

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

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM  
MODELO LESIONAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

Porto Alegre

2011

CAROLINE CALICE DA SILVA

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM  
MODELO LESIONAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

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

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa DaCosta

Porto Alegre

2011

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

S586t Silva, Caroline Calice da

Transplante de células mononucleares de medula óssea em modelo lesional da doença de Parkinson / Caroline Calice da Silva. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

99 f.: gráf. il. Inclui artigo a ser submetido para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Neurociências.

1. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO. 2. CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA. 3. CÉLULAS-TRONCO. 4. DOENÇA DE PARKINSON/terapia. 5. CAMUNDONGOS. 6. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. 7. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 8. PESQUISAS COM CÉLULAS-TRONCO. 9. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Título.

C.D.D. 616.833  
C.D.U. 616.858(043.3)  
N.L.M. WL 359

CAROLINE CALICE DA SILVA

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM  
MODELO LESIONAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

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

Aprovado em 16 de março de 2011

**BANCA EXAMINADORA:**

Dr. André Dalbem – HSL-PUCRS

---

Prof. Dr. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

---

Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder - UFRGS

---

*Dedico essa dissertação aos meus amados pais, Luiz Antônio e Zuleica, pelo amor e apoio incondicionais.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Jaderson Costa DaCosta, por todos os ensinamentos repassados ao longo desses anos, que levo tanto para o meu trabalho como para o dia-a-dia. Obrigado por sanar minhas dúvidas e, também, por me despertar novas dúvidas, as quais contribuem continuamente para meu crescimento.

A todos os amigos e colegas do Neurolab pela convivência diária e por de alguma maneira terem participado e colaborado para a realização desse trabalho. Em especial, à Mariana Santos pelos primeiros ensinamentos em estereotaxia, à Zuzete Pires por cuidar diariamente com tanto carinho de nossos animais e à Gianina Venturin e ao Samuel Greggio por todos os conselhos e ensinamentos científicos.

À minha querida bolsista de iniciação científica, Gleice Reder, indispensável na realização desse projeto, pela dedicação, maturidade e compromisso com o trabalho.

Às colegas de mestrado Bibiana França e Elisa Kaminski pela amizade ao longo desses anos. Obrigado por participarem e contribuírem para meu crescimento pessoal e profissional.

À PUCRS, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, e à CAPES pela bolsa de Mestrado, a qual me possibilitou realizar este curso.

Ao meu amor e companheiro, Daniel Carvalho, pelos infinitos conselhos, os quais foram essenciais para que eu pudesse seguir adiante na busca pelo desenvolvimento profissional.

A toda minha família, cujo apoio foi fundamental para realização desse trabalho. Aos meus pais, por estimularem e oportunizarem a busca por meus objetivos, e por todo amor e dedicação constantes. Aos meus queridos irmãos, Viviane e Eduardo, pelo amor e amizade de sempre.

*"Ora (dizeis) ouvir estrelas! Certo  
Perdeste o senso"! E eu vos direi, no entanto,  
Que, para ouvi-las, muita vez desperto  
E abro as janelas, pálido de espanto...*

*E conversamos toda a noite, enquanto  
A via láctea, como um pálido aberto,  
Cintila. E, ao vir do sol, saudosos e em pranto,  
Inda as procuro pelo céu deserto.*

*Dizeis agora! "Tresloucado amigo!  
Que conversas com elas? Que sentido  
Tem o que dizem, quando estão contigo?"*

*E eu vos direi: "Amai para entendê-las:  
Pois só quem ama pode ter ouvido  
Capaz de ouvir e de entender estrelas".*

*Olavo Bilac*

## 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 visa avaliar o potencial terapêutico do transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO) em um modelo lesional da DP. Os animais foram submetidos à estereotaxia e 1µl de 6-hidroxidopamina foi injetado no feixe prosencefálico medial. Três semanas após, os camundongos foram transplantados com CMMO, fibroblasto ou salina, através da veia da cauda. A função motora foi avaliada através do teste de Rotarod e do teste de rotação induzida por apomorfina. Nosso estudo demonstrou que as CMMO, transplantadas através da veia da cauda em camundongos parkinsonianos, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e migrar em direção ao tecido encefálico, além de sobreviverem por uma semana após o transplante. Essas células, porém, não foram capazes de restabelecer a função motora desses animais, em até 30 dias pós-transplante. Se as CMMO conseguiram restaurar os neurônios dopaminérgicos nigroestriatais apenas a nível histológico, não podendo essa restauração ser detectada pelos testes motores realizados, ainda precisa ser esclarecido.



## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons from substantia nigra (SN), which leads to a deficiency of dopamine levels in the striatum. This deficiency is responsible by the development of motor symptoms like rest tremor, bradykinesia, rigidity and postural instability. Other alternatives to PD treatment have been studied and a promising possibility is the stem cell transplantation. The present study aims to assess the therapeutic potential of bone marrow-derived mononuclear cells (BMMC) transplantation in a mouse model of Parkinson's disease. Animals underwent stereotaxic surgery and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was injected into their medial forebrain bundle (MFB). Three weeks later, they were transplanted with BMMCs, fibroblast or saline, through the caudal vein. Motor function was assessed using the Rotarod test and the apomorphine-induced rotation test. We had showed that BMMC, transplanted through caudal vein in parkinsonian mouse, are able to cross the BBB and migrate forward the encephalic tissue, besides survive until 1 week after transplantation. These cells, however, were not capable to restore the normal motor function of those animals, within 30 days post-transplantation. Whether BMMC could restore nigrostriatal dopaminergic neurons only to the histological level, and that restoration cannot be detected by motor test carried out, remains unclear.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Constituição dos grupos experimentais em relação à intervenção terapêutica.....	34
Figura 1 – Cirurgia de estereotaxia para lesão do MFB com 6-OHDA e Hamilton, acoplada a tubo de polietileno, utilizada para infusão.....	35
Figura 2 – Obtenção de CMMO de camundongos C57Bl/6-EGFP .....	37
Figura 3 – Infusão das células mononucleares de medula óssea através da veia da cauda.....	38
Figura 4 – Teste de Rotarod.....	40
Figura 5 - Delineamento Experimental.....	43
Figura 6 – Citometria de fluxo para imunofenotipagem das CMMO.....	45
Figura 7 – Comparação do desempenho no teste de Rotarod antes e depois da lesão.....	46
Figura 8 – Comparação do desempenho no teste de Rotarod entre os grupos ao longo do tempo.....	46
Figura 9 – Comparação da latência de queda no teste de Rotarod ao longo do tempo.....	47
Figura 10 – Comparação da velocidade/fase de queda no teste de Rotarod ao longo do tempo.....	47
Figura 11 – Comparação do nº de rotações no teste da apomorfina entre grupos ao longo do tempo.....	48
Figura 12 – Comparação do nº de rotações no teste da apomorfina ao longo do tempo.....	49
Figura 13 – PCR 1h pós-transplante.....	49
Figura 14 – PCR 24h pós-transplante.....	50
Figura 15 – PCR 7 dias pós-transplante.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA – 6-hidroxi-dopamina  
AP – ântero-posterior  
ATCC – American Type Culture Collection  
ATP – trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate)  
BDNF – fator neurotróficos derivado do cérebro (brain-derived neurotrophic factor)  
BHE – barreira hematoencefálica  
CD (nº) – grupo de diferenciação (nº)  
CMMO – células mononucleares de medula óssea  
CTMO – células-tronco de medula óssea  
DNA – ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)  
DP – doença de Parkinson  
DV – dorsoventral  
E1 – ubiquitina ligase 1  
E2 – ubiquitina ligase 2  
E3 – ubiquitina ligase 3  
EGFP – proteína verde fluorescente (enhanced green fluorescent protein)  
ESC – células-tronco embrionárias (embryonic stem cell)  
EUA – Estados Unidos da América  
FIB – fibroblasto  
GDNF – fator neurotróficos derivado da glia (glial cell-derived neurotrophic factor)  
GFAP – proteína glial fibrilar ácida (glial fibrillary acidic 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)  
i.v. – intravenoso  
iPS – células-tronco de pluripotência induzida (induced pluripotent stem cells)  
LB – corpos de Lewy (Lewy's body)  
MAO-B - monoamina oxidase- B  
MFB – feixe prosencefálico medial (medial forebrain bundle)  
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)

NTF – SC – células secretoras de fatores neurotróficos (neurotrophic factors-secreting cells)

NURR1 – nuclear receptor related 1 protein

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)

SAL – salina

SDF -1 – fator derivado do estroma (stromal cell-derived factor 1)

SGZ – zona subgranular (subgranular zone)

SN – substância negra

SNC – sistema nervoso central

SNC – substância negra, parte compacta

SNCAIP – synuclein alpha interacting protein

SVZ – zona subventricular (subventricular zone)

TH – tirosina hidroxilase

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

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	DOENÇA DE PARKINSON	14
1.1.1	<b>Histórico</b>	14
1.1.2	<b>Fisiopatologia</b>	15
1.1.3	<b>Genética</b>	17
1.1.4	<b>Manifestações Clínicas</b>	21
1.1.5	<b>Diagnóstico da DP e diagnóstico diferencial</b>	22
1.1.6	<b>Tratamento</b>	23
1.2	CÉLULAS-TRONCO	24
1.2.1	<b>Células-tronco embrionárias</b>	24
1.2.2	<b>Células-tronco adultas</b>	25
1.3	DOENÇA DE PARKINSON E CÉLULAS-TRONCO	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
3.1	ANIMAIS	34
3.1.1	<b>Lesão com 6-hidroxidopamina (6-OHDA)</b>	35
3.1.2	<b>Aspectos éticos</b>	36
3.2	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA	36
3.3	OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS	37
3.4	TRANSPLANTE	38
3.5	TESTES DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA	39
3.5.1	<b>Teste de desempenho no Rotarod em aceleração</b>	39
3.5.2	<b>Teste de rotação induzida por apomorfina</b>	40
3.6	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	41
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>

4.1	CITOMETRIA DE FLUXO E FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA PARA TRANSPLANTE .....	44
4.2	TESTES DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA .....	44
4.2.1	<b>Teste de desempenho do Rotarod em aceleração</b> .....	44
4.2.2	<b>Teste de Rotação Induzida por apomorfina</b> .....	48
4.3	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	49
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	58
7	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	59
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60
9	<b>ANEXOS</b> .....	73
A	CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS	73
B	COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO .....	74
C	ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA A REVISTA “MOVEMENT DISORDERS” .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

### 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, aquém da medicina, como política, reforma social, química e geologia (GOLDMAN and GOETZ, 2005).

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. Os cinco capítulos da monografia incluem: I - Definição, História e Casos Ilustrativos; II – Sintomas Patognômicos Examinados, *Tremor Coactus*, *Scelotyrbe Festinians*, III – Distinção da Paralisia Agitante de outras doenças com as quais pode ser confundida; IV – Causa Imediata, Causas Remotas, Casos Ilustrativos e V – Considerações a respeito da cura (GOLDMAN and GOETZ, 2005, PARKINSON, 2002).

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 (PARKINSON, 2002, TEIVE, 1998). 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 (JANKOVIC, 2008, TEIVE, 1998).

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 nigrais sobreviventes observou corpos de inclusão, os quais chamou de corpos de Lewy (do francês *corps de Lewy*) em reconhecimento a descrição de Friedrich Lewy de inclusões semelhantes no núcleo dorsal do vago (LEES, et al., 2008, TEIVE, 1998). 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 (BANDOPADHYAY and DE BELLEROCHE, 2009, FAHN and SULZER, 2004, PARISH, et al., 2008). 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 and SULZER, 2004, LEES, HARDY and REVESZ, 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 (LB, do inglês *Lewy's Body*) (FAHN and SULZER, 2004, LEES, HARDY and REVESZ, 2009). Essas estruturas apresentam um diâmetro de 5–25  $\mu\text{m}$ , um núcleo densamente eosinofílico circundado por um halo mais claro e seu principal componente é a proteína  $\alpha$ -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 and 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 and SULZER, 2004, WANG and 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 and 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 and TAKAHASHI, 2007).

O retículo endoplasmático (RE) participa da síntese proteica e do pregueamento de proteínas, além de outras funções pós-traducionais. Em diversos casos, como por exemplo, bloqueio do proteossoma ou mutações genéticas em que algumas proteínas não são corretamente pregueadas, 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 and 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 and 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 and TAKAHASHI, 2007). Além disso, a identificação da  $\alpha$ -sinucleína como principal componente dos LB e a posterior descoberta de que mutações no gene dessa proteína podem causar DP, sugerem que a DP pode ser causada pela agregação anormal de  $\alpha$ -sinucleína (LEROY, et al., 1998, POLYMERPOULOS, et al., 1996, POLYMERPOULOS, et al., 1997, 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, et al., 2004a) 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, ABOU-SLEIMAN and WOOD, 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 and SULZER, 2004). Nas últimas décadas, houve um avanço muito grande no conhecimento sobre a genética da DP e de outros distúrbios parkinsonianos (HEALY, ABOU-SLEIMAN and WOOD, 2004). Tanto heranças autossômicas

dominantes quanto recessivas são descritas, sendo as dominantes mais comuns (MIZUNO, HATTORI and MORI, 1999). Os principais genes envolvidos na DP familiar estão descritos a seguir.

#### 1.1.3.1 Herança autossômica dominante

##### 1.1.3.1.1 $\alpha$ -sinucleína (PARK1)

Golbe e colaboradores (1990, 1996) descreveram manifestações clínicas, muito semelhantes à DP idiopática, na família grega-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 *missense* A53T na proteína  $\alpha$ -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 subcortiais (ZARRANZ, et al., 2004).

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

##### 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 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 UCKL1 (PARK5)

Uma mutação *missense* 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 (HEALY, ABOU-SLEIMAN and WOOD, 2004, LE, et al., 2003).

#### 1.1.3.1.5 Sinfilina-1 (SNCAIP)

A sinfilina-1 é uma proteína que interage com a  $\alpha$ -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 (HEALY, ABOU-SLEIMAN and WOOD, 2004, MARX, et al., 2003).

### 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, 1973 apud (MIZUNO, HATTORI and MORI, 1999, YAMAMURA, et al., 1973). 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, ABOU-SLEIMAN and WOOD, 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, et al., 2004b). 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, ABOU-SLEIMAN and WOOD, 2004, VALENTE, et al., 2004b).

#### 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 de parkinsonismo 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, WATT and LEES, 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, HARDY and REVESZ, 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., 2002, HUGHES, DANIEL and LEES, 2001, 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, HARDY and REVESZ, 2009).

