

CAROLINE SANTOS CAPITELLI

**EFEITO DA MANIPULAÇÃO DO MICROAMBIENTE NEURONAL
INDIRETAMENTE ATRAVÉS DA PINEALECTOMIA OU TRANSPLANTE DE
CÉLULAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA NOS MODELOS ANIMAIS DA
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR NEUROTOXINAS**

CURITIBA
2014

CAROLINE SANTOS CAPITELLI

**EFEITO DA MANIPULAÇÃO DO MICROAMBIENTE NEURONAL
INDIRETAMENTE ATRAVÉS DA PINEALECTOMIA OU TRANSPLANTE DE
CÉLULAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA NOS MODELOS ANIMAIS DA
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR NEUROTOXINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital

Co-orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

CURITIBA
2014

Os resultados aqui apresentados foram obtidos no Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná e no Departamento de Bioquímica, Farmacologia, Fisiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro com apoio financeiro da Capes, CNPq e FUNEPU.

“Tudo, aliás, é a ponta de um mistério. Inclusive, os fatos. Ou a ausência deles. Dúvida? Quando nada acontece, há um milagre que não estamos vendo.”

João Guimarães Rosa

(O Espelho)

AGRADECIMENTOS

À Cristo Jesus, o Senhor, “cujos olhos me viram a substância ainda informe, e no teu livro foram escritos todos os meus dias, cada um deles escrito e determinado, quando nem um deles havia ainda” (Sl 139:16) e ainda por Sua terna presença, pois quando fraca, me fez forte; quando desanimada, me recobrou o ânimo; quando achei que não houvesse mais solução, me mostrou que não há impossíveis para o que crê.

Aos meus pais, pelo exemplo, amor incondicional e doação, pois fizeram dos meus sonhos e lutas, seus sonhos e suas lutas. Acreditaram sempre, mesmo quando eu tinha dúvidas.

A meu esposo e filha, pelo amor, paciência, companheirismo e compreensão que me dedicaram durante todo o trajeto até o dia de hoje. Todas as conquistas só ganham sentido pela existência de vocês na minha vida.

A meus irmãos, Ricardo e Jaqueline, e tios pelo amor, incentivo e apoio.

À minha orientadora professora Maria, por acreditar que eu seria capaz de fazer esse trabalho e ser uma comigo para que ele pudesse hoje existir.

Ao meu coorientador professor Valdo, por me adotar como “filha científica” em seu laboratório, por todo empenho a mim dedicado, sugestões e incentivo.

Aos professores, Rosângela, Antônio, Aldo e Luís, pelas valorosas sugestões, incentivo e colaboração.

Às minhas queridas amigas, Carolina, Camila, Lidiane e Angélica, pela sincera amizade, por toda ajuda, idéias e sugestões.

A todos meus amigos pós-graduandos, Marília, Lucas Felipe, Janaína, Eduardo, Gleice, Rafael e outros, que de alguma forma cooperaram na execução desse trabalho. Este trabalho também é de vocês.

SUMÁRIO

Lista de Abreviações	i
Lista de Tabelas	ii
Lista de Figuras	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos Gerais da Doença de Parkinson (DP)	1
1.2 Modelos Animais da DP: Modelo da 6-OHDA e MPTP	5
1.3 Mecanismos Moleculares Envolvidos na Patofisiologia da DP	8
1.3.1. Estresse Oxidativo como possível mediador da neurodegeneração dopaminérgica na DP	8
1.3.2. Neuroinflamação e Ativação Imune: componentes importantes na neurodegeneração dopaminérgica na DP	11
1.4. Tratamento Farmacológico da DP	15
1.5. Terapia Celular na DP	18
1.5.1 Células Tronco Adultas: células mononucleares derivadas de medula óssea e células tronco mesenquimais	23
1.6. Relação entre Melatonina e DP	27
2. HIPÓTESE	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37

4.1.	Animais	37
4.2.	Drogas	37
4.3.	Desenhos Experimentais	37
4.3.1.	Experimento 1	37
4.3.2.	Experimento 2	38
4.3.2.1.	Experimento 2A	38
4.3.2.2.	Experimento 2B	39
4.4.	Pinealectomia	40
4.5.	Cirurgia Estereotáxica	41
4.6.	Isolamento e Transplante de BMMCs	41
4.7.	Isolamento, Cultivo e Transplante de BM-MSC	42
4.8.	Caracterização Funcional das BM-MSCs	43
4.8.1.	Diferenciação Osteogênica	43
4.8.2.	Diferenciação Adipogênica	43
4.9.	Caracterização Imunofenotípica das BM-MSCs por Citometria de Fluxo	44
4.10.	Teste Campo Aberto	45
4.11.	Teste Natação Forçada Versão Modificada	46
4.12.	Identificação de BMMCs e BM-MSCs em Ratos Receptores	47
4.13.	Imunohistoquímica para enzima tirosina hidroxilase	47
4.14.	Imunomarcagem para CD45	48
4.15.	Imunohistoquímica para Iba-1	49
4.16.	Avaliação da Produção de Ânion Superóxido por Microscopia	50

	Fluorescente	
4.17.	Ensaio de Permeabilidade da Barreira Hemato-Encefálica	51
4.18.	Análise Estatística	52
5.	RESULTADOS	54
5.1.	Efeito da pinealectomia em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA no teste do campo aberto 24 h, 3 e 7 dias após lesão da SNpc	54
5.2.	Efeito da pinealectomia em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA no teste de natação forçada versão modificada 15 dias após lesão da SNpc	57
5.3.	Efeito da pinealectomia sobre a morte de neurônios imunorreativos à TH induzida por MPTP ou 6-OHDA	59
5.4.	Efeito da pinealectomia em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA na produção de ânions superóxido determinado indiretamente por microscopia fluorescente	61
5.5.	Caracterização funcional das BM-MSCs	62
5.6.	Caracterização imunofenotípica das BM-MSCs por citometria de fluxo	63
5.7.	Efeito do transplante de BMMCs ou BM-MSCs em ratos lesados com MPTP no teste do campo aberto 24 h após lesão- Experimento 2A	64
5.8.	Efeito do transplante de BMMCs em ratos lesados com MPTP no teste do campo aberto 24 h, 3 e 7 dias após lesão- Experimento 2B	64
5.9.	Efeito do transplante de BMMCs em ratos lesados com MPTP no teste de natação forçada versão modificada	68
5.10.	Imunohistoquímica para enzima tirosina-hidroxilase	69

5.11.	Identificação das BMMCs e BM-MSCs em amostras cerebrais de ratos transplantados	69
5.12.	Expressão de CD45 em cortes cerebrais de ratos	70
5.13.	Efeito da infusão de MPTP e do transplante de BMMC sobre a ativação microglial	74
5.14.	Efeito da infusão do MPTP na integridade da barreira hematoencefálica 24 h e 7 dias após a lesão	74
6.	DISCUSSÃO	77
7.	CONCLUSÕES	92
7.1.	CONCLUSÃO FINAL	96
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE ABREVIACÕES

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
AE	Azul de Evans
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	(<i>Brain derived neurotrophic factor</i>) Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hemato-encefálica
BMMC	(<i>Bone marrow mononuclear cell</i>) Célula tronco derivada de medula óssea
BM-MSC	(<i>Bone marrow mesenchymal stem cell</i>) Célula tronco mesenquimal derivada de medula óssea
BNP	(<i>Brain natriuretic peptide</i>) Peptídeo natriurético atrial
CM-Dil	(<i>Cell marker-Dil</i>) Marcador celular Dil
COMT	Catecol-O-metil transferase
COX-2	Ciclooxigenase tipo-2
CSF	(<i>Cerebrospinal fluid</i>) Líquido cefalorraquidiano
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DAMP	(<i>Damage-associated molecular pattern</i>) Padrões moleculares associados ao perigo
DAT	(<i>Dopamine transporter</i>) Transportador de dopamina
DHE	Dihidroetídio
DMEM	(<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>) Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	(<i>Deoxyribonucleic acid</i>) Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
EGF	(<i>Epidermal growth factor</i>) Fator de crescimento epidermal
ESC	(<i>Embryonic stem cell</i>) Célula tronco embrionária
FGF-1	(<i>Fibroblast growth factor</i>) Fator de crescimento de fibroblasto-1
FITC	(<i>Fluorescein isothiocyanate</i>) Isotiociano de fluoresceína

GDNF	<i>(glial-cell-line-derived neurotrophic factor)</i> Fator neurotrófico derivado de células da glia
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HNE	4-hidroxi-2,3-nonenal
Iba-1	<i>(ionized calcium-binding adapter molecule 1)</i> Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	<i>(Inducible nitric oxide syntase)</i> Óxido nítrico sintase induzível
iPSC	<i>(Induced pluripotent stem cell)</i> Célula tronco pluripotente induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
LRRK2	(Leucine-rich repeat-quinase 2)
MAO	Monoamino oxidase
MnSOD	<i>(Manganese superoxide dismutase)</i> Enzima superóxido dismutase dependente de manganês
MPP⁺	1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridíneo
MSC	<i>(Mesenchymal stem cell)</i> Células tronco mesenquimal
NGF	<i>(Nerve growth factor)</i> Fator de crescimento de nervo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	<i>(Nitric oxide)</i> Óxido nítrico
NSC	<i>(Neural stem cell)</i> Célula tronco neural
O₂⁻	Ânion superóxido
PBS	<i>(Phosphate buffered saline)</i> Tampão fosfato-salino
Px	Pinealectomia
RNS	<i>(Reactive nitrogen species)</i> Espécies reativas de nitrogênio
ROS	<i>(Reactive oxygen species)</i> Espécies reativas de oxigênio

SCN	(<i>Suprachiasmatic nuclei</i>) Núcleo supraquiasmático
SN	Substância negra
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância negra parte compacta
TH	Tirosina hidroxilase
TNF-α	(<i>Tumor necrosis factor alpha</i>) Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	(<i>Vascular endothelial growth factor</i>) Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da pinealectomia em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA no teste do campo aberto 24 horas, 7 e 14 dias após a lesão da SNpc.

Tabela 2. Caracterização imunofenotípica das BM-MSCs por citometria de fluxo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações fisiopatológicas da Doença de Parkinson.

Figura 2. Envolvimento do estresse oxidativo e neuroinflamação na neurodegeneração dopaminérgica na Doença de Parkinson.

Figura 3. Representação esquemática de como as células retiradas do próprio paciente podem ser reprogramadas diretamente em neurônios (transdiferenciação) ou reprogramadas ao estado tronco/progenitor (iPSC ou NPC) e então diferenciadas em neurônios dopaminérgicos.

Figura 4. Migração de células tronco derivadas de medula óssea em condições normal e patológica.

Figura 5. Desenho experimental do experimento 1.

Figura 6. Desenho experimental do experimento 2A.

Figura 7. Desenho experimental do experimento 2B.

Figura 8. Efeito da pinealectomia em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA no teste de natação forçada versão modificada 15 dias após lesão da SNpc.

Figura 9. Efeito da pinealectomia sobre a morte de neurônios imunorreativos à TH induzida por MPTP ou 6-OHDA.

Figura 10. Efeito da pinealectomia em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA na produção de ânions superóxido determinado indiretamente por microscopia fluorescente

Figura 11. Caracterização funcional das BM-MSCs

Figura 12. Efeito do transplante de BMMCs ou BM-MSCs em ratos lesados com MPTP no teste do campo aberto 24 h após lesão- Experimento 2A

Figura 13. Efeito do transplante de BMMCs em ratos lesados com MPTP no teste do campo aberto 24 h, 3 e 7 dias após lesão- Experimento 2B

Figura 14. Efeito do transplante de BMMCs em ratos lesados com MPTP no teste de natação forçada versão modificada

Figura 15. Imunohistoquímica para enzima tirosina-hidroxilase

Figura 16. Identificação das BMMCs e BM-MSCs em amostras cerebrais de ratos transplantados

Figura 17. Expressão de CD45 em cortes cerebrais de ratos

Figura 18. Efeito da infusão de MPTP e do transplante de BMMC sobre a ativação microglial

Figura 19. Efeito da infusão do MPTP na integridade da barreira hematoencefálica 24 h e 7 dias após a lesão

RESUMO

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc. O presente trabalho visou investigar em duas linhas distintas o papel do microambiente celular na neurodegeneração. Na primeira linha de investigação, os animais foram avaliados quanto ao efeito da pinealectomia sobre a neurodegeneração e estresse oxidativo induzido pela administração de MPTP e 6-OHDA. A administração dessas neurotoxinas resultou em comprometimento motor em ambos os grupos Sham e Px 24 h após a lesão no teste do campo aberto. Contudo, 7 e 14 dias após a cirurgia, os animais lesados pertencentes ao grupo Sham apresentavam recuperação motora, ao contrário dos grupos Px e lesados. No teste de natação forçada os animais lesados apresentavam menor tempo de natação em relação aos grupos controles, e ainda, os grupos Sham-6-OHDA e Px-6-OHDA apresentaram maior tempo de imobilidade comparado aos controles. Corroborando com essas alterações, significativa degeneração dopaminérgica foi evidenciada nos animais lesados, e ainda, aumento na quantidade de células contendo ROS nesses grupos em relação aos grupos controles. Já no segundo estudo, o modelo do MPTP foi empregado para avaliar o efeito do transplante de BMMC ou BM-MSC em diferentes tempos, imediatamente e 24 h após a infusão da neurotoxina. A infusão de MPTP resultou em quebra da BHE e prejuízo motor 24 h após a infusão de MPTP, e o tratamento com BMMC imediatamente após a lesão aumentou significativamente a perda de células TH-ir nesses animais, ao contrário do tratamento com BM-MSCs. Por outro lado, o tratamento com BMMC 24 h após a infusão de MPTP resultou em similar perda de neurônios TH-ir comparado ao grupo MPTP-salina. No teste de natação forçada, o grupo MPTP-BMMC apresentou aumento no tempo de imobilidade comparado aos grupos Sham e MPTP, e ainda, aumento no número de células CD45⁺ e micróglia ativada nas secções estudadas. O presente estudo sugere que o transplante de BM-MSC em animais lesados com MPTP module positivamente o microambiente neuronal favorecendo a sobrevivência neuronal, enquanto que o transplante com BMMCs e a redução dos níveis fisiológicos de melatonina mostraram-se desfavorável ao microambiente neuronal.

Palavras-chave: MPTP, 6-OHDA, BMMC, BM-MSC, pinealectomia e DP.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by loss of dopaminergic neurons in the SNpc. This study aimed to investigate the role of cellular microenvironment on the neurodegeneration in two distinct investigation lines. In the first line, the animals were evaluated for the effect of pinealectomy (Px) on neurodegeneration and oxidative stress induced by MPTP or 6-OHDA. The administration of these neurotoxins results in motor impairment in both sham and Px groups 24 h after injury in the open field test. However, 7 and 14th days after injury, the injured animals belonging to Sham group showed recovery of motor abnormalities, unlike injured animals of the Px-groups. In the forced swim test, the injured animals exhibited shorter swimming compared to control groups, and further, Sham-6-OHDA and Px-6-OHDA groups showed a significant increase in immobility time compared to control groups. Supporting these alterations, significant dopaminergic loss in animals injured was observed in comparison to control groups, and further, increased quantity of cellular ROS in these groups. In the second study, the MPTP model was used to evaluate the effect of BMMC and BM-MSCs at different times, immediately and 24 hours, after neurotoxins infusion. The MPTP infusion resulted in breakdown of blood-brain barrier and motor impairment 24h after MPTP infusion, and the BMMC treatment immediately after lesion induced a significant increase loss of TH-ir neurons in these animals when compared to MPTP-saline group, in opposite to the BM-MSCs treatment. In the other hand, MPTP-lesioned rats treated with BMMCs 24 h after to neurotoxin infusion showed similar loss of dopaminergic neurons to MPTP-saline. In the forced swimming test, MPTP-BMMC treated group presented an increase in the immobility time compared to sham and MPTP-saline group, and further increase in the number of CD45-labeled cells and activated microglial cells in the sections studied. This study suggests that the BM-MSCs transplantation in MPTP-lesioned rats positively modulate the microenvironment favoring neuronal neuronal survival, whereas transplantation BMMCs and the reduction of physiological levels of melatonin have proved unfavorable neuronal microenvironment.

Keywords: MPTP, 6-OHDA, BMMC, BM-MSC, pinealectomy e PD.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais da Doença de Parkinson (DP)

A DP é uma desordem neurodegenerativa debilitante e progressiva, que se inicia em média aos 55 anos de idade e cuja incidência aumenta drasticamente com o envelhecimento (Hald e Lotharius, 2005), afetando aproximadamente 1,5% a 2,0% da população acima de 60 anos (Briennesse e Emerson, 2013).

Os sintomas mais marcantes da doença são decorrentes da degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) no mesencéfalo com consequente déficit de neurotransmissor dopamina nos núcleos caudato e putâmen (Przedborski, 2005). Essa degeneração é acompanhada por respostas adaptativas no globo pálido externo e interno, núcleo subtalâmico, tálamo e substância negra parte reticulata (Blandini et al., 2000; Dauer e Przedborski, 2003; Ferrer 2009). Esse conjunto de alterações resulta nos sinais e sintomas motores característicos da doença, que incluem rigidez muscular, tremores em repouso, bradicinesia e instabilidade postural (Yanagisawa 2006). Segundo Kirik e colaboradores (1998), quando esses sintomas são clinicamente identificados, aproximadamente 60% dos neurônios dopaminérgicos e 80% do neurotransmissor dopamina, a nível estriatal, já se encontram perdidos.

Além da degeneração dopaminérgica da via nigroestriatal e consequente despigmentação da região mesencefálica, outros achados patológicos comuns na DP são os neuritos distróficos em neurônios sobreviventes e as inclusões citoplasmáticas neurais denominadas corpúsculos de *Lewy* (Forno 1996, Moore

et al., 2005). Estas estruturas apresentam-se em formato esférico, organizadas em um núcleo denso de hialina e circundadas por um halo claro, compostas de numerosas proteínas, sendo a proteína α -sinucleína a mais abundante desses corpúsculos (Wakabayashi et al., 2007).

A proteína α -sinucleína é uma proteína presente nas terminações pré-sináptica dos neurônios e parece estar envolvida no processo de sinalização celular. O envolvimento direto desta proteína com a DP surgiu com evidências genéticas, nas quais mutações identificadas no gene da α -sinucleína estavam associadas ao desenvolvimento da DP (Moore et al., 2005).

Diversos estudos afirmam que a formação de corpúsculos de *Lewy* está fortemente relacionada à degeneração neuronal, uma vez a que morte neuronal situa-se em regiões de predileção para os corpúsculos de *Lewy* (Wakabayashi et al., 2007). De fato, a proteína α -sinucleína presente nos corpúsculos de *Lewy* apresenta-se anormalmente fosforilada, nitrada e oxidada, apresentando solubilidade anormal, tendendo a formação de agregados e fibrilas (ver Figura 1), o que perturbaria a atividade neuronal normal (Ferrer, 2009).

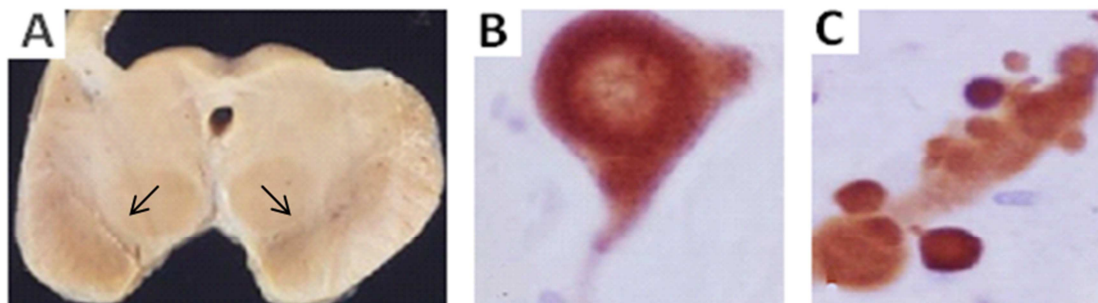


Figura 1. Alterações fisiopatológicas da DP. A) Perda de pigmentação e atrofia da substância negra parte compacta. B) Corpúsculo de Lewy imunomarcados com anticorpo anti- α -sinucleína; C) Neuritos aberrantes imunomarcados com anticorpo anti- α -sinucleína. Obtido de Ferrer, 2009.

Os corpúsculos de *Lewy* na DP não são exclusivos da substância negra parte compacta, mas estão presentes em outras regiões cerebrais tais como, córtex cerebral, tálamo anterior, hipotálamo, amígdala e prosencéfalo basal (Valko et al., 2007) e outros sistemas de neurotransmissão como, serotoninérgico, GABAérgico, colinérgico e noradrenérgico tiveram alterações documentadas na DP (Zweig et al., 1989; Bertrand et al., 1997, Shan et al., 2012).

Além dos sinais e sintomas motores, pacientes com DP apresentam outros sintomas como ansiedade, depressão, distúrbios de sono, fadiga, constipação, distúrbio olfatório e declínio cognitivo (Fahn e Sulzer, 2004; Yanagisawas, 2006; Ziemssen e Reichmann, 2007). Acredita-se que alterações em neurônios não-dopaminérgicos sejam os responsáveis pelos sintomas não-motores da DP (Chaudhuri e Odin, 2010; Pienaar e Chinnery, 2013).

Essa amplitude de perfil sintomático da DP que se estende além dos sinais e sintomas motores, resultado da degeneração específica da via nigroestriatal, associada à ampla distribuição de corpúsculos de *Lewy* no cérebro e o comprometimento de outros sistemas de neurotransmissão além do sistema dopaminérgico, tem levado a comunidade científica a considerar a DP como uma doença do cérebro e não apenas como uma desordem caracterizada apenas pelo parkinsonismo (Ferrer, 2009).

O gatilho do processo de neurodegeneração da SNpc permanece desconhecido e nenhum fator único foi encontrado, sugerindo que a causa da DP envolva vários fatores associados (Dauer e Przedborski, 2003), incluindo alterações genéticas, fatores ambientais, estresse oxidativo, excitotoxicidade e neuroinflamação (Przedborski, 2005).

