemisphere (RH). SNc - Substantia Nigra pars compacta; VTA – Ventral Tegmental Area; LH – left hemisphere.

Experiment 1

Intravenous BMMC did not restore the motor impairment induced by PD model, assessed by rotarod test

To evaluate animals' motor function the rotarod test was performed three weeks after 6-OHDA injection (pre-transplant; day zero), as well as 10 and 30 days post-transplant. The mean drop latency was used to measure motor changes. GEE test did not reveal a significant interaction between groups and time ($P = 0.29$; Figure 3). In addition, it was not found significant difference between groups Saline-IV and CMMO-IV ($P = 0.22$) nor among times assessed ($P = 0.50$), indicating these cells, when transplanted by intravenous pathway, did not restore animals' motor function.

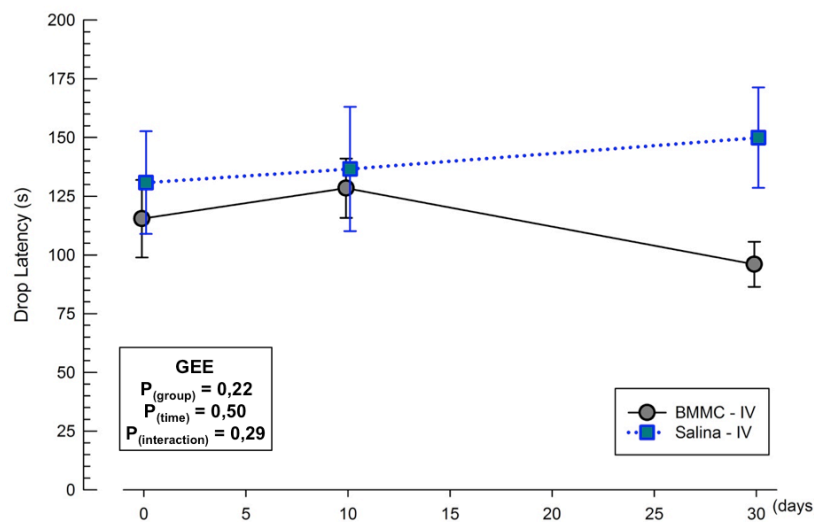


Figure 3 – Rotarod test performance over time. Drop latency (seconds) observed at day zero (pre-transplant) and at 10 and 30 days post-transplant. BMMC-IV (N=10) and Salina-IV (N=7) groups received intravenous injection of BMMC or saline, respectively. Data are presented as mean \pm SEM (GEE).

Intravenous BMMC didn't decrease the apomorphine-induced rotation caused by 6-OHDA MFB injection

We used the measure of contralateral rotations over time to evaluate whether BMMC i.v. transplant improved animals motor function. It was not verified significant interaction between groups and time ($P = 0.90$ in GEE; Figure 4). Furthermore, it was not shown significant difference between groups CMMO-IV and Saline-IV ($P = 0.51$) nor in animals' performance in the different times assessed ($P = 0.88$).

EGFP gene was detected in samples obtained from the brains of i.v. BMMC-transplanted animals

We employed a nested PCR analysis to determine whether *EGFP* gene from BMMC, transplanted systemically, could be detected in the brains of transplanted animals. Amplified *EGFP* gene was found in the brain of parkinsonian mice 1 h (Figure 5A), 24 h (Figure 5B) and 7 days (Figure 5C) following transplant. Analyses performed 15 and 30 days post-transplant were negative for the GFP gene (data not shown).

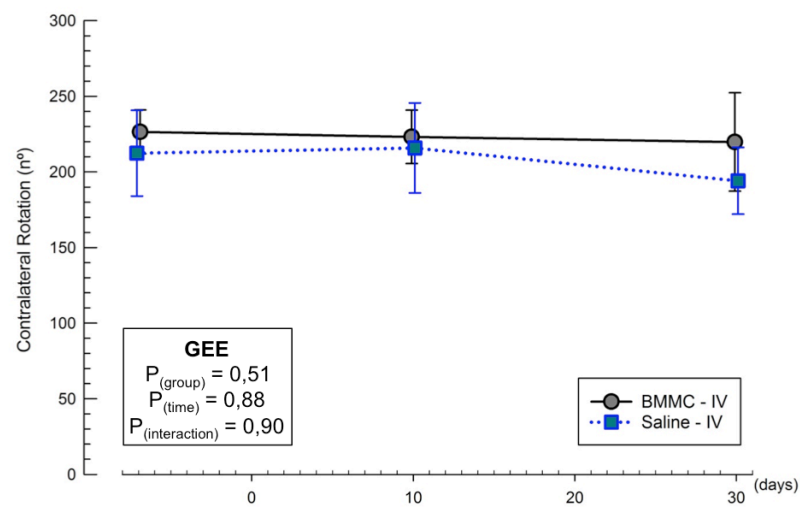


Figure 4 – Rotation number in apomorphine test over time. Number of contralateral rotations observed before (day -7) and 10 and 30 days after transplant. The transplant was carry out at day zero. BMMC-IV (N=10) and SAL-IV (N=7) groups received intravenous injection of BMMC or saline, respectively. Data are presented as mean \pm SEM (GEE).

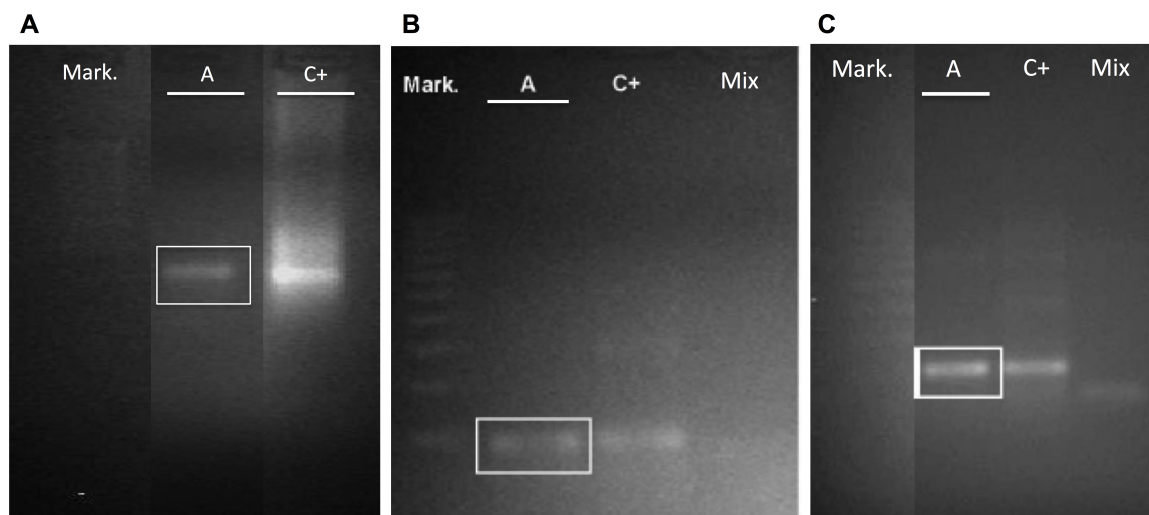


Figure 5 – PCR analysis after intravenous transplant. Two percent agarose gel with ethidium bromide staining. Mark.: molecular weight marker; A: brain samples; C+: positive control, DNA extracted from C57BL/6-EGFP mouse; Mix: negative control. A) 1h post-transplant; B) 24h post-transplant; C) 7 days post-transplant.

Very few cells were found in brain tissue after intravenous BMMC transplant

We also verified the survival and migration of BMMC to the mice brain, by IF, 24h and 7 days after intravenous transplant. Only a small amount of BMMC was found in the animals' brain, 24h post-transplant, confirming the findings from PCR. However, no cells were found at 7 days after BMMC injection (Figure 6).