A doença de Parkinson pode ser confundida com outros distúrbios motores, como MSA, PSP e tremor essencial (LEES, HARDY and REVESZ, 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, HARDY and REVESZ, 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, HARDY and REVESZ, 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, HARDY and REVESZ, 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 (LEES, HARDY and REVESZ, 2009, SHOULSON, 1998).

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 (MIYASAKI, 2006, RASCOL, et al., 2002).

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 and SEGRE, 2000, LI and 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 teratômas (BRIGNIER and GEWIRTZ, 2010, LI and DING, 2009, 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 (BRIGNIER and GEWIRTZ, 2010, LI and DING, 2009). 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 and 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 and 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 que, posteriormente, diferenciam-se espontaneamente em diversos tipos celulares (LI and 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 and GEWIRTZ, 2010). Dessa forma, opiniões contrárias sobre o uso das hESCs em pesquisa dificultam a realização de estudos nessa área.

### **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 and 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, ESTROV and CHAMPLIN, 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, CONGET and MINGUELL, 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 (KOGLER, SENSKEN and WERNET, 2006). 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 and GLUCKMAN, 2006).

Em 1989, foi descrito o primeiro transplante de sucesso com hUCB criopreservado de doador relacionado (irmão) 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 relacionadas 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 (KIM, et al., 2005). 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*) (JANG, et al., 2004). 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 and 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 apud IMAYOSHI, et al., 2009) 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 (KELLY, et al., 2004). 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<sup>+</sup> (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, TENG and SNYDER, 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 and 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. Além disso, a fração mononuclear da medula óssea (MO) é formada por células hematopoiéticas e mesenquimais.

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

Krause e colaboradores (2001) demonstraram que o transplante de uma única 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, COGLE, et al., 2004, TERADA, et al., 2002). 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 and 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* (BRIGNIER and GEWIRTZ, 2010, SELMANI, et al., 2008).

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 (KOPEN, PROCKOP and PHINNEY, 1999). 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).

### 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 and 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., 1990, MADRAZO, et al., 1988).

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, PICCINI, et al., 1999, SPENCER, et al., 1992). 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 (FREED, et al., 2001).

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) (HAGELL, et al., 1999, HAUSER, et al., 1999, LINDVALL, et al., 1990, 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* (BARBERI, et al., 2003). 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<sup>+</sup> derivados de ESCs de camundongos apresentam atividade eletrofisiológica *in vitro* e *in vivo*, após transplante em ratos lesionados com 6-OHDA (KIM, et al., 2002). 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, WERNIG and JAENISCH, 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. Estudos indicam, também, que as MSCs humanas diferenciam-se em astrócitos *in vitro*, sendo que os mesmos secretam neurotrofinas, como GDNF (do inglês *glial cell-derived neurotrophic factor*) e BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*). Essas células, quando transplantadas em ratos parkinsonianos transdiferenciadas em astrócitos ou indiferenciadas, melhoram o desempenho do animal nos testes de função motora e promovem proliferação de células TH<sup>+</sup> nigroestriatais (BAHAT-STROOMZA, et al., 2009, BLANDINI, et al., 2010). 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.) e células-tronco de pluripotência induzida (iPS, do inglês *induced pluripotent stem cells*) derivadas, geralmente, de fibroblastos reprogramados (CAI, et al., 2010, HARGUS, et al., 2010, WERNIG, et al., 2008). Apesar dos dados disponíveis na literatura demonstrarem resultados otimistas para o tratamento da DP, o potencial terapêutico das células adultas provenientes da medula óssea ainda é pouco estudado (CARRION, VENTURIN and DACOSTA, 2009, DE PAULA, et al., 2005). 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 de medula óssea em um modelo lesional da doença de Parkinson.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Quantificar o desempenho motor dos animais transplantados com CMMO no teste de Rotarod e comparar com o grupo controle.
2. Verificar possível melhora do desempenho dos animais transplantados com CMMO no teste de rotação induzida por apomorfina.
3. Analisar a migração e a sobrevivência das células GFP+ transplantadas, por via sistêmica, no encéfalo dos animais parkinsonianos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (60 – 90 dias) que sofreram lesão do feixe prosencefálico medial (MFB) pela 6 – hidroxidopamina através de cirurgia estereotáxica.

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: (a) camundongos transplantados com células mononucleares de MO GFP<sup>+</sup> (Grupo CMMO, n = 11), (b) camundongos transplantados com fibroblastos (Grupo FIB, n = 8 – controle 1) e (c) camundongos transplantados com solução salina (Grupo SAL, n = 12 – controle 2). Uma ilustração dos grupos experimentais é mostrada no Quadro 1.

Grupos/ Tratamento	Células mononucleares da medula óssea GFP <sup>+</sup>	Controle 1 (controle celular): Fibroblastos	Controle 2: Solução Salina
CMMO (n: 11)	10 <sup>7</sup> células em 200µL		
FIB (n: 8)		10 <sup>6</sup> células em 200µL	
SAL (n: 12)			200µL

**Quadro 1 – Constituição dos grupos experimentais em relação à intervenção terapêutica.**

### 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 Ketamina (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil; 80mg/kg) intraperitoneal (i.p.). Após a fixação dos animais no aparelho estereotáxico (Insight, Brasil), 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 $\mu$ L de 6-OHDA (3 $\mu$ g/ $\mu$ L). As coordenadas utilizadas, em relação ao bregma foram: ântero-posterior (AP) -1,2mm, médio-lateral (ML) -1,2 mm e dorsoventral (DV) -5,00 mm, de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001). Para a infusão, utilizou-se uma microseringa Hamilton de 10  $\mu$ L acoplada por um tubo de polietileno a uma agulha de infusão (25G) fixada no estereotáxico. A agulha era posicionada no ponto de cada infusão, e no local era feita uma pequena trepanação utilizando-se uma broca odontológica. A agulha era baixada até o ponto alvo e a 6-OHDA infundida a uma velocidade constante de 0,5  $\mu$ L/min com o auxílio de uma bomba de infusão (KDS2000, KD Scientific). Após o término de cada infusão, a agulha era mantida no local por 5 minutos, a fim de evitar refluxo da droga e permitir sua total dispersão pela área. Após, a ferida operatória era limpa e suturada com fio de seda 4.0 (Figura 1).



**Figura 1 – Cirurgia de estereotaxia para lesão do MFB com 6-OHDA e Hamilton, acoplada a tubo de polietileno, utilizada para infusão.**

### 3.1.1.1 Preparação da 6-hidroxiopamina

A 6-OHDA (Sigma, EUA) era diluída no dia da infusão para evitar oxidação da mesma. Um miligrama da droga era pesado em balança de precisão e diluído em 0,333 $\mu$ L de solução de ácido ascórbico (Nuclear, Brasil) 0,1%, para uma concentração final de 3 $\mu$ g/ $\mu$ L. A droga diluída era protegida da luz e mantida em refrigeração durante as cirurgias para evitar degradação da mesma.

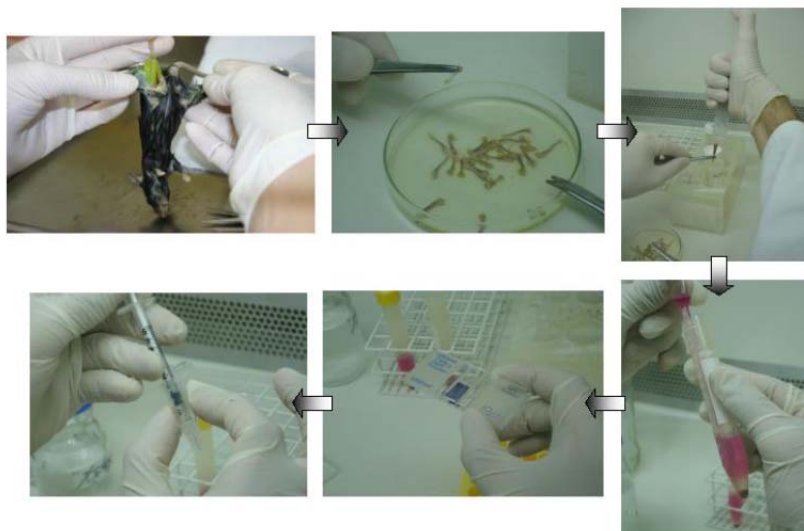
### 3.1.2 Aspectos éticos

Os protocolos experimentais utilizados foram submetidos para avaliação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS, aprovados conforme registro CEUA 09/00121 de 2 de março de 2010 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-tronco 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 ketamina 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 1077 e as células foram contadas em câmara de

Neubauer. Por fim, separaram-se alíquotas de 200  $\mu$ L contendo  $10^7$  células mononucleares GFP+ (Figura 2).



**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: CD19, CD45, vCD19/CD45, CD117, Sca-1, CD117/Sca-1, CD34, diluídos na concentração de um 1:10 em PBS. Após incubação a 5° C no escuro por pelo menos 15 minutos, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com 1 ml de paraformaldeído 4% (em PBS), para análise. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA). Os dados obtidos correspondem a pelo menos 50.000 eventos.

### 3.3 OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS

Fibroblastos da linhagem NIH-3T3 foram obtidas da American Type Culture Collection - ATCC n° CRL-1658™ (Rockville, MD) e cultivadas em meio DMEM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino,

penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL) em estufa de a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura foi substituído a cada três dias e as passagens foram realizadas sempre que as células atingiam 70% de confluência. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Azul de Trypan. No dia do transplante, as células eram separadas em alíquotas contendo 10<sup>6</sup> células em 200µL de solução salina.

### 3.4 TRANSPLANTE

Os animais foram anestesiados com xilazina e ketamina 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 200µL contendo 10<sup>7</sup> CMMO-GFP<sup>+</sup>, 10<sup>6</sup> fibroblastos (controle) ou solução salina (200µL – controle), com uma seringa (BD Ultra-Fine 0,5 mL). Logo após o transplante, os animais eram devolvidos para sua caixa moradia 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.**

### 3.5 TESTES DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

#### 3.5.1 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 instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do chão, e 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) e a velocidade/fase do cilindro em que caia. 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:

##### 3.5.1.1 Protocolo com velocidade constante (habituação)

Os animais eram 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.

##### 3.5.1.2 Protocolo Acelerado

No dia seguinte a habituação, os animais eram 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 30 minutos entre eles. Em cada sessão, calculou-se a média da latência de queda e a média da fase em que esta ocorreu 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 antes da lesão do MFB, após a lesão e 10 e 30 dias após o transplante, 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, velocidade/fase de queda do animal é avaliada.

### 3.5.2 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, 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. Apenas os animais que rotaram  $\geq 50$  vezes/30 min foram incluídos no estudo. O teste de rotação induzida por apomorfina foi realizado novamente 10 e 30 dias após o transplante para avaliação da função motora dos animais entre os grupos, ao longo do tempo (NILSSON, et al., 2009, ZHANG, et al., 2008)

### 3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para identificar se as células EGFP migram em direção a região lesada e sobrevivem após o transplante, foi realizada a infusão de CMMO-GFP<sup>+</sup>, através da veia da cauda, e os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, em diferentes tempos pós-transplante: 1h (n=3); 24h (n=2); 7 dias (n=4); 15 dias (n=2) e 30 dias (n=2). Esses animais tiveram seus encéfalos dissecados e coletados para posterior análise pela técnica de PCR. A presença da EGFP serve de indicativo de que as células encontradas no tecido são derivadas da medula óssea do animal doador.

Para a extração de DNA (do inglês deoxyribonucleic acid), os tecidos foram homogeneizados em 300  $\mu$ L de tampão fosfato. A seguir, adicionou-se 600  $\mu$ L de Brazol. Os tubos foram agitados com auxílio de um vórtex por dois minutos e então se adicionou 120  $\mu$ L de clorofórmio gelado. As amostras foram centrifugadas em 10.000 rpm por 15 minutos. Logo depois, o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 300  $\mu$ L de isopropanol gelado, e estes foram agitados por 2 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada em 10.000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado por aspiração. Por fim, o DNA foi dissolvido em água ultra-pura e os frascos contendo as amostras de DNA armazenados em freezer a -20°C até o momento da análise por PCR.

Para a reação foram adicionados a uma alíquota de 5  $\mu$ L de DNA de cada amostra: 0,5  $\mu$ L de Taq DNA polimerase, 1  $\mu$ L do primer 1, 1  $\mu$ L do primer 2, 2  $\mu$ L de dNTPs, 2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ L de solução tampão e água MilliQ para completar o volume de reação de 50  $\mu$ L. A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-200/MJ Research) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direto 5'-

TTGAATTCGCCACCATGGTGAGC-3' e reverso 5'-  
TTGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3' complementares à sequência de DNA  
correspondente a uma sequência específica do gene que codifica a proteína EGFP,  
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*. As condições de amplificação foram as  
seguintes: 95°C por 5 minutos para desnaturação; 30 ciclos subsequentes  
consistindo cada ciclo de uma etapa de desnaturação a 95°C por 45 segundos, uma  
etapa de anelamento a 62°C por 1 minuto e uma etapa a 72°C por 1,5 minutos para  
extensão; e então uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

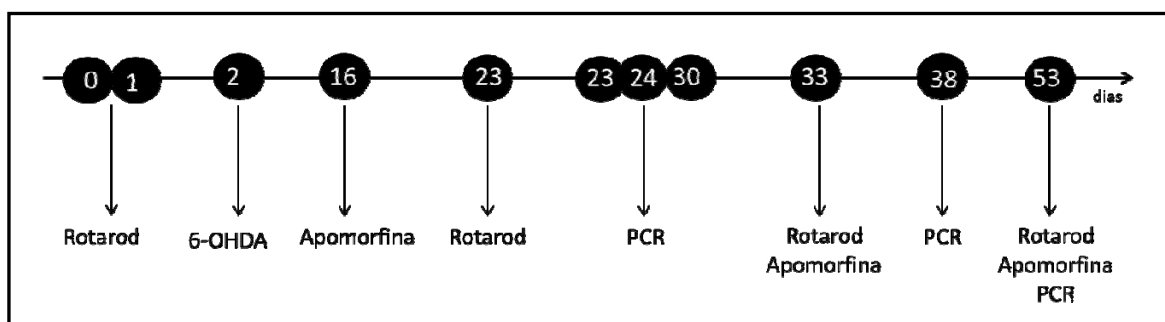
Para controlar o funcionamento da reação, foram ensaiados, juntamente com  
cada bateria de DNA de amostras de animais transplantados, um controle positivo  
de reação que consistirá de DNA extraído a partir de CMMO obtidas de camundongo  
C57BL/6-EGFP, e um controle negativo de reação, com omissão de qualquer DNA,  
além de amostras de animais que não receberão 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.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi feita através do programa GraphPad Prism (versão  
5.0). Foram utilizados os teste t pareado, ANOVA de duas vias, seguido de *post hoc*  
Bonferroni e ANOVA de medidas repetidas, seguido de Newman-Keuls para análise  
dos testes de função motora.