Atualmente, sabe-se que o processo de degeneração neuronal progride através de vários estágios e que a composição genética da célula, bem como o ambiente em que a célula reside (microambiente neuronal) determinará seu perfil bioquímico e predisposição a degeneração (Schapira et al., 2014).

Embora a maioria dos casos de DP seja esporádica, cerca de 10-15% dos casos de DP apresentam histórico familiar positivo para a doença (Tanner et al., 1999; Elbaz et al., 2007).

Estudos genéticos relacionaram mutações no gene da proteína α -sinucleína (*PARK1*) a forma de DP familiar autossômica dominante, e ainda, que a duplicação e triplicação do locus desta proteína também estavam relacionadas à doença (Ferrer, 2009; Dexter e Jenner, 2013).

Mutações em outros genes também se mostraram associados à forma familiar da doença. Esses genes incluem o gene da proteína parkina (*PARK2*), UCH-L1 (*PARK5*), PINK1 (*PARK6*), DJ1 (*PARK7*), LRRK2 (*PARK8*) e HTRA2 (*PARK13*) (Elbaz, et al., 2007; Dexter e Jenner, 2013).

Embora mutações em diversos genes tenham sido identificadas e correlacionadas a DP, a etiologia da DP idiopática (~ 95% dos casos) ainda permanece não definida (Subramanian e Chesselet, 2013). Pesquisadores afirmam que a gênese da DP seria resultado do envolvimento de aspectos genéticos associados a fatores ambientais, e que a neurodegeneração progressiva observada na DP seria resultado de uma exposição inicial ou crônica a neurotoxina com consequente ativação de uma cascata de eventos deletérios em direção à morte celular (Dauer e Przedborski, 2003; Kanthasamy et al., 2010).

Essa hipótese recebeu especial atenção em 1982 quando jovens californianos intoxicados com a neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridíneo (MPTP) desenvolveram no decurso de poucos dias uma síndrome caracterizada por rigidez muscular, acinesia, de carácter irreversível e severa, semelhante à DP (Przedborski e Vila, 2001), sugerindo que toxinas exógenas poderiam mimetizar os aspectos clínicos e patológicos da DP.

Além do MPTP, outros agentes ambientais potenciais são conhecidos, tais como o paraquat, um agente herbicida quimicamente semelhante ao MPTP e que em estudos epidemiológicos tem sido relacionado à DP (Jenner, 2001) e a rotenona, potente membro dos rotenóides cuja administração em animais resulta em características clínicas e patológicas muito semelhantes àsquelas da DP (Collins e Neafsey, 2002; Sherer et al., 2003; Newhouse et al., 2004).

1.2. Modelos Animais da DP: Modelo da 6-OHDA e MPTP

Doenças neurodegenerativas, como a DP, são caracterizadas pela lenta e progressiva morte de neurônios ao longo do tempo, sendo que o início real da neurodegeneração pode preceder em muitos anos as manifestações clínicas da doença (Gao e Hong, 2008), dificultando a elucidação da causa.

O emprego de modelos experimentais da DP surgiu na tentativa de conhecer a causa e os mecanismos moleculares envolvidos na neurodegeneração presente na DP, e ainda, apontar possíveis alvos para intervenção terapêutica (Tolwani et al., 1999; Jenner, 2003; Bové e Perier, 2012).

Atualmente, existem diversos modelos animais para estudo da DP, dentre eles estão o modelo da 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), rotenona, paraquat, lipopolissacarídeo (LPS) e reserpina (Lee Mosley et al, 2006; Santiago et al., 2010), pois essas neurotoxinas induzem a neuropatologia semelhante à DP. (Tolwani et al., 1999; Jenner, 2003; Dexter e Jenner, 2013).

A 6-OHDA foi o primeiro agente usado num modelo animal de parkinsonismo. Aplicações de pequenas doses direto no ventrículo lateral (150µg), ou em várias estruturas encefálicas, levam a destruição seletiva dos neurônios catecolaminérgicos (Ungerstedt, 1971). A maneira mais comum de utilização, desta neurotoxina, envolve a injeção unilateral de 6-OHDA diretamente na SN, haja vista que ela não atravessa a barreira hematoencefálica, levando a rápida morte celular similar ao modelo do MPTP. Dessa forma a lesão ocorre em decorrência da geração de radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio, que presumivelmente inicia-se devido a um metal de transição, como o ferro. A principal limitação deste modelo é que o comportamento rotacional produzido não é característico da DP (Jenner 2003; Bové e Perier, 2012).

A neurotoxina MPTP é amplamente empregada como modelo animal da DP. Esta neurotoxina é capaz de produzir mudanças clínicas, bioquímicas e neuropatológicas semelhantes a que ocorre na DP idiopática (Schulz e Falkenburger, 2004; Ho et al., 2011), embora raramente ocasione a formação de corpos de Lewy (Newhouse et al., 2004).

Em humanos e primatas não humanos, o MPTP induz síndrome parkinsoniana irreversível e severa, replicando todas as características da DP (Przedborski e Vila, 2001). Entretanto, a principal desvantagem deste modelo em roedores é que os efeitos induzidos pela neurotoxina MPTP são agudos e não progressivos (Hattori e Sato, 2007).

O MPTP é altamente lipofílico e uma vez administrado por via parenteral em camundongos, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, sendo convertido rapidamente nas células gliais à MPP^+ , radical livre altamente neurotóxico (Chiba *et al.*, 1985; Przedborski e Jackson-Lewis, 1998; Jenner, 2003). Esse íon devido à elevada afinidade pelos transportadores de dopamina (DAT) acumula-se no interior das mitocôndrias dos neurônios dopaminérgicos e inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Schulz e Falkenburger, 2004), resultando na menor produção de ATP, aumento da concentração de cálcio intracelular e aumento de radicais livres (Watanabe *et al.*, 2005; Bartels e Leenders, 2009; Pienaar *et al.*, 2012). Além da disfunção e morte de neurônios dopaminérgicos, essa neurotoxina induz a neuroinflamação por meio da ativação microglial (Sy *et al.*, 2010, Ho *et al.*, 2011), aumento de citocinas inflamatórias incluindo IL-2 (Wang *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2011) e ainda, estresse oxidativo (Hung *et al.*, 1998; Speciale, 2002; Chung *et al.*, 2011; Pienaar *et al.*, 2012).

Devido à similaridade bioquímica e histológica do modelo animal de parkinsonismo induzido por MPTP com a DP, este tem sido uma ferramenta importante na compreensão da fisiopatologia da DP (Speciale, 2002; Jenner, 2003; Bové e Perier, 2012).

1.3. Mecanismos Moleculares Envolvidos na Patofisiologia da DP

Estudos apontam diversos mecanismos moleculares envolvidos na neurodegeneração da SNpc observada na DP como, produção de radicais livres em excesso e estresse oxidativo, excitotoxicidade mediada pela estimulação glutamatérgica exacerbada, disfunção mitocondrial, deposição excessiva de ferro reativo, disfunção do sistema ubiquitina-proteossoma, deficiência de fatores tróficos, resposta imune, neuroinflamação e apoptose (Licker et al., 2009; Çomoglu et al., 2013). Embora diferentes estudos tenham demonstrado a relação desses diferentes mecanismos à degeneração de neurônios dopaminérgicos, a exata combinação e sucessão permanecem desconhecidas, sugerindo o envolvimento de múltiplos mecanismos na morte neuronal da doença.

1.3.1. O estresse Oxidativo como possível mediador da morte de neurônios dopaminérgicos na DP

O estresse oxidativo consiste em um processo caracterizado por produção aumentada de ROS ou acúmulo dessas, associadas à redução na capacidade antioxidante celular (Taylor et al., 2013).

Numerosas evidências apontam a mitocôndria como origem primária de ROS, que podem contribuir para o estresse oxidativo intracelular, uma vez que, o complexo I e em menor extensão o complexo III da cadeia respiratória mitocondrial apresentam-se como os principais sítios de produção de ROS mitocondrial (Subramanian and Chesselet, 2013).

De fato, a partir do primeiro relato que pacientes com DP apresentavam disfunção mitocondrial por Schapira e colaboradores (1989), crescentes evidências tem apontado o envolvimento do complexo I mitocondrial na patogênese da DP (Weissman et al., 2007; Subramanian e Chesselet, 2013).

Além da origem mitocondrial, ROS podem ser geradas a partir do neurotransmissor dopamina pela ação da enzima monoamino oxidase (MAO) e ainda, como produto da sua auto-oxidação. Como resultado ocorre a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical superóxido (O_2^-) (Taylor et al., 2013).

O O_2^- e H_2O_2 constituem as principais moléculas de ROS. O radical O_2^- é a primeira ROS produzida na mitocôndria como resultado da transferência de elétron ao oxigênio na cadeia respiratória, mas que pela ação da enzima superóxido dismutase 2 ou MnSOD é convertido à H_2O_2 , o qual pode ser detoxificado pela ação da catalase (Subramanian e Chesselet, 2013). O O_2^- está associado à produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS) que ao reagirem com o óxido nítrico (NO) geram peroxinitritos, os quais são agentes altamente oxidantes (Taylor et al., 2013). Além disso, na presença de íon metálico (Fe^{+2}) o H_2O_2 pode ser convertido à radicais hidroxil altamente reativos e assim, causarem dano oxidativo de diversos componentes celulares (Subramanian e Chesselet, 2013).

Acredita-se que ROS e RNS desempenhem um papel dual no organismo, ora como ferramentas benéficas e ora como agentes nocivos ao organismo. Em concentrações baixas e moderadas, essas espécies estão envolvidas em processos fisiológicos normais tais como, defesa contra possíveis agentes

infecciosos, estimulação de fatores de crescimento e em diversos sistemas de sinalização celular. Entretanto, em níveis elevados, essas espécies produziriam dano celular (Valko et al., 2007; Zuo e Motherwell, 2013).

Recentemente, estudos tem reportado que neurônios dopaminérgicos são particularmente vulneráveis ao dano durante o envelhecimento quando comparado a outras estruturas cerebrais, estimando-se que a morte neuronal nessa região ocorra numa taxa de 9.8% a cada década (Ma et al., 1999). Tal vulnerabilidade dessa população neuronal foi corroborada pelos resultados de um estudo envolvendo pacientes idosos não-parkinsonianos (média de ~88.5 anos de idade), o qual mostrou que aproximadamente 1/3 dos indivíduos estudados apresentavam degeneração intermediária e até mesmo severa de neurônios da SN (Buchman et al., 2012).

De fato, neurônios dopaminérgicos da SN apresentam algumas características que os diferem de outros grupos neuronais e conforme sugerido por alguns autores, tais características tornariam essas células mais susceptíveis ao dano oxidativo como, a presença de neuromelanina, elevado consumo de oxigênio por parte dessa região cerebral, baixos níveis de enzimas antioxidantes (SOD, glutathiona e catalase) e estresse oxidativo aumentado em decorrência do metabolismo do neurotransmissor dopamina, o que poderia favorecer a sua degeneração após insulto inicial (Floyd, 1999; Reeve et al., 2014).

O envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da DP é ainda reforçado por evidências como, o elevado nível basal de estresse oxidativo na SNpc de indivíduos normais, sendo que em pacientes com DP estes níveis são ainda maiores (Valko et al., 2007).

Além disso, estudos *post-mortem* de pacientes com DP reportaram níveis elevados de oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos implicando o estresse oxidativo no processo de neurodegeneração (Dexter et al., 1989; Tsang e Chung, 2009; Jin et al., 2014) e ainda, foi identificadas alterações no sistema de defesa antioxidantes na SN de pacientes com DP (Sian et al., 1994). Somado a esses achados, níveis aumentados de 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), produto da peroxidação lipídica, e 6-hidroxi-guanosina, um produto da oxidação nucleotídica, foram identificados na SN de pacientes com DP quando comparado a controles (Hald e Lotharius, 2005).

Os efeitos deletérios da excessiva produção de ROS no cérebro podem ser perpetuados através da ativação microglial e consequentemente, do processo pró-inflamatório. Células microgliais ativadas podem resultar da ativação de vias associadas a padrões moleculares relacionados ao dano (DAMP) como consequência de danos oxidativos de lipídeos, proteínas e DNA, bem como por liberação de neuromelanina de neurônios durante processo de morte celular. O desfecho consiste em um ambiente oxidativo e inflamatório favorecendo a neurodegeneração dopaminérgica progressiva (Taylor et al., 2013) (Veja Figura 2).

1.3.2. Neuroinflamação e ativação imune: componentes importantes na neurodegeneração dopaminérgica na DP

Por muito tempo o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune foram vistos como dois sistemas isolados, entretanto crescentes evidências sugerem que o cérebro e o sistema imune mantêm constante comunicação a

fim de manter a homeostasia. Atualmente, sabe-se que mediadores e células do sistema imune são encontrados no SNC, e que neurônios são capazes de interagirem e regularem células do sistema imune (Lucin e Wyss-Coray, 2009).

O envolvimento da neuroinflamação na DP foi sugerido inicialmente por McGeer e colaboradores (1988), os quais demonstraram a presença de micróglia ativada na SNpc de pacientes com DP.

Após tal demonstração, estudos clínicos e em animais de laboratório reportaram o envolvimento das células microgliais ativadas, infiltrado de células T CD8⁺ e CD4⁺, *up-regulation* de enzimas associadas à inflamação, como a enzima cicloxigenase tipo-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na SN de pacientes com DP (Hunot et al., 1999; Knott et al., 2000) e em modelos animais da DP (Lima et al., 2006; Singh et al., 2005). Além disso, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias tais como, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6 foram identificados em pacientes com DP (Mogi et al., 1994; Muller et al., 1998; Whitton, 2007; Çomoglu et al., 2013).

Células microgliais são células do sistema imune residente do cérebro que apresentam numerosos receptores capazes de detectar distúrbios fisiológicos (Lucin e Wyss-Coray, 2009) e prontamente respondem gerando uma resposta imune inata inflamatória clássica, a qual pode evoluir para uma resposta imune adaptativa mais específica através da apresentação de antígenos a linfócitos reativos (Neurmann e Wekerle, 2013).

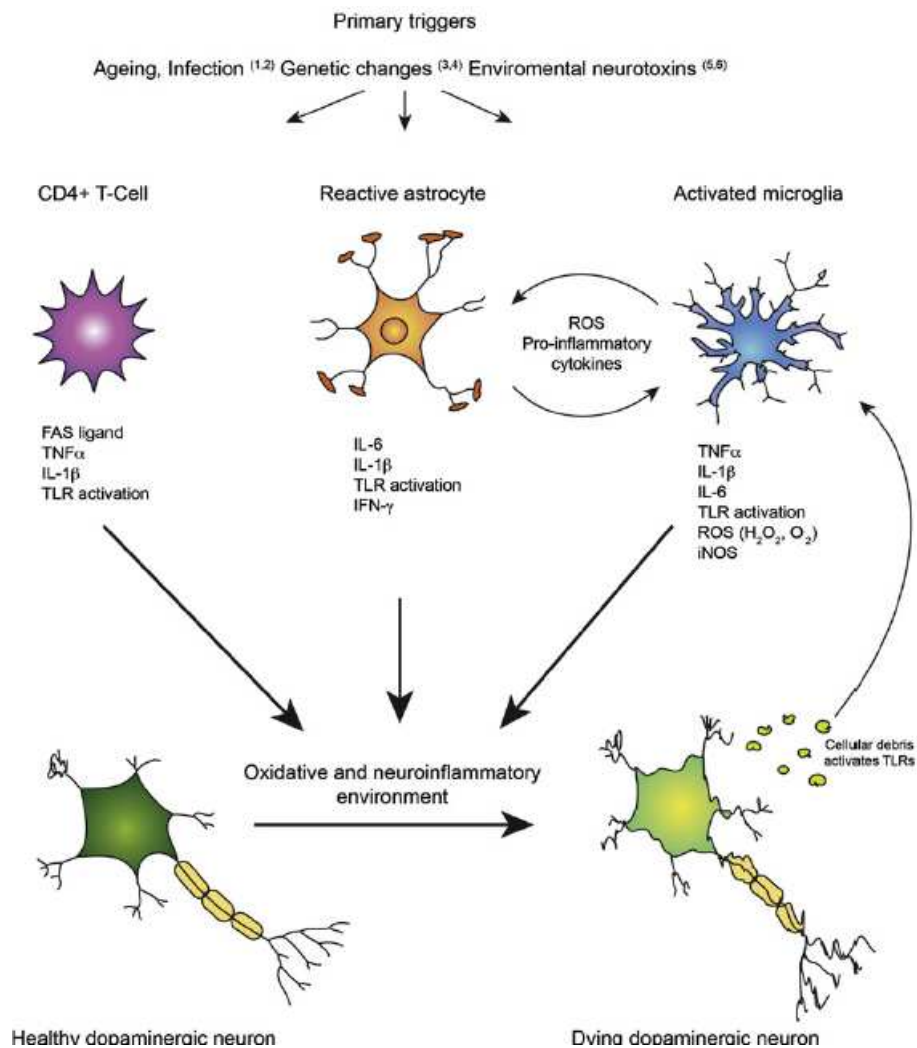


Figura 2 Envolvimento do estresse oxidativo e neuroinflamação na degeneração dopaminérgica na DP. Após insulto tóxico, o processo oxidativo e inflamatório induzem alterações que direcionam o destino dos neurônios dopaminérgicos à neurodegeneração. A resposta neuroinflamatória pode ocorrer como resultado do estresse oxidativo em células do SNC e mediante infiltrado de células T em decorrência do comprometimento da BHE. A ativação de células microgлияis e astrócitos exacerba a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) e produção de ROS e RNS, criando um ambiente inflamatório e oxidativo sustentado na DP. Obtido de Taylo et al 2013.

Numerosos trabalhos demonstraram o envolvimento de micrógлия ativada na neurodegeneração em modelos animais da DP induzido por MPTP e 6-hidroxi dopamina (6-OHDA), reforçando a relação entre a ativação microgлияl e o dano neuronal (Sugama et al., 2003; He et al., 2001; Wu et al., 2002).

Após insulto neurotóxico e lesão neuronal, células microgлияis tornam-se ativadas via liberação de ATP, fatores de crescimento, citocinas,

neurotransmissores, alterações nos íons do microambiente ou perda de moléculas inibidoras decorrentes de neurônios saudáveis (Lucin e Wyss-Coray, 2009).

Uma vez ativada, as células microgliais secretam fatores citotóxicos, incluindo TNF- α , interferon- γ (IFN- γ), óxido nítrico (NO) e ROS amplificando o dano neuronal (Lull e Block, 2010; Lee Mosley et al., 2006). (Veja Figura 2)

Há diversos estudos reportando que citocinas pró-inflamatórias e TNF- α , em modelos animais da DP, podem induzir a morte de neurônios dopaminérgicos (Carvey et al., 2005), e ainda, a presença de células gliais imunorreativas a enzima TH, liberação de TNF- α a partir de células gliais e níveis aumentados de TNF- α na via nigroestriatal em estudos *post-mortem* de pacientes com DP (Boka, et al., 1994; Mogi et al., 1994 e 2000).

Até os dias atuais não está claro se a ativação microglial induz ao dano neuronal ou precede tal evento. Entretanto, no modelo animal do MPTP, pesquisadores demonstraram a presença de extensiva gliose na SN dos animais paralelamente ou precedendo a neurodegeneração (Liberatore et al., 1999).

O papel crítico da neuroinflamação na DP é ainda corroborado por estudos que demonstraram que citocinas como TNF- α , potente citocina pró-inflamatória, promove a neuroinflamação favorecendo a progressiva degeneração de neurônios dopaminérgicos (De Lella Ezcurra et al., 2010; Çomoglu et al., 2013) e por estudo reportando que a maior ativação microglial resulta em aumento na morte de neurônios dopaminérgicos em camundongos deficientes em CX3CR1, receptor de quimiocina envolvido no controle da ativação microglial (Fuhrmann et al., 2010). E mais, por estudos propondo que

anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (Kurkowska-Jastrzebska et al., 2002; Teismann et al., 2003) e inibidores da ativação microglial (Wu et al., 2002; Tomás-Camardiel et al., 2004; Ponzoni, 2012) atenuam a morte de neurônios dopaminérgicos.

Crescentes evidências na literatura sugerem que células microgliais podem tornar-se hiper-reativas (primed) em condições de inflamação crônica ou doenças neurodegenerativas, e que estas células, contrariamente à micróglia normal residente, apresentariam menor limiar de ativação e poderiam tornar-se prejudiciais após novo estímulo (Hart et al., 2012).

Ao longo do tempo, alterações do ambiente celular e disfunções celulares iniciais antes toleradas, ou mesmo compensadas pela própria célula ou células vizinhas, tornam-se falhos e o processo de degeneração acontece e os sinais e sintomas característicos da doença emergem (Schapira et al., 2014).

1.4. Tratamento Farmacológico da DP

Os tratamentos disponíveis para a DP caracterizam-se pelo alívio dos sintomas da doença, melhorando significativamente a qualidade e expectativa de vida do paciente, entretanto não são capazes de reduzir ou prevenir a progressão da doença, e ainda, mostram-se menos eficazes no tratamento das complicações não-motoras da doença (Schapira, 2008).

Fármacos dopaminérgicos como, levodopa, agonistas de receptores dopaminérgicos, inibidores da enzima MAO-B e inibidores da enzima catecol-O-metil transferase (COMT) constituem a principal terapia para os sintomas motores da DP (Dexter e Jenner, 2013).

A levodopa permanece como a droga disponível para administração oral mais potente na melhora dos sintomas da DP, contudo após certo tempo essa melhora tende a ser irregular e não persistente (Blandini et al., 2000; Kuno, 2006). Além disso, o tratamento com levodopa é acompanhado por vários efeitos adversos, bem como aparecimento de complicações motoras tais como, flutuações motoras e discinesias, que são movimentos involuntários tão incapacitantes quanto a própria doença (Matos e Matos, 1999; Dexter e Jenner, 2013). A causa do aparecimento das complicações motoras na levodopoterapia é ainda desconhecida, mas acredita-se estar relacionada à estimulação pulsátil de curta duração do estriado desnervado (Schapira, 2008).