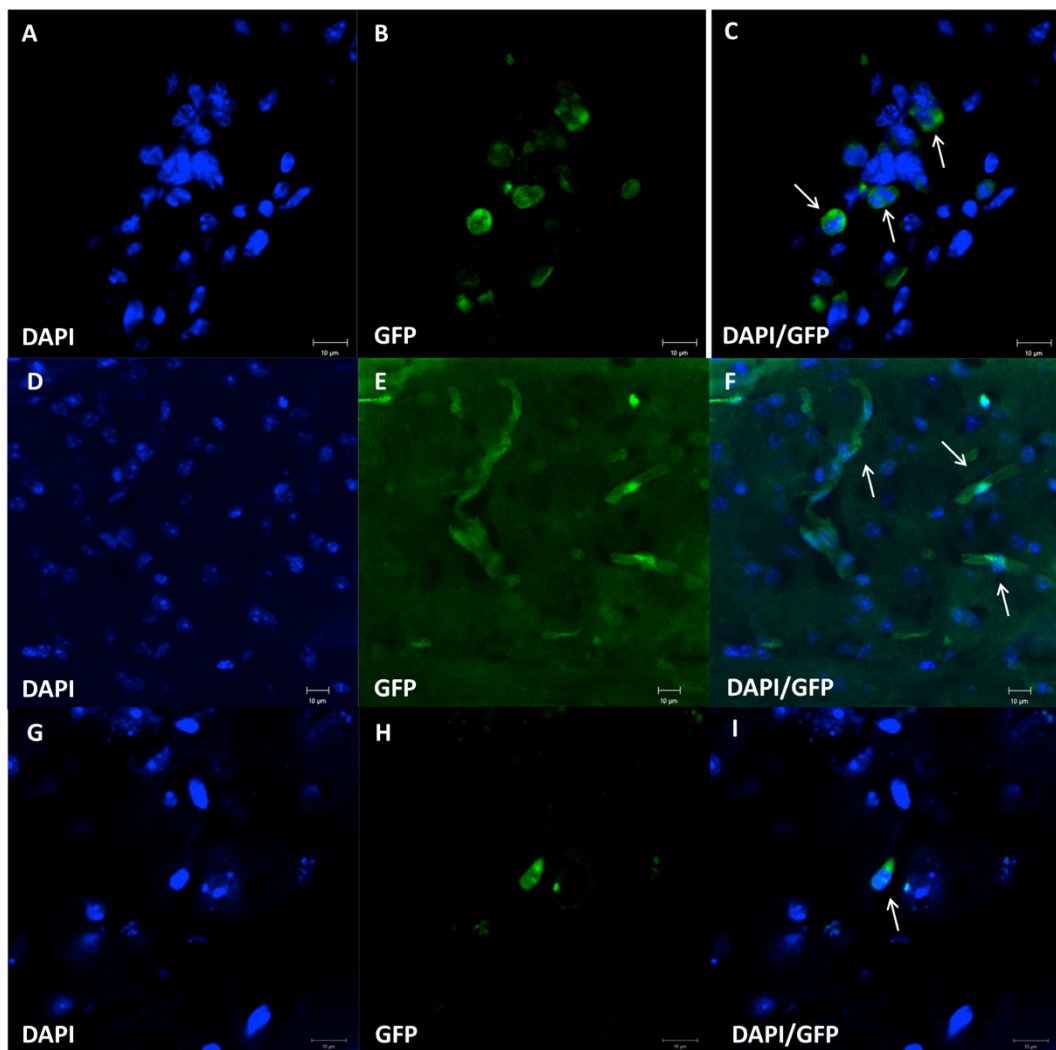


Figure 6 – Immunofluorescence to GFP 24h after intravenous transplant. Positive control 1 (A – C): BMMC-EGFP transplanted directly into mice brain. Positive control 2 (D – E): brain from a C57BL/6-EGFP mouse (cells donor). Samples (G – I): brain tissue of parkinsonian mice transplanted through the tail vein. Arrows indicate EGFP cells co-localized with DAPI.

Experiment 2

As the intravenous transplant of BMNC didn't have effects on parkinsonian mice's motor function, we assessed the therapeutic potential of the intrastriatal transplant of BMNC in DP induced mice.

Intrastriatal BMNC did not prevent or restore the impairment caused by 6-OHDA injection on rotarod test performance

Figure 7 shows the comparison of the mean of drop latency between groups, after lesion (pre-transplant) and 10 and 30 days after transplant. No significant interaction between groups and time was found ($P = 0.33$ in GEE). The GEE test showed, indeed, a significant effect of time ($P = 0.04$) in the animals performance. When the Sidak post hoc was applied, however, no differences were seen among times assessed.

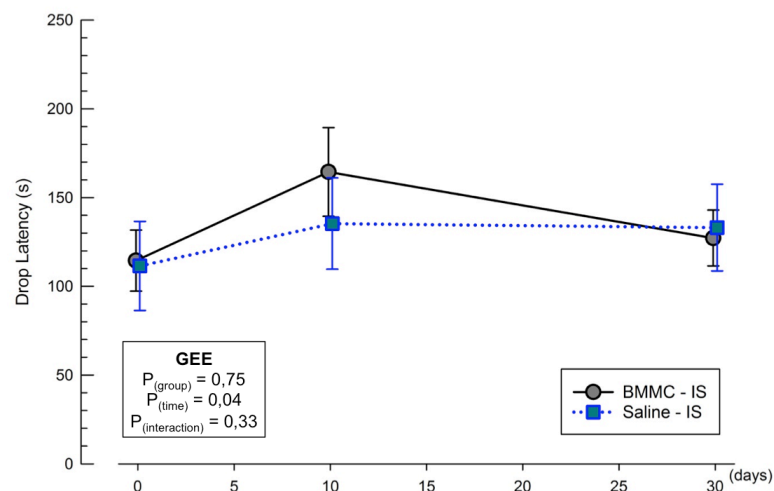


Figura 7: Rotarod test performance over time. Drop latency (seconds) observed at day zero (pre-transplant) and at 10 and 30 days post-transplant. BMMC-IS (N=9) and Saline-IS (N=6) groups received intrastriatal injection of BMNC or saline, respectively. Data are presented as mean \pm SEM (GEE).

The transplant of BMNC into parkinsonian mice's striatum seems to prevent the dopaminergic deficit, assessed by apomorphine-induced rotation test.

We used the apomorphine-induced rotation test as an indirect measure of the mice dopaminergic response. The GEE test showed a significant effect of time ($P=0.001$) in

animals' contralateral rotations number. The post hoc Sidak revealed that Saline-IS group performed a greater number of contralateral rotation 10 (172 ± 15.09 rotations; $P=0.027$) and 30 days post-transplant (170.43 ± 10.54 rotations; $P= 0.035$) in comparison to the test performed prior to the transplantation (115.86 ± 15.7 rotations). These data show a worsening of Saline-IS group, in 10 days post-transplant, that lasts till 30 days. The group CMMO-IS, however, presented a similar performance before (150.33 ± 17.02 rotations) and 10 days post-transplant (142.56 ± 20.16 ; $P >0.99$). On the test carried out 30 days after transplantation, there was an increase, but no statistic significant, of the rotations number (198 ± 24.08 rotations) compared to the period pre ($P= 0.22$) and 10 days post-transplant ($P = 0.062$). These results suggest that BMMC prevent, even temporarily, the progression of neuronal death induced by 6-OHDA, assessed indirectly by the apomorphine test. It was not shown, however, a significant interaction between the factors group and time ($P= 0.081$ in GEE; Figure 8), nor a significant difference between groups ($P = 0.56$ in GEE).

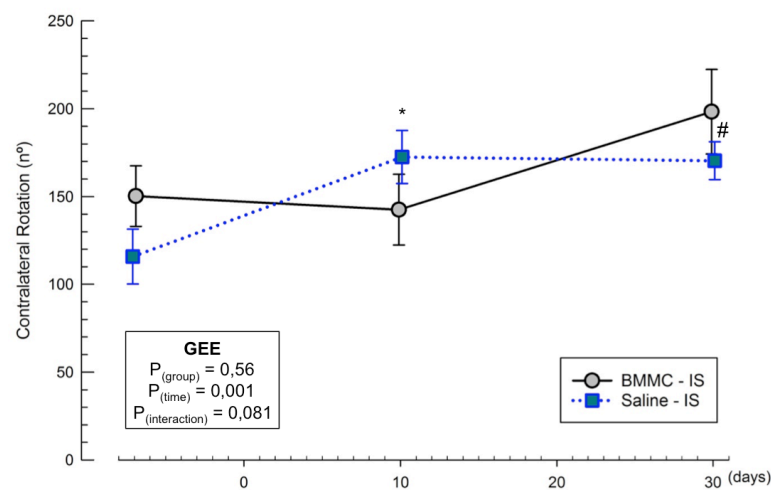


Figure 8: Rotation number in apomorphine test over time. Number of contralateral rotations observed before (day -7) and 10 and 30 days after transplant. The transplant was carry out at day zero. BMMC-IS (N=9) and Saline-IS (N=6) groups received intrastriatal injection of BMMC or saline, respectively. Data are presented as mean \pm SEM. * $P = 0.027$ vs. Saline-IS pre-transplant; # $P=0.035$ vs. Saline-IS pre-transplant, in Sidak post hoc, after GEE.

PCR analysis of mice brain showed the presence of GFP gene till 30 days after BMMC intrastriatal transplant

To evaluate the survival of BMMC, transplanted into the striatum of mice with PD, we tracked the GFP gene in the mice brains, by PCR. The presence of this gene was identified in the parkinsonian animals' brains 10 and 30 days post-transplant (Figure 9).