Um esquema do delineamento experimental está ilustrado na Figura 5.



**Figura 5 - Delineamento Experimental.**

## 4 RESULTADOS

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

A fração mononuclear isolada para o transplante apresentou positividade para os marcadores CD34 (precursora hematopoiética), CD19 (linhagem linfócito B), CD45 (leucócito/eritrócito não maduro) e CD117 (célula tronco hematopoiética) (Figura 6).

### 4.2 TESTES DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

#### 4.2.1 Teste de desempenho do Rotarod em aceleração

A Figura 7 mostra a avaliação da função motora dos animais antes e depois da lesão com 6-OHDA, no teste de Rotarod em aceleração. Observou-se uma diminuição da latência de queda após a lesão em comparação ao teste realizado antes da lesão (teste t pareado,  $P < 0,0001$ ).

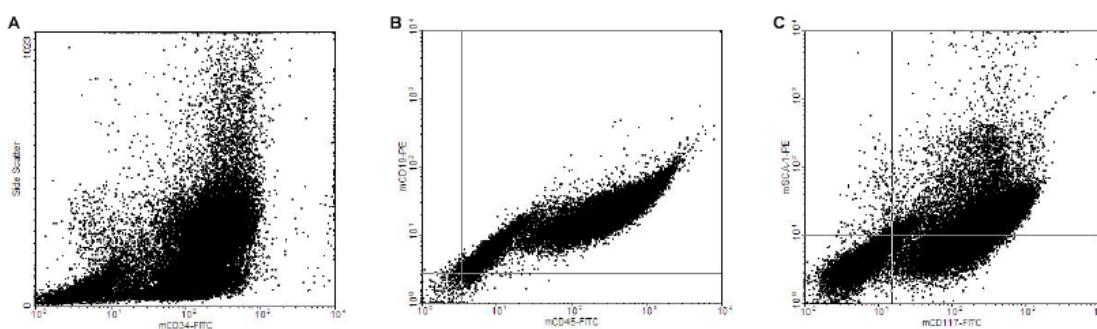
O teste ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa na interação tratamento e tempo entre os grupos, na latência de queda [ $F_{(2,112)} = 0,68$ ,  $P = 0,6690$ , Fig. 8A] nem na velocidade/fase de queda [ $F_{(2,112)} = 0,31$ ,  $P = 0,9298$ , Fig. 8B]. O grupo FIB apresentou melhor desempenho no Rotarod, avaliado pela latência de queda (ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* Bonferroni,  $P < 0,05$ ) e pela velocidade/fase de queda (ANOVA de duas vias, seguido do *post hoc* Bonferroni,  $P < 0,05$ ) em relação ao grupo CMMO, 30 dias após o tratamento.

Tendo em vista que a extensão da lesão realizada com 6-OHDA tem alta variabilidade de um animal para outro, realizamos também um teste estatístico que avalia um mesmo animal do mesmo grupo, ao longo do tempo, na tentativa de descartar esse viés.

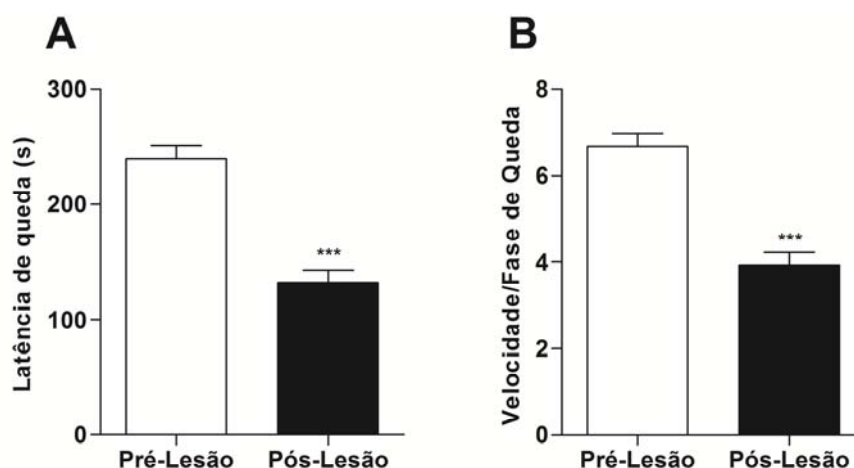
Em relação à latência de queda, o grupo salina (Figura 9A) piorou seu desempenho nos tempos pós-lesão (ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0,001$ ), Pós 10 (ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0,001$ ) e Pós 30 (ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0,05$ ) em comparação ao tempo pré-lesão. O mesmo ocorreu no grupo CMMO (Figura 9B, ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0,0001$  nos tempos

Pós-lesão, Pós 10 e Pós 30) e com o grupo FIB (Figura 9C, ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0,0001$  nos tempos Pós-lesão e Pós 10 e  $P < 0,001$  no tempo Pós 30).

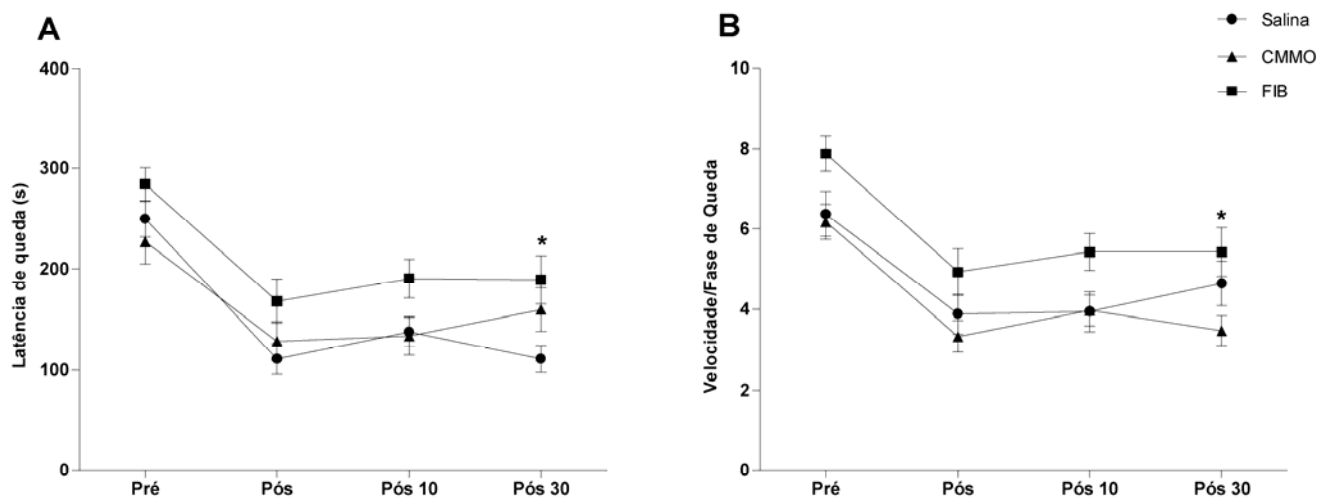
Em relação à velocidade/fase de queda (Figura 10), todos os grupos pioraram seu desempenho após a lesão (ANOVA de medidas repetidas, SAL: Figura 10A,  $P < 0,001$  nos tempos pós-lesão e Pós 10 e  $P < 0,05$  no tempo Pós 30; CMMO: Figura 10B,  $P < 0,0001$  nos tempos pós-lesão, Pós 10 e Pós 30; FIB: Figura 10C,  $P < 0,0001$  nos tempos pós-lesão e Pós 30 e  $P < 0,001$  no tempo Pós 30). Não se observou, porém, diferença significativa, em nenhum dos grupos, nos testes realizados após o tratamento, em comparação ao teste pré-transplante, tanto para a avaliação da latência de queda (Figura 9) como da velocidade/fase de queda (Figura 10) (ANOVA de medidas repetidas,  $P > 0,05$ ).



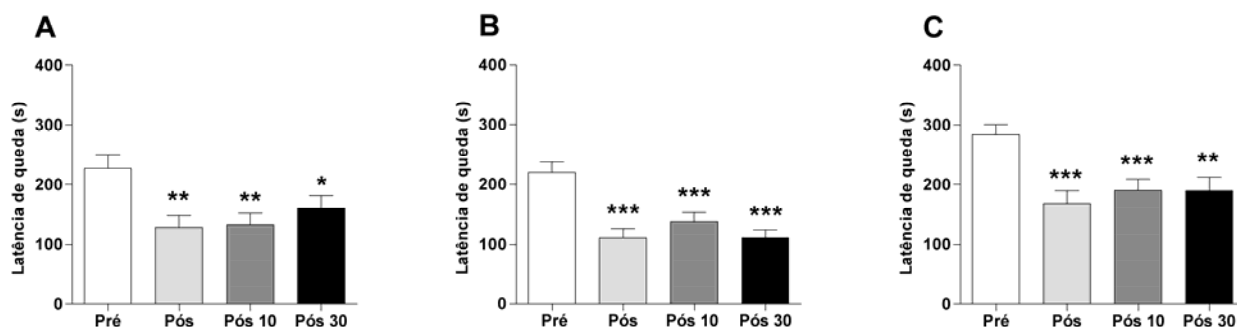
**Figura 6 – Citometria de fluxo para imunofenotipagem das CMMO.** AS células extraídas da medula óssea de camundongos C57BL/6-EGFP eram CD34+ (A), CD45+ e CD19+ (B) e CD117+ (C).



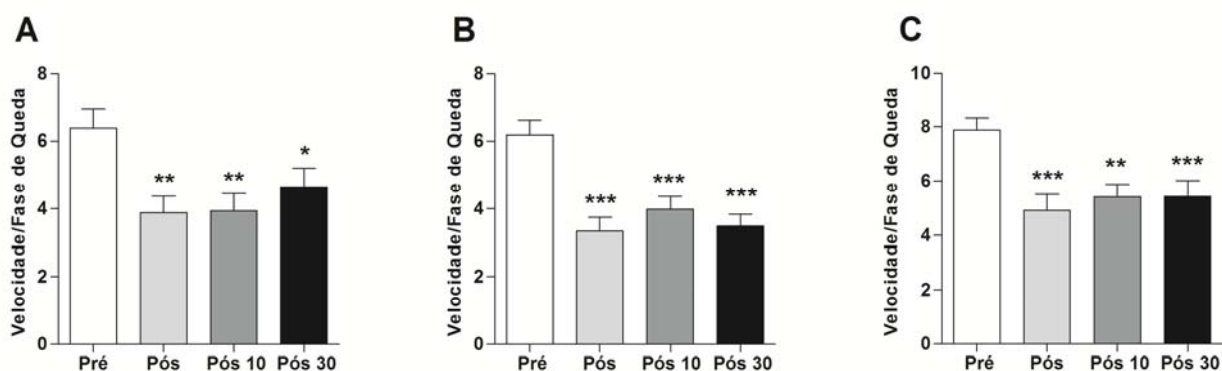
**Figura 7 – Comparação do desempenho no teste de Rotarod antes e depois da lesão.** A) Latência de queda observada antes (Pré-Lesão) e depois da lesão do MFB (Pós-Lesão). B) Velocidade/Fase de queda observada antes (Pré-Lesão) e depois da lesão do MFB (Pós-Lesão). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão,  $n = 31$ . \*\*\* $P < 0,001$  vs. Pré-Lesão no teste t pareado.



**Figura 8 – Comparação do desempenho no teste de Rotarod entre os grupos ao longo do tempo.** (A) Latência de queda observada para os grupos CMMO, FIB e SAL antes (Pré) e depois da lesão do MFB (Pós), e depois do transplante celular: 10 (Pós 10) e 30 dias (Pós 30) pós-transplante [ $F(2,112) = 0,68$ ,  $P = 0,6690$ ]. B) Velocidade/fase de queda observada para os grupos CMMO, FIB e SAL antes (Pré) e depois da lesão do MFB (Pós), e depois do transplante celular: 10 (Pós 10) e 30 dias (Pós 30) pós-transplante [ $F(2,112) = 0,31$ ,  $P = 0,9298$ ]. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $P < 0,05$  vs. CMMO no post hoc Bonferroni, depois do ANOVA de duas vias.



**Figura 9 – Comparação da latência de queda no teste de Rotarod ao longo do tempo.** Latência de queda observada nos grupos SAL, CMMO e FIB antes (Pré) e depois da lesão do MFB (Pós), e depois do transplante celular: 10 (Pós 10) e 30 dias (Pós 30) pós-transplante (A) Grupo SAL, n = 11. (B) Grupo CMMO, n = 12. (C) Grupo FIB, n = 8. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01 e \*P<0,05 vs. Pré no post hoc Newman-Keuls, depois do ANOVA de medidas repetida.



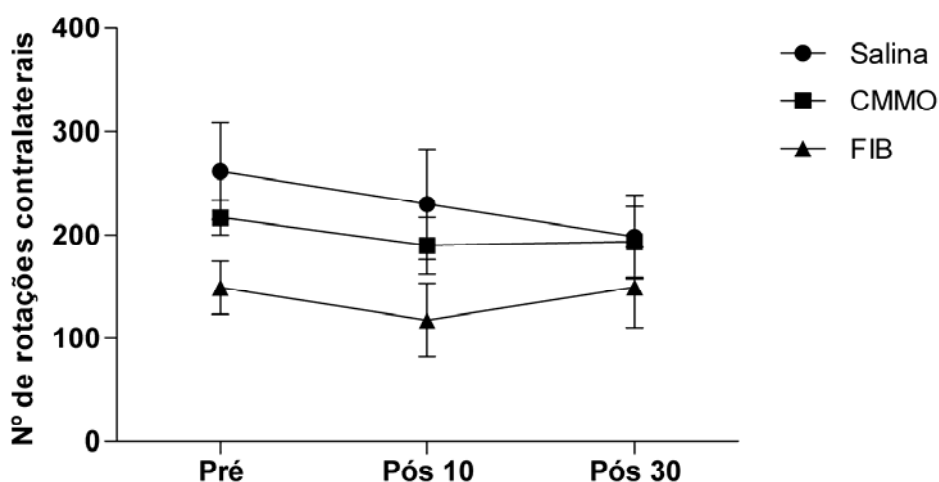
**Figura 10 – Comparação da velocidade/fase de queda no teste de Rotarod ao longo do tempo.** Velocidade/fase de queda observada nos grupos SAL, CMMO e FIB antes (Pré) e depois da lesão do MFB (Pós), e depois do transplante celular: 10 (Pós 10) e 30 dias (Pós 30) pós-transplante (A) Grupo SAL, n = 11. (B) Grupo CMMO, n = 12. (C) Grupo FIB, n = 8. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01 e \*P<0,05 vs. Pré no post hoc Newman-Keuls, depois do ANOVA de medidas repetida.