Agonistas dopaminérgicos ativam diretamente receptores de dopamina pré e pós-sinápticos mimetizando o efeito da dopamina. Nesta classe de fármacos estão incluídos a bromocriptina, pergolide, pramipexole, ropinirole e lisuride. Esses agentes são capazes de produzir melhora sintomática da doença e em monoterapia frequentemente controlam os sintomas parkinsonianos nos primeiros anos retardando a utilização da levodopa (Mattos e Mattos, 1999; Samii et al., 2004). Embora bem tolerados, esses fármacos estão associados a diferentes efeitos adversos como, edema periférico, sonolência e distúrbios cognitivos (Schapira, 2008).

Inibidores da MAO-B (ex.: selegiline e rasagiline) são efetivos em monoterapia nos estágios iniciais da DP, mas principalmente empregados como adjuvantes terapêuticos em estágios avançados da doença, visando aumentar o efeito antiparkinsoniano e reduzir a dose de levodopa empregada (Singh et al., 2007). Estudos pré-clínicos mostraram a capacidade desses fármacos de prevenirem a lesão neuronal induzida por MPTP em animais

frente ao bloqueio da atividade da enzima MAO-B, atraindo a atenção a estes fármacos como possíveis agentes modificadores da doença (Jenner, 2004; Dexter e Jenner, 2013).

Outra classe de fármacos que atuam sobre o sistema dopaminérgico são os inibidores da COMT, como por exemplo, entacapone e tolcapone. Esses inibidores são geralmente empregados em associação a levodopa, uma vez que reduzem a degradação da levodopa a nível gastrointestinal aumentando sua meia-vida, reduzem o tempo “*off*” (tempo de relativa imobilidade) e aumentam o tempo “*on*” (pacientes apresentam capacidade de mover-se ou até mesmo apresentam discinesias) (Schrag, 2005; Singh et al., 2007).

Além dos agentes dopaminérgicos, fármacos anticolinérgicos, como triexifenidila, também estão disponíveis para o tratamento de pacientes com DP (Kidd, 2000). Embora sejam particularmente eficazes na redução dos tremores, apresentam pouco efeito sobre a bradicinesia e ainda, o surgimento de efeitos adversos tais como, confusão mental, sonolência, boca seca, agitação e alucinação, são bastante comuns e limitam o emprego desses agentes farmacológicos (Clarke, 2002; Singh et al., 2007).

Surpreendentemente, em 1969, foi descoberta a ação antiparkinsoniana da amantadina, um antagonista NMDA não competitivo e antiviral (Lim, 2005), o qual tem se mostrado útil no tratamento de discinesia na DP avançada (Maranis et al., 2011). Atualmente, tem-se estimado que o processo de excitotoxicidade neuronal possa contribuir para o mecanismo de morte celular progressiva na DP (Dickie et al., 1996) e que assim, a inibição da função glutamatérgica poderia influenciar na progressão da DP.

Embora os fármacos mencionados acima se mostrem eficazes no tratamento dos sintomas motores da DP, esses agentes apresentam pouco ou nenhum efeito sobre os sintomas não-motores da doença, que resultam predominantemente de degeneração neuronal além do sistema dopaminérgico, e que causam significativa morbidade e prejuízo na qualidade de vida do paciente (Lloyd et al., 1975; Chaudhuri et al., 2006; Poewe, 2009).

Uma vez que a DP é uma desordem neurodegenerativa crônica e progressiva, o aparecimento de eventos como, diminuição da responsividade ao tratamento farmacológico e o acúmulo de efeitos colaterais no decorrer do tratamento, mostram-se inevitáveis, assim a necessidade de descoberta de terapia eficaz capaz de tratar os sintomas da DP em sua amplitude, restaurando as funções cerebrais, e ainda, impedindo a progressão da doença é de suma urgência.

1.5. Terapia celular na DP

A terapia celular na DP é considerada uma alternativa bastante promissora visando a substituição dos neurônios em degeneração e perdidos na SN de pacientes com DP (Hall et al., 2007) e ainda, o reparo tecidual por modulação imune e suporte trófico, fenômeno este chamado de “plasticidade terapêutica” (Matino et al, 2011).

Há diferentes origens celulares consideradas úteis na pesquisa e desenvolvimento de terapias celulares para o tratamento da DP como, embriônica (por exemplo: células tronco embrionárias), fetal (células tronco neurais e mesencéfalo ventral) e adulta (células tronco neurais, células tronco

derivadas da medula óssea e células tronco pluripotente induzidas) (Hall et al., 2007).

Em 1979, dois estudos envolvendo o transplante alogênico (inter-espécie, mas indivíduos geneticamente diferentes) de mesencéfalo ventral de tecido fetal em ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA reportaram a reversão das alterações comportamentais induzidas pela neurotoxina e ainda, que neurônios dopaminérgicos transplantados inervavam o estriado e faziam sinapse com células do hospedeiro (Wijeyekoon e Baker, 2009).

A partir de 1987 iniciaram-se os estudos com transplante de mesencéfalo ventral de tecido fetal humano no estriado de pacientes com DP, e numerosos estudos clínicos abertos na década seguinte reportaram melhora da função motora na ausência de medicação antiparkinsoniana, redução do tempo gasto no estado “off” e alguns casos de redução das discinesias no estado “on” (Freed et al., 1990, 1992; Lindvall et al., 1990). Entretanto, alguns problemas surgiram com esta terapia como, escassez de tecido mesencefálico ventral fetal humano, problema ético, variabilidade quanto ao alívio dos sintomas entre os pacientes com DP e aparecimento de discinesias decorrente do transplante (Lindvall e Björklund, 2004; Olanow et al., 2003).

Células tronco são células com capacidade de autorrenovação, produção de progênie e diferenciação em células especializadas (Lindvall et al., 2004).

Células tronco embrionárias (ESC-embryonic stem cells) caracterizam-se por serem células extraídas do maciço celular interno do blastocisto com potencial de auto-revonação, propagação de forma indefinidamente no estado indiferenciado e capaz de diferenciar-se em todas as células do organismo

(Riaz e Bradford, 2005). Assim, essas células consistem em alternativa promissora a terapia de substituição celular na DP (Preynat-Seauve et al., 2009).

Björklund e colaboradores (2002) fazendo uso do modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA transplantaram ESCs diretamente no estriado de ratos e demonstraram que as ESCs transplantadas podiam se diferenciar em neurônios dopaminérgicos maduros e funcionais, evidenciaram recuperação funcional dos animais, entretanto 20 % dos animais desenvolveram teratomas no sítio do transplante.

Embora ESCs sejam potenciais candidatos celulares para a reposição de células dopaminérgicas na DP, muito trabalho deve ser feito no sentido de garantir a segurança e eficiência na produção de neurônios dopaminérgicos com capacidade funcional, bem como melhorar a sobrevivência destas células após transplante esquivando-se dos possíveis efeitos adversos potenciais antes que testes clínicos se iniciem (Wijeyekoon e Baker, 2009).

Células tronco adultas consistem em células indiferenciadas multipotentes residentes de tecidos adultos, relativamente quiescentes ou com baixa atividade proliferativa, mas que em determinadas situações, assumem atividade proliferativa substituindo células lesadas ou mortas (Gritti et al., 2002).

Até recentemente, acreditava-se que células tronco adultas somente poderiam diferenciar-se em células do tecido de origem. Contudo vários trabalhos relatam que células tronco adultas podem se diferenciar em células de outras linhagens além do tecido de origem, como por exemplo, células

derivadas de medula óssea originando células gliais e neurônios (Kopen et al., 1999; Mezey et al., 2000; Raff, 2003).

As mais investigadas dentre as células tronco adultas como possíveis ferramentas para o tratamento da DP são as células tronco neurais (NSC-neural stem cells), células tronco pluripotente induzidas (iPSC) e as células tronco mesenquimais (MSC).

Células tronco neurais são células com capacidade de autorenovação e diferenciação em oligodendrócitos, neurônios e astrócitos, numa razão de aproximadamente 1:5:25 (Hall et al., 2007). Essas células podem ser isoladas de SNC embrionário ou fetal, incluindo córtex cerebral, prosencéfalo basal, hipocampo e medula espinhal, e ainda, no SNC adulto as NSCs podem ser isoladas da zona subventricular nos ventrículos laterais e giro dentado hipocampal (Palmer et al., 2001; Shihabuddin e Aubert, 2010).

A maioria dos estudos demonstrando que neurosféricas derivadas de NSCs podem ser diferenciadas em neurônios dopaminérgicos *in vitro* foi realizada em roedores, e frequentemente, a eficiência na produção de neurônios TH-positivos é considerada baixa (Potter et al., 1999; Sawamoto et al., 2001).

Numerosos estudos tem sido realizados no sentido de aumentar o número de neurônios dopaminérgicos gerados a partir de NSCs fetal humana usando combinações de diversos fatores, entretanto este processo ainda constitui-se uma limitação prática (Storch et al., 2001; Christophersen et al., 2006).

Embora NSCs apresentem menor potencial tumorigênico comparado as ESCs e isto se constitua numa grande vantagem na utilização de neurônios

dopaminérgicos derivados de NSCs, limitações práticas e éticas quanto à diferenciação e extração de NSCs ainda permanecem (Wijeyekoon e Baker, 2009).

No ano de 2006, Yamanaka e colaboradores demonstraram que a transdução viral de fibroblasto murino com quatro fatores de transcrição (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) era capaz de reprogramar essas células, fazendo-as retornarem ao estado indiferenciado, nomeando tais células de células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) (Takahashi e Yamanaka, 2006).

iPSCs foram obtidas de diferentes células somáticas, incluindo células somáticas humanas (Takahashi et al., 2007). Essas células apresentam capacidade de autorrenovação *in vitro* e pluripotência semelhante as ESCs, porém não estão relacionadas ao problema ético envolvido no uso de material fetal e embrionário (Li et al., 2010) e problemas de rejeição imune (Wijeyekoon e Baker, 2009). Entretanto, embora iPSCs apresentem estas vantagens em relação as ESCs, no que diz respeito a capacidade inerente em gerar teratomas, as iPSCs comportam-se semelhantemente as ESCs (Li et al., 2010)

Assim, surgiu a proposta de que neurônios derivados de iPSCs fossem utilizados como modelos da DP *in vitro* para melhor compreensão da patogênese molecular da doença (Abeliovich e Doege, 2009), bem como para triagem de drogas e talvez, transplante celular (Ali et al., 2013). (Figura 3)

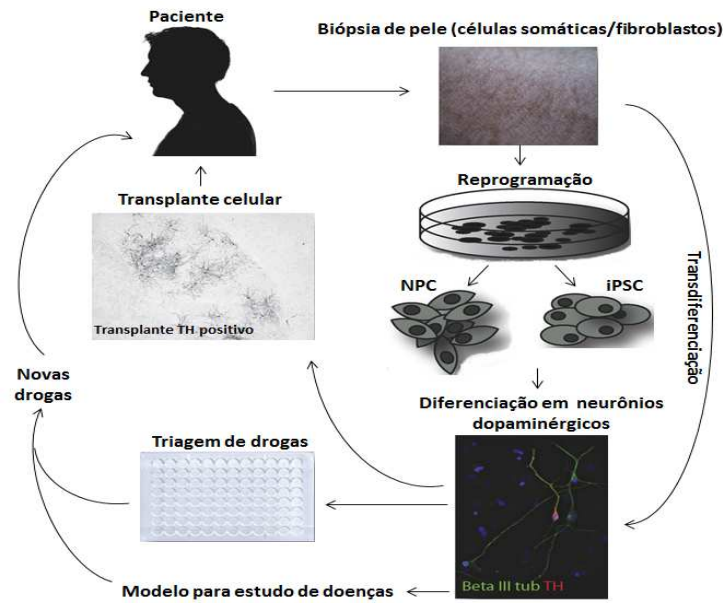


Figura 3 Representação esquemática de como as células retiradas do paciente podem ser reprogramadas diretamente em neurônios (transdiferenciação), ou reprogramadas ao estado tronco/progenitor (iPSC ou NPC) e então diferenciadas em neurônios dopaminérgicos, os quais podem ser usados como modelos da doença, transplante celular ou triagem de novos fármacos. Adaptada de Ali et al., 2013.

De fato, Qiang e colaboradores (2011) reportaram a geração eficiente de células neuronais induzidas humanas a partir de fibroblasto de indivíduos adultos normais e pacientes com doença de Alzheimer, e ainda, que células neuronais induzidas humanas de pacientes com doença de Alzheimer familiar apresentavam alteração o processamento da proteína precursora amiloide e aumento na produção de proteína β -amilóide, revelando patologia seletiva ao tipo celular.

1.5.1. Células Tronco Adultas: Células Mononucleares derivadas de Medula Óssea (BMMC) e Células tronco Mesenquimais (MSC)

As células tronco mesenquimais consistem em outro tipo de célula tronco adulta com potencial de diferenciação em neurônios dopaminérgicos. Essas células são multipotentes, não-hematopoiéticas e que dão origem as células

estromais da medula óssea (Wijeyekoon e Baker, 2009). *In vivo*, MSC dão origem a osteócitos, condrócitos e adipócitos, porém também apresentam capacidade de se transdiferenciar em neurônios (Kim et al., 2006). Essas células são potenciais candidatos a terapia celular, pois uma vez injetada apresentam tropismo para o sítio de lesão, e uma vez lá liberam fatores que aceleram o reparo endógeno (Joyce et al., 2010; Huang et al., 2012), apresentam fácil acessibilidade e ainda, exibem propriedade imunomodulatória (Bartholomew et al., 2002).

Estudos recentes têm demonstrado que as MSCs derivadas de medula óssea não apenas são células tronco multipotentes, mas também moduladores da resposta imune inibindo a ativação microglial (Kim et al., 2009; Park et al., 2008), entre outros efeitos.

Munoz e colaboradores (2005) mostraram que BM-MSCs aumentam a proliferação de células tronco neurais derivadas do hipocampo devido à secreção de NGF, BDNF e fator neurotrófico derivado de célula da glia (GDNF) (Garcia et al., 2004; Mahmood et al., 2004; Crigler et al., 2006).

Além disso, numerosos trabalhos demonstram o efeito benéfico do transplante de células tronco mesenquimais em modelos animais da DP, reduzindo as alterações induzidas pela neurotoxina (Bouchez et al., 2008; Shetty et al., 2009; Chao et al., 2009).

Diversos estudos apontam as BMMCs como potenciais células para o tratamento de diversas doenças como, infarto do miocárdio (Mäkelä et al., 2007), lesão de medula espinhal (Sasaki et al., 2001) e isquemia cerebral (Iioshi et al., 2004; Kamiya et al., 2008).

A fração de BMMCs compreende um conjunto de vários tipos celulares, tais como, MSC, células tronco hematopoiéticas e outras células que são facilmente isoladas da medula óssea através de centrifugação por gradiente de densidade (Azizi et al., 1998).

Além desta característica de fácil obtenção, o potencial das BMMCs na medicina regenerativa é favorecido pela possibilidade de obtenção celular do próprio paciente transpondo o problema de rejeição celular e ainda, porque o processo desde a obtenção das células até o momento do transplante não exige manipulação genética ou cultivo celular (Strauer e Ran, 2003).

Franco e colaboradores (2012) investigaram o efeito da administração de BMMCs (5×10^6 células) e de minociclina em modelo animal de isquemia cerebral focal 24 horas após a lesão, e determinaram que o tratamento com BMMCs resulta em considerável redução da área infartada, apoptose e aumenta a preservação neuronal. E mais, que o tratamento com minociclina, inibidor da ativação microglial, favorece a neuroproteção mediada pelas BMMCs. Embora o mecanismo envolvido no efeito protetor não esteja claro, possivelmente não envolva a transdiferenciação dessas células e reposição celular.

Estudos relatam que células derivadas de medula óssea liberam diversos fatores solúveis, tais como, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblasto-1 (FGF-1), fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), fator de crescimento de nervo (NGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), peptídeo natriurético cerebral (BNP) e citocinas anti-inflamatórias (Chopp et al., 2009).

Embora numerosos estudos apontem os efeitos benéficos do transplante de BMSCs em diferentes doenças, outros demonstram inconsistências e muitas questões permanecem sem respostas.

Atualmente, sabe-se que o SNC amplifica o recrutamento de células derivadas da medula óssea para dentro do SNC via produção de citocinas, incluindo células tronco hematopoiéticas, durante condições patológicas (veja revisão Borlongan et al., 2011) (Figura 4)

Estudo conduzido por Nikolic e colaboradores (2008) demonstrou que a infusão de células mononucleares derivadas células sanguíneas de cordão umbilical humano em camundongo transgênico PSAPP e Tg2576 resultou em níveis reduzidos de β -amilóide solúvel e insolúvel cerebral, concomitante com aumento dos níveis de plasmáticos de β -amilóide, sugerindo mecanismo de remoção de β -amilóide do cérebro para o sangue.

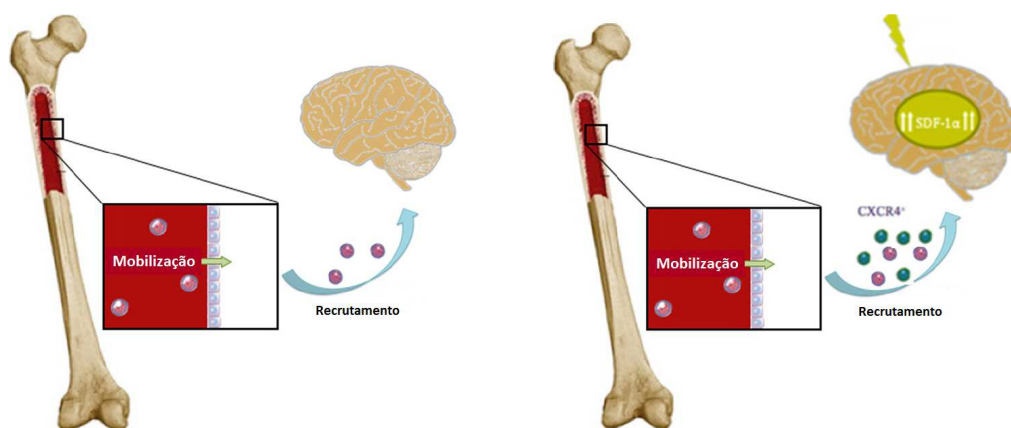


Figura 4. Migração de células tronco derivadas de medula óssea em condições normal e patológica. A) Sobre condições não-patológicas quantidade ínfimas de células tronco derivadas de medula óssea são mobilizadas. B) Células derivadas de medula óssea endógena e transplantada são recrutadas para o sítio de lesão através da via CXCR4/SDF-1 (fator derivado do estroma). Adaptada de Borlongan et al., 2011.

Assim, a terapia com BMBCs poderia ser uma estratégia terapêutica para a DP também, favorecendo a homeostasia do microambiente onde a lesão neuronal encontra-se instalada e a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos.

1.6. Relação entre Melatonina e DP

A melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) é um neurohomônio produzido e ritmicamente secretado pela glândula pineal (Cardinali e Pévet, 1998; Hardeland *et al.*, 2006). Uma vez liberada, este neuropeptídeo transmite informação sobre o fotoperíodo para os tecidos periféricos e centrais que expressam sítios para a ligação da melatonina regulando assim o ritmo circadiano (Boutin *et al.*, 2005) e ainda, parece estar envolvida em outros processos fisiológicos, como regulação da pressão sanguínea, reprodução sazonal, fisiologia da retina e ovários (Witt-Enderby *et al.*, 2003).

As concentrações de melatonina na corrente sanguínea é altamente variável, de 10-60 pg/ml, durante o dia e noite, respectivamente (Bonfont-Rousselot e Collins, 2010). O níveis de melatonina aumentam aproximadamente às 21:00 horas, com pico máximo às 03:00 horas e retornam a níveis menores aproximadamente às 09:00 horas (Kennaway, 2000).

A produção e secreção de melatonina pela glândula pineal são controladas pelo núcleo supraquiasmático (SCN), localizado no hipotálamo anterior (Cardinali e Pévet, 1998; Macchi e Bruce, 2004). Esta estrutura é naturalmente rítmica, com um período que encerra às 24 horas. A ritmicidade do SCN é garantida pela sincronia com o ciclo solar através de projeções oriundas da retina (fibras retino-hipotalâmica), informando a ausência ou

presença de luz (Kennaway, 2000). Na presença de luz, a síntese de melatonina é inibida, entretanto durante a noite sua produção é estimulada (Hardeland *et al.*, 2006).

Alguns sítios para a ligação da melatonina já foram identificados: receptores acoplados à proteína G (MT1 e MT2) e a enzima quinona redutase 2 (QR2/MT3), que está envolvida nos processos de toxificação e detoxificação (Boutin *et al.*, 2005; Witt-Enderly *et al.*, 2003). Além desses alvos, a melatonina pode regular a expressão de genes atuando em receptores nucleares, interagir com proteínas celulares, tais como calmodulina ou proteínas associadas à tubulina (Horstman *et al.*, 2002; Claustrat *et al.*, 2005).

Além dos mecanismos citados acima, a melatonina também exibe um efeito antioxidante direto e indireto (Claustrat *et al.*, 2005). Diretamente, a melatonina interage com várias ROS e RNS, prevenindo dano ao DNA, proteínas e lipídios de membrana por radicais livres (Cui *et al.*, 2004). Indiretamente, este neurohormônio produz ação antioxidante por atenuar a produção de radicais livres através de efeitos antiinflamatórios e por causar *downregulation* de enzimas pró-oxidantes (óxido nítrico sintase - NOS e lipoxigenase), além de aumentar as defesas antioxidantes por *upregulation* de enzimas antioxidantes (glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, glucose 6-fosfato desidrogenase e algumas vezes, catalase e Cu-, Zn-, Mn-superóxido dismutase) (Hardeland *et al.*, 2006; Claustrat *et al.*, 2005; Cardinali *et al.*, 2013).