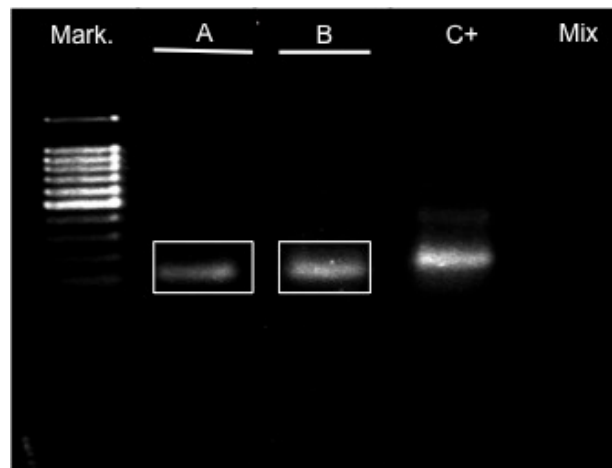


Figure 9 – PCR analysis after intrastriatal transplant. Two percent agarose gel with ethidium bromide staining. Mark.: molecular weight marker; A: 10 days post-transplant; B: 30 days post-transplant; C+: positive control, DNA extracted from C57BL/6-EGFP mouse; Mix: negative control.

BMMC transplanted into the striatum of parkinsonian mice were found 30 days post-transplant

To confirm the PCR results and to verify the presence of BMMC in the animals' brain, the immunofluorescence was done 10 and 30 days after transplant. Many EGFP cells were found into mice striatum, in both times assessed (Figure 10).

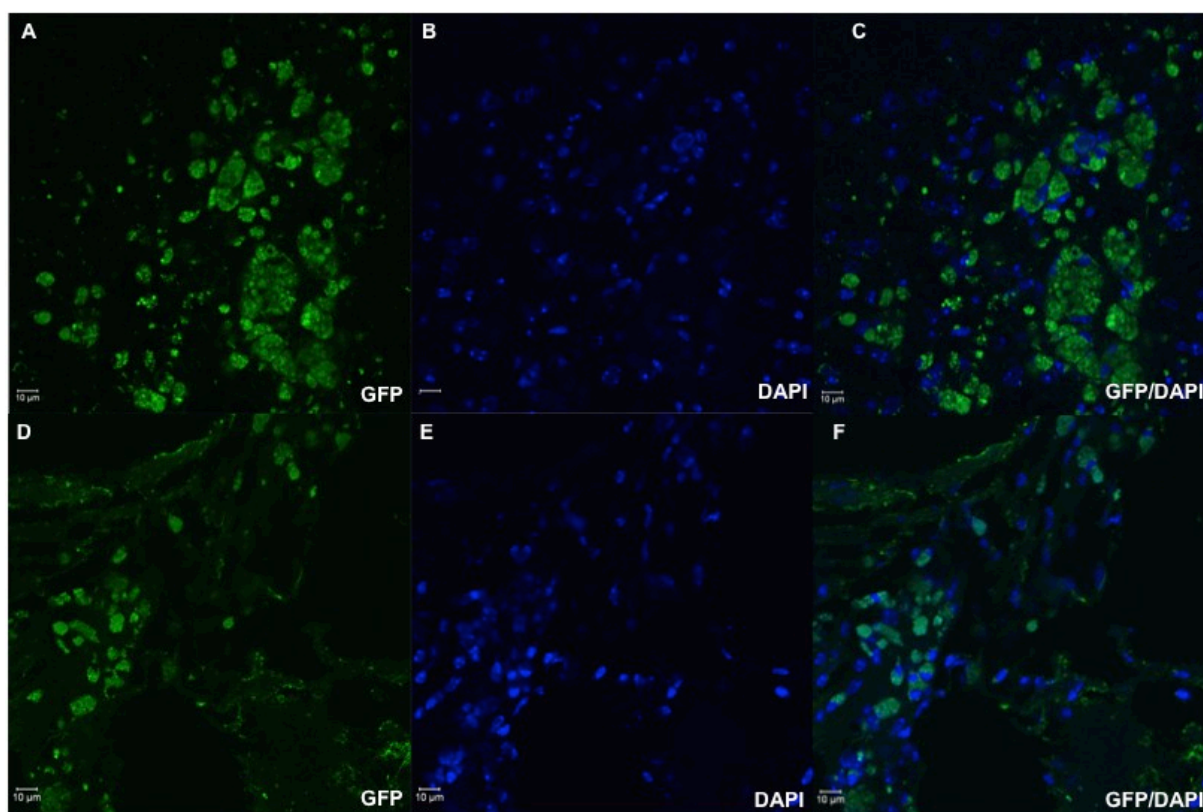


Figura 10 – Immunofluorescence to GFP after intrastriatal transplant. 10 days post-transplant (A – C); 30 days post-transplant (D – E). C and D represent BMMC-EGFP colocalized with DAPI.

Experiment 3

In an attempt to potentialize the effect of intrastriatal BMMC transplant, and perhaps, contribute to a motor function improvement, assessed by the rotarod test, we performed a second transplant of BMMC into the striatum of parkinsonian mice, 20 days after the first transplant.

Double intrastriatal transplant do not improve the parkinsonian mice motor function assessed by the rotarod test

The GEE test did not showed significant interaction between the factors group and time ($P=0.35$; Figure 11). Moreover, it was not verified significant difference between groups ($P=0.80$) or in the animals' performance on different times evaluated ($P=0.15$). Double transplantation of BMMC was not able to improve animals' motor function, assessed by rotarod test.

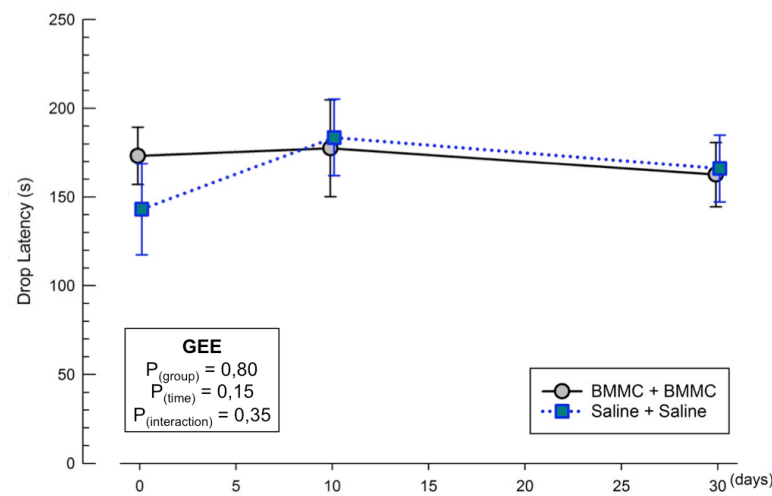


Figure 11: Rotarod test performance over time. Drop latency (seconds) observed at day zero (before) and at 10 and 30 days after the first transplant. BMMC + BMMC (N = 7) and Saline + Saline (N=5) groups received double intrastriatal injection of BMMC or saline, respectively. The first transplant was carry out at day zero and the second at day 20. Data are presented as mean \pm SEM (GEE).

A second intrastriatal BMMC transplant did not extend the effect seen 10 days post-transplant, in the apomorphine-induced rotation test

To elucidate if a second intrastriatal transplant could potentialize the dopaminergic response induced by BMMC in parkinsonian mice, these animals received again an injection of BMMC into the right striatum, 20 days after the first transplant. It was demonstrated a significant interaction between the factors group and time ($P=0.006$ in GEE; Figure 12), although it has not been verified a statistic significant difference between groups ($P=0.29$). The test GEE also revealed a significant difference in the animals' performance on the various times studied ($P=0.004$). Sidak post hoc indicated a worsening of Saline + Saline group 10 days post-transplant (371.2 ± 41.82 rotations), verified by the increase of rotations' number in comparison to the time pre-transplant (244.2 ± 26.86 rotations; $P = 0.001$) and compared to BMMC + BMMC group pre-transplant (203 ± 27.37 rotations; $P = 0.011$). BMMC + BMMC group, however, kept constant the rotations number 10 days post-transplant (235.62 ± 47.22 rotations) in comparison to the test performed before transplantation (203 ± 27.37 rotations; $P>0.99$). It was verified, indeed, a significant increase in rotations number, 30 days post-transplant (346.78 ± 33.08 rotations; $P<0.001$) compared to the test pre-transplant. These data

confirm the result obtained previously, with the single injection, demonstrating that BMMC protect, temporarily, the animal from neuronal death induced by 6-OHDA, evaluated indirectly by apomorphine test. However, the second injection of BMMC was not able to keep this effect.