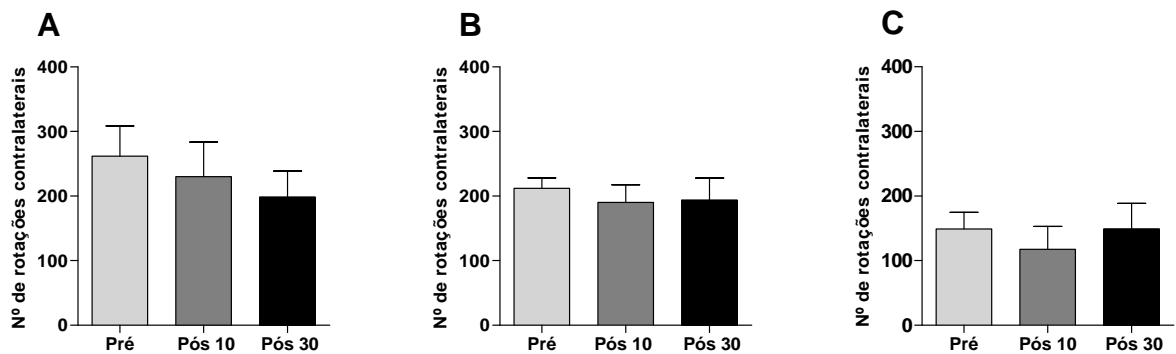
#### 4.2.2 Teste de Rotação Induzida por apomorfina

Não se verificou diferença significativa na interação tempo e tratamento entre os grupos (ANOVA de duas vias) [ $F_{(2,84)} = 0,24$ ,  $P = 0,9159$ , Fig. 11].

Da mesma forma que no teste de Rotarod, tentamos eliminar a variabilidade da lesão dentro do mesmo grupo, através do teste ANOVA de medidas repetidas. Não se encontrou, porém, diferença significativa nos testes realizados depois do tratamento em comparação ao teste pré-tratamento, em nenhum dos grupos avaliados (Figura 12, ANOVA de medidas repetidas,  $P > 0,05$ )



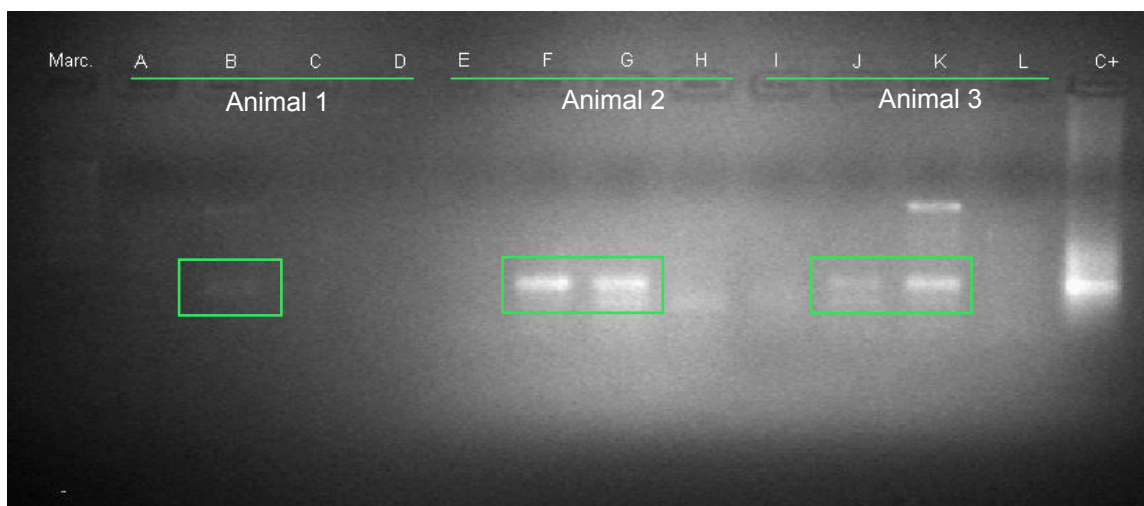
**Figura 11 – Comparação do nº de rotações no teste da apomorfina entre grupos ao longo do tempo.** Nº de rotações observado para os grupos SAL, CMMO e FIB antes (Pré) e depois do transplante celular: 10 (Pós 10) e 30 dias (Pós 30) pós-transplante [ $F_{(2,84)} = 0,24$ ,  $P = 0,9159$ ]. Dados expressos em média ± erro padrão (ANOVA de duas vias).



**Figura 12 – Comparação do nº de rotações no teste da apomorfina ao longo do tempo.** Nº de rotações observado nos grupos SAL, CMMO e FIB antes (Pré) e depois do transplante celular: 10 (Pós 10) e 30 dias (Pós 30) pós-transplante (A) Grupo SAL, n = 11. (B) Grupo CMMO, n = 12. (C) Grupo FIB, n = 8. Dados expressos como média ± erro padrão (ANOVA de medidas repetidas).

#### 4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A técnica de PCR revelou presença das CMMO-GFP<sup>+</sup>, transplantadas através da veia da cauda, no tecido encefálico dos animais parkinsonianos 1h (Figura 13), 24h (Figura 14) e 7 dias (Figura 15) após o transplante. A análise feita 15 e 30 dias após o transplante foi negativa para a presença das células transplantadas no encéfalo dos animais (dados não mostrados).



**Figura 13 – PCR 1h pós-transplante.** Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Canaleta Marc.: marcador de peso molecular (100 pb); Canaletas A – L: amostras de encéfalos, 1h pós infusão de CMMO – Positivo para o gene EGFP nos 3 animais. canaleta C+: controle EGFP<sup>+</sup>.



**Figura 14 – PCR 24h pós-transplante.** Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Canaleta Marc.: marcador de peso molecular (100 pb); Canaleta Amostra: amostra de encéfalo, 24h pós infusão de CMMO – Positivo para p gene EGFP em 1 dos animais; canaleta C+: controle EGFP+; canaleta Mix: controle -.



**Figura 15 – PCR 7 dias pós-transplante.** Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Canaleta Marc.: marcador de peso molecular (100 pb); Canaletas A e B: amostras de encéfalos, 7 dias pós infusão de CMMO – Positivo para o gene EGFP em 2 animais. Canaleta C+: controle EGFP+.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito do transplante intravenoso de CMMO sobre a função motora do animal com DP, através dos testes de rotação induzida por apomorfina e Rotarod. Observou-se que o tratamento com CMMO não modificou significativamente a assimetria rotacional induzida por apomorfina ao longo do tempo. Diversos estudos, porém, mostram melhora da função motora após transplante de células-tronco em modelo lesional da DP. Lu e colaboradores (2005) isolaram e transfectaram MSCs de ratos com o gene da TH, que quando transplantadas ( $10^6$  células) no estriado de ratos lesados com 6-OHDA promoveram diminuição da taxa rotacional induzida por apomorfina (LU, et al., 2005). O grupo controle recebeu MSCs que não expressavam o gene da TH e não apresentaram mudança no comportamento rotacional. Da mesma maneira, o transplante de MSCs transfectadas com o gene da TH ( $10^5$  células) no ventrículo lateral de ratos parkinsonianos reduziu cerca de 50% o número de rotações, 4 e 10 semanas pós-transplante, em comparação ao grupo que recebeu salina (ZOU, et al., 2010) Esses dados sugerem que as MSCs derivadas da medula óssea teriam efeito no padrão de rotação apenas quando induzidas a expressar marcadores neuronais *in vitro*, o que pode justificar, em parte, a diferença encontrada em nosso estudo, uma vez que transplantamos células que não passaram por cultura antes da infusão.

Além disso, MSCs obtidas da MO de ratos foram transplantadas (180.000 células) em ratos com lesão por 6-OHDA, após cultivo padrão ou indução neuronal. Uma semana após o transplante, os animais apresentaram diminuição de 50% da rotação induzida por anfetamina em relação ao número basal e aos grupos controle (salina ou  $\emptyset$ ). Nesse estudo, não houve diferença entre o comportamento rotacional dos animais que receberam células do meio enriquecido ou padrão (BOUCHEZ, et al., 2008). Outro estudo com MSCs derivadas da MO de humanos demonstrou alguns resultados diferentes. Sadan e colaboradores (2009) sugerem que o transplante de MSCs induzidas a secretarem fatores neurotróficos (NTF-SC, do inglês *neurotrophic factors-secreting cells*) (150.000 e 450.000 células) no cérebro de ratos parkinsonianos, promove redução das rotações em comparação ao grupo controle, resultado que não foi encontrado após transplante do mesmo volume celular de MSCs não tratadas (SADAN, et al., 2009).

Os dados da literatura acima descritos sugerem que a utilização de meios de indução neural para cultivo das MSCs facilita a recuperação da função motora no modelo lesional da DP. Além disso, os volumes celulares diferem do utilizado no presente estudo, bem como as vias de administração dessas células. Ao optarmos pela utilização de CMMO, diferentes tipos celulares são transplantados, incluindo células maduras e progenitores hematopoiéticos, além de MSCs. Porém, a quantidade de células-tronco em relação às células especializadas é muito pequena nessa fração. A frequência de MSCs é de 1/10.000 a 1/100.000 células mononucleares, sendo que as HSCs correspondem a 1% das células da fração mononuclear da medula óssea (JONES and MCGONAGLE, 2008). Já no transplante direto de MSCs existe uma maior quantidade de células-tronco, uma vez que, para seu isolamento essas células são expandidas em cultura. Sendo assim, apesar de injetarmos uma quantidade maior de células ( $10^7$ ) em relação aos estudos anteriores, o número de células-tronco disponíveis é menor, o que poderia explicar a diferença encontrada na avaliação da função motora dos animais após o transplante. Além disso, a administração das células diretamente no local da lesão também aumenta o número de células disponíveis, já que com o transplante sistêmico as células migram para outros tecidos além do encéfalo.

Poucos dados estão disponíveis na literatura a respeito do transplante intravenoso de células-tronco para o tratamento da DP. Wang e colegas (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, 1,2,3 e 4 semanas pós-transplante, em comparação aos grupos controle (fibroblasto e PBS) (WANG, et al., 2010). Apesar do transplante realizado na fase aguda da lesão favorecer a atração e migração das células, a administração pela via intravenosa parece funcionar. Dessa forma, a diferença encontrada em nosso estudo no efeito das células-tronco sobre a função motora de animais parkinsonianos parece ser devido ao tipo celular utilizado e não a via de administração. Sugerimos, portanto, que, de fato, as CMMO não teriam a capacidade de restaurar a função motora de camundongos parkinsonianos, ao menos que pudesse ser detectada pelos testes motores utilizados.

Outro teste utilizado em nosso estudo para avaliar a função motora foi o teste de Rotarod, em que se observou diferença significativa no desempenho do animal nesse teste, antes e depois da lesão com 6-OHDA. Esses resultados indicam que o

desempenho do animal no protocolo acelerado é sensível à degradação dos neurônios dopaminérgicos pela 6-OHDA, sugerindo que o teste de Rotarod pode ser utilizado como teste para confirmação e/ou avaliação do dano dopaminérgico e consequente reflexo na função motora.

Após o transplante de CMMO, porém, não se observou diferença significativa na latência, nem na velocidade/fase de queda do animal. Bahat-Stroomza e colaboradores (2009) demonstraram que o transplante de astrócitos derivados de MSCs humanas no estriado de ratos parkinsonianos promove aumento da latência de queda desses animais, em comparação ao grupo controle (salina) (BAHAT-STROOMZA, et al., 2009). Entretanto, diferenças na metodologia impossibilitam a comparação desses resultados com nossos achados, como, por exemplo, o tipo celular utilizado. Além disso, na pesquisa citada, utiliza-se um protocolo constante, na velocidade de 16rpm, enquanto que em nosso estudo a velocidade de rotação varia de 16 – 37rpm. Apontamos, ainda, que realizamos o teste até 30 dias pós-transplante, sendo que uma melhora tardia no desempenho do teste de Rotarod não pode ser descartada, uma vez que no estudo de Bahat-Stroomza (2009) o animal foi avaliado 110 dias após o transplante.

Um estudo com um modelo experimental diferente da DP, o modelo do MPTP (do inglês *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*) em camundongos, também demonstrou melhora da função motora avaliada pelo teste de Rotarod, após o transplante intracerebral de MSCs de camundongos. O teste foi realizado em duas frequências diferentes, 16 e 20rpm, sendo que o animal que recebeu MSCs apresentou maior latência de queda em comparação com o grupo que recebeu PBS (LI, et al., 2001). Igualmente ao teste de rotação induzida por drogas, 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 dos diferentes protocolos empregados. Não podemos descartar, ainda, a possibilidade de que as CMMO realmente não sejam eficazes na restauração da função motora de animais lesionados com 6-OHDA, avaliada através do teste de Rotarod. Esse aparelho ainda não é muito utilizado para a avaliação da função motora em modelos experimentais de DP. Sendo assim, é necessária maior investigação sobre a utilidade desse teste na avaliação comportamental de modelos animais da DP.

Nosso grupo evidenciou, ainda, melhor desempenho no teste de Rotarod no grupo FIB, 30 dias após o transplante, em comparação ao grupo CMMO. Essa diferença, embora significativa, não possui relevância clínica, uma vez que ambos os grupos não foram diferentes do grupo SAL. Além disso, o grupo FIB, apesar de estatisticamente idêntico aos demais grupos, desempenhou melhor as tarefas comportamentais desde o início dos experimentos.