Ainda, acredita-se que as ações antiinflamatórias da melatonina são decorrentes da formação do metabólito N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), capaz de causar inibição e *downregulation* da cicloxigenase do tipo 2 (COX-2) (Hardeland *et al.*, 2006).

Numerosos estudos apotam para o efeito neuroprotetor da melatonina em modelos animais de estudo da DP (Sharma et al., 2006; Capitelli et al., 2008; Ma et al., 2009; Patki e Lau, 2011).

Alterações no padrão de secreção de melatonina foram identificadas no envelhecimento em várias doenças como, doença de Alzheimer e depressão, de forma que autores sugerem que alterações nos níveis de melatonina poderiam estar relacionadas à DP (Skeene et al., 1990; Ferrari et al., 2000; Hardeland et al., 2011).

Há evidências que exista forte relação entre alterações relacionadas ao envelhecimento no SNC com desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes, e ainda, que a pinealectomia acelera o processo de envelhecimento (Reiter et al., 1999; Payao et al., 2001).

Como não ocorre armazenamento de melatonina na glândula pineal, o perfil deste hormônio no plasma reflete confiavelmente a atividade da glândula pineal (Macchi e Bruce, 2004; Claustrat *et al.*, 2005). Segundo alguns autores, a concentração de melatonina em outros fluidos humanos pode ser maior do que a mensurada no sangue, como no CSF no terceiro ventrículo, corroborando com o potencial antioxidante dessa molécula (Reiter e Tan, 2003).

A técnica de pinealectomia (Px) permite a modulação dos níveis endógenos de melatonina e desta forma, este procedimento possibilita a compreensão do papel deste neurohormônio endógeno na proteção celular intrínseca e no microambiente neuronal.

Uma vez que a melatonina é uma substância com múltiplas funções no organismo, a ausência deste neurohormônio implica em gradual perda na

proteção antioxidante, efeito anti-inflamatório e imunológico exercido por ela (Hardeland et al., 2011).

Estudos investigando o efeito da pinealectomia sobre diferentes sistemas, incluindo o cerebral, reportam que a pinealectomia resulta em maior dano oxidativo de lipídeos de membrana, proteínas e DNA (Reiter et al., 1999) e aumento da área de lesão em isquemia focal (Manev et al., 1996) implicando a importância da manutenção dos níveis fisiológicos da melatonina.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que a redução dos níveis fisiológicos de melatonina pela técnica de pinealectomia favoreça a lesão neuronal dopaminérgica mediante aumento do estresse oxidativo celular e que em contrapartida, o transplante de células mononucleares e mesenquimais derivadas de medula óssea favoreçam a sobrevivência neuronal dopaminérgica após insulto tóxico através de suporte trófico e efeito imunomodulatório. Caso a hipótese seja verdadeira, o efeito fisiológico protetor da melatonina será mais bem esclarecido e o potencial emprego do transplante de células derivadas de medula óssea considerado como uma ferramenta promissora na terapia da doença de Parkinson.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Compreender o papel do microambiente celular através da pinealectomia e transplante de células tronco derivada de medula óssea, nos modelos animais da 6-OHDA e MPTP, sobre o comportamento animal e degeneração neuronal.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito da redução dos níveis de melatonina mediada pela pinealectomia (Px) em animais controle e lesados com MPTP ou 6-OHDA sobre a atividade motora no teste do campo aberto 24 horas, 7 e 14 dias após lesão.
- ✓ Investigar o efeito da Px e lesão induzido pelas neurotoxinas MPTP e 6-OHDA, no teste de natação forçada versão modificada.
- ✓ Determinar o efeito da Px sobre a perda de neurônios imunorreativos à enzima tirosina-hidroxilase em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA.
- ✓ Avaliar o efeito da Px em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA na produção de ânions superóxido determinado indiretamente por microscopia fluorescente.
- ✓ Investigar o efeito do transplante imediatamente após a lesão com MPTP de BMDCs ou BM-MSC sobre o comportamento de ratos no teste campo aberto.

- ✓ Investigar o efeito do transplante de BMMCs 24 horas após a lesão com MPTP sobre o comportamento de ratos no teste campo aberto 24 horas, 3 e 7 dias após cirurgia estereotáxica.
- ✓ Determinar o efeito do transplante de BMMC em ratos lesados com MPTP no teste de natação forçada versão modificada.
- ✓ Quantificar neurônios imunorreativos a enzima TH na substância negra parte compacta dos grupos investigados
- ✓ Identificar BMMCs e BM-MSCs marcadas previamente ao transplante celular em amostras cerebrais de ratos transplantados.
- ✓ Investigar a expressão in situ de CD45 em cortes histológicos dos grupos estudados.
- ✓ Estudar o efeito da infusão de MPTP e do transplante com BMMC sobre a ativação microglial.
- ✓ Investigar o efeito da infusão de MPTP sobre a integridade da BHE 24 horas e 7 dias após a lesão.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando 280-310g no dia da cirurgia estereotáxica. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e mantidos em uma sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), em um ciclo de claro-escuro de 12 horas (7:00 - 19:00 - 7:00). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todos os experimentos. Todos os procedimentos empregados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal da UFTM (Número 264).

4.2. Drogas

- ✓ MPTP (Sigma Chemical Co, USA) em uma concentração de $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- ✓ 6-OHDA (Sigma Chemical Co, USA) em uma concentração de $6\mu\text{g}/2\mu\text{l}$
- ✓ Tiopental sódico (40 mg/kg). i.p.
- ✓ Lidocaína 0,2 ml com 2% de vasoconstrictor. s.c.

4.3. Desenhos Experimentais

4.3.1. Experimento 1

Os animais destinados a este experimento foram submetidos a dois procedimentos cirúrgicos (Px e cirurgia estereotáxica) com 10 dias de intervalo entre eles e sempre no período entre 8:00 e 11:00h da manhã. Vinte e quatro horas após a cirurgia estereotáxica, os animais foram avaliados no teste do campo aberto. Este procedimento de análise do comportamento motor foi

repetido 7 e 14 dias após a cirurgia estereotáxica. Quinze dias após este procedimento, os animais foram submetidos ao teste de natação forçada e em seguida, perfundidos intracardialmente para posterior análise histológica (Fig. 5).

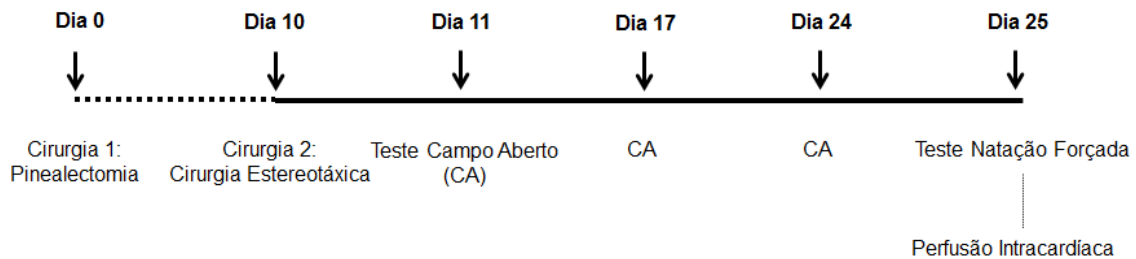


Figura 5 Desenho temporal do experimento 1

4.3.2. Experimento 2

4.3.2.1. Experimento 2A

Este experimento foi conduzido visando verificar o efeito do transplante de BMMC ou BM-MSc imediatamente após injeção intranigral bilateral de MPTP na função motora avaliada pelo teste campo aberto e sobre a quantidade de neurônios TH positivos. Os animais foram randomicamente divididos em 6 grupos experimentais: Sham-Salina, Sham-BMMC, Sham-BM-MSc, MPTP-Salina, MPTP-BMMC e MPTP-BM-MSc. Após a cirurgia estereotáxica, os animais foram injetados por via intravenosa com 5×10^6 BMMC/ml ou 1×10^6 marcadas com marcador de superfície celular (CM-Dil), ou ainda, salina. Vinte e quatro horas após a cirurgia estereotáxica, os animais foram expostos ao teste campo aberto para investigar a atividade geral do animal. Após o teste comportamental, os animais foram perfundidos intracardialmente com salina, e em seguida, com solução fixadora (p-formoldeído 4%). Os cérebros foram removidos do crânio e imersos em solução fixadora por 24 horas, e em seguida

colocados em solução de sacarose 30% por 48h previamente ao procedimento de congelamento. As amostras foram estocadas para posterior análise histológica (Fig. 6).

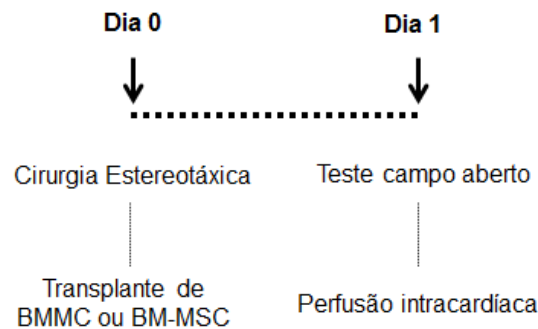


Figura 6. Desenho temporal do experimento 2A.

4.3.2.2. Experimento 2B

Este experimento foi realizado a fim de verificar o efeito do transplante de BMMC vinte e quatro horas após a infusão intranigral bilateral de MPTP sobre a função motora avaliada pelo teste campo aberto, comportamento de depressão no teste de natação forçada versão modificada e sobre o número de neurônios positivos para enzima TH. Para isto, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais como descrito no experimento 1. Vinte e quatro horas após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto para determinarmos alterações motoras. Após o teste comportamental, os animais foram injetados por via intravenosa 5×10^6 BMMC/ml marcadas com marcador celular (CM-Dil) ou salina. O teste campo aberto foi repetido 3 e 7 dias após a cirurgia estereotáxica. No sétimo dia, os animais foram expostos ao teste de natação forçada versão modificada. Após este teste, os animais foram perfundido intracardialmente como descrito no experimento 1 (Fig. 7).

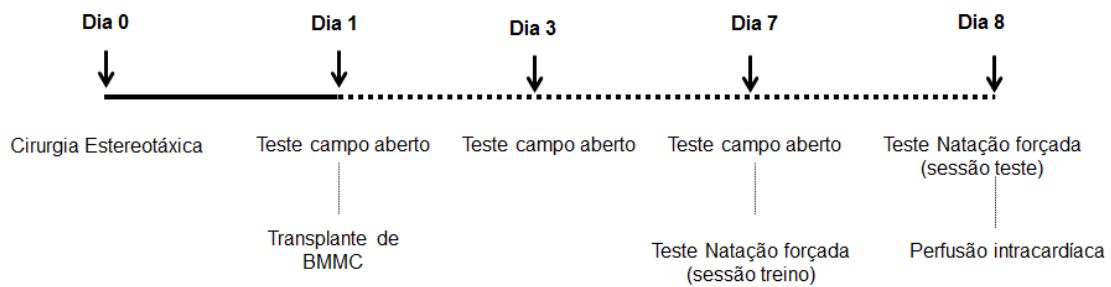


Figura 7. Desenho temporal do experimento 2B

4.4. Pinealectomia

O procedimento cirúrgico para remoção da glândula pineal foi realizado conforme descrito por Siuciak e Dubocovich (1993). Sucintamente, os animais foram anestesiados (tiopental 40 mg/Kg), fixados no aparato estereotáxico e administrado anestésico local (lidocaína associada à 2% de vasoconstritor - s. c.) (0,1 ml) na derme que recobre o crânio dos ratos. Após uma incisão na região sagital da cabeça, um recorte circular foi realizado com o auxílio de uma broca de dentista (Trephine Burs- 5.0 mm de diâmetro) na região do lambda. Em seguida, o fragmento ósseo foi removido com auxílio de uma pinça e deixado imerso em solução salina estéril. A glândula pineal foi removida com auxílio de uma pinça curva. Após a remoção, o fragmento ósseo foi reposicionado na sua região original e a pele suturada. Ratos pertencentes ao grupo Sham passaram por procedimento cirúrgico similar, entretanto não foi realizada a remoção da glândula pineal.

4.5. Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram inicialmente anestesiados com tiopental sódico (40 mg/Kg), além da administração de anestésico local (lidocaína com 2% de vasoconstritor - s. c.) (0,1 ml) na derme que recobre o crânio dos ratos.

Os animais dos grupos lesados receberam a microinfusão bilateral de MPTP (100 µg em 1 µl of saline) ou 6-OHDA (6 µg em 2 µl fluído cerebrospinal artificial, suplementado com 0.2% ácido ascórbico; Sigma) na substância negra parte compacta, utilizando as seguintes coordenadas estereotáxicas: antero-posterior (AP): - 5.0 mm a partir do bregma; médio-lateral (ML): ±2.1 mm a partir da linha média e dorso-ventral (DV): -7.7 mm a partir da calota craniana, segundo Paxinos e Watson (1986). O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, entretanto, não recebeu a infusão de neurotoxina, sendo somente introduzida a agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas.

4.6. Isolamento e transplante das BMMCs

Células de medula óssea foram obtidas de ratos Wistar doador. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico e então eutanasiados. Os ossos femorais, tibial e úmeros foram coletados e as epífises foram cortadas e em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 400 x g, 4°C. O pellet obtido a partir da centrifugação foi ressuspenso em PBS-EDTA estéril (pH=7.2) e, a fração de BMMCs foi isolada usando o procedimento de centrifugação por Ficoll (Hypaque®). As células mononucleares foram ressuspendidas em PBS e viabilidade foi avaliada usando azul de tripan (0,4%). Para estudo de identificação e distribuição das BMMCs nos animais receptores no sítio da

lesão cerebral, as células foram marcadas com marcador de superfície celular Dil 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine] (CM-Dil, Molecular Probes Inc.) para identificação posterior das células transplantadas por microscopia de fluorescência. Todos os animais receberam 1 ml de salina ou solução contendo BMMC (5×10^6 células) dentro da veia jugular imediatamente ou 24 h após a cirurgia estereotáxica (Experimento 2A e 2B, respectivamente) conforme descrito na seção desenho experimental.

4.7. Isolamento, cultivo e transplante das BM-MSC

Após isolamento das BMMCs como descrito acima, as células foram suspendidas em meio de Dulbecco Modificado (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 1% penicilina e streptomina, e então, plaqueadas em garrafas de cultura celular numa densidade de 4×10^5 células/cm². Após 48h de incubação, a população de células não-aderentes foi removida por reposição do meio de cultivo. Quando a cultura de BM-MSC aderente tornou-se confluenta, as células foram despregadas por meio de tripsina 0,25%, suspendidas em PBS-EDTA 1 mM e então novamente plaqueadas. Esse procedimento foi repetido até a 4^a passagem. Para estudo de identificação e distribuição das BM-MSC transplantadas no sítio da lesão, as células foram marcadas com marcador de superfície celular como descrito acima (CM-Dil, Molecular Probes Inc.). Todos os animais receberam a injeção de 1 ml de salina ou suspensão contendo BM-MSC (1×10^6 células) na veia jugular imediatamente após a administração de MPTP conforme descrito no desenho experimental 2A.

4.8. Caracterização funcional das BM-MSCs

As MSCs em cultura foram estimuladas a diferenciação em osteoblastos e adipócitos mediante protocolo específico (Neuhuber *et al.*, 2008) para em associação ao perfil imunofenotípico obtido no item anterior (4.9) e ainda, observada a capacidade de aderir ao plástico, as MSCs preenchem os critérios mínimos exigidos para caracterização desse tipo celular (Dominici *et al.*, 2006).

4.8.1. Diferenciação osteogênica

BM-MSC em P4 foram semeadas em placas de cultura contendo 06 poços, numa densidade de 3×10^3 células/cm². Após dois dias, o meio de cultura foi substituído por meio de indução osteogênica (DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 100 nM dexametasona, 50 µM ascorbato-2-fosfato e 10mM de glicerol-fosfato). A troca foi realizada a cada 3 ou 4 dias até o 18º dia, quando foi realizada a análise de diferenciação. Primeiramente, o meio de indução foi removido e em seguida, as células foram fixadas com *p*-formoldeído 4% por 20 minutos, e então coradas com corante Alizarin-Red (Sigma-Aldrich) por 5-10 minutos. Concluída a coloração, foram adquiridas imagens de cada poço da placa em microscópio invertido (Axioobserver Z1, Carl Zeiss, Alemanha).

4.8.2. Diferenciação adipogênica

BM-MSC em P4 foram semeadas em placas de cultura de 6 poços em densidade de 2×10^4 células/cm² e mantidas até confluência celular. Após as células adquirirem confluência, o meio de cultura foi substituído por meio de indução adipogênica (DMEM acrescido de 15% FBS, 1%

penicilina/estreptomicina, 1 μ M dexametasona, 0,5mM isobutil-metil-xantina, 10 μ g/mL insulina e 100 μ M indometacina). Após 3 dias, esse meio foi substituído por meio de manutenção adipogênica (DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina e 10 μ g/mL insulina). Vinte e quatro horas após, o meio foi novamente substituído por meio de indução adipogênica e mantido por 3 dias. Completado esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de manutenção adipogênica por 24 h. Tal procedimento de revezamento entre o meio de indução e manutenção adipogênica foi repetido por 3 vezes. Completado este ciclo, as células permaneceram no meio de manutenção por 5 dias e então, avaliadas quanto a diferenciação adipogênica.

A análise da diferenciação consistiu de remoção do meio de indução adipogênica, fixação das células na placa através da utilização de *p*-formaldeído 4% por 60 minutos e aplicação do corante Oil-Red, o qual cora lipídios em vermelho, por 5-10 minutos.

4.9. Caracterização imunofenotípica das BM-MSC por citometria de fluxo

Para caracterização imunofenotípica BM-MSC em P4 foram despregadas usando tripsina 0,25%, suspendidas em PBS-EDTA 1mM e centrifugadas por 5 min em rotação de 200G. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e as células suspendidas em 5 ml de PBS-SBF (1%), homogeneizadas e centrifugadas novamente por mais 5 min à 350G. O sobrenadante foi novamente descartado e o procedimento de lavagem repetido. Concluída as lavagens, as células foram quantificadas usando um microscópio de luz e hemocítmetro. Logo após, as células foram concentradas ou diluídas em PBS-SBF 1% a uma concentração de 20.000 células/ μ l. As BM-MSC foram

incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD11b, anti-CD29, anti-CD31, anti-CD34, anti-CD45 e anti-c-Kit (BD Biosciences Inc., San Jose, CA) conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE) por 40 minutos sob abrigo da luz à 4°C. Para análise, 9 tubos contendo BM-MSC para citometria foram preparados, sendo que seis receberam os anticorpos acima mencionados, dois receberam os anticorpos isotipos controles e um tubo “branco” para controle da reação. Todos os tubos receberam 50 µl de solução contendo as BM-MSC e 1 µl de bloqueador da porção Fc (FcBlock- BD-Biosciences Inc., San Jose, CA). Em seguida, foram realizadas 3 lavagens usando PBS-SBF 1% (centrifugação à 200G durante 5 minutos cada) e procedido a leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur com o “software” CELLQUEST (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA) adquirindo-se 20.000 eventos em cada amostra.

4.10. Teste campo aberto

A atividade motora dos animais foi mensurada no teste do campo aberto. O aparelho utilizado consistiu numa arena construída conforme Broadhurst (1960). Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto e seu comportamento foi avaliado durante 5 minutos. Durante a observação foram analisados parâmetros como frequência de locomoção (entrar em uma unidade com as quatro patas), levantar (apoio sobre as patas traseiras, com o tronco perpendicular ao chão da arena), tempo de imobilidade (ausência de atividade motora, permanecendo estático no que diz respeito à cabeça, tronco e patas) e latência para o início do movimento (tempo que o animal leva para deixar o primeiro quadrante no centro do aparelho). Os

tempos de imobilidade e latência para o início do movimento foram mensurados através de cronômetros, e a limpeza da arena após a saída de cada animal foi realizada com solução de álcool a 5% para eliminar possíveis odores deixados pelo animal no aparato.

4.11. Teste de natação forçada versão modificada

Os animais foram individualmente colocados em um recipiente cilíndrico de PVC (46 cm altura x 20 cm de diâmetro) contendo 30 cm de água com temperatura entre 23-25°C. A profundidade de 30 cm evita que os ratos toquem no fundo do cilindro, levando a valores da linha de base menor e respostas aumentadas a antidepressivos serotoninérgicos e noradrenérgicos (Detke e Lucki, 1995). Este teste foi conduzido em duas sessões: 1) sessão pré-teste, com duração de 15 minutos, e 2) sessão teste, com duração de 5 minutos. Os animais tiveram seus comportamentos monitorados por uma câmera localizada acima do cilindro. Os parâmetros avaliados na sessão testes foram: *tempo de escalada* (consiste em movimentos verticais, no qual o animal tenta com as patas dianteiras fora da água e escala as paredes do cilindro), *tempo de natação* (movimentos horizontais, no qual o animal realiza movimentos circulares e cruzamentos de um quadrante para o outro) e *tempo de imobilidade* (inexistência de movimento adicional além daqueles necessários para manter a cabeça do animal fora da água). Concluídas as sessões de natação, os animais foram removidos da água, secados e introduzidos novamente em suas respectivas gaiolas. A água do cilindro foi trocada sempre após a retirada de cada animal.

4.12. Identificação de BMMCs e BM-MSC em ratos receptores

Vinte e quatro horas e 7 dias após o transplante com BMMCs ou BM-MSC, os animais foram perfundidos intracardialmente, os cérebros removidos e congelados. As amostras foram cortadas em criostato (LEICA CM 1850 UV) e as secções de tecido foram coletadas e a identificação de BMMCs ou BM-MSC marcadas com marcador de superfície celular (CM-Dil) foi realizada usando microscópio de fluorescência (Axioobserver Z1, Carl Zeiss, Germany).