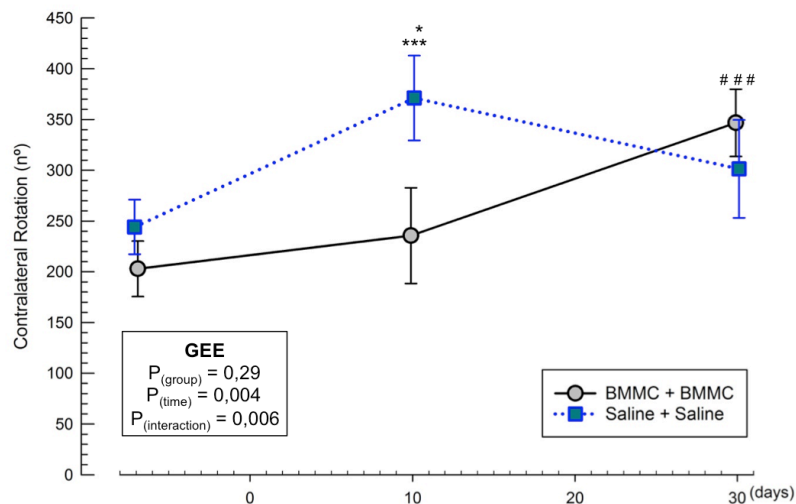


Figure 12 - Rotation number in apomorphine test over time. Number of contralateral rotations observed before (day -7) and 10 and 30 days after the first transplant. BMMC + BMMC (N=7) and Saline + Saline (N=5) groups received double intrastriatal injection of BMMC or saline, respectively. The first transplant was carry out at day zero and the second at day 20. Data are presented as mean \pm SEM. *P = 0.011 vs. BMMC + BMMC pre-transplant; ***P = 0.001 vs. Saline + Saline pre-transplant; ###P<0.001 vs. BMMC + BMMC pre-transplant, in Sidak post hoc, after GEE.

GFP gene is found in mice brain 30 days after the second BMMC intrastriatal transplant

To assess the survival of BMMC, transplanted into mice striatum, we performed PCR analyses in the brain tissue. The presence of the GFP gene was found at 30 days after the second transplant (Figure 13).

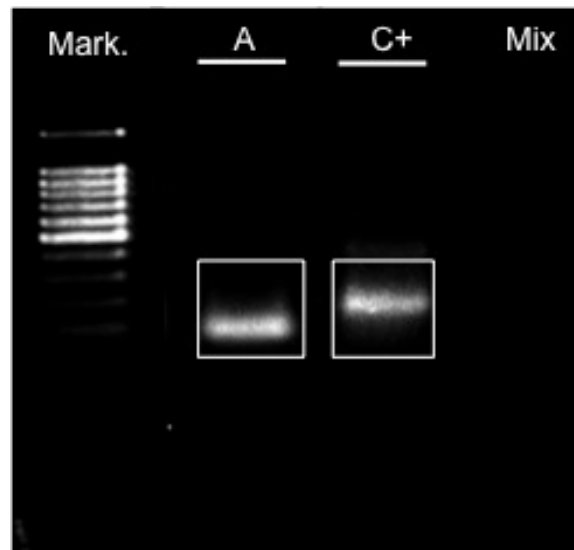


Figure 13 – PCR analysis after double intrastriatal transplant. Two percent agarose gel with ethidium bromide staining. Mark.: molecular weight marker; A:30 days after the second transplant; C+: positive control, DNA extracted from C57BL/6-EGFP mouse; Mix: negative control.

BMMC were identified in mice brain 30 days after the second transplant

We also assessed the presence of BMMC in the mice brain, by immunofluorescence to GFP, 30 days after the second transplant. Many EGFP cells were seen at this time (Figure 14).

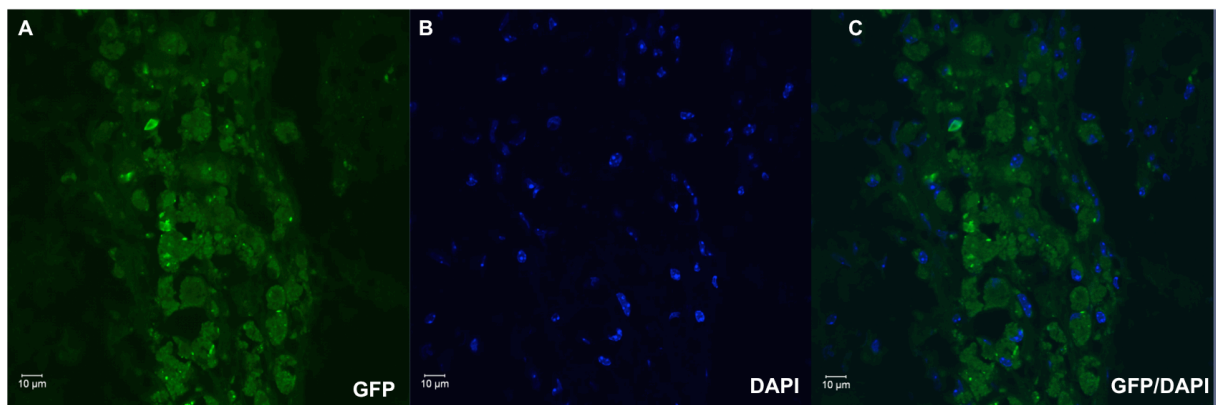


Figure 14 – Immunofluorescence to GFP after double intrastriatal transplant. 30 days after the second transplant (A – C); C represents BMMC-EGFP co-localized with DAPI.

Discussion

The present study evaluated the effect of intravenous BMMC transplant on the motor function of animals with PD, assessed by the rotarod and apomorphine-induced rotation tests. Most pre-clinical studies involving stem cells in PD carry out the transplant, directly into the animals' brains (CAPITELLI *et al.*, 2014). Given that changes in the BBB were described in patients with PD (KORTEKAAS *et al.*, 2005; PERSIDSKY *et al.*, 2006) and in animals' model of the disease (CARVEY *et al.*, 2005; CHAO *et al.*, 2009; CAPITELLI *et al.*, 2014), the intravenous pathway to the cellular therapy seems a promising alternative, due to its easy clinical application.

The drop latency of parkinsonian mice, on rotarod test, was assessed, in our study, before (day zero), 10 and 30 days after BMMC intravenous transplant. It was not found, however, significant difference in the performance of BMMC-IV group compared to Saline-IV group. Some studies have demonstrated that transplant of MSCs, differentiated in culture or not, into striatum of parkinsonian rodents, increases drop latency in the rotarod test (LI *et al.*, 2001; BAHAT-STROOMZA *et al.*, 2009). Differences in study designs, including the concentrations and/or types of transplanted stem cells and route of infusion, could explain the opposite motor task results found by our group, besides the differences in the test protocols used in this evaluation.

Our study also evaluated the motor function by the apomorphine-induced rotation test. BMMC treatment did not significantly modify apomorphine-induced rotational asymmetry compared to the Saline-IV group. Wang and colleagues (2010) demonstrated that MSCs transplanted through the femoral vein, 2h after 6-OHDA infusion, decreased the apomorphine-induced rotational rate. Besides the cellular type used, our study differs by the time post-lesion that the cell injection was carried out, which appears crucial to the therapeutic effect of the stem cells. Accordingly, acute transplantation of these cells seems to be more effective.

Our results, obtained by PCR and immunofluorescence to GFP, can help to understand why no BMMC effect on animals' motor function was seen. PCR demonstrated that the gene of BMMC-EGFP, transplanted 3 weeks post-lesion with 6-OHDA, was present up to 7 days post-transplant. However, only a small amount of cells reached the brain tissue and could be found, only 24h post-transplant, stained with GFP in immunofluorescence. The difference in the findings of the two technics is justified because PCR, besides being a more sensitive test,

uses fresh tissue, enabling to find DNA from BMMC both in the brain tissue and blood circulation, different from immunofluorescence where the brain was perfused. These results suggest that the BMMC survive longer, systemically, than in the brain of PD animals. In addition, these data can reflect a greater systemic cells' concentration, considering its route of administration.

Studies identified the presence of BMMC and/or MSCs for up to 7 days after i.v. transplant in parkinsonian rat brains (WANG *et al.*, 2010; CAPITELLI *et al.*, 2014). The difference in our results can be explained by the time when the cells were injected. Although the BBB disruption can be observed for up to, at least, 34 days after MFB lesion with 6-OHDA (CARVEY *et al.*, 2005), our BMMC, transplanted 3 weeks post-lesion, failed to migrate till the mice brain in large amounts. Wang (2010) and Capitelli (2014) *et al.*, however, injected the cells at most 24h post-model induction. Since lesion is considered acute at this time, it may have attracted a greater number of cells, promoting greater adherence and survival of these cells. Migration of transplanted cells to the lesioned area may have occurred due to an inflammatory process triggered by 6-OHDA injection (GRUNBLATT *et al.*, 2000; HELLMANN *et al.*, 2006).