No presente estudo, foram utilizados camundongos C57Bl/6 no modelo animal da 6-OHDA de DP para que pudéssemos transplantar CMMO-GFP<sup>+</sup> derivadas de camundongos e diminuir as chances de rejeição das células infundidas. Tendo em vista que a maioria dos estudos utilizam ratos nesse modelo, algumas considerações podem ser feitas. Iancu e colegas (2005) padronizaram o modelo em camundongos e demonstraram que, independente da dose, a injeção de 6-OHDA no MFB provoca lesões da via nigroestriatal de diferentes extensões (IANCU, et al., 2005). A contagem das células TH<sup>+</sup> revelou uma perda neuronal que varia entre 4 – 100% na dose de 5,4 µg e entre 12 – 97% na dose de 3,9µg (semelhante à dose utilizada por nosso grupo). Essa variabilidade dificulta a homogeneização dos animais dentro do mesmo grupo e conseqüentemente eleva o desvio padrão do mesmo. Dessa forma, os testes estatísticos disponíveis para comparação de diferentes grupos não conseguem detectar diferenças significativas entre os mesmos. Para tentar descartar esse viés, utilizamos ANOVA de medidas repetidas para compararmos o desempenho nas tarefas motoras do mesmo animal, ao longo do tempo, e não a média dos grupos. Porém, ainda assim, não encontramos diferenças significativas após o transplante de CMMO. Sendo assim, sugerimos que a extensão da lesão deve ser limitada antes da realização dos transplantes, utilizando apenas animais com lesões pequenas, médias ou grandes em todos os grupos experimentais.

O presente estudo demonstrou, ainda, que as CMMO-GPF<sup>+</sup>, de camundongos, transplantadas por via sistêmica, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e migrar em direção ao encéfalo no modelo da 6-OHDA da DP. A BHE é um obstáculo entre o sangue e o cérebro, em que as células endoteliais capilares cerebrais formam junções impermeáveis entre as células adjacentes (BETZ, 1992, GREENWOOD, 1991). Em lesões agudas do sistema nervoso central (SNC), sabe-se que ocorre quebra dessa barreira por alguns instantes, como durante crises epiléticas (OBY and JANIGRO, 2006), podendo

persistir por algumas semanas, como no caso de isquemias cerebrais (BELAYEV, et al., 1996, GREENWOOD, 1991). A quebra da BHE nas crises epiléticas associadas à lesão crônica pode ser responsável pela redução na frequência das crises epiléticas pós-transplante de CMMO (COSTA-FERRO, et al., 2010). Porém, em lesões crônicas, como na DP, acreditava-se que a barreira impediria a migração de células transplantadas i.v. em direção ao encéfalo. Conseguimos demonstrar através da técnica de PCR que, mesmo três semanas após a lesão com 6-OHDA, as CMMO transplantadas através da veia da cauda migram em direção ao encéfalo e atravessam a barreira hematoencefálica. Esse resultado é de grande relevância clínica, pois sugere uma nova via de administração de células-tronco para o tratamento da DP, uma vez que a maioria dos dados disponíveis na literatura realizam transplantes intracerebrais e esse tipo de infusão dificulta a aplicação clínica e oferece maior risco ao paciente.

A análise do tecido encefálico dos camundongos parkinsonianos através de PCR revelou, também, que as CMMO transplantadas sobrevivem 1 semana pós-transplante. Os testes realizados 15 e 30 dias após a infusão não indicaram presença das células transplantadas no tecido do hospedeiro. Esses dados estão de acordo com o estudo realizado por Suon e colaboradores (2006) em que neuroesferas derivadas de MSCs humanas transplantadas no estriado de ratos parkinsonianos sobrevivem por um curto prazo (1- 2 semanas). Além disso, eles demonstraram que quatro semanas após o transplante, todas as células do doador haviam morrido (SUON, YANG and IACOVITTI, 2006). Wang e colaboradores (2010) também demonstraram que MSCs transplantadas i.v. em ratos parkinsonianos sobrevivem até por uma semana no encéfalo desses animais e que, 4 semanas após o transplante não são detectadas células de doadores (WANG, et al., 2010).

Diferentemente, porém, Glavaski-Joksimovic e colegas (2009) demonstram que SB623 MSCs humanas, geneticamente modificadas para expressarem marcadores neurais, quando transplantadas no estriado de ratos, uma semana após a lesão com 6-OHDA, sobrevivem por 3 semanas no encéfalo desses animais (GLAVASKI-JOKSIMOVIC, et al., 2009). Essa diferença pode ser justificada pelo período em que as células-tronco foram administradas. Em nosso estudo, os animais parkinsonianos receberam as CMMO apenas 3 semanas após a lesão com 6-OHDA, enquanto que Glavaski-Joksimovic e colaboradores (2009) injetaram as células uma semana após a lesão (GLAVASKI-JOKSIMOVIC, et al., 2009). Uma vez



que a lesão ainda pode ser considerada aguda nesse período, a mesma pode ter atraído um maior número de células para si, promovendo maior aderência e sobrevivência dessas células. Além disso, o transplante direto das células-tronco também pode promover a sobrevivência de um maior número de células em ambos os estudos descritos acima.

A migração das células transplantadas para a região lesada pode ter ocorrido devido a um processo inflamatório desencadeado pela injeção de 6-OHDA, que promove a proliferação de microglia reativa na substância negra, parte compacta (SNc) (GRUNBLATT, MANDEL and YODIM, 2000). Essa microglia, 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).

Diversos estudos demonstram que o transplante de MSCs é capaz de modificar a citoarquitetura do cérebro de animais parkinsonianos. Bouchez e colaboradores (2008) demonstraram que o transplante de MSCs cultivadas em meio enriquecido (indução de neurodiferenciação) promoveu um aumento não significativo do número de células TH<sup>+</sup> no estriado e um aumento significativo SNc em comparação ao grupo controle (BOUCHEZ, et al., 2008). Além disso, foi demonstrado também que MSCs induzidas *in vitro* a secretarem fatores tróficos (NTF-SC), quando transplantadas em ratos lesionados com 6-OHDA tem efeito protetor no estriado desses animais, além de aumentar significativamente o número de células TH<sup>+</sup> em comparação ao grupo controle (SADAN, et al., 2009). Outros estudos, utilizando MSCs transfectadas com o gene da TH demonstram que o transplante dessas células no estriado de ratos parkinsonianos é capaz de aumentar o conteúdo de dopamina na SNc e no estriado, em relação ao grupo controle (LU, et al., 2005, ZOU, et al., 2010).

Wang e colaboradores (2010) demonstraram, ainda, que o transplante intravenoso (i.v.) de MSCs preserva as fibras TH<sup>+</sup> do estriado em comparação aos grupos controle, sugerindo que a via intravenosa pode ser funcional para o transplante de células-tronco. Sendo assim, futuramente, pretendemos avaliar as possíveis modificações histológicas induzidas pelo transplante i.v. de CMMO em camundongos parkinsonianos (WANG, et al., 2010).

Em resumo, demonstramos que as CMMO, transplantadas através da veia da cauda em camundongos parkinsonianos, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e migrar em direção ao encéfalo, além de sobreviverem por 1 semana após o transplante. Essas células, porém, não foram capazes de restabelecer a função motora desses animais, em até 30 dias pós-transplante. Se as CMMO conseguiram restaurar os neurônios dopaminérgicos nigroestriatais apenas a nível histológico, não podendo essa restauração ser detectada pelos testes motores realizados, ainda precisa ser esclarecido. Dessa forma, sugerimos que se continue a investigar, em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos, o potencial terapêutico das células tronco na DP, utilizando a via sistêmica, a qual parece mais segura e de mais fácil execução, em comparação ao transplante intracerebral realizado pela maioria dos estudos disponíveis até o momento.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho investigamos os efeitos do transplante de células mononucleares de medula óssea em modelo lesional da doença de Parkinson por infusão de 6-OHDA em camundongos.

Nosso estudo possibilitou as seguintes conclusões:

1. O desempenho no teste de Rotarod é sensível à lesão do MFB em camundongos e pode ser utilizado para avaliação da perda neuronal e função motora no modelo lesional da DP nesses animais.
2. O transplante i.v. de CMMO não foi capaz de melhorar o desempenho motor dos animais parkinsonianos.
3. Demonstramos, pela primeira vez, que as CMMO transplantadas por via sistêmica são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, mesmo após lesão crônica (3 semanas pós-lesão), e migrar em direção ao tecido encefálico.
4. Foram detectadas CMMO-GFP+ no encéfalo do hospedeiro, até 1 semana após o transplante, sugerindo que essas células aderiram ao tecido encefálico.

## 7 PERSPECTIVAS

O presente estudo não realizou análise histológica do tecido encefálico de animais transplantados com CMMO, sendo que uma alteração na citoarquitetura da região lesada, após a infusão de células, não pode ser descartada. O tempo de avaliação pós-transplante utilizado por nosso grupo pode não ter sido suficiente para demonstrar alterações comportamentais nos animais transplantados, porém, uma restauração do tecido lesado, que posteriormente desencadearia modificações comportamentais, pode ter ocorrido. Dessa forma, pretendemos, no futuro, realizar estudo histológico para avaliar a possível reorganização estrutural encefálica, além de utilizar novas abordagens, tais como:

1. Padronizar o tamanho da lesão antes da divisão dos grupos e quantificar a extensão da mesma antes e depois do transplante;
2. Marcar e avaliar apenas neurônios dopaminérgicos, a fim de realizar estudo mais específico e detectar mais facilmente qualquer alteração histológica;
3. Transplantar células-tronco diferenciadas em cultura;
4. Estudar outras vias de administração de células, como a intracarotídea, a qual já vem sendo aplicada, com sucesso, em outros modelos experimentais de nosso laboratório;
5. Realizar seguimento do comportamento animal a curto, médio e longo prazo (2 semanas, 4 semanas e 6 semanas) e
6. Transplantar as células-tronco juntamente com a aplicação de drogas, tais como: resveratrol, para proteger as células-tronco injetadas e a neurogênese local de agentes oxidantes; e drogas que bloqueiam fatores inflamatórios, como a ciclo-oxigenase 2. Essa combinação pode garantir maior sobrevivência das células e sucesso do transplante.

## 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.283-286, Sep 2003.

BAGHERI, H., et al. A study of salivary secretion in Parkinson's disease. **Clin Neuropharmacol**, v.22, n.4, p.213-215, Jul-Aug 1999.

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.

BANDOPADHYAY, R. and 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.

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.1200-1207, Oct 2003.

BELAYEV, L., et al. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain Res**, v.739, n.1-2, p.88-96, Nov 11 1996.

BERARDELLI, A., et al. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. **Brain**, v.124, n.Pt 11, p.2131-2146, Nov 2001.

BETZ, A. L. An overview of the multiple functions of the blood-brain barrier. **NIDA Res Monogr**, v.120, p.54-72, 1992.

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.307-333, Oct 20 1980.

BJORKLUND, A. and STENEVI, U. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. **Brain Res**, v.177, n.3, p.555-560, Nov 30 1979.

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.203-217, 2010.

BONIFATI, V., et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. **Science**, v.299, n.5604, p.256-259, Jan 10 2003.

BOUCHEZ, G., et al. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. **Neurochem Int**, v.52, n.7, p.1332-1342, Jun 2008.

BRAZELTON, T. R., et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science**, v.290, n.5497, p.1775-1779, Dec 1 2000.

BRIGNIER, A. C. and GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy. **J Allergy Clin Immunol**, v.125, n.2 Suppl 2, p.S336-344, Feb 2010.

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.3828-3832, May 1989.

BUCHHEISER, A., et al. Cord blood for tissue regeneration. **J Cell Biochem**, v.108, n.4, p.762-768, Nov 1 2009.

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.

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.1017-1023, Jul 2010.

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

COGLE, C. R., et al. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. **Lancet**, v.363, n.9419, p.1432-1437, May 1 2004.

COSTA-FERRO, Z. S., et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. **Seizure**, v.19, n.2, p.84-92, Mar 2010.

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.1437-1448, Aug 1999.

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.

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.315-317, 2006.

EBERSBACH, G., et al. Scales in Parkinson's disease. **J Neurol**, v.253 Suppl 4, p.IV32-35, Aug 2006.

EINSTEIN, O. and BEN-HUR, T. The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases. **Arch Neurol**, v.65, n.4, p.452-456, Apr 2008.

ENGELENDER, S., et al. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. **Nat Genet**, v.22, n.1, p.110-114, May 1999.

ERICES, A., CONGET, P. and MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, v.109, n.1, p.235-242, Apr 2000.

EVANS, M. J. and KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v.292, n.5819, p.154-156, Jul 9 1981.

FAHN, S., et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v.351, n.24, p.2498-2508, Dec 9 2004.

FAHN, S. and SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **NeuroRx**, v.1, n.1, p.139-154, Jan 2004.

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.1549-1555, Nov 26 1992.

\_\_\_\_\_. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v.344, n.10, p.710-719, Mar 8 2001.

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.115-124, Jan 2006.

FUCHS, E. and SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v.100, n.1, p.143-155, Jan 7 2000.

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.

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.801-814, 2009.

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.1174-1178, Oct 26 1989.

GOLBE, L. I., et al. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.27, n.3, p.276-282, Mar 1990.

\_\_\_\_\_. Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. **Ann Neurol**, v.40, n.5, p.767-775, Nov 1996.

GREENWOOD, J. Mechanisms of blood-brain barrier breakdown. **Neuroradiology**, v.33, n.2, p.95-100, 1991.

GRUNBLATT, E., MANDEL, S. and 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.262-273, 2000.

HAGELL, P., et al. Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. **Brain**, v.122 ( Pt 6), p.1121-1132, Jun 1999.



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.15921-15926, Sep 7 2010.

HARRIS, D. T. and 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.301-309, Dec 2007.

HATANO, Y., et al. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. **Ann Neurol**, v.56, n.3, p.424-427, Sep 2004.

HAUSER, R. A., et al. Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. **Arch Neurol**, v.56, n.2, p.179-187, Feb 1999.

HEALY, D. G., ABOU-SLEIMAN, P. M. and WOOD, N. W. PINK, PANK, or PARK? A clinicians' guide to familial parkinsonism. **Lancet Neurol**, v.3, n.11, p.652-662, Nov 2004.

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.124-128, Mar 6 2006.

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.837-844, Apr 30 2008.

HOCHSTRASSER, M. Protein degradation or regulation: Ub the judge. **Cell**, v.84, n.6, p.813-815, Mar 22 1996.

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.861-870, Apr 2002.

HUGHES, A. J., DANIEL, S. E. and LEES, A. J. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. **Neurology**, v.57, n.8, p.1497-1499, Oct 23 2001.

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.

IMAYOSHI, I., et al. Continuous neurogenesis in the adult brain. **Dev Growth Differ**, v.51, n.3, p.379-386, Apr 2009.

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.573-584, Feb 15 2004.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.79, n.4, p.368-376, Apr 2008.

JONES, E. and MCGONAGLE, D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. **Rheumatology (Oxford)**, v.47, n.2, p.126-131, Feb 2008.

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.474-480, Aug 12 2008.