4.13. Imunohistoquímica para enzima tirosina-hidroxilase (TH)

Para o estudo da imunohistoquímica, os ratos foram anestesiados com equitesin imediatamente após o teste comportamental e foram perfundidos intracardialmente primeiramente com salina, e em seguida, com a solução fixadora p-formaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M (pH7.4). Os cérebros foram removidos e mantidos imersos durante 1 semana na solução fixadora a 4°C. Concluída esta etapa, os cérebros foram colocados em uma solução de sacarose 30% por 48h antes do seccionamento.

Quatro séries de secções de 30 µm de espessura foram cortadas no criostato no plano frontal e coletadas do diencéfalo ao mesencéfalo. As secções do tecido foram incubadas com anticorpo primário anti-TH, proveniente de coelhos, diluídos em PBS contendo 0.3% Triton X-100 (1:500; cat # AB152 Chemicon, CA, USA) por toda a noite a 4°C. Logo após, as amostras foram incubadas com biotina conjugada a anticorpo secundário (1:200 cat # S-1000 Vector Laboratories, USA) por 2h em temperatura ambiente. Após várias lavagens com PBS, o complexo anticorpo foi localizado utilizando uma variação do sistema ABC (Vectastain ABC Elite kit cat #

PK6101, Vector Laboratories, USA) seguido pela reação 3,3'-diaminobenzidine (DAB) com níquel. As amostras foram então desidratadas com etanol e coradas com violeta cresil.

Para estimar a extensão da perda neuronal devido ao MPTP, primeiramente foram avaliados os grupos de células dopaminérgicas na substância negra parte compacta (SNpc) dos animais controle e Sham, que preservam a citoarquitetura e expressão de TH normal. Subsequentemente foram observados os grupos de células dopaminérgicas dos animais lesados com MPTP e ainda, dos lesados com MPTP e pinealectomizados. Para quantificação de neurônios imunorreativos a TH da substância negra parte compacta, foram obtidas imagens através de microscopia (aumento de 10x) de áreas selecionadas por meio de uma câmera digital DP71 (Olympus Optical). As imagens foram transferidas para um computador e analisadas através de detecção de densidade ótica de cada corte histológico usando o programa "ImageJ". O valor de densidade ótica de cada região foi expressa como porcentagem do grupo controle na respectiva secção.

4.14. Imunomarcção para CD45

A expressão in situ de CD45 foi examinada em secções cerebrais obtidas em ratos perfundidos como descrito na seção acima. As amostras teciduais foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% soro de cabra (Sigma Chemical Co., Madrid, Spain), 3% BSA e 0,1% Triton X-100 em 0.1M PBS por 2 hours a temperatura ambiente. Após este período, as secções cerebrais foram incubadas com anticorpo monoclonal CD45 (BD Pharmigen) (1:20) overnight a 4°C. Após várias lavagens em PBS, os cortes histológicos foram

incubados com DAPI (Sigma) (1:10000) por 5 minutos a temperatura ambiente. Cortes foram lavados com PBS e então, analisados em microscópio de fluorescência (Axioobserver Z1, Carl Zeiss, Germany). Experimentos controles foram realizados omitindo o anticorpo primário.

4.15. Imunohistoquímica para Iba-1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1)

No objetivo de investigar a existência de ativação microglial após o transplante de BMMC, secções cerebrais mesencefálicas foram marcadas com anticorpo contra Iba-1, um marcador de células microgliais amplamente empregado.

Este procedimento foi executado em apenas alguns grupos de animais estudados com o objetivo de verificar a implicação da ativação microglial na perda de neurônios dopaminérgicos observado nos animais transplantados com BMMCs imediatamente e 24 h após a administração de MPTP. Resumidamente, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (100 mg/Kg, i.p) e perfundidos intracardiacamente com salina seguido por solução fixadora à 4 % (formaldeído em 0.1 M de tampão fosfato, pH 7.4). O cérebro foi removido do crânio e imerso em solução fixadora por 1 semana à 4°C. Em seguida, as amostras foram imersas em solução de sacarose 30% por 48 h. Secções cerebrais de 20 µm de espessura foram cortadas no criostato no plano frontal e coletadas do diencéfalo ao mesencéfalo, como descrito acima. Todos os cortes foram inicialmente aquecidos em tampão Tris-HCl (50mM Trizma base, pH 9.5) em microondas com potência de 100% por 6 min e então, deixados esfriar em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, os cortes

foram lavados em PBS, aplicou-se a solução de bloqueio contendo 2.5% de soro normal de cavalo e então, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal anti-Iba1 (1:500, Abcam) diluído em PBS contendo 0.3% Triton X-100 por toda a noite à 4°C. Os cortes foram então incubados com anticorpo secundário conjugado a biotina (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 2 h em temperatura ambiente. Após várias lavagens em PBS, a reação de imunohistoquímica foi visualizada usando DAB e as secções foram desidratadas com etanol, passadas em xileno e as lâminas montadas usando meio de montagem. Para análise, SNpc e área tegmentar ventral (VTA) por secção foi analisada em microscópio (AxioObserver Z1, Carl Zeiss, Germany). Reação controle foi realizada por omissão do anticorpo primário.

4.16. *Produção de ânion superóxido por microscopia fluorescente*

Os níveis de ROS em secções mesencefálicas de ratos foram quantificados através do marcador diidroetídio (DHE; Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR), o qual fluoresce vermelho quando é oxidado à etídio na presença de ROS. Secções seriadas (20 µm) foram incubadas em câmara úmida e protegida da luz à temperatura ambiente com DHE (5µM) por 30 min seguido por DAPI (1:20.000) por 5 min. Após repetidas lavagens com PBS e montagem das lâminas, as secções foram analisadas por microscopia de fluorescência, para detecção do etídio produzido (comprimento de onda - excitação 510-550nm, e emissão >580nm). Imagens do mesencéfalo foram fotografadas com auxílio de microscópio de fluorescência (AxioObserver Z1, Carl Zeiss, Germany). Dez campos foram obtidos de cada SN bilateral através

de objetiva com aumento de 10x e as imagens foram então analisadas através do programa ImageJ.

4.17. Ensaio de permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE)

Azul de Evans (AE, Sigma) é um corante de baixo peso molecular comumente usado para determinar quebra da BHE. Esta prova liga-se a albumina sérica e apenas atravessa a BHE se houver aumento na permeabilidade da BHE. Assim, o extravasamento do corante no parênquima tecidual reflete alteração na permeabilidade da barreira. Para este ensaio, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica como descrito na seção 3.3. Entretanto, neste caso os animais receberam a infusão unilateral de MPTP ou salina. Alterações na permeabilidade da BHE foi avaliada 24 h e 7 dias após a infusão de MPTP. O primeiro grupo, 24 h após a cirurgia, foi anestesiado com tiopental (40 mg/kg) e recebeu a injeção de AE 2% (4ml/Kg) através da veia jugular. Após 30 minutos os animais foram perfundidos intracardialmente como descrito em seção anterior. Secções coronais (10 μ m) da SNpc foram coletadas usando criostato (LEICA 1850 UV). A localização do extravasamento do AE nas secções analisadas foram registradas com microscópio de fluorescência (Axioobserver Z1, Carl Zeiss, Germany) com uma excitação de 530-550 nm e emissão de >590nm. No lado contralateral a lesão do tecido, a autofluorescência foi fotografada com os mesmos parâmetros acima. O segundo grupo foi submetido ao mesmo procedimento, entretanto o AE foi injetado apenas 7 dias após a cirurgia estereotáxica.

4.18. *Análise estatística*

Dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer. Os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis seguido o teste de Dunn foram usados para analisar dados não paramétricos. Todos os valores estão representados como média \pm Erro padrão da média.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da pinealectomia em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA na SNpc no teste do campo aberto 24 h, 7 e 14 dias após lesão.

O efeito da manipulação negativa do microambiente neuronal (redução dos níveis de melatonina induzido pela remoção da glândula pineal) sobre o comportamento animal avaliado no teste do campo aberto após lesão com MPTP ou 6-OHDA encontra-se descrito na Tabela 1. Vinte e quatro horas após a administração das neurotoxinas, os grupos Sham-MPTP e Sham-6-OHDA apresentaram significativo aumento na latência para início do movimento ($P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente) quando comparados a ambos os grupos controle (Sham-Sham e Px-Sham), e ainda, menor frequência de levantar ($P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente) comparados ao grupo Sham-Sham, frequência de locomoção reduzida ($P < 0.01$ e $P < 0.001$, respectivamente) em relação ao grupo Px-Sham e maior tempo de imobilidade ($P < 0.01$ e $P < 0.001$, respectivamente) quando comparados ao grupo Px-Sham. Os grupos Px-MPTP e Px-6-OHDA apresentaram maior tempo de latência para início do movimento ($P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente) e frequência de locomoção menor ($P < 0.01$ e $P < 0.001$, respectivamente) em relação ao grupo Px-Sham. Além disso, ratos pinealectomizados e lesados com 6-OHDA exibiram significativo aumento no tempo de latência para início do movimento ($P < 0.01$) em relação a ambos os grupos controle e tempo de imobilidade maior ($P < 0.001$) quando comparado aos animais do grupo Px-Sham. Os animais Px-MPTP mostraram menor frequência de levantar ($P < 0.05$) comparado ao grupo Sham-Sham e ainda, tempo de imobilidade menor ($P < 0.05$) comparado aos animais do grupo Sham-

6-OHDA. Exceto no parâmetro tempo de imobilidade, o qual permaneceu elevado 7 dias após a lesão no grupo Px-MPTP ($P < 0.05$) em relação aos grupos controles (Sham-Sham e Px-Sham) e no grupo Px-6-OHDA em comparação ao grupo Sham-Sham ($P < 0.001$), Sham-MPTP ($P < 0.01$), Sham-6-OHDA ($P < 0.01$) e Px-Sham ($P < 0.05$), os outros parâmetros foram completamente recuperados a níveis similares aos dos animais controle. Quatorze dias após a cirurgia estereotáxica, o grupo Px-6-OHDA apresentou significativo aumento no tempo de imobilidade comparado aos grupos Sham-Sham ($P < 0.001$), Sham-MPTP ($P < 0.05$) e Px-Sham ($P < 0.05$). Semelhantemente, o grupo Px-MPTP exibiu tempo de imobilidade maior em comparação aos grupos Sham-Sham ($P < 0.01$) e Px-Sham ($P < 0.05$). Ainda, animais Sham-6-OHDA apresentaram significativo aumento na latência para início do movimento comparado aos grupos controles ($P < 0.05$). Não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos experimentais avaliados nos demais parâmetros quatorze dias após a cirurgia estereotáxica no teste do campo aberto.

Tabela 1: Alterações motoras evidenciadas no teste do campo aberto 24 h, 7 e 14 dias após administração de neurotoxinas

Grupos	Tempos (dias)	Latência para início do movimento(s)	Frequência de Locomoção	Frequência de Levantar	Tempo de imobilidade (s)
Sham-Sham	1	6.11±0.9	46.1±6.4	10.1±1.5	24.6±5.1
	7	3.2±0.6	57.7±8.0	8.3±1.0	26.4±5.7
	14	2.0±0.6	49.4±8.0	8.8±2.2	29.8±5.9
Sham-MPTP	1	15.0±2.3 ^{ab}	36.3±5.2 ^b	4.3±1.0 ^a	55.2±7.0 ^b
	7	4.3±0.9	45.4±6.0	6.2±1.4	43.7±7.2
	14	3.2±0.4	42.0±5.5	5.0±0.6	53.2±7.1
Sham-6-OHDA	1	21.0±4.6 ^{ab}	27.6±7.4 ^b	4.0±0.9 ^a	71.3±10.3 ^b
	7	5.5±1.1	63.0±11.0	10.1±1.6	38.0±8.6
	14	5.7±0.8 ^{ab}	41.4±7.7	9.3±2.0	71.4±11.7
Px-Sham	1	5.1±0.6	75.0±8.2 ^a	8.6±0.9	10.3±2.7
	7	3.5±0.8	63.6±9.3	10.3±1.7	29.8±7.2
	14	2.2±0.4	54.0±8.6	8.5±1.5	32.3±6.3
Px-MPTP	1	11.8±0.4 ^b	34.2±7.7 ^b	4.6±0.9 ^a	27.1±7.7 ^c
	7	5.0±0.7	45.6±6.1	8.3±1.9	62.0±7.0 ^{ab}
	14	4.4±1.0	33.4±5.6	4.4±0.9	84.6±11.2 ^{ab}
Px-6-OHDA	1	14.4±1.9 ^{ab}	34.4±5.8 ^b	6.9±1.4	67.2±11.3 ^b
	7	6.2±1.6	42.6±4.8	7.5±1.9	86.7±9.2 ^{abcd}
	14	4.8±0.6	40.9±6.4	5.8±0.9	100.1±16.2 ^{abd}

Os valores estão expressos como Média ± Erro Padrão da Média (SEM) (n=10±2 animais/grupo). Diferenças estatísticas entre os grupos são indicados pelas seguintes letras: ^adiferente do grupo Sham-Sham (P<0.05), ^bdiferente do grupo Px-Sham (P<0.05), ^cdiferente do grupo Sham-6-OHDA (P<0.01) e ^ddiferente do grupo Sham-MPTP (P<0.01) 1, 7 e 14 dias após administração de neurotoxina. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer ou Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações foram empregados para análise dos dados.

5.2. Efeito da pinealectomia em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA no teste de natação forçada versão modificada 15 dias após lesão da SNpc

Os resultados apresentados na Figura 8A-C mostram o efeito da administração de MPTP e 6-OHDA em animais pinealectomizados ou não, 15 dias após a cirurgia estereotáxica. No parâmetro tempo de escala, nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos estudados foi evidenciada. Entretanto, o grupo Px-6-OHDA apresentou diminuição significativa no tempo de natação em comparação aos grupos Sham-Sham ($P < 0.001$), Px-Sham ($P < 0.001$), Sham-MPTP ($P < 0.01$) e Px-MPTP ($P < 0.05$). Semelhantemente, Sham-MPTP ($P < 0.05$; $P < 0.05$), Sham-6-OHDA ($P < 0.001$; $P < 0.001$) e Px-MPTP ($P < 0.01$; $P < 0.05$) apresentaram menor tempo de natação quando comparados aos grupos Sham-Sham e Px-Sham, respectivamente. No mesmo parâmetro, o grupo Sham-6-OHDA exibiu menor comportamento de natação comparado ao grupo Px-Sham ($P < 0.001$). Além disso, Sham-6-OHDA e Px-6-OHDA apresentaram aumento significativo no tempo de imobilidade em comparação aos grupos Sham-Sham ($P < 0.05$; $P < 0.001$) e Px-Sham ($P < 0.01$; $P < 0.001$), respectivamente.

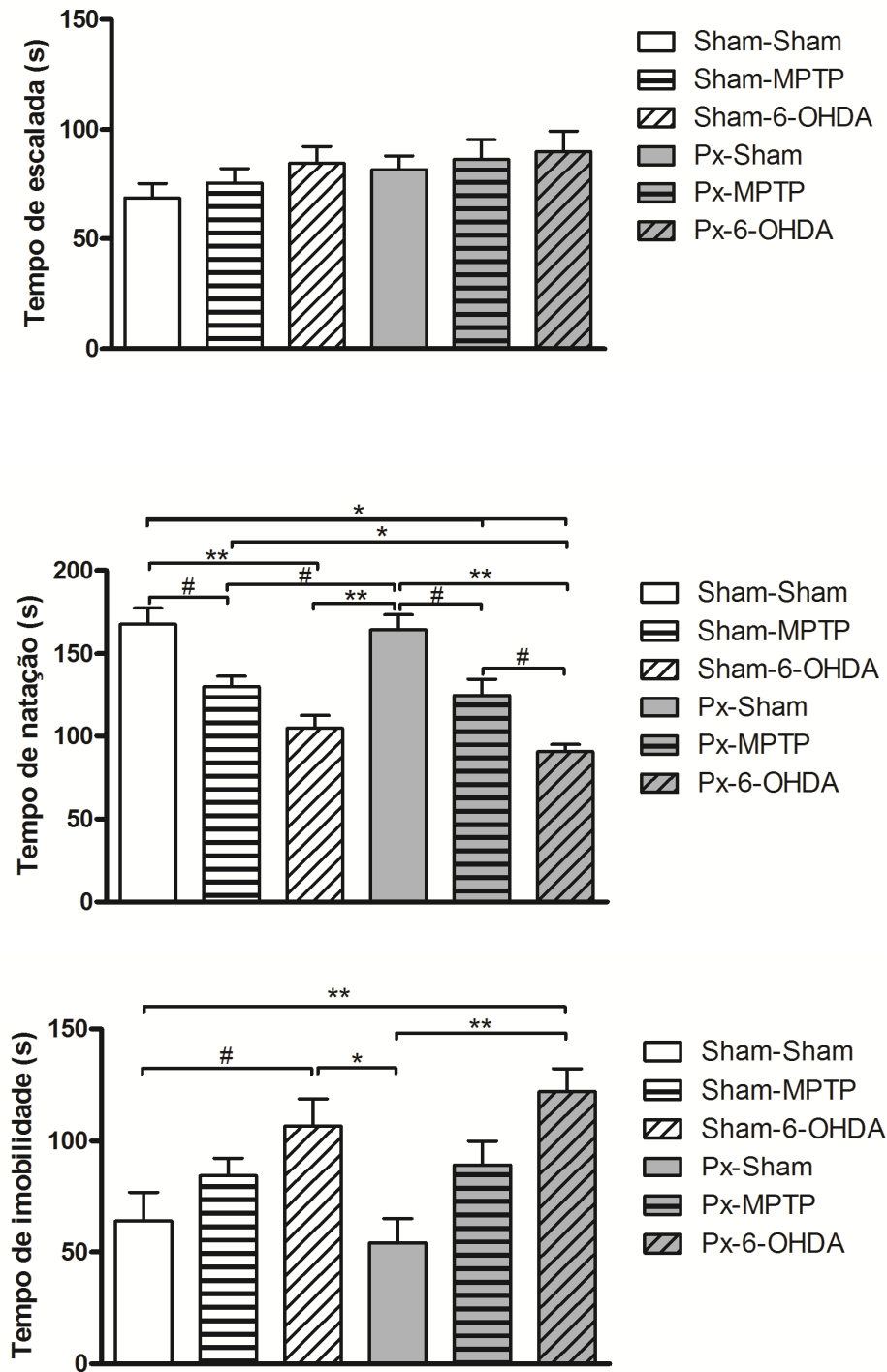
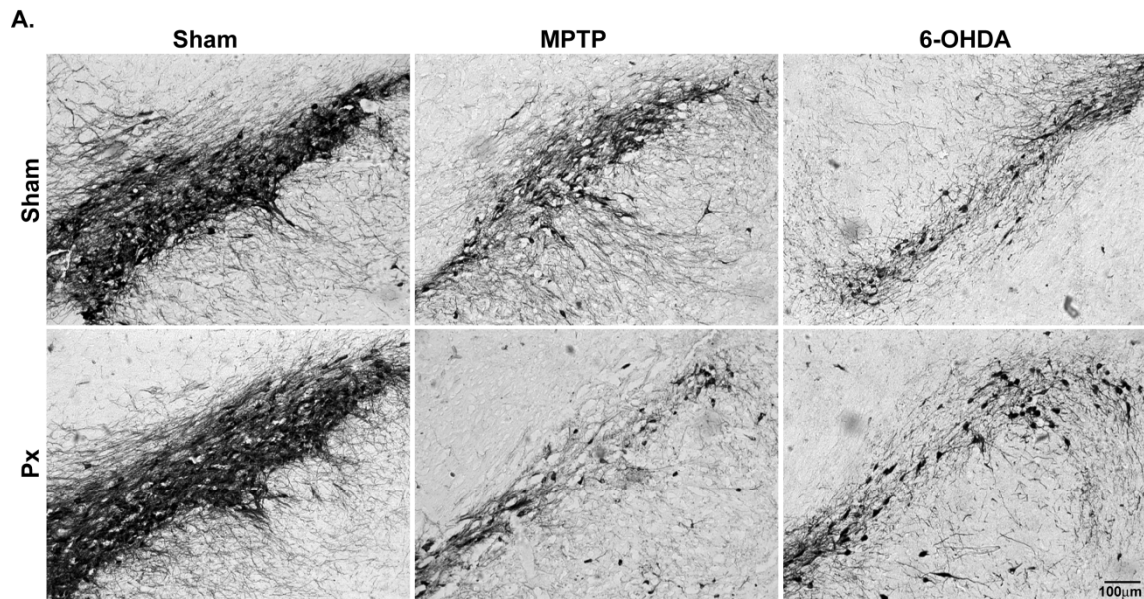


Fig.8. Efeito da administração de MPTP e 6-OHDA em animais submetido ou não à pinealectomia sobre o comportamento animal avaliado no teste de natação forçada versão modificada 15 após cirurgia estereotáxica. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (SEM) ($n=11\pm 2$ animais/grupo). # $P<0.05$, * $P<0.01$ e ** $P<0.001$. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer ou Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações foram empregados para análise dos dados.

5.3. Efeito da pinealectomia sobre a redução de neurônios imunorreativos à TH induzida por MPTP ou 6-OHDA

A administração de ambas neurotoxinas causaram significativa perda de neurônios na SNpc 15 dias após cirurgia estereotáxica como mostrado na Figura 9A-B. Após a infusão de neurotoxina, os grupos Sham-MPTP e Sham-6-OHDA apresentaram significativa redução de neurônios imunorreativos à enzima TH comparados aos grupos Sham-Sham ($P < 0.05$; $P < 0.05$, respectivamente) e Px-Sham ($P < 0.01$; $P < 0.01$, respectivamente). Além disso, animais pertencentes ao grupo Px-6-OHDA possuíam porcentagem de neurônios imunorreativos à TH-ir menor quando comparados aos animais dos grupos Sham-Sham ($P < 0.05$) e Px-Sham ($P < 0.01$). Entretanto, o grupo Px-MPTP não apresentou perda de neurônios estatisticamente significativo na SNpc em comparação aos grupos Sham e lesados. Não foi observada diferença significativa na perda de neurônios na SNpc entre os grupos controles, Sham-Sham ($P < 0.05$) e Px-Sham ($P < 0.01$).