In addition, we also assessed the efficacy of the BMMC intrastriatal transplant in mice submitted to the 6-OHDA PD model (experiment 2 and 3). The present study demonstrated relevant differences over time in the apomorphine test, whereas the groups treated with saline presented a rotational behavior different from that verified in the groups transplanted with BMMC, in the different times evaluated. There was no significant difference, however, when compared the groups BMMC-IS with Saline-IS or BMMC + BMMC with Saline + Saline, in each time assessed. These findings may be explained by the variability of the dopaminergic lesion induced by 6-OHDA. Studies demonstrate that this model of PD can promote a decrease between 12 and 97% of the dopaminergic neurons (IANCU *et al.*, 2005). Thus, the intragroup evaluation over the time seems to be more effective to demonstrate the effects of the different therapeutic interventions used.

In experiment 2, three weeks after MFB lesion by 6-OHDA, parkinsonian mice received an intrastriatal injection of BMMC or saline. No difference was found in the motor function analyzed by the rotarod test 10 and 30 days post-transplant, between groups, nor intragroups on the different times assessed. In the apomorphine test, however, Saline-IS group presented, in the evaluations at 10 and 30 days after transplantation, a significant increase in the rotational asymmetry, compared to rotations number pre-transplant. On the other hand, the

BMMC-IS group maintained constant the number of contralateral rotations, 10 days post-transplant compared to the test performed pre-transplant, demonstrating an increase of these rotations, no statistic significant, only 30 days after transplantation.

These data suggest dissociation between the dopaminergic response and the animal's motor function, demonstrating that the improvement seen 10 days after BMMC-IS transplant, in the apomorphine test, doesn't reflect in the improvement of the motor function in general. Apomorphine is a dopamine agonist that acts stimulating dopamine receptors that are supersensitive after nigrostriatal pathway degeneration (UNGERSTEDT, 1971; HEFTI *et al.*, 1980). Apomorphine injection promotes contralateral rotations (from lesioned side) and this number is related to the degree of nigrostriatal circuit lesion (BOVE e PERIER, 2012). Rotarod test, however, according to Iancu and colleagues (2005), is the motor spontaneous test that better reflects the neuronal loss at the SN. However, this test evaluates animals' motor coordination (BAHAT-STROOMZA *et al.*, 2009), and does not depend on dopaminergic control, alone. Thus, other motor pathways can be activated, when running this test, and hide a basal ganglia dysfunction and/or recovery. Hence, BMMC transplanted directly into the mice striatum seems to act on the dopaminergic response, effect that does not result in improvement of the motor function on the rotarod test.

To elucidate the mechanisms involved in this dissociated effect of BMMC, new studies need to be carrying out. A similar result was seen when compared the decrease in dopamine levels, after 6-OHDA injection into rats' striatum, and the animals' performance on lateral stepping test. Na and colleagues (2010) showed that 6-OHDA induces a reduction of over 80% on dopamine levels in the striatum, the three first days post-lesion and, this decrease persists for 4 weeks after model induction. On the other hand, although the performance on the *stepping test* was impaired immediately after the striatum lesion, an improvement can be demonstrated in this test, starting from 7 days, and continuing for at least 4 weeks (greatest estimated time).

Our study also demonstrated that the increase of rotational asymmetry seen on the groups treated with saline, in 10 days after transplant, occurs only in 30 days on the groups treated with BMMC. These results suggest that these cells prevent the progression of the neuronal loss and/or the decrease of dopamine levels caused by the 6-OHDA, however this effect seems to be short-term. We believe that the microglia and the inflammatory process may be involved in the BMMC mechanism of action.

Studies have shown that microglia seems to be involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, as Alzheimer's disease (CAGNIN *et al.*, 2001) and PD (apud MCGEER *et al.*, 1988; KIM *et al.*, 2009). Marinova-Mutafchieva and colleagues (2009) demonstrated that activated microglia participates in the cellular death caused by 6-OHDA injection into the MFB. Researchers describe, also, that the activation of microglia occurs before the neuronal loss and that, once activated, promotes continuously, this neurodegeneration (GAO *et al.*, 2002; CHO *et al.*, 2006). Furthermore, Kim and colleagues (2009) confirmed that the MSCs transplant reduces the loss of TH⁺ neurons through decrease of the activated microglia and TNF- α . Thus, we can postulate that the protector effect of BMMC seen, 10 days post-transplant, in the apomorphine test, occurs due to the delay in the microglia activation, that, thereafter, prevent the neurodegeneration progress. The transplant of these cells, however, seems to postpone, but not permanently block the microglia activation, what explains the deficit on dopaminergic response seen 30 days after transplant, through the increase of rotational asymmetry.

Based on a clinical study that demonstrate that double transplant of hESC-derived dopaminergic neurons in patients with PD improves the motor score UPDRS, for 18 years (KEFALOPOULOU *et al.*, 2014), we designed the experiment 3. In an attempt to potentialize the BMMC effects we performed a double transplant into the parkinsonian mice striatum. The first transplant was carry out at day zero and the second one at day 20. As describe before, animals were assessed on rotarod and apomorphine-induced rotation tests, before and 10 and 30 days after the first transplant. The second cells injection, however, was unable to maintain the effect seen 10 days after transplant, in the apomorphine test, not preventing the rotational increase seen on the group treated with BMMC, 30 days after transplantation. The animals' performance on rotarod test continued showing no difference between groups, or over the time.

Again, the immunoinflammatory response, mediated by microglia, seems to be involved in the effect of intrastriatal transplant of BMMC in parkinsonian mice. Studies showed that the inflammation peak caused, by 6-OHDA injection into the striatum, occurs 3 weeks after the model induction (CICCHETTI *et al.*, 2002). Thus, the first transplant was carried out exactly at this point, what guaranteed the therapeutic effect of these cells, even if transitory. The second transplant, however, was performed around 40 days after 6-OHDA lesion. We suggest, then, that the late transplant of BMMC is unable to prevent the microglia activation induced by 6-OHDA.

Moreover, de Vasconcelos dos Santos and colleagues (2010) assessed the therapeutic window to the treatment of ischemia in rats. It was showed that the intravenous transplant of BMMC promotes the improvement of animals' performance on cylinder test; only when carry out 1 and 7 days post-ischemia, but not 14 or 30 days. These data are in accordance with our results, confirming that the late transplant of BMMC don't show therapeutic effect. This leads us to believe that the time, in which the transplant is performed, it is essential for BMMC to have a therapeutic effect in PD. These data are in accordance to our hypothesis that BMMC restore or prevent the deficit of the dopaminergic response caused by 6-ODA, acting as a barrier to the microglia activation. Further studies involving the assessment of dopamine, TH+ neurons and microglia should be conducted to prove these hypotheses.

Our study also evaluated the survival of BMMC injected directly into parkinsonian mice striatum. The transplanted cells were detected, either by PCR and immunofluorescence, for up to 30 days after the first and the second transplantation. These data suggest that, even if present in brain tissue, these cells have a function threshold and seem to not definitely hold the microglia activation and the consequent neuronal death. Similar findings were published by Webber and colleagues (2007) regarding to the transplant of neural progenitors to spinal cord injury recovery, in rats. Researchers showed that these cells survive up to 6 weeks, although the behavioral improvement has being seen only up to 35 days post-transplant. These results also reinforce that the presence of BMMC in the injured tissue is not enough to recover it and that the microenvironment where the cells are, is essential to its therapeutic effects. In addition, our results indicated that the inflammatory response can be crucial to the treatment of PD animals, but not for the survival of transplanted cells, at least when injected directly into the interested area.

Conclusion

With this study we can conclude that, intrastriatal BMMC, but not intravenous, have a short-term therapeutic effect on dopaminergic response of parkinsonian mice assessed by the apomorphine-induced rotation test. This potential is not seen on rotarod test, showing dissociation between dopaminergic response and motor function. These results are of great importance and may, in the future, contribute to cell therapy in Parkinson's disease in the clinical practice. However, further experiments are needed to elucidate the mechanisms involved in these effects.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do RS and Pandurata Ltda, Brazil.

References

ABOU-SLEIMAN, P. M. et al. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 54, n. 3, p. 283-6, Sep 2003. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

BAGHERI, H. et al. A study of salivary secretion in Parkinson's disease. **Clin Neuropharmacol**, v. 22, n. 4, p. 213-5, Jul-Aug 1999. ISSN 0362-5664 (Print) 0362-5664 (Linking).

BAHAT-STROOMZA, M. et al. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. **J Mol Neurosci**, v. 39, n. 1-2, p. 199-210, Sep 2009. ISSN 1559-1166 (Electronic) 0895-8696 (Linking).

BANDOPADHYAY, R.; DE BELLEROCHE, J. Pathogenesis of Parkinson's disease: emerging role of molecular chaperones. **Trends Mol Med**, v. 16, n. 1, p. 27-36, Jan 2009. ISSN 1471-499X (Electronic) 1471-4914 (Linking).

BARBERI, T. et al. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 10, p. 1200-7, Oct 2003. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking).