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.11839-11844, Aug 10 2004.

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.196-104, Aug 30 2005.

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.50-56, Jul 4 2002.

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.573-583, May 2005.

\_\_\_\_\_. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **J Exp Med**, v.200, n.2, p.123-135, Jul 19 2004.

KOGLER, G., SENSKEN, S. and 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.1589-1595, Nov 2006.

KOPEN, G. C., PROCKOP, D. J. and 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.10711-10716, Sep 14 1999.

KORBLING, M., ESTROV, Z. and CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. **Bone Marrow Transplant**, v.32 Suppl 1, p.S23-24, Aug 2003.

KRAUSE, D. S., et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v.105, n.3, p.369-377, May 4 2001.

KRUGER, R., et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Nat Genet**, v.18, n.2, p.106-108, Feb 1998.

LE, W. D., et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. **Nat Genet**, v.33, n.1, p.85-89, Jan 2003.

LEES, A. J., HARDY, J. and REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v.373, n.9680, p.2055-2066, Jun 13 2009.

LEES, A. J., et al. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. **Mov Disord**, v.23, n.6, p.777-783, Apr 30 2008.

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.163-190, 2008.

LEROY, E., et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. **Nature**, v.395, n.6701, p.451-452, Oct 1 1998.

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.1522-1529, Oct 2010.

LI, W. and 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.

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.

LINDVALL, O., et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. **Science**, v.247, n.4942, p.574-577, Feb 2 1990.

LU, L., et al. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. **Brain Res Brain Res Protoc**, v.15, n.1, p.46-51, May 2005.

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.1560-1567, May 25 2000.

MA, D. K., et al. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. **Cell Res**, v.19, n.6, p.672-682, Jun 2009.

MADRAZO, I., et al. Fetal homotransplants (ventral mesencephalon and adrenal tissue) to the striatum of parkinsonian subjects. **Arch Neurol**, v.47, n.12, p.1281-1285, Dec 1990.

\_\_\_\_\_. 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.

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.7634-7638, Dec 1981.

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.1223-1231, Jun 1 2003.

MASUI, S. Pluripotency maintenance mechanism of embryonic stem cells and reprogramming. **Int J Hematol**, v.91, n.3, p.360-372, Apr 2010.

MEISSNER, A., WERNIG, M. and JAENISCH, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. **Nat Biotechnol**, v.25, n.10, p.1177-1181, Oct 2007.

MIYASAKI, J. M. New practice parameters in Parkinson's disease. **Nat Clin Pract Neurol**, v.2, n.12, p.638-639, Dec 2006.

MIZUNO, Y., HATTORI, N. and MORI, H. Genetics of Parkinson's disease. **Biomed Pharmacother**, v.53, n.3, p.109-116, Apr 1999.

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

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.2017-2024, Aug 2007.

O'SULLIVAN, S. S., et al. Clinical outcomes of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy. **Brain**, v.131, n.Pt 5, p.1362-1372, May 2008.

OBY, E. and JANIGRO, D. The blood-brain barrier and epilepsy. **Epilepsia**, v.47, n.11, p.1761-1774, Nov 2006.

OKABE, M., et al. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. **FEBS Lett**, v.407, n.3, p.313-319, May 5 1997.

OUREDNIK, J., et al. Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. **Nat Biotechnol**, v.20, n.11, p.1103-1110, Nov 2002.

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.

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.149-160, Jan 2008.

PARK, K. I., TENG, Y. D. and 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.1111-1117, Nov 2002.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v.14, n.2, p.223-236; discussion 222, Spring 2002.

PHINNEY, D. G. and 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.2896-2902, Nov 2007.

PICCINI, P., et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. **Nat Neurosci**, v.2, n.12, p.1137-1140, Dec 1999.

PLEMPER, R. K. and WOLF, D. H. Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. **Mol Biol Rep**, v.26, n.1-2, p.125-130, Apr 1999a.

\_\_\_\_\_. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. **Trends Biochem Sci**, v.24, n.7, p.266-270, Jul 1999b.

POLYMEROPOULOS, M. H., et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science**, v.274, n.5290, p.1197-1199, Nov 15 1996.

\_\_\_\_\_. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v.276, n.5321, p.2045-2047, Jun 27 1997.

QUINN, N. P. How to diagnose multiple system atrophy. **Mov Disord**, v.20 Suppl 12, p.S5-S10, Aug 2005.

RAO, G., et al. Does this patient have Parkinson disease? **JAMA**, v.289, n.3, p.347-353, Jan 15 2003.

RASCOL, O., et al. Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. **Lancet**, v.359, n.9317, p.1589-1598, May 4 2002.

ROCHA, V. and 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.

RODRIGUEZ-OROZ, M. C., et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **Lancet Neurol**, v.8, n.12, p.1128-1139, Dec 2009.

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.587-596; discussion 596-600, 1994.

SADAN, O., et al. Protective effects of neurotrophic factor-secreting cells in a 6-OHDA rat model of Parkinson disease. **Stem Cells Dev**, v.18, n.8, p.1179-1190, Oct 2009.

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<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. **Stem Cells**, v.26, n.1, p.212-222, Jan 2008.

SEOL, W. Biochemical and molecular features of LRRK2 and its pathophysiological roles in Parkinson's disease. **BMB Rep**, v.43, n.4, p.233-244, Apr 2010.

SHIMURA, H., et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nat Genet**, v.25, n.3, p.302-305, Jul 2000.

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.S160-166, Sep 1998.

SINGLETON, A. B., et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. **Science**, v.302, n.5646, p.841, Oct 31 2003.

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.1541-1548, Nov 26 1992.

SPELLANTINI, 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.6469-6473, May 26 1998.

SUON, S., YANG, M. and 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.

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.3024-3029, Mar 5 2002.

TERADA, N., et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, v.416, n.6880, p.542-545, Apr 4 2002.

THOMSON, J. A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, n.5391, p.1145-1147, Nov 6 1998.

VALENTE, E. M., et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. **Science**, v.304, n.5674, p.1158-1160, May 21 2004a.

\_\_\_\_\_. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. **Ann Neurol**, v.56, n.3, p.336-341, Sep 2004b.

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.

WAKABAYASHI, K., et al. Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.47, n.4, p.521-523, Apr 2000.

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.

WANG, H. Q. and TAKAHASHI, R. Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal**, v.9, n.5, p.553-561, May 2007.

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.

WELTE, K., et al. International exchange of cord blood units: the registry aspects. **Bone Marrow Transplant**, v.45, n.5, p.825-831, May 2010.

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.5856-5861, Apr 15 2008.



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.1247-1258, Jun 2005.

WILLIAMS, D. R., WATT, H. C. and LEES, A. J. Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.77, n.4, p.468-473, Apr 2006.

WOODBURY, D., et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J Neurosci Res**, v.61, n.4, p.364-370, Aug 15 2000.

YAMAMURA, Y., et al. Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. **Neurology**, v.23, n.3, p.239-244, Mar 1973.

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.164-173, Feb 2004.

ZETTERSTROM, R. H., et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. **Science**, v.276, n.5310, p.248-250, Apr 11 1997.

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.

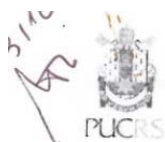
ZHONG, X. Y., et al. Umbilical cord blood stem cells: what to expect. **Ann N Y Acad Sci**, v.1205, p.17-22, Sep 2010.

ZIMPRICH, A., et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. **Neuron**, v.44, n.4, p.601-607, Nov 18 2004.

ZOU, Z., et al. Efficacy of Tyrosine Hydroxylase gene modified neural stem cells derived from bone marrow on Parkinson's disease--a rat model study. **Brain Res**, v.1346, p.279-286, Jul 30 2010.

## 9 ANEXOS

### A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



CEUA  
COMITÊ DE ÉTICA PARA  
O USO DE ANIMAIS

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

## B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO





The screenshot shows the top navigation bar of the ScholarOne Manuscripts system. On the left is the Wiley logo and the journal title "Movement Disorders". On the right are links for "Edit Acc", "Instructions & F", "Log O", and "Get Help". Below the journal title is the "SCHOLARONE™ Manuscripts" logo. A breadcrumb trail at the bottom of the bar reads "Main Menu → Author Dashboard → Submission Confirmation". A status message at the bottom right of the bar says "You are logged in as Jaderson DaCosta".

## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Movement Disorders*.

Manuscript ID:	MDS-11-0161
Title:	Migration and survival of bone marrow mononuclear cells following systemic transplant in a mouse model of Parkinson's disease.
Authors:	Silva, Caroline Reder, Gleice Marinowic, Daniel Machado, Denise DaCosta, Jaderson
Date Submitted:	31-Jan-2011

 **Print**    **Return to Dashboard**

ScholarOne Manuscripts™ v4.5.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2010. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

C - ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA A REVISTA "MOVEMENT DISORDERS"

**Migration and survival of bone marrow mononuclear cells following systemic transplant in a mouse model of Parkinson's disease.**

Journal:	<i>Movement Disorders</i>
Manuscript ID:	MDS-11-0161
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	04-Feb-2011
Complete List of Authors:	Silva, Caroline; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Biomédicas and Instituto do Cérebro Reder, Gleice; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Biomédicas and Instituto do Cérebro Marinowic, Daniel; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Biomédicas and Instituto do Cérebro Machado, Denise; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Biomédicas DaCosta, Jaderson; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Biomédicas and Instituto do Cérebro
Keywords:	Parkinson's disease, mouse, stem cell, systemic transplant, motor function

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3 **Migration and survival of bone marrow mononuclear cells following systemic**  
4 **transplant in a mouse model of Parkinson's disease.**  
5

6 Caroline Calice da Silva<sup>1</sup>, Gleice Monteiro Reder<sup>1</sup>, Daniel Rodrigo Marinowic<sup>2</sup>, Denise  
7 Cantarelli Machado<sup>2</sup>, Jaderson Costa DaCosta<sup>1,2</sup>.  
8

9  
10  
11  
12 <sup>1</sup>Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do  
13 Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga  
14 6690, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.  
15  
16

17  
18  
19 <sup>2</sup>Centro de Terapia Celular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade  
20 Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, Porto Alegre, Rio Grande do Sul,  
21 Brasil.  
22  
23  
24

25  
26 **Corresponding author:**

27  
28 Jaderson Costa Dacosta, M.D., Ph.D  
29  
30 Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do Cérebro,  
31 PUCRS  
32  
33 Av. Ipiranga 6690/220, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil  
34  
35 Phone: +55 51 3320-3250  
36  
37 Fax: +55 51 3320-3250  
38  
39 E-mail: [jcc@pucrs.br](mailto:jcc@pucrs.br)  
40  
41

42 **Word count**

43 Abstract: 227

44 Text: 2919  
45  
46  
47  
48

49 **Running title**

50 BMMC in a mouse model of Parkinson's disease.  
51  
52

53  
54 **Key words**

55 Parkinson's disease, mouse, stem cell, systemic transplant, motor function.  
56  
57  
58  
59  
60

**Financial disclosure related to research covered in this article**

This work was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Pandurata Ltda, and fellowship from Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

The authors declare no conflicts of interests.

For Peer Review

**Abstract**

**Background:** 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 viability of systemic transplant of bone marrow mononuclear cells in a mouse model of Parkinson's disease and to evaluate their therapeutic potential.

**Methods:** Animals underwent stereotaxic surgery and received an injection of 6-hydroxydopamine into their medial forebrain bundle. Three weeks later, mice were transplanted with bone marrow mononuclear cells, fibroblasts or saline through the caudal vein. Motor function was assessed using the Rotarod and apomorphine-induced rotation tests. **Results:** Our results show that bone marrow mononuclear cells are able to cross the blood-brain barrier, migrate toward encephalic tissue, and survive for 1 week following transplant into parkinsonian mice. These cells, however, were not capable of restoring these animals' motor function 30 days after post-transplant. **Conclusions:** Further studies are needed to ascertain whether bone marrow mononuclear cells have an effect on the motor function of parkinsonian mice. We suggest that systemic cell administration should be considered as a possible route in pre-clinical and clinical studies of Parkinson's disease.



## 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<sup>1-3</sup>. This neuronal loss is accompanied by an increased number of glial cells and the appearance of Lewy's body, which are intracytoplasmic inclusions in the SN and other brain areas<sup>2,4</sup>. The dopamine deficiency in Parkinson's disease is responsible for the development of motor symptoms, such as resting tremor, bradykinesia, rigidity and postural instability<sup>1-3</sup>.

Pharmacological therapies, such as monoamine oxidase-B inhibitors and levodopa are widely used, the latter being the most effective for controlling motor symptoms<sup>4</sup>. Surgical interventions, including deep brain stimulation<sup>5</sup>, 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 (dyskinesias)<sup>6</sup>. Thus, other alternatives have been studied, and one promising possibility is stem cell transplant.

Many pre-clinical and clinical studies have used fetal<sup>7-13</sup>, neural<sup>14,15</sup> or embryonic<sup>16,17</sup> 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<sup>18</sup>. Moreover, these treatment modalities generally require a surgical procedure involving intracerebral transplant of cells. Conversely, bone marrow-derived stem cells are easy to obtain in substantial quantity and allow for autologous transplant<sup>19,20</sup>. Some studies have been done using mesenchymal stem cells (MSCs) for PD treatment<sup>21-23</sup>, but further research is needed to improve these therapeutic approaches. There are two key questions regarding cell-based therapy. First, are systemically delivered bone marrow mononuclear cells (BMMCs) able to cross the blood-brain barrier (BBB) and survive in the parkinsonian rodent brain? Second, are these cells, once in the animal brain, capable of reversing motor function deficits? The present study aimed to assess the viability of systemic transplant of BMMCs in a mouse model of PD and to evaluate their potential therapeutic effects on motor function.

## Methods

### *Animals:*

Thirty-one 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.). BMNCs were extracted from 10 male C57BL/6-EGFP adult mice. All procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and use of Laboratory Animals and were approved by the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Experimental Animal Committee.