B.

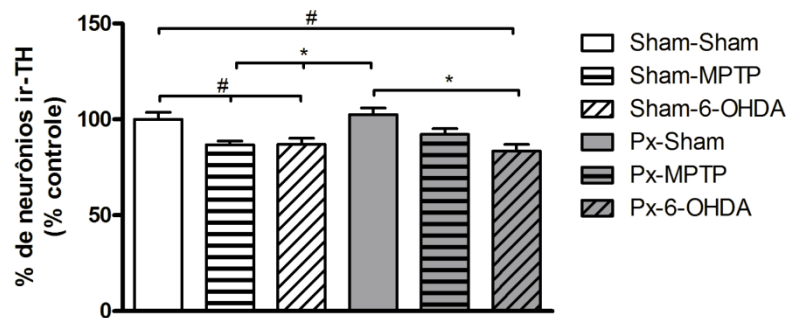


Fig.9. Efeito da redução dos níveis de melatonina por remoção da glândula pineal sobre a sobrevivência neuronal frente à morte celular induzida por MPTP ou 6-OHDA 15 dias após cirurgia estereotáxica. A. Fotomicrografia de secções representativas de neurônios imunorreativos à enzima TH na SNpc após pinealectomia, injeção de MPTP ou 6-OHDA. Escala: 100 µm. B. Porcentagem de células TH-ir na SNpc dos grupos estudados. Os valores estão expressos como Média ± Erro Padrão da Média (SEM) (n=5 animais/grupo). # P<0.05 e * P<0.01. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer foi empregado para análise dos dados.

5.4. Efeito da pinealectomia em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA na produção de ânions superóxido determinado indiretamente por microscopia fluorescente.

A Figura 10A ilustra os resultados da marcação indireta de ROS por DHE em secções mesencefálicas dos grupos estudados e a Figura 10B representa a porcentagem de células positivas para DHE 15 dias após cirurgia estereotáxica. O estudo revelou que animais Sham-Sham menor porcentagem de células DHE⁺ comparados a todos os animais lesados ($P < 0.001$) e ao grupo Px-Sham ($P < 0.05$). Ratos lesados com 6-OHDA, pinealectomizados ($P < 0.001$) ou não ($P < 0.001$), apresentaram aumento significativo na quantidade de células DHE⁺ comparados ao grupo Px-Sham. Semelhantemente, ratos lesados com MPTP, pinealectomizados ($P < 0.001$) ou não ($P < 0.001$), apresentaram maior quantidade de células DHE⁺ quando comparados a animais pertencentes ao grupo Px-Sham. Entretanto, animais que receberam a administração de MPTP (Sham-MPTP e Px-MPTP) exibiram quantidade menor de células DHE⁺ comparados aos grupos que receberam a administração de 6-OHDA (Sham-6-OHDA: $P < 0.001$ e $P < 0.001$; e Px-6-OHDA: $P < 0.01$ e $P < 0.05$, respectivamente). Não foi observado efeito da redução precoce nos níveis de melatonina sobre a produção de ROS em animais lesados com MPTP e 6-OHDA.

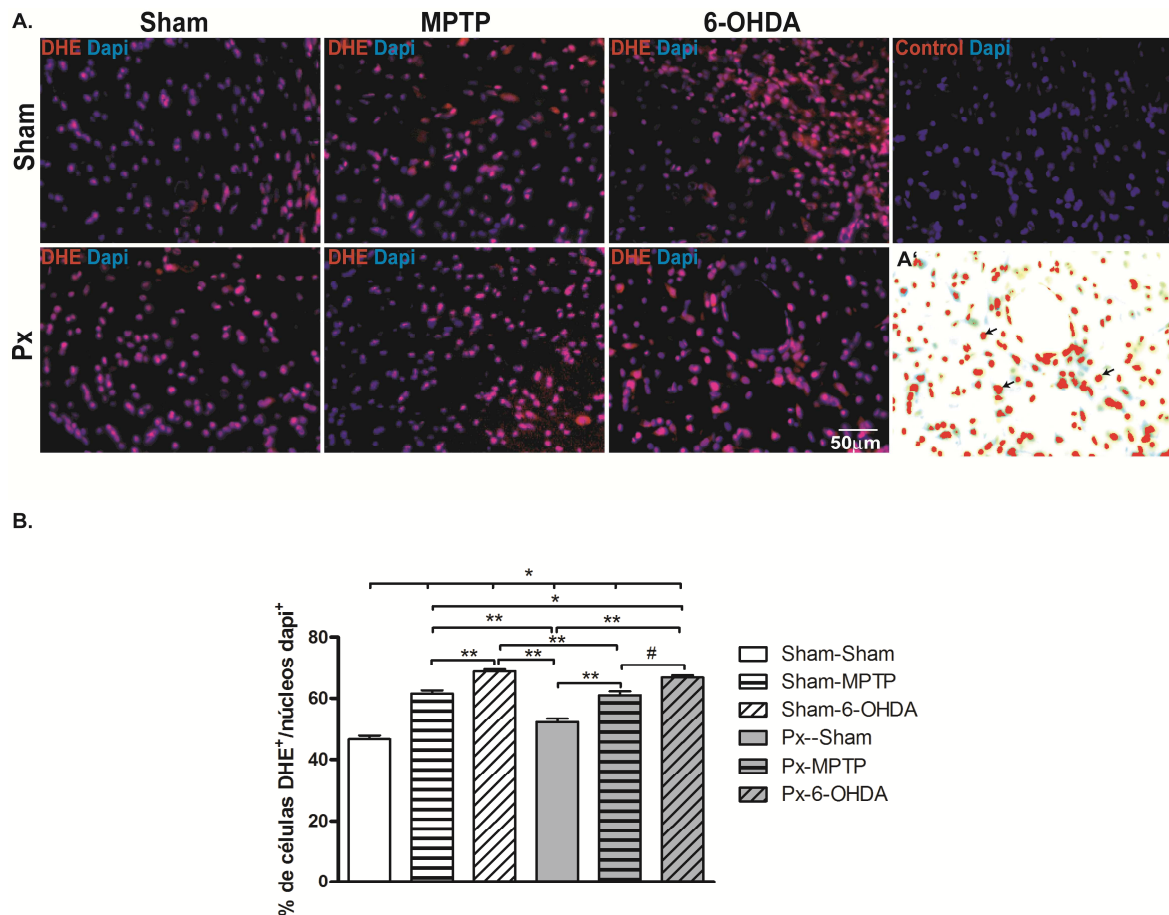


Fig.10. Efeito da redução dos níveis de melatonina por remoção da glândula pineal sobre produção de ânions superóxido em animais lesados com MPTP ou 6-OHDA 15 dias após cirurgia estereotáxica. A. Fotomicrografia de secções representativas de células DHE⁺ na SNpc após pinealectomia, injeção de MPTP ou 6-OHDA. A'. Fotomicrografia representativa das células quantificadas pelo software ImageJ. Escala: 50 µm. B. Porcentagem de células DHE⁺/núcleos DAPI⁺ na SNpc dos grupos estudados. Os valores estão expressos como Média ± Erro Padrão da Média (SEM) (n=5 animais/grupo). # P<0.05 e * P<0.01. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer foi empregado para análise dos dados.

5.5. Caracterização funcional das BM-MSC

Após isolamento e cultivo de BM-MSC, as células cresceram até adquirirem confluência e exibiram morfologia similar a fibroblasto (Fig. 11A). Quando as células foram submetidas à estimulação adipogênica, foi observada alteração morfológicas nas BM-MSC, adquirindo um fenótipo de célula esférica, a qual era marcada com Oil Red-O, o qual marca gotículas de lipídio em vermelho (Fig. 11B). Por outro lado, BM-MSC cultivadas submetidas ao

protocolo de diferenciação osteogênica resultou em matriz extracelular marcada para Alizarin-Red (Fig. 11C).

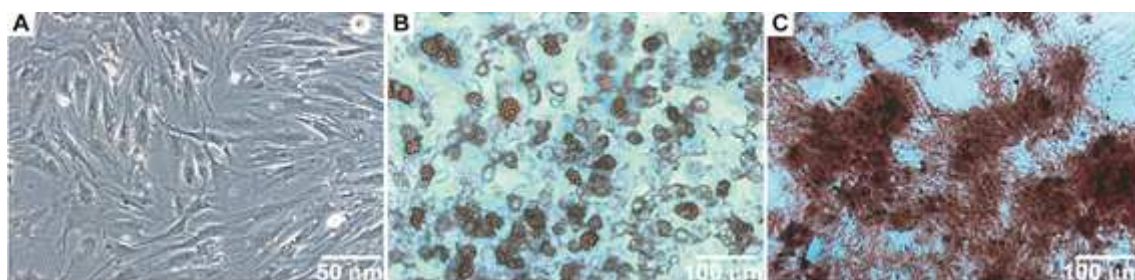


Figure 11. Morfologia da cultura de BM-MSC (A). Fotomicrografia ilustrando BM-MSC submetidas ao protocolo de diferenciação adipogênica (B) e osteogênica (C).

5.6. Caracterização imunofenotípica das BM-MSC por citometria de fluxo

BM-MSC cultivadas submetidas á caracterização fenotípica através da citometria de fluxo exibiram positividade para CD29 e mostraram-se negativas para CD45, CD31, CD34, CD11b e c-Kit. Esses achados indicaram número reduzido de contaminação com células como, macrófagos, células tronco hematopoiéticas, leucócitos e células endoteliais.

Tabela 2: Valores percentuais de BM-MSC para marcadores específicos avaliados por citometria de fluxo.

Marcadores	Valores %
CD11b	7,83
CD34	8,67
CD45	15,80
CD31	2,47
CD29	89,64
c-Kit	8,35

5.7. Efeito do transplante de BMMCs ou BM-MSc em ratos lesados com MPTP no teste campo aberto 24 horas após a lesão - Experimento 2A

O efeito do transplante de BMMCs ou BM-MSc em ratos lesados com MPTP no teste de campo aberto é apresentado na figura 12 A-D. O grupo MPTP-Salina exibiu significativo aumento no tempo de imobilidade ($P < 0.05$) quando comparado ao grupo Sham-Salina e redução na frequência de levantar ($P < 0.05$) comparado ao grupo Sham-Salina e Sham-BMMC. Além disso, o grupo MPTP-Salina apresentou aumento no tempo de latência para iniciar o movimento ($P < 0.05$) em comparação ao grupo Sham-BMMC. Animais lesados com MPTP e transplantados com BMMCs mostraram redução na frequência de levantar ($P < 0.05$) e aumento no tempo de imobilidade ($P < 0.05$) comparado a ambos grupos Sham. Ainda, o grupo MPTP-BMMC apresentou aumento no tempo de latência para iniciar o movimento ($P < 0.05$) comparado ao grupo Sham-BMMC e redução na frequência de locomoção quando comparado ao grupo Sham-BMMC ($P < 0.01$) e Sham-MSc ($P < 0.05$). Não houve diferença nos parâmetros do teste do campo aberto quando MPTP-Salina e MPTP-BMMC foi comparado. Quanto aos animais transplantados com BM-MSc, não houve diferença com relação ao grupo MPTP-Salina em qualquer dos parâmetros analisados no teste do campo aberto.

5.8. Efeito do transplante de BMMCs em ratos lesados com MPTP no teste de campo aberto 24 horas, 3 e 7 dias após lesão - Experimento 2B

Os dados ilustrados na Figura 13 demonstram que a administração de MPTP causou redução significativa na atividade geral dos animais submetidos

ao teste do campo aberto 24 horas após a cirurgia estereotáxica e previamente o transplante de BMMCs, como descrito no desenho experimental 2B (Fig. 7).

Nas primeiras 24 h, ratos lesados com MPTP apresentaram diminuição significativa na frequência de locomoção ($P<0.0001$) e frequência de levantar ($P=0.0011$) quando comparados ao grupo Sham. Ainda, o grupo MPTP apresentou aumento significativo no tempo de imobilidade ($P=0.0003$) e latência para início do movimento ($P=0.029$) comparado ao grupo Sham. Exceto para o parâmetro latência para início do movimento, o qual permaneceu aumento 3 dias ($P<0.05$) e sete dias ($P<0.05$) após a lesão, os outros parâmetros retornaram aos níveis normais, similares aqueles encontrados nos animais controle.

O efeito do transplante de BMMCs no teste de campo aberto 3 e 7 dias após a infusão de MPTP também é ilustrado na figura 13 A-D. Três dias após a cirurgia estereotáxica, animais pertencentes ao grupo MPTP-BMMC significante aumento no tempo de imobilidade ($P<0.05$) comparado ao grupo Sham-BMMC e reduzida frequência de levantar quando comparado ao grupo MPTP-Salina ($P<0.05$). Não houve diferença nos demais parâmetros entre os grupos experimentais 3 dias após a cirurgia estereotáxica. Sete dias após a infusão de MPTP, o grupo MPTP-BMMC mostrou redução na frequência de levantar ($P<0.05$) e aumento na latência para iniciar o movimento ($P<0.05$) comparado ao grupo Sham-BMMC. Não houve diferença nos demais parâmetros entre os grupos experimentais analisados 7 dias após a cirurgia estereotáxica.

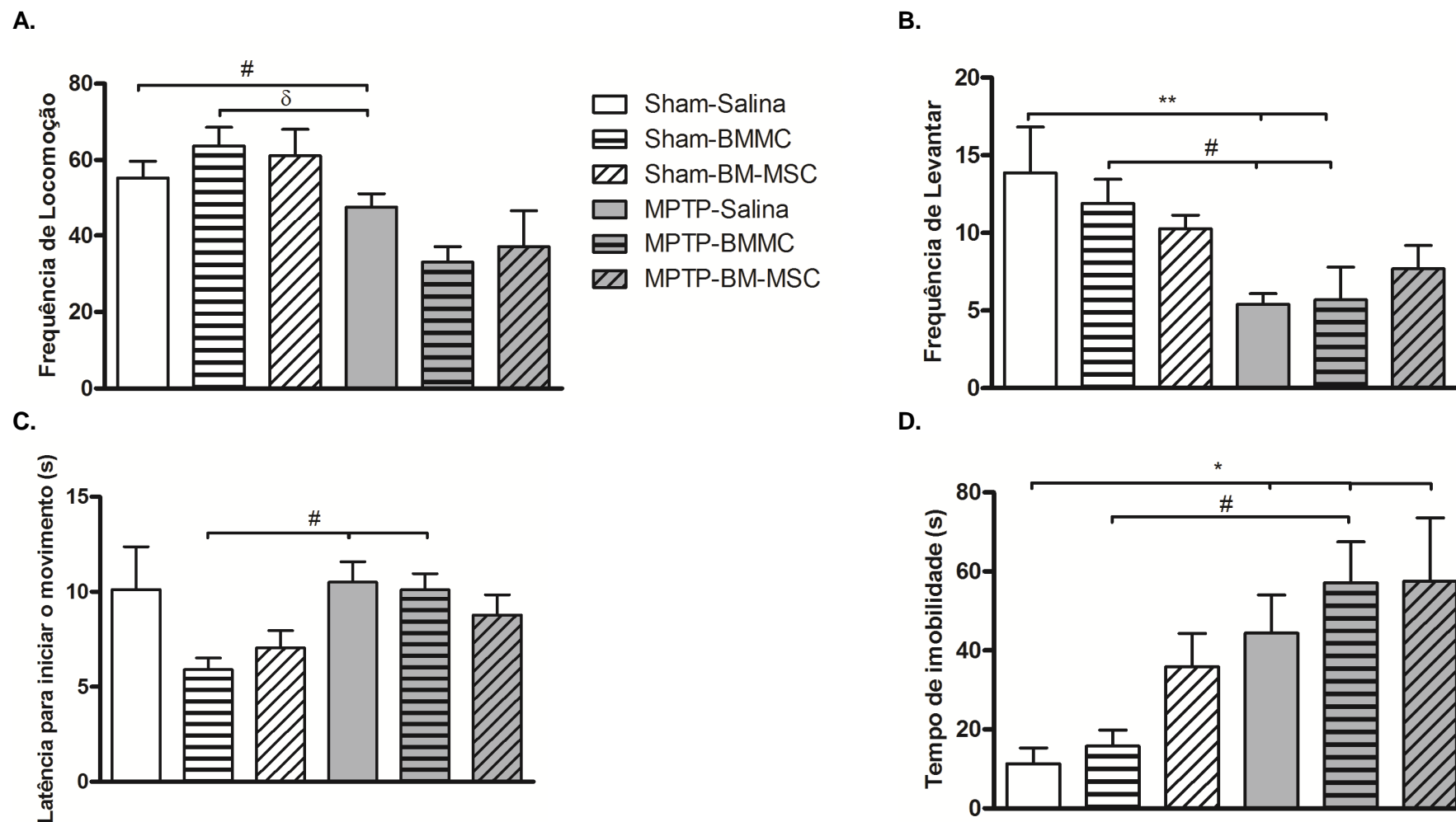


Fig.12. Efeito do transplante de BMMC ou BM-MSc imediatamente após a infusão de MPTP no teste campo aberto 24h após a cirurgia estereotáxica. Valores são expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ significativamente diferente do grupo Sham-Salina; # $P < 0.05$ significativamente diferente do grupo Sham-BMMC e δ $P < 0.05$ comparado ao grupo Sham-BM-MSc. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey-Kramer ou teste de Kruskal-Wallis test seguido do teste de Dunn.

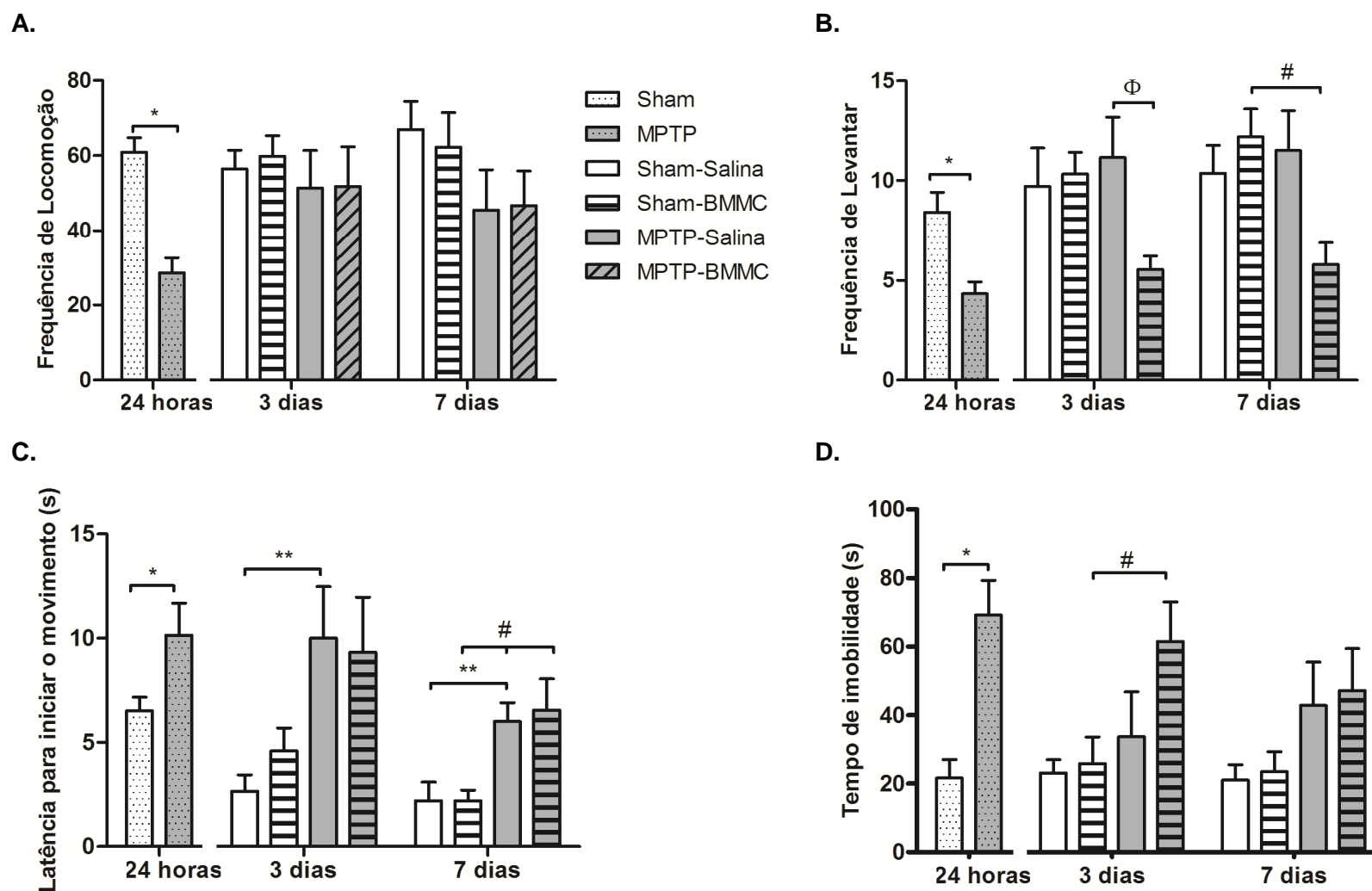


Fig.13. Efeito da infusão de MPTP e do transplante de BMMC na atividade geral dos animais avaliada no teste de campo aberto 24 horas, 3 e 7 dias após cirurgia estereotáxica. Valores são expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0.01$ diferente do grupo Sham 24 h após cirurgia estereotáxica; ** $P < 0.05$ significativamente diferente do grupo Sham-Salina 3 dias e 7 dias após cirurgia; # $P < 0.05$ significativamente diferente do grupo Sham-BMMC e $\phi P < 0.05$ diferente estatisticamente do grupo MPTP-Salina. Teste t-Student ou teste U-Mann-Whitney foram empregados para análise de dados 24h após a infusão de MPTP. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foram empregados para análise dos dados do campo aberto 3 e 7 dias após a cirurgia estereotáxica

5.9. Efeito do transplante de BMMC em ratos lesados com MPTP no teste de natação forçada versão modificada

Os resultados mostrados na Figura 14 demonstram o efeito da infusão de MPTP e do transplante de BMMC 8 dias após a cirurgia estereotáxica em ratos. Não houve diferença entre os grupos testados nos parâmetros tempo de natação e de escalada. Entretanto, animais lesados com MPTP e transplantados com BMMC 24h após a injeção da neurotoxina mostraram significativo aumento no tempo de imobilidade ($P=0.0047$) quando comparados aos grupos Sham-Salina ($P<0.05$) e MPTP-Salina ($P<0.01$).