BARTELS, A. L. et al. Blood-brain barrier P-glycoprotein function is not impaired in early Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14, n. 6, p. 505-8, Aug 2008. ISSN 1353-8020 (Print) 1353-8020 (Linking).

BERARDELLI, A. et al. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. **Brain**, v. 124, n. Pt 11, p. 2131-46, Nov 2001. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking).

BJORKLUND, A. et al. Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. **Brain Res**, v. 199, n. 2, p. 307-33, Oct 20 1980. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

BJORKLUND, A.; STENEVI, U. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. **Brain Res**, v. 177, n. 3, p. 555-60, Nov 30 1979. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

BLANDINI, F. et al. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. **Cell Transplant**, v. 19, n. 2, p. 203-17, 2010. ISSN 1555-3892 (Electronic) 0963-6897 (Linking).

BONIFATI, V. et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. **Science**, v. 299, n. 5604, p. 256-9, Jan 10 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

BOVE, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51-76, Jun 1 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking).

BRAZELTON, T. R. et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1775-9, Dec 1 2000. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

BRIGNIER, A. C.; GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S336-44, Feb 2010. ISSN 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking).

BROXMEYER, H. E. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 10, p. 3828-32, May 1989. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

BUCHHEISER, A. et al. Cord blood for tissue regeneration. **J Cell Biochem**, v. 108, n. 4, p. 762-8, Nov 1 2009. ISSN 1097-4644 (Electronic) 0730-2312 (Linking).

BUZANSKA, L. et al. Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. **Stem Cells Dev**, v. 15, n. 3, p. 391-406, Jun 2006. ISSN 1547-3287 (Print) 1547-3287 (Linking).

CAGNIN, A. et al. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. **Lancet**, v. 358, n. 9280, p. 461-7, Aug 11 2001. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking).

CAI, J. et al. Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats. **Stem Cells Dev**, v. 19, n. 7, p. 1017-23, Jul 2010. ISSN 1557-8534 (Electronic) 1547-3287 (Linking).

CAPITELLI, C. S. et al. Opposite effects of bone marrow-derived cells transplantation in MPTP-rat model of Parkinson's disease: a comparison study of mononuclear and mesenchymal stem cells. **Int J Med Sci**, v. 11, n. 10, p. 1049-64, 2014. ISSN 1449-1907 (Electronic) 1449-1907 (Linking).

CARRION, M. J. M.; VENTURIN, G. T.; DACOSTA, J. C. Potencial terapêutico das células-tronco de medula óssea no tratamento da epilepsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2009.

CARVEY, P. M. et al. 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 1158-68, Sep 2005. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking).

CHAO, Y. X.; HE, B. P.; TAY, S. S. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. **J Neuroimmunol**, v. 216, n. 1-2, p. 39-50, Nov 30 2009. ISSN 1872-8421 (Electronic) 0165-5728 (Linking).

CHO, B. P. et al. Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. **Glia**, v. 53, n. 1, p. 92-102, Jan 1 2006. ISSN 0894-1491 (Print) 0894-1491 (Linking).

CICCHETTI, F. et al. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. **Eur J Neurosci**, v. 15, n. 6, p. 991-8, Mar 2002. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking).

COGLE, C. R. et al. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. **Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1432-7, May 1 2004. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).

COSTA-FERRO, Z. S. et al. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. **Neurobiol Dis**, v. 46, n. 2, p. 302-13, May 2012. ISSN 1095-953X (Electronic) 0969-9961 (Linking).

DAMIER, P. et al. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. **Brain**, v. 122 (Pt 8), p. 1437-48, Aug 1999. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking).

DANIELYAN, L. et al. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. **Rejuvenation Res**, v. 14, n. 1, p. 3-16, Feb 2011. ISSN 1557-8577 (Electronic) 1549-1684 (Linking).

DE PAULA, S. et al. 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**, v. 210, p. 431-41, May 17 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking).

DE PAULA, S. et al. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica** v. 15, n. 4, p. 263 - 269, 2005.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A. et al. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Res**, v. 1306, p. 149-58, Jan 8 2010. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

DELCROIX, G. J. et al. The therapeutic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells combined with pharmacologically active microcarriers transplanted in hemiparkinsonian rats. **Biomaterials**, v. 32, n. 6, p. 1560-73, Feb 2011. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking).

DELEIDI, M. et al. Development of histocompatible primate-induced pluripotent stem cells for neural transplantation. **Stem Cells**, v. 29, n. 7, p. 1052-63, Jul 2011. ISSN 1549-4918 (Electronic) 1066-5099 (Linking).

DEMEULE, M. et al. Isolation of endothelial cells from brain, lung, and kidney: expression of the multidrug resistance P-glycoprotein isoforms. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 281, n. 3, p. 827-34, Mar 2 2001. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking).

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249 (Print) 1465-3249 (Linking).

EBERSBACH, G. et al. Scales in Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 253 Suppl 4, p. IV32-5, Aug 2006. ISSN 0340-5354 (Print) 0340-5354 (Linking).

EINSTEIN, O.; BEN-HUR, T. The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases. **Arch Neurol**, v. 65, n. 4, p. 452-6, Apr 2008. ISSN 1538-3687 (Electronic) 0003-9942 (Linking).

ENGELENDER, S. et al. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. **Nat Genet**, v. 22, n. 1, p. 110-4, May 1999. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking).

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, v. 109, n. 1, p. 235-42, Apr 2000. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking).

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-6, Jul 9 1981. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

FAHN, S. et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 351, n. 24, p. 2498-508, Dec 9 2004. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking).

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 139-54, Jan 2004. ISSN 1545-5343 (Print) 1545-5343 (Linking).

FREED, C. R. et al. Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 327, n. 22, p. 1549-55, Nov 26 1992. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

FREED, C. R. et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 344, n. 10, p. 710-9, Mar 8 2001. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

FU, Y. S. et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. **Stem Cells**, v. 24, n. 1, p. 115-24, Jan 2006. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099 (Linking).

FUCHS, E.; SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 143-55, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).

FUNAYAMA, M. et al. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. **Ann Neurol**, v. 51, n. 3, p. 296-301, Mar 2002. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

GAO, H. M. et al. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 782-90, Feb 1 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking).

GEHRMANN, J.; MATSUMOTO, Y.; KREUTZBERG, G. W. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 20, n. 3, p. 269-87, Mar 1995.

GLAVASKI-JOKSIMOVIC, A. et al. Reversal of dopaminergic degeneration in a parkinsonian rat following micrografting of human bone marrow-derived neural progenitors. **Cell Transplant**, v. 18, n. 7, p. 801-14, 2009. ISSN 1555-3892 (Electronic) 0963-6897 (Linking).

GLUCKMAN, E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **N Engl J Med**, v. 321, n. 17, p. 1174-8, Oct 26 1989. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

GOLBE, L. I. et al. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 27, n. 3, p. 276-82, Mar 1990. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

GOLBE, L. I. et al. Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. **Ann Neurol**, v. 40, n. 5, p. 767-75, Nov 1996. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

GOLDMAN, J. G.; GOETZ, C. G. James Parkinson. In: EBADI, M. S. (Ed.). **Parkinson's Disease**: CRC Press, 2005. cap. 1, p.1050.

GREALISH, S. et al. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 31, n. 12, p. 2266-78, Jun 2010. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking).

GRUNBLATT, E.; MANDEL, S.; YODIM, M. B. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 262-73, 2000. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking).

HAGELL, P. et al. Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. **Brain**, v. 122 (Pt 6), p. 1121-32, Jun 1999. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking).

HARGUS, G. et al. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 36, p. 15921-6, Sep 7 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).

HARRIS, D. T.; ROGERS, I. Umbilical cord blood: a unique source of pluripotent stem cells for regenerative medicine. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 2, n. 4, p. 301-9, Dec 2007. ISSN 1574 888X (Print).

HATANO, Y. et al. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. **Ann Neurol**, v. 56, n. 3, p. 424-7, Sep 2004. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

HAUSER, R. A. et al. Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 56, n. 2, p. 179-87, Feb 1999. ISSN 0003-9942 (Print) 0003-9942 (Linking).

HEALY, D. G.; ABOU-SLEIMAN, P. M.; WOOD, N. W. PINK, PANK, or PARK? A clinicians' guide to familial parkinsonism. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 11, p. 652-62, Nov 2004. ISSN 1474-4422 (Print) 1474-4422 (Linking).

HEFTI, F.; MELAMED, E.; WURTMAN, R. J. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. **Brain Res**, v. 195, n. 1, p. 123-37, Aug 11 1980. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

HELLMANN, M. A. et al. Increased survival and migration of engrafted mesenchymal bone marrow stem cells in 6-hydroxydopamine-lesioned rodents. **Neurosci Lett**, v. 395, n. 2, p. 124-8, Mar 6 2006. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking).