### *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 (Insight Equipments, Brazil). The scalp was opened through a midline incision, the skull was exposed and a small burr hole was drilled. One microliter of 6-hydroxydopamine (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<sup>24</sup>. Infusions were performed with a 25-gauge (G) needle linked by a polyethylene tube to a 10- $\mu$ L Hamilton syringe. The infusion was performed at a flow rate of 0.5  $\mu$ L/min with the aid of a pump (KDS2000, KD Scientific). 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*

BMNCs were obtained from C57BL/6 mice expressing eGFP, which was used as a reporter of transplanted cells<sup>25</sup>. 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 11191, 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

1  
2  
3 determined by Trypan Blue exclusion. Extracted cells were distributed in 200  $\mu$ L  
4 aliquots, which contained  $10^7$  BMMCs. For the detection of surface antigen, BMMCs  
5 were incubated with conjugated antibodies against CD34, CD11b, CD117, CD45 and  
6 Sca1. Labeled cells were collected and analyzed using a FACSCalibur cytometer.  
7  
8  
9

#### 10 11 *Fibroblast culture and preparation*

12 Fibroblasts of the NIH-3T3 lineage were obtained from American Type Culture  
13 Collection (ATCC, Rockville, MD, cell line number CRL-1658<sup>TM</sup>) and cultured in  
14 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Chemical Co, USA  
15 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin and 100 U/mL  
16 streptomycin. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> and 95%  
17 air incubator. Medium was replaced every 3 days until cells were 70% confluent. Cell  
18 viability was assessed by Trypan blue exclusion. On the day of transplant, fibroblasts  
19 were distributed in 200  $\mu$ L saline aliquots containing  $10^6$  cells.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

#### 30 31 *Transplant*

32 Three weeks following 6-OHDA injection, animals with MFB lesions were randomly  
33 assigned to receive an intravenous (i.v.) infusion of 200  $\mu$ L of a solution containing  $10^7$   
34 BMMCs (BMMC group, n = 12),  $10^6$  fibroblasts (FIB group, n = 8) or saline (SAL  
35 group, n = 11). Prior to the i.v. infusion, animals were anesthetized with ketamine and  
36 xylazine. The solution was infused through one of the caudal veins using a syringe (BD  
37 Ultra-Fine 0.5 mL). Only animals with proven rotational behavior ( $\geq 50$  rotations / 30  
38 min), which was assessed using the apomorphine test at two week post-lesion, were  
39 selected for the transplant.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

#### 49 50 *Rotarod test*

51 Motor function was analyzed using a Rotarod apparatus (EFF 411, Insight, Brazil).  
52 Following an adaptation trial on the previous day, mice were tested one day prior to  
53 surgery and three weeks post-lesion as well as 10 and 30 days post-transplantat.  
54 Adaptation consisted of placing the mouse on the cylinder for 420 s at a constant  
55 rotation rate of 16 rpm. If the animal fell, it was placed back onto the rod. The test was  
56 performed on an accelerating Rotarod with an initial speed of 16 rpm, which was  
57 gradually increased to 37 rpm over ten phases. Each animal underwent three trials of  
58  
59  
60

1  
2  
3 420 s each at 30-minute intervals. For each session, the mean drop latency and the mean  
4  
5 phase in which the drop occurred for the three trials were calculated.  
6  
7

#### 8 9 *Apomorphine-induced rotation test*

10 Apomorphine-induced rotation was measured two weeks post-lesion as well as 10 and  
11  
12 30 days post-transplant. Mice received 1 mg/kg of apomorphine (i.p.; Sigma Aldrich,  
13  
14 USA) and were placed in individual acrylic bowls with a diameter of 20 cm. Mice were  
15  
16 allowed to adapt to their environment for 10 min before the 30 min period during which  
17  
18 turns contralateral to the lesion were counted. Ipsilateral turns, if present, were deducted  
19  
20 from the total number of contralateral turns<sup>26,27</sup>.  
21

#### 22 23 *Nested polymerase chain reaction analysis*

24 DNA was obtained from the brains of transplanted animals 1 h (n = 3) and 24 h (n = 2),  
25  
26 as well as 7 days (n = 4), 15 days (n = 2) and 30 days (n = 2) after BMNC  
27  
28 administration. To evaluate BMNC migration, we used the forward primer 5'-  
29  
30 ttgaattcgccaccatggtgagc-3' and the reverse primer 5'-ttgaattcttactgtacagctcgtcc-3'  
31  
32 complimentary to the eGFP DNA sequence, and reamplified with the forward primer  
33  
34 5'-gggcacaagctggagtaca-3' and the reverse primer 5'-atgtgtggcggatcttga-3' using a  
35  
36 nested PCR technique. Amplified products were detected using gel electrophoresis (2%  
37  
38 agarose containing ethidium bromide) and visualized under ultraviolet light<sup>25</sup>.  
39

#### 40 41 *Statistical analysis*

42 Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), as indicated in the  
43  
44 figure legends. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni  
45  
46 post hoc test or paired Student's t test were used to analyze the effect of the MFB  
47  
48 lesions and BMNC transplant on the rotarod and apomorphine tests. Analyses were  
49  
50 performed using PrismGraph 5.0 software (Graph-Pad Software, San Diego, CA). A  
51  
52 statistical significance level of  $\alpha = 0.05$  and  $p < 0.05$  was applied to all tests.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Results

### *Performance of mice in the Rotarod test was changed following lesioning of the MFB and cell transplant*

The Rotarod test was first performed to evaluate whether the MFB lesion affected the motor function of mice. We used the same test to monitor animals' motor function after cell transplant and to elucidate whether BMMCs administration is able to improve animals' performance in this test. The mean drop latency and the mean phase in which the drop occurred were used to measure motor changes.

The mean drop latency prior to the MFB lesion was  $239.1 \pm 12.08$  s, and after 6-OHDA injection, the mean drop latency was  $132 \pm 10.94$  s (Figure 1,  $P < 0.0001$ ). The mean phase of drop was  $6.67 \pm 0.30$  prior to the MFB lesion and was  $3.93 \pm 0.28$  after the lesion. These data indicate a motor function deficit following 6-OHDA-induced dopaminergic neuron death.

To analyze and compare data taken after BMMC transplant, we performed a two-way ANOVA. This statistical analysis did not reveal significant differences in the interaction between treatment and time post-transplant among the groups, either in mean drop latencies [ $F_{(2,112)} = 0.68$ ,  $P = 0.6690$ , Fig. 2A] or mean drop phase [ $F_{(2,112)} = 0.31$ ,  $P = 0.9298$ , Fig. 2B]. The FIB group showed better performance in the Rotarod test 30 days after treatment as indicated by increases in the mean of drop latency and phase of drop (in drop latencies analysis, FIB mean was  $189.1 \pm 23.57$  s and BMMC mean was  $111.1 \pm 13.36$  s; in phase of drop analysis, FIB mean was  $5.41 \pm 0.60$  and BMMC mean was  $3.47 \pm 0.35$ ,  $P < 0.05$  for both analysis; Figure 2).

### *MFB lesion promotes apomorphine-induced rotation that was not decreased by BMMC transplant*

To evaluate whether the injection of 6-OHDA into the MFB was effective, we administered apomorphine (i.p.) in mice following stereotaxic surgery and measured the number of rotations contralateral to the lesion site. Only animals with proven rotational behavior were selected for transplant. Few lesioned animals were not considered in this study (data not shown). We also used the measure of contralateral rotations over time to evaluate whether BMMC transplant improved animals motor function. Two-way ANOVA analysis showed that there were no significant differences in the interaction between treatment and time [ $F_{(2,84)} = 0.24$ ,  $P = 0.9159$ , Fig. 3].

1  
2  
3  
4  
5 *eGFP was detected in samples obtained from the brains of BMMC-transplanted*  
6 *animals*  
7

8  
9 We employed a nested PCR analysis to determine whether eGFP DNA from BMMCs  
10 could be detected in the brains of transplanted animals. This analysis was performed to  
11 elucidate whether intravenously administered BMMCs are able to cross the BBB and  
12 whether these cells survive in the encephalic tissue. Amplified eGFP DNA was found in  
13 the brain of parkinsonian mice 1 h (Figure 4A), 24 h (Figure 4B) and 7 days (Figure 4C)  
14 following transplant. Analyses performed 15 and 30 days post-transplantat were  
15 negative for the eGFP gene (data not shown).  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Discussion

Our study shows that parkinsonian mice transplanted with BMMCs do not exhibit restored motor function, as evaluated by the Rotarod and apomorphine-induced rotation tests. In addition, we demonstrated that BMMC-GFP+ cells transplanted systemically via i.v. into parkinsonian mice can cross the BBB, migrate toward encephalic tissue and survive for one week.

In the present study, the effect of BMMC transplant on motor function was evaluated. We observed that lesioning with 6-OHDA resulted in a significant difference in animal performance on the Rotarod. Performance on this test was assessed by both drop latency and by the phase of drop. These data indirectly indicate that the MFB lesion was effective and that animal motor function was damaged. We did not find, however, effects of BMMC transplant on Rotarod performance. Some studies have demonstrated that intracerebral transplant of MSCs into different animals models of PD increases drop latency in the Rotarod test<sup>28, 21</sup>. Our group also showed a better performance of the FIB group compared to the BMMC group 30 days after transplant. This difference, although significant, does not have clinical relevance, given that neither group was different from the SAL group. In addition, the FIB group, despite being statistically identical to the other groups, displayed better performance on the behavioral tasks from the beginning of experimentation.

Another test used in our study to evaluate motor function was the apomorphine-induced rotation test. BMMC treatment did not significantly modify apomorphine-induced rotational asymmetry over time. Studies using MSCs induced to express neuronal markers have shown that intracerebral transplant of these cells in parkinsonian rodents can decrease the apomorphine-induced rotational rate<sup>22, 23, 29, 30</sup>. Furthermore, Wang and colleagues (2010) demonstrated that intravenously-transplanted MSCs also have a large effect on the rotation behavior of parkinsonian rats<sup>31</sup>.

Differences in study designs, including the concentrations and/or types of transplanted stem cells, route of infusion, test protocols, and duration of monitoring animal motor function, could explain the opposite motor task results found by our group. We cannot, however, rule out the possibility that BMMCs are actually not effective in restoring motor function in animals lesioned with 6-OHDA, at least as assessed by the Rotarod and apomorphine-induced rotation tests.

1  
2  
3 We also evaluated the capacity of intravenously-transplanted BMNCs to migrate to  
4 encephalic tissue by crossing the BBB. The BBB is a barrier in which brain capillary  
5 endothelial cells form impermeable junctions between adjacent cells<sup>32, 33</sup>. In acute  
6 central nervous system (CNS) injuries, it is established that the BBB is transiently  
7 disrupted, as in epileptic seizures<sup>34</sup> or cerebral ischemia<sup>33, 35</sup>. However, in chronic  
8 lesions, such as those related to PD, it was thought that the BBB would block the  
9 migration of transplanted cells into the brain. Wang and colleagues (2010) demonstrated  
10 that MSCs transplanted intravenously 2 h post-6-OHDA lesion migrated toward  
11 encephalic tissue<sup>31</sup>. Similarly, we demonstrate here for the first time that systemically  
12 administered BMNCs can cross the BBB after a chronic lesion (3 weeks post-lesion), a  
13 situation closer to what would be encountered in clinical practice. Given that  
14 intracerebral transplant restricts therapeutic application, the suggestion of a new stem  
15 cell administration route has high clinical relevance.

16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000

PCR-based assessment of the parkinsonian mouse brain also showed that transplanted BMNCs survive one week post-transplant. Tests carried out 15 and 30 days following infusion were negative for BMNC-GFP+ cells. These data are in accordance with the study of Suon and colleagues (2006), in which human MSC-derived neurospheres transplanted into the parkinsonian rat striatum survived for 1-2 weeks. In addition, they showed that 4 weeks post-transplant, donor cells could no longer be identified in the rodent brain<sup>36</sup>. Wang and colleagues (2010) also showed that MSCs intravenously-transplanted into parkinsonian rats survive for up to one week in these animals' brains and that donor cells are not detected 4 weeks post-transplant<sup>31</sup>.

Migration of transplanted cells to the lesioned area may have occurred due to an inflammatory process triggered by 6-OHDA injection, which promotes reactive microglia proliferation in the SN<sup>37</sup>. These microglia, in turn, release chemotactic factors, such as stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), that stimulate the migration of hematopoietic and neural progenitors during embryonic development<sup>38</sup>. These data suggest that lesion-induced inflammation stimulates recruitment of transplanted cells<sup>38</sup>. Here, we show for the first time that, following a chronic lesion, BMNCs transplanted through a caudal vein into parkinsonian mice are able to cross the BBB, migrate toward encephalic tissue and survive for 1 week following transplant. Transplant during the chronic period of the lesion is a better model for clinical applications given that patients with PD present chronic and progressive neurodegeneration. BMNCs, however, were not capable of restoring motor function in treated animals within 30 days of the



transplant. Due to the relevance of our findings with respect to the administration route, we intend to carry out further studies using systemic delivery of cellular vectors, which can express genes responsible for the synthesis and/or release of neurotrophic factors and neurotransmitters, such as dopamine. In conclusion, we suggest that systemic cell administration should be considered as a possible delivery route in pre-clinical and clinical PD treatment studies.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Zuzete Pires and Ricardo Breda for their technical assistance. We also thank Gianina Venturin and Samuel Greggio for help with statistical analysis, and Weber Cláudio da Silva for help with drug preparation. 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.

### **Author roles**

Caroline Calice da Silva: 1A, 1B, 1C, 2B, 2C, 3A, 3B. Gleice Monteiro Reder: 1C, 2C, 3B. Daniel Rodrigo Marinowic: 1C, 3B. Denise Cantarelli Machado: 2C, 3B. Jaderson Costa DaCosta: 1A, 1B, 2C, 3B.

Jaderson Costa DaCosta takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

### **Full financial disclosure for the previous 12 months**

Caroline Calice da Silva is the recipient of a Master's degree fellowship from CAPES (Brazil). Gleice Reder has a scientific initiation fellowship from PUCRS and Daniel Marinowic is an employee of the Centro de Terapia Celular from PUCRS. Denise Cantarelli Machado is Professor at Faculdade de Medicina (PUCRS) and a researcher from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq). Jaderson Costa Dacosta is the Director of Instituto do Cérebro, Professor of Neurology at Faculdade de Medicina, PUCRS and a researcher from CNPq.

## References

1. Parish CL, Castelo-Branco G, Rawal N, et al. Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. *J Clin Invest* 2008;118(1):149-160.
2. Fahn S, Sulzer D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx* 2004;1(1):139-154.
3. Bandopadhyay R, de Belleruche J. Pathogenesis of Parkinson's disease: emerging role of molecular chaperones. *Trends Mol Med* 2009;16(1):27-36.
4. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet* 2009;373(9680):2055-2066.
5. Limousin P, Martinez-Torres I. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 2008;5(2):309-319.
6. Isacson O. Problems and solutions for circuits and synapses in Parkinson's disease. *Neuron* 2004;43(2):165-168.
7. Madrazo I, Leon V, Torres C, 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* 1988;318(1):51.
8. Madrazo I, Franco-Bourland R, Ostrosky-Solis F, et al. Fetal homotransplants (ventral mesencephalon and adrenal tissue) to the striatum of parkinsonian subjects. *Arch Neurol* 1990;47(12):1281-1285.
9. Lindvall O, Brundin P, Widner H, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 1990;247(4942):574-577.