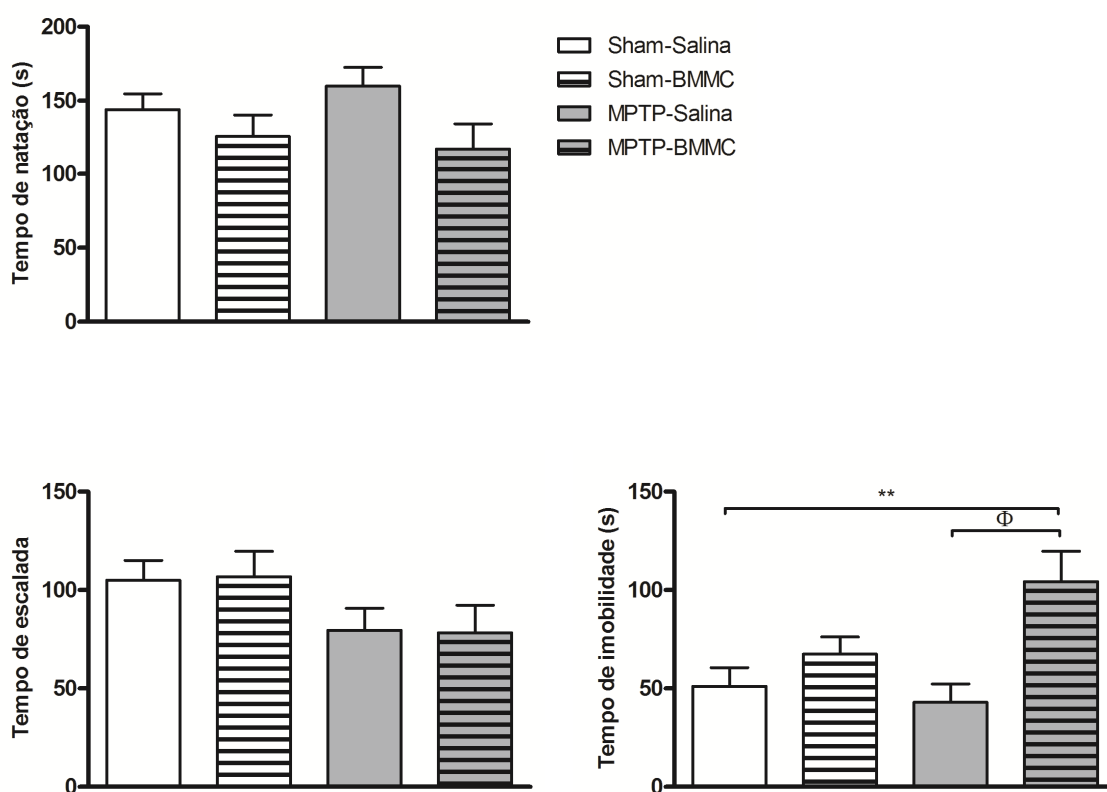


Fig.14. Efeito do transplante de BMMCs e infusão de MPTP no teste de natação forçada versão modificada 7 dias após a cirurgia estereotáxica. Valores são expressos como média \pm S.E.M. * $P<0.01$ significativamente diferente do grupo Sham-Salina; Φ $P<0.01$ significativamente diferente do grupo MPTP-Salina. ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações.

5.10. Imunohistoquímica para enzima Tirosina hidroxilase

A administração de MPTP causou significativa perda de neurônios na SNpc 24 h ($P < 0.01$) (Figura 15A e 15C), e 7 dias (Figura 15B e 15D) após a cirurgia estereotáxica ($P < 0.001$) quando comparado aos grupos Sham, apresentando aproximadamente 20% e 38% de perda neuronal 24 h e 7 dias após a injeção de MPTP comparado ao grupo Sham-Salina, respectivamente. Vinte e quatro horas após a infusão de MPTP, o grupo MPTP-BMMC apresentou significativo aumento na perda neuronal comparado ao grupo Sham-Salina ($P < 0.001$), Sham-BMMC ($P < 0.01$), Sham-BM-MS ($P < 0.001$) e MPTP-Salina ($P < 0.01$). Entretanto, ratos lesados com MPTP e transplantados com BM-MS não exibiram perda de neurônios TH-ir quando comparado ao grupo MPTP-BMMC ($P < 0.001$) e ainda, não apresentavam diferença dos grupos Sham. Não foi observado diferença entre os grupos MPTP-Salina e MPTP-BMMC na perda neuronal 7 dias após a cirurgia.

5.11. Identificação de BMMC e BM-MS em amostras cerebrais de ratos transplantados

Vinte e quatro horas (Figura 16A e 16B) e sete dias (Figure 16C e 16D) após o transplante celular, células marcadas com marcador celular Dil foram encontradas em secções cerebrais dos grupos Sham-BMMC, Sham-BM-MS, MPTP-BMMC e MPTP-BM-MS, respectivamente. Não foram identificadas células marcadas com Dil nos grupos Sham-Salina e MPTP-Salina.

5.12. Expressão de CD45 em cortes cerebrais de ratos

Figura 17A-B e 17C-D mostram a expressão de CD45 e DAPI nas amostras cerebrais dos animais dos grupos Sham-Salina, Sham-BMMC, Sham-BM-MSc, MPTP-Salina, MPTP-BMMC e MPTP-BM-MSc 24h e 7 dias após a cirurgia estereotáxica, respectivamente. Animais lesados com MPTP e transplantados com BMMC imediatamente após a lesão apresentaram maior quantidade de células CD45⁺ (7,43% ± 0.9) quando comparado ao grupo Sham-Salina (2,54% ± 0.3) (P<0.01), Sham-BMMC (3,38% ±0.4) (P<0.01), Sham-BM-MSc (1,44% ±0.09) (P<0.01), MPTP-Salina (3,04% ±0.2) (P<0.01) e MPTP-BM-MSc (2,87% ±0.7) (P<0.05). Além disso, 8 dias após a cirurgia estereotáxica, ratos lesados com MPTP que receberam BMMC 24 h após a infusão da neurotoxina exibiram maior quantidade de células CD45⁺ (4,61% ±0.5) comparado ao grupo Sham-Salina (2,88% ± 0.3) (P<0.05) e Sham-BMMC (3.08% ±0.34) (P<0.05). Não houve diferença entre os demais grupos estudados.

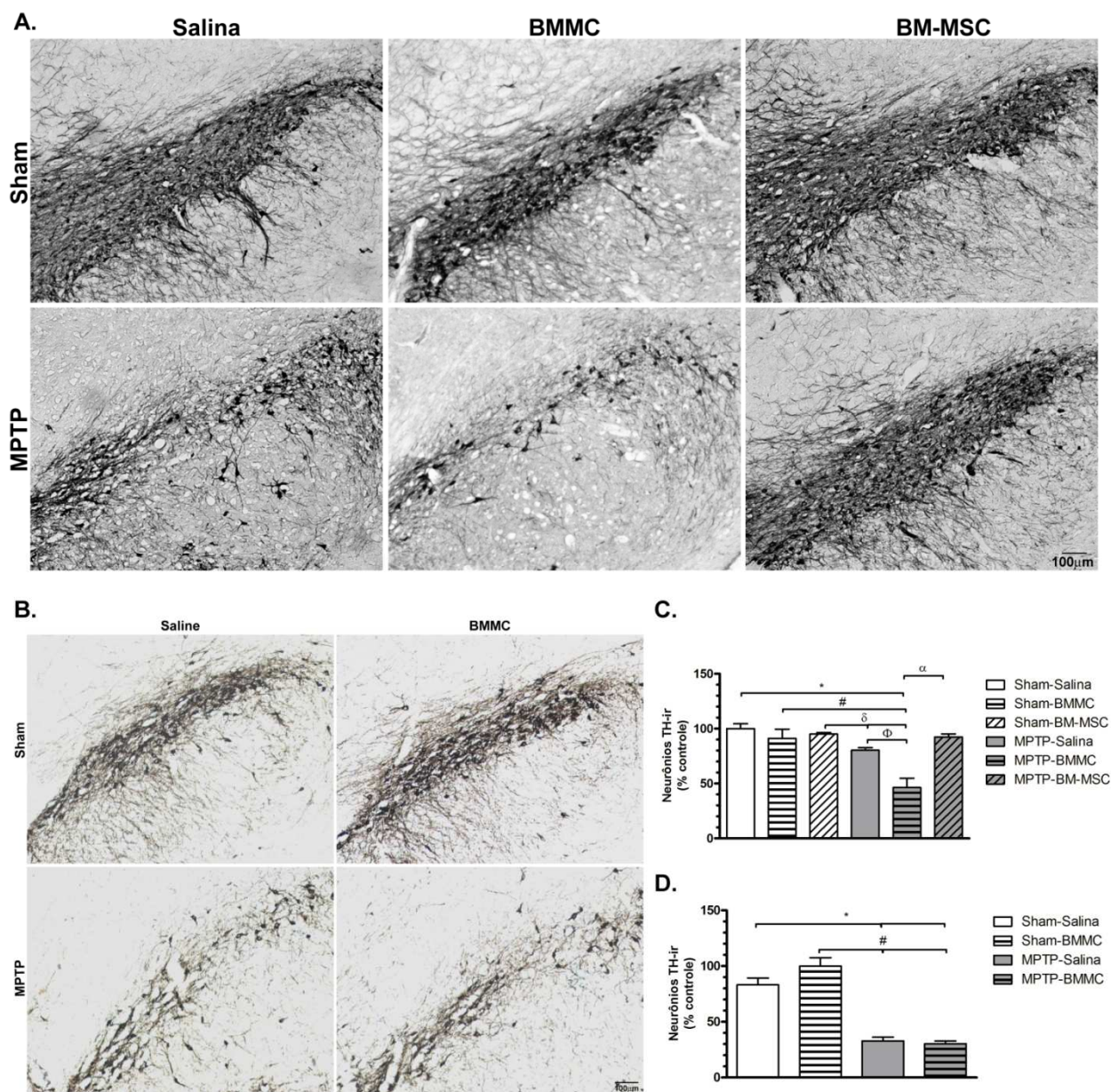


Fig.15. Fotomicrografia das representativas secções de neurônios imunorreativos a TH na SN 24 h (A) e 7 dias após a infusão de MPTP (B). Escala 100 µm. C) Efeito do transplante de BMMC ou BM-MSC no modelo animal do MPTP na porcentagem de neurônios imunorreativos para TH na SN de ratos 24 h após a administração de MPTP. D) Efeitos do transplante de BMMC 7 dias após a injeção de MPTP. Valores são expressos como média±S.E.M. * P<0.01 comparado ao grupo Sham-Salina; # P<0.01 comparado a Sham-BMMC, δ P<0.01 comparado ao grupo Sham-BM-MSC, Φ P<0.01 comparado ao grupo MPTP-Salina e α P<0.001 comparado ao grupo MPTP-BMMC. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas.

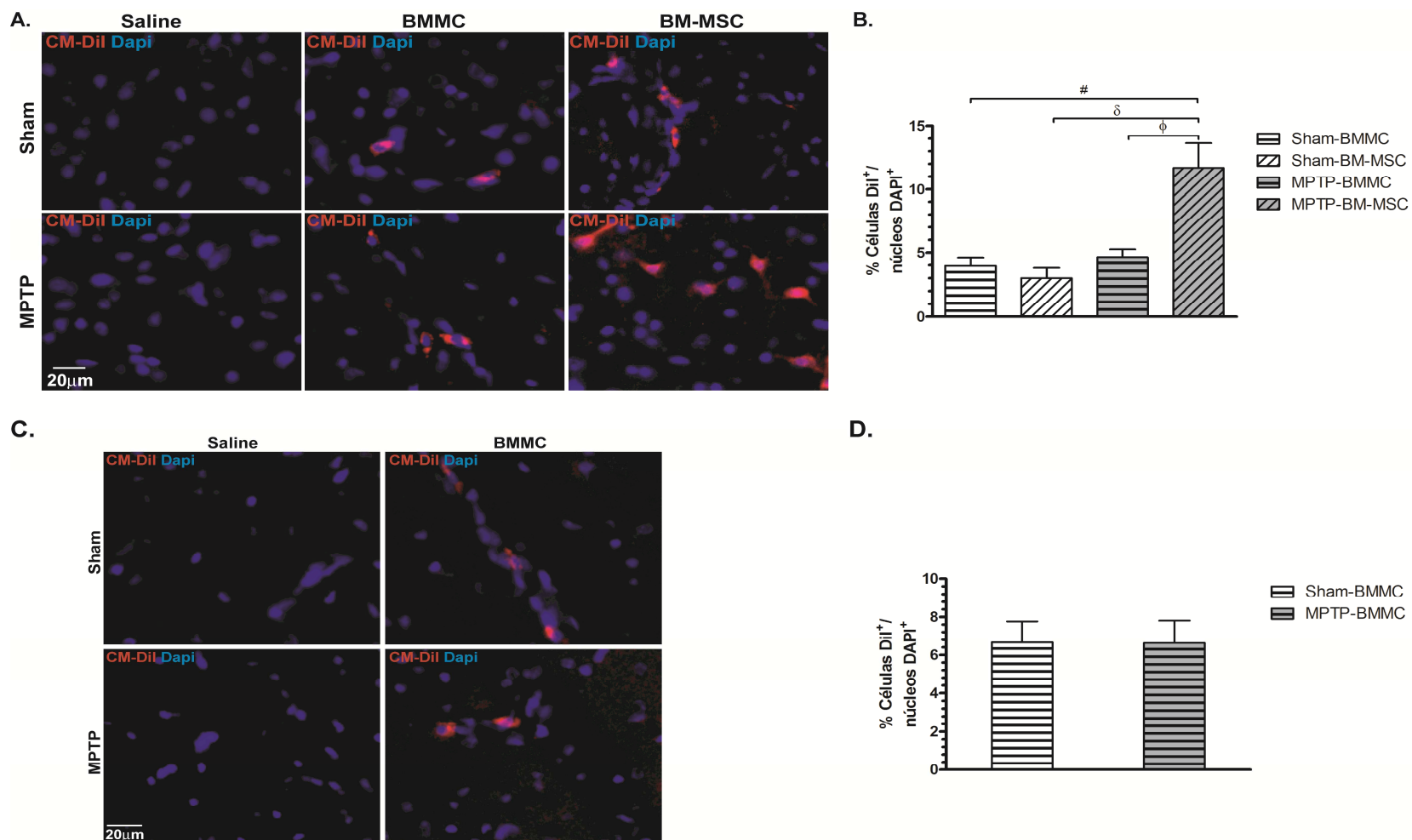


Fig.16. Fotomicrografia ilustrando células marcadas com Dil⁺ encontradas em amostras cerebrais de animais transplantados com BMMC ou BM-MSc 24 h (A) e 7 dias (C) após cirurgia estereotáxica. Escala: 20 µm. B) Porcentagem de células Dil⁺ encontradas 24 h após a administração de MPTP. D) Porcentagem de células Dil⁺ encontradas 7 dias após cirurgia estereotáxica.

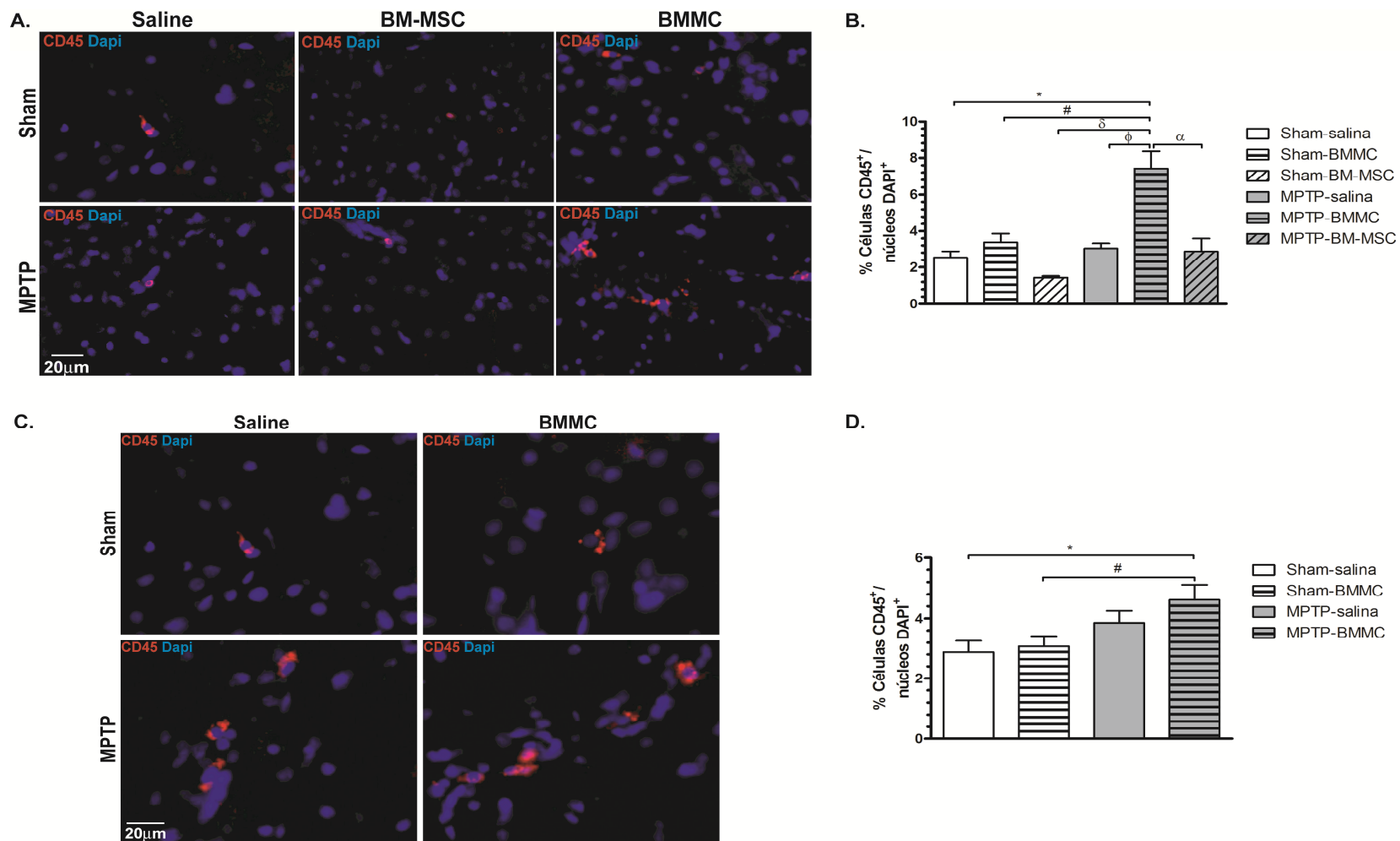


Fig.17. Fotomicrografia ilustrando células marcadas para CD45 presentes em secções cerebrais de animais transplantados com BMMC ou BM-MSc 24 h (A) e 7 dias (C) após cirurgia estereotáxica. Escala: 20 µm. B) Porcentagem de células marcadas para CD45 encontradas 24 h após a administração de MPTP. D) Porcentagem de células marcadas para CD45 encontradas 7 dias após cirurgia estereotáxica.

5.13. Efeito da infusão de MPTP e do transplante com BMMC sobre a ativação microglial

Células microgliais foram visualizadas em secções cerebrais através de imunomarcagem do antígeno Iba-1 em ambas as áreas mesencefálicas estudadas, SNpc e VTA, nos grupos selecionados Sham-salina, Sham-BMMC, MPTP-salina e MPTP-BMMC (Figura 18B-J). Não foram observadas diferenças nas marcações da VTA entre os grupos estudados e uma imagem representativa foi selecionada para ilustrar a morfologia das células microgliais presentes na região (Figura 18B). Entretanto, no sítio da infusão de MPTP houve pronunciada alteração da morfologia das células microgliais do estado de repouso, o qual é caracterizado por corpo celular pequeno e por muitos processos finos partindo do mesmo, para um estado reativo caracterizado por morfologia amebóide ou hiper-ramificada com processos densos (Figura 18B-J). Além disso, a presença de células microgliais ativadas parecia mais abundante em animais lesados com MPTP e transplantados com BMMC imediatamente após a lesão do que animais lesados com MPTP e tratados com salina (Figura 18I).

5.14. Efeito da infusão de MPTP na integridade da BHE 24 h e 7 dias após lesão

Análise de secções cerebrais após a injeção da prova AE em ratos com lesão unilateral da SNpc induzida por MPTP demonstraram que a infusão de MPTP resultou em significativo extravasamento de AE dentro do parênquima no sítio da lesão, indicando que houve severa quebra da BHE em ambos tempos analisados. Não houve extravasamento de AE dentro do parênquima no lado contralateral a lesão, mostrando a preservação da BHE em ambos tempos analisados (Figura 19).