HELY, M. A. et al. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. **Mov Disord**, v. 23, n. 6, p. 837-44, Apr 30 2008. ISSN 1531-8257 (Electronic) 0885-3185 (Linking).

HOCHSTRASSER, M. Protein degradation or regulation: Ub the judge. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 813-5, Mar 22 1996. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).

HUGHES, A. J. et al. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. **Brain**, v. 125, n. Pt 4, p. 861-70, Apr 2002. ISSN 0006-8950 (Print) 0006-8950 (Linking).

HUGHES, A. J.; DANIEL, S. E.; LEES, A. J. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. **Neurology**, v. 57, n. 8, p. 1497-9, Oct 23 2001. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878 (Linking).

IANCU, R. et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behav Brain Res**, v. 162, n. 1, p. 1-10, Jul 1 2005. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking).

IMAYOSHI, I. et al. Continuous neurogenesis in the adult brain. **Dev Growth Differ**, v. 51, n. 3, p. 379-86, Apr 2009. ISSN 1440-169X (Electronic) 0012-1592 (Linking).

ISACSON, O. Problems and solutions for circuits and synapses in Parkinson's disease. **Neuron**, v. 43, n. 2, p. 165-8, Jul 22 2004. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking).

JANG, Y. K. et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. **J Neurosci Res**, v. 75, n. 4, p. 573-84, Feb 15 2004. ISSN 0360-4012 (Print) 0360-4012 (Linking).

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368-76, Apr 2008. ISSN 1468-330X (Electronic) 0022-3050 (Linking).

JONES, E.; MCGONAGLE, D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. **Rheumatology (Oxford)**, v. 47, n. 2, p. 126-31, Feb 2008. ISSN 1462-0332 (Electronic) 1462-0324 (Linking).

KATZENSCHLAGER, R. et al. Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. **Neurology**, v. 71, n. 7, p. 474-80, Aug 12 2008. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking).

KEFALOPOULOU, Z. et al. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. **JAMA Neurol**, v. 71, n. 1, p. 83-7, Jan 2014. ISSN 2168-6157 (Electronic) 2168-6149 (Linking).

KELLY, S. et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 32, p. 11839-44, Aug 10 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

KIM, B. O. et al. Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. **Circulation**, v. 112, n. 9 Suppl, p. I96-104, Aug 30 2005. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking).

KIM, J. H. et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 50-6, Jul 4 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

KIM, Y. J. et al. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. **Glia**, v. 57, n. 1, p. 13-23, Jan 1 2009. ISSN 1098-1136 (Electronic) 0894-1491 (Linking).

KOGLER, G. et al. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. **Exp Hematol**, v. 33, n. 5, p. 573-83, May 2005. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking).

KOGLER, G. et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **J Exp Med**, v. 200, n. 2, p. 123-35, Jul 19 2004. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking).

KOGLER, G.; SENSKEN, S.; WERNET, P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. **Exp Hematol**, v. 34, n. 11, p. 1589-95, Nov 2006. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking).

KOPEN, G. C.; PROCKOP, D. J.; PHINNEY, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into

neonatal mouse brains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 19, p. 10711-6, Sep 14 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

KORBLING, M.; ESTROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. **Bone Marrow Transplant**, v. 32 Suppl 1, p. S23-4, Aug 2003. ISSN 0268-3369 (Print) 0268-3369 (Linking).

KORTEKAAS, R. et al. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. **Ann Neurol**, v. 57, n. 2, p. 176-9, Feb 2005. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

KRAUSE, D. S. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v. 105, n. 3, p. 369-77, May 4 2001. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).

KRUGER, R. et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Nat Genet**, v. 18, n. 2, p. 106-8, Feb 1998. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking).

LE, W. D. et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. **Nat Genet**, v. 33, n. 1, p. 85-9, Jan 2003. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking).

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055-66, Jun 13 2009. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).

LEES, A. J. et al. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. **Mov Disord**, v. 23, n. 6, p. 777-83, Apr 30 2008. ISSN 1531-8257 (Electronic) 0885-3185 (Linking).

LEIST, M. et al. The biological and ethical basis of the use of human embryonic stem cells for in vitro test systems or cell therapy. **ALTEX**, v. 25, n. 3, p. 163-90, 2008. ISSN 1868-596X (Print) 1868-596X (Linking).

LEROY, E. et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. **Nature**, v. 395, n. 6701, p. 451-2, Oct 1 1998. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

LI, M. et al. Human umbilical vein-derived dopaminergic-like cell transplantation with nerve growth factor ameliorates motor dysfunction in a rat model of Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 35, n. 10, p. 1522-9, Oct 2010. ISSN 1573-6903 (Electronic) 0364-3190 (Linking).

LI, W.; DING, S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 1, p. 36-45, Jan 2009. ISSN 1873-3735 (Electronic) 0165-6147 (Linking).

LI, Y. et al. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 316, n. 2, p. 67-70, Dec 2001. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking).

LIMOUSIN, P.; MARTINEZ-TORRES, I. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. **Neurotherapeutics**, v. 5, n. 2, p. 309-19, Apr 2008. ISSN 1933-7213 (Print) 1878-7479 (Linking).

LINDVALL, O. et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. **Science**, v. 247, n. 4942, p. 574-7, Feb 2 1990. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

LUCKING, C. B. et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. **N Engl J Med**, v. 342, n. 21, p. 1560-7, May 25 2000. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

MA, D. K. et al. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. **Cell Res**, v. 19, n. 6, p. 672-82, Jun 2009. ISSN 1748-7838 (Electronic) 1001-0602 (Linking).

MADRAZO, I. et al. Fetal homotransplants (ventral mesencephalon and adrenal tissue) to the striatum of parkinsonian subjects. **Arch Neurol**, v. 47, n. 12, p. 1281-5, Dec 1990. ISSN 0003-9942 (Print) 0003-9942 (Linking).

MADRAZO, I. et al. Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 318, n. 1, p. 51, Jan 7 1988. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L. et al. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 110, n. 3, p. 966-75, Aug 2009. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking).

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 12, p. 7634-8, Dec 1981. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

MARX, F. P. et al. Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 11, p. 1223-31, Jun 1 2003. ISSN 0964-6906 (Print) 0964-6906 (Linking).

MASUI, S. Pluripotency maintenance mechanism of embryonic stem cells and reprogramming. **Int J Hematol**, v. 91, n. 3, p. 360-72, Apr 2010. ISSN 1865-3774 (Electronic) 0925-5710 (Linking).

MCGEER, P. L. et al. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1285-91, Aug 1988. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878 (Linking).

MEISSNER, A.; WERNIG, M.; JAENISCH, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 10, p. 1177-81, Oct 2007. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking).

MINGUELL, J. J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 8, p. 881-7, Aug 2000. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking).

MIYASAKI, J. M. New practice parameters in Parkinson's disease. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 2, n. 12, p. 638-9, Dec 2006. ISSN 1745-834X (Print) 1745-834X (Linking).

MIZUNO, Y.; HATTORI, N.; MORI, H. Genetics of Parkinson's disease. **Biomed Pharmacother**, v. 53, n. 3, p. 109-16, Apr 1999. ISSN 0753-3322 (Print) 0753-3322 (Linking).

NA, S. J. et al. Molecular profiling of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 35, n. 5, p. 761-72, May 2010. ISSN 1573-6903 (Electronic) 0364-3190 (Linking).

NESTI, C. et al. Human dental pulp stem cells protect mouse dopaminergic neurons against MPP(+) or rotenone. **Brain Res**, v. 1367, p. 94-102, Sep 18 2010. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

NILSSON, A. et al. Striatal Alterations of Secretogranin-1, Somatostatin, Prodynorphin, and Cholecystokinin Peptides in an Experimental Mouse Model of Parkinson Disease. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, p. 1094-1104, 2009.

NISHIYAMA, N. et al. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Stem Cells**, v. 25, n. 8, p. 2017-24, Aug 2007. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099 (Linking).

O'SULLIVAN, S. S. et al. Clinical outcomes of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy. **Brain**, v. 131, n. Pt 5, p. 1362-72, May 2008. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking).

OKABE, M. et al. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. **FEBS Lett**, v. 407, n. 3, p. 313-9, May 5 1997. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking).

ORKIN, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. **Nat Rev Genet**, v. 1, n. 1, p. 57-64, Oct 2000. ISSN 1471-0056 (Print) 1471-0056 (Linking).

OURDNIK, J. et al. Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. **Nat Biotechnol**, v. 20, n. 11, p. 1103-10, Nov 2002. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking).

PAISAN-RUIZ, C. et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. **Neuron**, v. 44, n. 4, p. 595-600, Nov 18 2004. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking).

PARISH, C. L. et al. Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 1, p. 149-60, Jan 2008. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).

PARK, K. I.; TENG, Y. D.; SNYDER, E. Y. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. **Nat Biotechnol**, v. 20, n. 11, p. 1111-7, Nov 2002. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking).