- 1  
2  
3 10. Spencer DD, Robbins RJ, Naftolin F, et al. Unilateral transplantation of human  
4 fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease.  
5 N Engl J Med 1992;327(22):1541-1548.  
6  
7
- 8  
9  
10 11. Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, et al. Dopamine release from nigral  
11 transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. Nat Neurosci 1999;2(12):1137-  
12 1140.  
13  
14
- 15  
16  
17 12. Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, et al. Survival of implanted fetal  
18 dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for  
19 Parkinson's disease. N Engl J Med 1992;327(22):1549-1555.  
20  
21
- 22  
23  
24 13. Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, et al. Long-term evaluation of bilateral fetal  
25 nigral transplantation in Parkinson disease. Arch Neurol 1999;56(2):179-187.  
26  
27
- 28  
29  
30 14. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically  
31 unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. Nat Biotechnol 2007;25(10):1177-  
32 1181.  
33  
34
- 35  
36  
37 15. Wei P, Liu J, Zhou HL, et al. Effects of engrafted neural stem cells derived from  
38 GFP transgenic mice in Parkinson's diseases rats. Neurosci Lett 2007;419(1):49-54.  
39  
40
- 41  
42  
43 16. Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, et al. Neural subtype specification of  
44 fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian  
45 mice. Nat Biotechnol 2003;21(10):1200-1207.  
46  
47
- 48  
49  
50 17. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al. Dopamine neurons derived  
51 from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. Nature  
52 2002;418(6893):50-56.  
53  
54
- 55  
56  
57 18. Leist M, Bremer S, Brundin P, et al. The biological and ethical basis of the use  
58 of human embryonic stem cells for in vitro test systems or cell therapy. ALTEX  
59 2008;25(3):163-190.  
60

- 1  
2  
3 19. Zhang Z, Wang X, Wang S. Isolation and characterization of mesenchymal stem  
4 cells derived from bone marrow of patients with Parkinson's disease. *In Vitro Cell Dev*  
5 *Biol Anim* 2008;44(5-6):169-177.  
6  
7
- 8  
9  
10 20. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of  
11 mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(8):881-887.  
12  
13
- 14  
15 21. Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M. Intracerebral transplantation  
16 of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse  
17 model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001;316(2):67-70.  
18  
19
- 20  
21 22. Sadan O, Bahat-Stromza M, Barhum Y, et al. Protective effects of neurotrophic  
22 factor-secreting cells in a 6-OHDA rat model of Parkinson disease. *Stem Cells Dev*  
23 2009;18(8):1179-1190.  
24  
25
- 26  
27 23. Bouchez G, Sensebe L, Vourc'h P, et al. Partial recovery of dopaminergic  
28 pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's  
29 disease. *Neurochem Int* 2008;52(7):1332-1342.  
30  
31
- 32  
33 24. Paxinos G, Frankling KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed:  
34 Academic Pr, 2003.  
35  
36
- 37  
38 25. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a  
39 source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997;407(3):313-319.  
40  
41
- 42  
43 26. Nilsson A, Ith MF, Zhang X, et al. Striatal Alterations of Secretogranin-1,  
44 Somatostatin, Prodynorphin, and Cholecystokinin Peptides in an Experimental Mouse  
45 Model of Parkinson Disease. *Molecular & Cellular Proteomics* 2009;8:1094–1104.  
46  
47
- 48  
49 27. Zhang X, Andren PE, Greengard P, Svenningsson P. Evidence for a role of the  
50 5-HT1B receptor and its adaptor protein, p11, in L-DOPA treatment of an animal model  
51 of Parkinsonism. *PNAS* 2008;105(6):2163–2168.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 28. Bahat-Stroomza M, Barhum Y, Levy YS, et al. Induction of adult human bone  
4 marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for  
5 restorative treatment in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2009;39(1-2):199-210.  
6  
7  
8  
9  
10 29. Lu L, Zhao C, Liu Y, et al. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal  
11 stem cells for Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Protoc* 2005;15(1):46-51.  
12  
13  
14  
15 30. Zou Z, Jiang X, Zhang W, et al. Efficacy of Tyrosine Hydroxylase gene  
16 modified neural stem cells derived from bone marrow on Parkinson's disease--a rat  
17 model study. *Brain Res*;1346:279-286.  
18  
19  
20  
21  
22 31. Wang F, Yasuhara T, Shingo T, et al. Intravenous administration of  
23 mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian model of rats:  
24 focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1alpha. *BMC*  
25 *Neurosci*;11:52.  
26  
27  
28  
29  
30  
31 32. Betz AL. An overview of the multiple functions of the blood-brain barrier.  
32 *NIDA Res Monogr* 1992;120:54-72.  
33  
34  
35  
36 33. Greenwood J. Mechanisms of blood-brain barrier breakdown. *Neuroradiology*  
37 1991;33(2):95-100.  
38  
39  
40  
41 34. Oby E, Janigro D. The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia*  
42 2006;47(11):1761-1774.  
43  
44  
45  
46 35. Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Quantitative evaluation of blood-  
47 brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*  
48 1996;739(1-2):88-96.  
49  
50  
51  
52  
53 36. Suon S, Yang M, Iacovitti L. Adult human bone marrow stromal spheres express  
54 neuronal traits in vitro and in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*  
55 2006;1106(1):46-51.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 37. Grunblatt E, Mandel S, Youdim MB. Neuroprotective strategies in Parkinson's  
4 disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. Ann N Y Acad Sci  
5 2000;899:262-273.  
6  
7

8  
9  
10 38. Hellmann MA, Panet H, Barhum Y, Melamed E, Offen D. Increased survival  
11 and migration of engrafted mesenchymal bone marrow stem cells in 6-  
12 hydroxydopamine-lesioned rodents. Neurosci Lett 2006;395(2):124-128.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

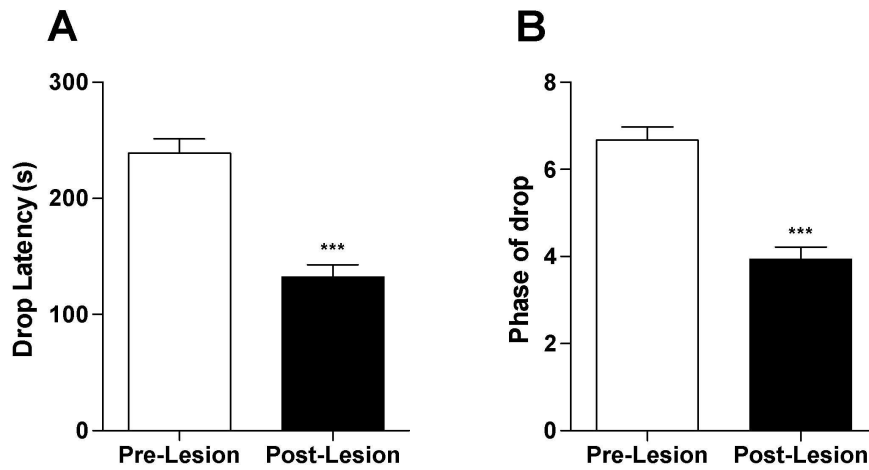
## Figure legends

**Figure 1 – Rotarod test performance before and after lesion.** A) Drop latency observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (pre-lesion) and after MFB lesion (post-lesion). B) Phase of drop observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (pre-lesion) and after MFB lesion (post-lesion). Data are presented as mean  $\pm$  SEM., n = 31 per group. \*\*\*P<0.001 vs. pre-lesion in paired t test.

**Figure 2 – Rotarod test performance over time.** A) Drop latency observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (Pre) and after MFB lesion (Post), and after cell transplant: 10 (Post-10) and 30 days (Post-30) post-transplant. (B) Phase of drop observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (Pre) and after MFB lesion (Post), and after cell transplant: 10 (Post-10) and 30 days (Post-30) post-transplant. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs. BMMC in Bonferroni post hoc test after two-way ANOVA.

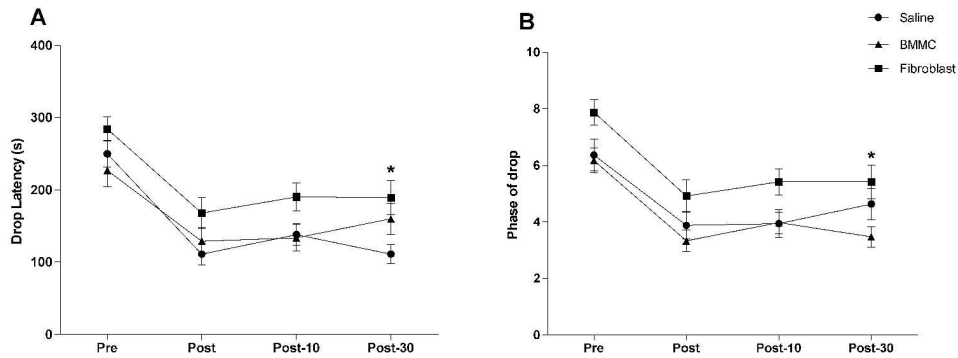
**Figure 3 – Rotation number in apomorphine test over time.** Number of contralateral rotations observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (Pre) and after cell transplant: 10 (Post-10) and 30 days (Post-30) post-transplant. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (two-way ANOVA).

**Figure 4 – PCR analysis.** Two percent agarose gel with ethidium bromide staining. C+: positive control, DNA extracted from transgenic eGFP mice brain. A) 1h post-transplant PCR; A – L: samples. B) 24h post-transplant PCR; A: sample. C) 7 days post-transplant PCR; A –B: samples.



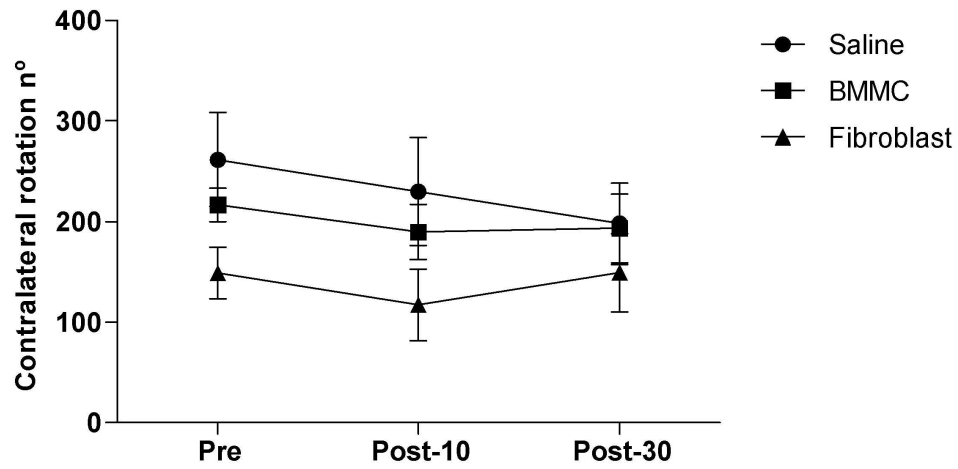
Rotarod test performance before and after lesion. A) Drop latency observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (pre-lesion) and after MFB lesion (post-lesion). B) Phase of drop observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (pre-lesion) and after MFB lesion (post-lesion). Data are presented as mean  $\pm$  SEM.,  $n = 31$  per group. \*\*\* $P < 0.001$  vs. pre-lesion in paired t test.  
100x54mm (600 x 600 DPI)



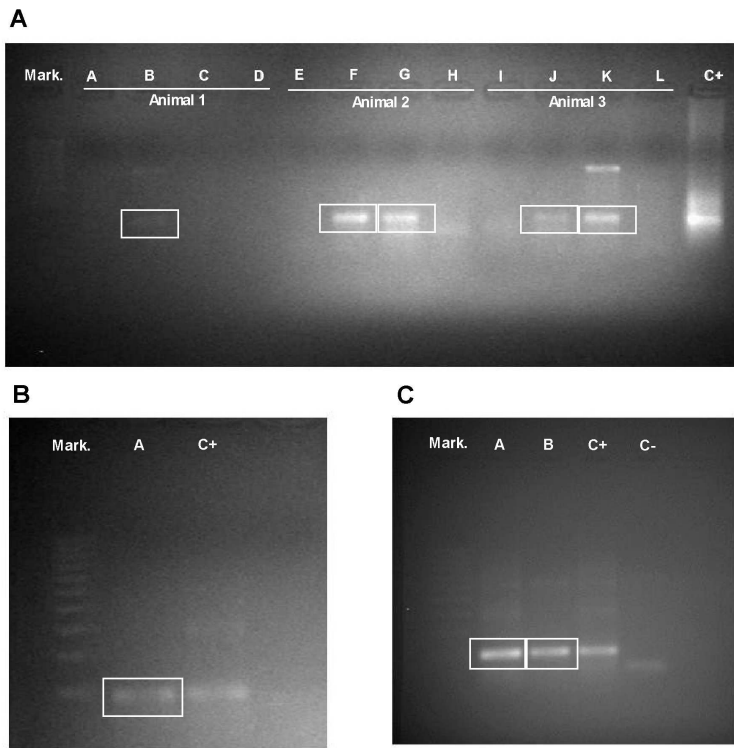


Rotarod test performance over time. A) Drop latency observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (Pre) and after MFB lesion (Post), and after cell transplant: 10 (Post-10) and 30 days (Post-30) post-transplant. (B) Phase of drop observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (Pre) and after MFB lesion (Post), and after cell transplant: 10 (Post-10) and 30 days (Post-30) post-transplant. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. BMMC in Bonferroni post hoc test after two-way ANOVA.

200x80mm (600 x 600 DPI)



Rotation number in apomorphine test over time. Number of contralateral rotations observed for BMMC, FIB and saline groups prior to (Pre) and after cell transplant: 10 (Post-10) and 30 days (Post-30) post-transplant. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (two-way ANOVA).  
100x52mm (600 x 600 DPI)



PCR analysis. Two percent agarose gel with ethidium bromide staining. C+: positive control, DNA extracted from transgenic eGFP mice brain. A) 1h post-transplant PCR; A - L: samples. B) 24h post-transplant PCR; A: sample. C) 7 days post-transplant PCR; A -B: samples.  
100x77mm (600 x 600 DPI)

view