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 223-36; discussion 222, Spring 2002. ISSN 0895-0172 (Print) 0895-0172 (Linking).

PAXINOS, G.; FRANKLING, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2nd. Academic Pr, 2003.

PERSIDSKY, Y. et al. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 1, n. 3, p. 223-36, Sep 2006. ISSN 1557-1904 (Electronic) 1557-1890 (Linking).

PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2896-902, Nov 2007. ISSN 1549-4918 (Electronic) 1066-5099 (Linking).

PICCINI, P. et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 12, p. 1137-40, Dec 1999. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking).

PLEMPER, R. K.; WOLF, D. H. Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. **Mol Biol Rep**, v. 26, n. 1-2, p. 125-30, Apr 1999a. ISSN 0301-4851 (Print) 0301-4851 (Linking).

_____. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. **Trends Biochem Sci**, v. 24, n. 7, p. 266-70, Jul 1999b. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking).

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science**, v. 274, n. 5290, p. 1197-9, Nov 15 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2045-7, Jun 27 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

QUINN, N. P. How to diagnose multiple system atrophy. **Mov Disord**, v. 20 Suppl 12, p. S5-S10, Aug 2005. ISSN 0885-3185 (Print) 0885-3185 (Linking).

RAO, G. et al. Does this patient have Parkinson disease? **JAMA**, v. 289, n. 3, p. 347-53, Jan 15 2003. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484 (Linking).

RASCOL, O. et al. Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. **Lancet**, v. 359, n. 9317, p. 1589-98, May 4 2002. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking).

RHEE, Y. H. et al. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2326-35, Jun 2011. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking).

ROCHA, V.; GLUCKMAN, E. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 12, n. 1 Suppl 1, p. 34-41, Jan 2006. ISSN 1083-8791 (Print) 1083-8791 (Linking).

RODRIGUEZ-OROZ, M. C. et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 12, p. 1128-39, Dec 2009. ISSN 1474-4465 (Electronic) 1474-4422 (Linking).

RUBINSTEIN, P. et al. Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. **Blood Cells**, v. 20, n. 2-3, p. 587-96; discussion 596-600, 1994. ISSN 0340-4684 (Print) 0340-4684 (Linking).

SELMANI, Z. et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 212-22, Jan 2008. ISSN 1549-4918 (Electronic) 1066-5099 (Linking).

SEOL, W. Biochemical and molecular features of LRRK2 and its pathophysiological roles in Parkinson's disease. **BMB Rep**, v. 43, n. 4, p. 233-44, Apr 2010. ISSN 1976-670X (Electronic) 1976-6696 (Linking).

SHI, D. et al. The effect of lentivirus-mediated TH and GDNF genetic engineering mesenchymal stem cells on Parkinson's disease rat model. **Neurol Sci**, v. 32, n. 1, p. 41-51, Feb 2011. ISSN 1590-3478 (Electronic) 1590-1874 (Linking).

SHIMURA, H. et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nat Genet**, v. 25, n. 3, p. 302-5, Jul 2000. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking).

SHOULSON, I. DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. **Ann Neurol**, v. 44, n. 3 Suppl 1, p. S160-6, Sep 1998. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

SILVA, C. C. D. **Tansplante de células-tronco em modelo lesional de Doença de Parkinson**. 2011. (Mestrado). Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre, Porto Alegre.

SINGLETON, A. B. et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. **Science**, v. 302, n. 5646, p. 841, Oct 31 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

SPENCER, D. D. et al. Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 327, n. 22, p. 1541-8, Nov 26 1992. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

SPILLANTINI, M. G. et al. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 6469-73, May 26 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

STRYER, L. **Bioquímica**. 4ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SUON, S.; YANG, M.; IACOVITTI, L. Adult human bone marrow stromal spheres express neuronal traits in vitro and in a rat model of Parkinson's disease. **Brain Res**, v. 1106, n. 1, p. 46-51, Aug 23 2006. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

TEIVE, H. A. G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 56, n. 1, p. 141 - 145, 1998.

TENG, Y. D. et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3024-9, Mar 5 2002. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

TERADA, N. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 542-5, Apr 4 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-7, Nov 6 1998. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 367, p. 69-93, 1971. ISSN 0302-2994 (Print) 0302-2994 (Linking).

VALENTE, E. M. et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. **Science**, v. 304, n. 5674, p. 1158-60, May 21 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

VALENTE, E. M. et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. **Ann Neurol**, v. 56, n. 3, p. 336-41, Sep 2004. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

VINGERHOETS, F. J. et al. Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion? **Ann Neurol**, v. 41, n. 1, p. 58-64, Jan 1997. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

WAKABAYASHI, K. et al. Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 47, n. 4, p. 521-3, Apr 2000. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

WANG, F. et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian model of rats: focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1alpha. **BMC Neurosci**, v. 11, p. 52, 2010. ISSN 1471-2202 (Electronic) 1471-2202 (Linking).

WANG, H. Q.; TAKAHASHI, R. Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 5, p. 553-61, May 2007. ISSN 1523-0864 (Print) 1523-0864 (Linking).

WEBBER, D. J. et al. Transplanted neural progenitor cells survive and differentiate but achieve limited functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. **Regen Med**, v. 2, n. 6, p. 929-45, Nov 2007. ISSN 1746-076X (Electronic) 1746-0751 (Linking).

WEI, P. et al. Effects of engrafted neural stem cells derived from GFP transgenic mice in Parkinson's diseases rats. **Neurosci Lett**, v. 419, n. 1, p. 49-54, May 23 2007. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking).

WEISSMAN, I. L.; ANDERSON, D. J.; GAGE, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 387-403, 2001. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706 (Linking).

WELTE, K. et al. International exchange of cord blood units: the registry aspects. **Bone Marrow Transplant**, v. 45, n. 5, p. 825-31, May 2010. ISSN 1476-5365 (Electronic) 0268-3369 (Linking).

WERNIG, M. et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 15, p. 5856-61, Apr 15 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).

WILLIAMS, D. R. et al. Characteristics of two distinct clinical phenotypes in pathologically proven progressive supranuclear palsy: Richardson's syndrome and PSP-parkinsonism. **Brain**, v. 128, n. Pt 6, p. 1247-58, Jun 2005. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking).

WILLIAMS, D. R.; WATT, H. C.; LEES, A. J. Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 77, n. 4, p. 468-73, Apr 2006. ISSN 0022-3050 (Print) 0022-3050 (Linking).

WOLBURG, H.; LIPPOLDT, A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. **Vascul Pharmacol**, v. 38, n. 6, p. 323-37, Jun 2002. ISSN 1537-1891 (Print) 1537-1891 (Linking).

WOLFF, E. F. et al. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. **J Cell Mol Med**, v. 15, n. 4, p. 747-55, Apr 2011. ISSN 1582-4934 (Electronic) 1582-1838 (Linking).

WOODBURY, D. et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J Neurosci Res**, v. 61, n. 4, p. 364-70, Aug 15 2000. ISSN 0360-4012 (Print) 0360-4012 (Linking).

YAMAMURA, Y. et al. Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. **Neurology**, v. 23, n. 3, p. 239-44, Mar 1973. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878 (Linking).

ZARRANZ, J. J. et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. **Ann Neurol**, v. 55, n. 2, p. 164-73, Feb 2004. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).

ZETTERSTROM, R. H. et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. **Science**, v. 276, n. 5310, p. 248-50, Apr 11 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

ZHANG, X. et al. Evidence for a role of the 5-HT1B receptor and its adaptor protein, p11, in L-DOPA treatment of an animal model of Parkinsonism. **PNAS**, v. 105, n. 6, p. 2163–2168, 2008.

ZHANG, Z.; WANG, X.; WANG, S. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with Parkinson's disease. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 44, n. 5-6, p. 169-77, May-Jun 2008. ISSN 1071-2690 (Print) 1071-2690 (Linking).

ZHONG, X. Y. et al. Umbilical cord blood stem cells: what to expect. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1205, p. 17-22, Sep 2010. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking).

ZIMPRICH, A. et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. **Neuron**, v. 44, n. 4, p. 601-7, Nov 18 2004. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking).

ANEXO A – Cartas de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



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

Ofício 014/10 – CEUA

Porto Alegre, 02 de março de 2010.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00121, intitulado: **“Transplante de células-tronco em modelos genético e lesional da doença de Parkinson”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Márcio C. Pitrez
Coordenador-adjunto do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.
Dr. Jaderson Costa da Costa
N/Universidade

*Recebido
19/4/12*



"Canol"
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 055/12 – CEUA

Porto Alegre, 12 de abril de 2012.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 12/00280 intitulado: **"Transplante de células mononucleares de medula óssea em modelo lesional da Doença de Parkinson"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Jaderson Costa da Costa
Inscer
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