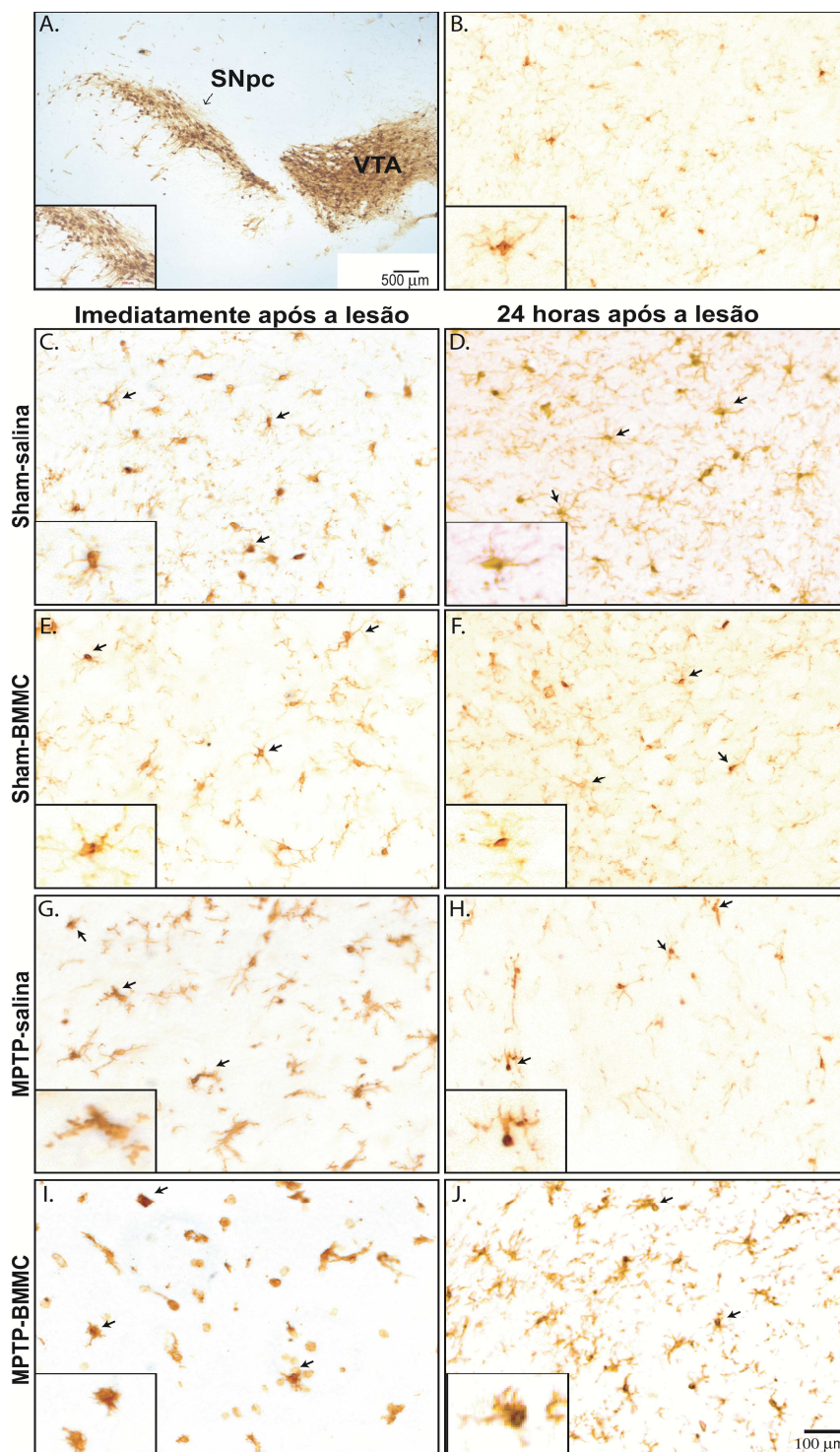


Fig.18. Fotomicrografia de secções representativas demonstrando o padrão de ativação diferente na VTA (Painel 18B) e SNpc 24h (Painel 18C-I) e 7 dias (Painel 18D-J) após cirurgia estereotáxica. Escala: 500 μm. N=3 animais/grupo. A) Fotomicrografia de secção representativa marcada para enzima TH ilustrando a area investigada. Escala: 100 μm

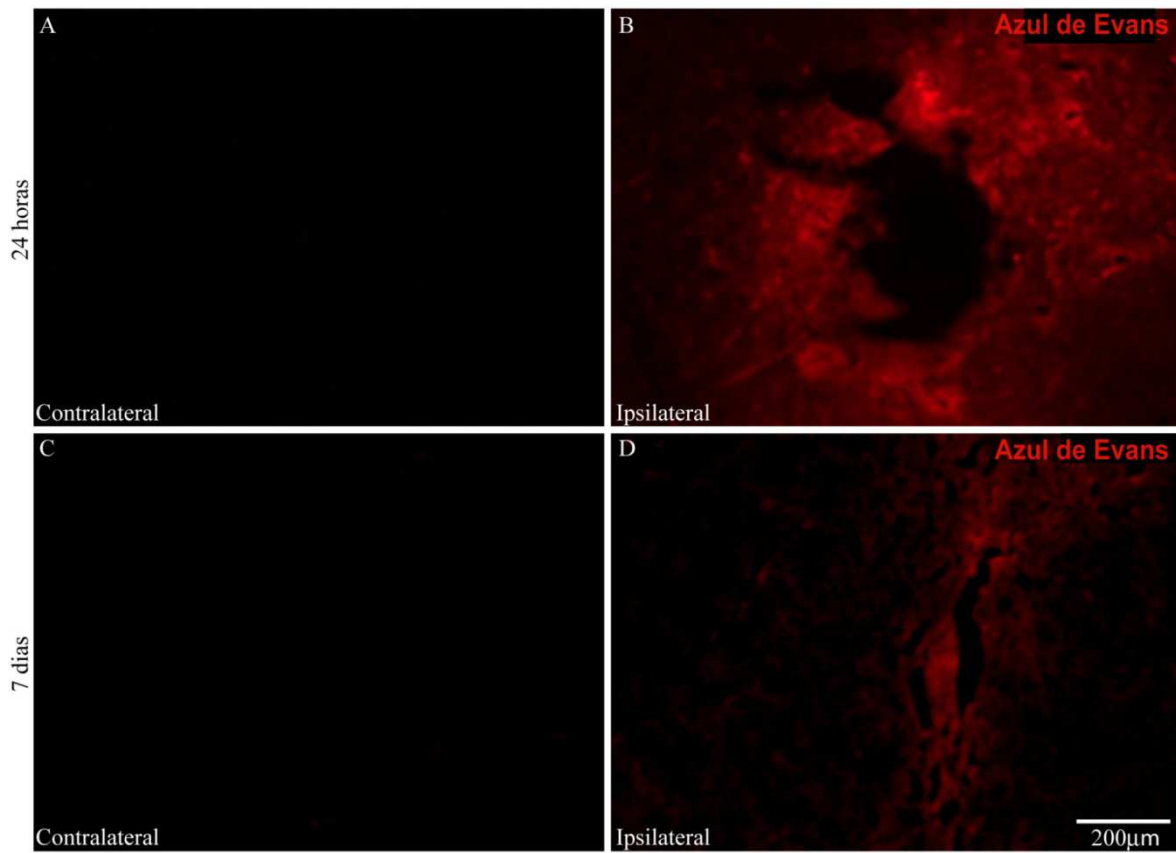


Fig.19. Fotomicrografias representativas demonstrando alteração na integridade da BHE após lesão unilateral da SNpc de ratos induzido pela infusão de MPTP. *A* e *C*, representam os lados contralaterais dos animais lesados com MPTP e tratados com AE 24 h e 7 dias após a cirurgia estereotáxica, respectivamente. *B* e *D*, representam os sítios de infusão de MPTP em ratos lesados com MPTP e injetados com AE 24 horas e 7 dias após cirurgia estereotáxica, respectivamente.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho visando compreender o papel do microambiente celular na morte neuronal investigou o efeito da redução dos níveis de melatonina por remoção da glândula pineal sobre o comportamento animal e sobrevivência neuronal frente à morte celular induzida por neurotoxinas, e em contrapartida, se a reposição de um conjunto de fatores benéficos intrínsecos mediados pelo transplante de células tronco poderia favorecer a sobrevivência celular frente à neurotoxina MPTP.

Nossos resultados demonstraram que a redução nos níveis de melatonina 10 dias previamente a lesão com MPTP ou 6-OHDA não resultou em alterações comportamentais significativas, e nem mesmo em favorecimento à perda neuronal induzida por 6-OHDA ou MPTP. Embora, animais pinealectomizados que receberam a administração de salina na SNpc apresentaram quantidade maior de células contendo ROS, sugerindo que a Px favorece o estresse oxidativo.

Diversos estudos apontam para resultados negativos da redução dos níveis de melatonina endógena mediados pela pinealectomia, como exacerbação dos efeitos agudos e crônicos da isquemia cerebral e perda de células piramidais no hipocampo (De Butte et al., 2002; De Butte and Pappas, 2007). E ainda, que a pinealectomia torna os ratos mais vulneráveis ao trauma cerebral (Ates et al., 2006) e facilita o processo epileptogênico (Lima et al., 2005).

A melatonina encontra-se envolvida em múltiplas funções fisiológicas como, controle do ritmo circadiano (Boutin *et al.*, 2005), iniciação do sono, controle vasomotor, reprodução sazonal, fisiologia da retina e ovários (Witt-Enderby *et al.*, 2003; Hardeland et al., 2011). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* reportam a presença de efeito anti-inflamatório incluindo imunomodulatório (Hardeland et al.,

2006; Hardeland et al., 2011) e potente efeito antioxidante direto, através do sequestro de espécies reativas, e indireto, aumentando as defesas antioxidantes do organismo (Claustrat *et al.*, 2005) prevenindo dano ao DNA, proteínas e lipídios de membrana por radicais livres (Cui *et al.*, 2004), dentre outras funções.

Uma vez que esse neurohormônio desempenha inúmeras funções no organismo, diminuições nos níveis de melatonina poderiam resultar em numerosos distúrbios no organismo. De fato, vários estudos demonstram que os níveis de melatonina decaem com o envelhecimento (Skene et al., 1990; Zhou et al., 2003), relacionando tal evento ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento, tais como doença de Alzheimer e DP.

Atualmente, sabe-se que o acúmulo de radicais livres ao longo da vida resulta em dano de proteínas, lipídeos e DNA, e conseqüentemente aumenta a susceptibilidade celular a doenças. Butte e Pappas (2007) demonstram que a pinealectomia resulta em estresse oxidativo, alterações compensatórias no sistema glutaciona e perda de células hipocâmpais, corroborando com nosso resultado de que a redução nos níveis de melatonina mediados pela Px aumenta a quantidade de células contendo radicais superóxidos. Entretanto, nosso estudo não conseguiu demonstrar que a ausência de melatonina por um período limitado (10 dias) favorece a perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc frente a administração de neurotoxina. Talvez, uma possível justificativa seja o curto período em que os animais foram submetidos a baixos níveis de melatonina (apenas 10 dias). Estudos que demonstraram alterações celulares significativas resultantes da Px, submeteram os animais a um período de níveis reduzidos desse neurohormônio bem maior que

nosso trabalho, no mínimo 2 meses (Butte et al., 2002; Ates et al., 2006; Butte e Pappas, 2007).

Contrariamente a hipótese anterior, nosso estudo investigou se o transplante de células derivadas da medula óssea (BMMC e BM-MSc) favoreceria a sobrevivência neuronal frente ao dano induzido pela administração da neurotoxina MPTP, uma vez que, estudos afirmam que o transplante de células tronco resulta em efeito na liberação de inúmeros fatores tróficos que modulam a ativação de células microgliais e induzem a proteção neuronal no sítio da lesão (Kokaia et al., 2012; Glavaski e Bohn, 2013).

Entretanto, nosso estudo mostra que o transplante com BMMCs não melhora a lesão induzida por MPTP em ratos. Pelo contrário, o transplante com BMMCs em ratos lesados com MPTP favorece a perda de neurônios dopaminérgicos e o comportamento imobilidade no teste de natação forçada, diferentemente do transplante com BM-MSc.

Além disso, nossos resultados mostram que a injeção de MPTP resulta em redução da atividade geral dos animais no teste do campo aberto nos tempos estudados. Animais transplantados com BMMCs imediatamente após a infusão de MPTP não exibem diferença significativa na atividade geral no teste do campo aberto em comparação com animais do grupo MPTP-Salina. Entretanto, análises histológicas de animais do grupo MPTP-BMMC demonstraram que a infusão de MPTP dentro da SNpc associada ao transplante de BMMCs induziu a pronunciada perda de neurônios imunorreativos a enzima TH 24 horas após a cirurgia estereotáxica comparada ao grupo MPTP-Salina. O transplante de BMMCs 24 horas após a infusão de MPTP não resultou em significativa diferença na atividade geral no

teste do campo aberto em comparação a ambos os grupos Sham e MPTP-Salina, mas resultou em significativo aumento no tempo de imobilidade comparado ao grupo MPTP-Salina 7 dias após a cirurgia no teste de natação forçada versão modificada. Análise histológica 7 dias após a cirurgia não mostrou diferença significativa na quantidade de neurônios positivos para a enzima TH entre os grupos MPTP-BMMC e MPTP-Salina.

Animais submetidos ao desenho experimental 2A, na qual o transplante de BMMCs foi realizado imediatamente após a execução do teste do campo aberto 24 h após a cirurgia, mostraram que a infusão de MPTP produziu significativo redução nas frequências de locomoção e de levantar. Além disso, estes ratos apresentavam aumento significativo no tempo de imobilidade e na latência para início do movimento. Essas alterações na atividade geral são importantes características do modelo animal do MPTP da DP e já foram demonstradas em muitos estudos (Heikkila et al., 1986; Da Cunha et al., 2001). Três e 7 dias após a cirurgia, os grupos MPTP-Saline e MPTP-BMMC não apresentavam diferenças no teste do campo aberto e ambos grupos exibiam recuperação da atividade motora. Muitos trabalhos demonstram que a lesão induzida pelo MPTP em ratos é transitória e que a recuperação é uma característica comum neste modelo animal de parkinsonismo (Sedelis et al., 2001; Perry et al., 2004, 2005; Capitelli et al., 2008).

A neurotoxina MPTP é uma ferramenta útil para estudo da degeneração dopaminérgica da DP, embora não reproduza exatamente a doença (Speciale, 2002). Primatas não-humanos são mais sensíveis que roedores ao MPTP, mas todos eles exibem redução nos níveis de dopamina, prejuízo motor e perda de neurônios dopaminérgicos frente a infusão de MPTP (Blum et al., 2001; Speciale,

2002, Emborg, 2004). Além desses efeitos, o modelo animal do MPTP é caracterizado por alterações não-motoras como, alterações de memória (Gevaerd et al., 2001; Da Cunha et al., 2001; Ferro et al., 2005; Capitelli et al., 2008), ansiedade (Ho et al., 2011), prejuízo no reconhecimento de objetos (Sy et al., 2010) e depressão (Santiago et al., 2010).

Curiosamente, sete dias após a cirurgia, animais do grupo MPTP-BMMC apresentavam aumento no tempo de imobilidade em comparação aos grupos Sham-Salina e MPTP-Salina quando avaliados no teste de natação forçada. Nós não encontramos evidência significativa de prejuízo motor 7 dias após a infusão de MPTP, sugerindo que a diferença encontrada após a infusão do MPTP no teste de natação forçada não seja devido a alteração motora. O teste de natação forçada foi introduzido por Porsolt e colaboradores (1978) para triagem de potenciais substâncias antidepressivas. Atualmente, o teste de natação forçada é considerado uma ferramenta útil para estudo do comportamento depressivo nos animais e para a procura de novos tratamentos para a depressão.

Estudos clínicos e neuropatológicos têm sugerido que a DP é um desordem neurodegenerativa caracterizada por um conjunto de diferentes manifestações além das alterações motoras características, tais como, disfunção olfatória, desordens de ansiedade e depressão, e que estas manifestações antecederiam o aparecimento das alterações motoras na doença (Iranzo et al., 2006; Ros et al., 2008; Ferrer, 2009; Reichmann, 2011). Neste sentido, vários sistemas de neurotransmissores estão envolvidos na DP, incluindo vias noradrenérgicas, colinérgicas e serotoninérgicas (see Jellinger, et al., 2000; Jellinger e Mizuno, 2003; Schrag et al., 2004). De fato, estudos com tomografia com emissão de pósitron (PET)

demonstraram que pacientes com DP deprimidos apresentam hipometabolismo em estruturas do sistema mesolímbico e mesocortical comparado a pacientes com DP não-deprimidos (Mayberg et al., 1990; Ring et al, 1994). Ainda, o hipometabolismo era também evidenciado em projeções do núcleo caudado e área tegmentar ventral (VTA) (Mayberg et al., 1990). Winter e colaboradores (2007) mostraram que lesões na VTA e SNpc com 6-hidroxidopamine (6-OHDA) induzia comportamento depressor e que este comportamento estava relacionado a extensiva lesão produzida pela neurotoxina. Além disso, estes autores demonstraram que a administração de citalopram, inibidor da recaptação de serotonina, era capaz de reduzir o sintoma depressivo nos animais testados.

O presente estudo demonstrou que ratos lesados com MPTP que receberam salina não exibiram aumento no tempo de imobilidade como foi observado no grupo MPTP tratado com BMMCs, indicando que o transplante celular de alguma forma está prejudicando o sistema envolvido com este comportamento.

Recentemente, um estudo do nosso grupo reportou que a infusão bilateral de neurotoxinas, incluindo MPTP e 6-OHDA, era capaz de produzir comportamento depressor avaliado através do teste de natação forçada versão modificada e teste de preferência de sacarose, e que este comportamento estava associado a redução do conteúdo de serotonina hipocampal (Santiago et al., 2010).

Consistente com estes resultados nos quais a infusão intranigral de MPTP produz alterações hipocampais, Sy e colaboradores (2010) mostraram que a injeção de MPTP induzia a neuroinflamação, ativação microglial e perda de células no hipocampo, sugerindo que as alterações motoras observadas, incluindo comportamento ansioso e prejuízo na capacidade de reconhecimento de objetos não

estava relacionado ao prejuízo motor e poderiam estar associados a degeneração dopaminérgica no sistema límbico.

Evidências sugerem que neurônios dopaminérgicos são altamente vulneráveis ao dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas, por exemplo, por células de defesa, as quais subsequentemente podem induzir a maior lesão neuronal e progressão da lesão (Block and Hong, 2005; Collins et al., 2012). Atualmente, há muitos estudos clínicos e em animais, incluindo aqueles com MPTP, que relatam o envolvimento da ativação microglial, aumento de mediadores inflamatórios e ROS na patologia da DP (Imamura et al., 2003; McGeer et al., 2003; McGeer e McGeer, 2004; Mount et al., 2007; Hirsch e Hunot, 2009; Cao et al., 2011; Collins et al., 2012; Kokovay e Cunningham, 2005).

Vários trabalhos reportam que a geração de ROS (Hathaway et al., 2000) e a neuroinflamação podem aumentar a permeabilidade da BHE (Chung et al., 2010; Larochelle et al., 2011; Collins et al., 2012), e podem suportar a entrada de células do sistema imune para dentro do compartimento do SNC (Kokovay e Cunningham, 2005; Brochard et al., 2009 and D'Mello et al., 2009), como monócitos e linfócitos (Hickey et al., 1991; Andersson et al., 1992; Knopf et al., 1998).

Embora o papel dos monócitos infiltrados no SNC nas desordens neurodegenerativas permaneça incerto, células derivadas de medula óssea parecem se significativamente recrutadas para regiões do SNC com degeneração (Kokovay and Cunningham, 2005; Brochard et al, 2009) e em alguns casos, este infiltrado pode contribuir para a neurodegeneração (Brochard et al, 2009). Além disso, estudo recente mostrou que células T e leucócitos polimorfonucleares podem favorecer

crises de epilepsia e subsequente degeneração através de sua ligação aos vasos sanguíneos cerebrais (Fabene et al., 2008).

A barreira hemato-encefálica (BHE) foi considerada por muito tempo como uma barreira física e estática para proteção do cérebro. Entretanto, alterações na BHE observada em muitas desordens neurológicas caracterizam-se por perda da integridade da BHE e aumento na permeabilidade de células endoteliais no cérebro (Al-Kassab et al., 1981; Mihaly, et al., 1984; Miller, 1999). O azul de Evans (AE) é uma prova molecular útil para investigar alterações na permeabilidade da BHE (Belayev et al., 1995; Matins et al., 2011).

Nossos resultados no estudo investigando a permeabilidade da BHE usando AE demonstraram que a administração de MPTP produz aumento na permeabilidade da BHE 24 horas e 7 dias após a cirurgia estereotáxica, como indicado pelo extravasamento elevado do AE no parênquima cerebral ao redor do sítio da lesão. Não houve extravasamento de AE no lado contralateral em todos os animais investigados. Dados da literatura sugerem que pacientes com DP apresentem comprometimento da integridade da BHE (Barcia et al., 2004; Kortekaas et al., 2005) e que a administração de MPTP em animais resultaria em significativa quebra da BHE (Zhao et al., 2007; Chao et al., 2009). Carvey e colaboradores (2005) mostraram que o tratamento com 6-OHDA resultava em prejuízo na integridade da BHE e que esta alteração era acompanhada pela perda de neurônios dopaminérgicos e ativação microglial.

Nós acreditamos que o comprometimento da BHE associada ao transplante de BMDCs pode favorecer a neuroinflamação, talvez via ativação microglial e/ou fatores inflamatórios periféricos.

Franco e colaboradores (2012) investigando o efeito do transplante de BMDCs e da modulação microglial após isquemia cerebral sugeriu que a ativação de células microgliais de forma exacerbada prejudica os efeitos benéficos do transplante das BMDCs no modelo de isquemia.

Células microgliais são células da glia derivadas de precursores mielóides da medula óssea durante o desenvolvimento e apresentam papel importante na detecção de distúrbios fisiológicos através de numerosos receptores moleculares. Baseado no estímulo que resulte em sua ativação, essas células podem assumir um perfil protetor secretando citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento ou assumir um perfil neurotóxico secretando fatores tóxicos e recrutando células do sistema imune por liberação de citocinas pró-inflamatórias (Mantovani et al., 2004; Lucin e Wyss-Coray, 2009). Além disso, alguns estudos recentes demonstram que a expressão de moléculas de adesão podem ser supra-reguladas pela ativação microglial e que a subsequente produção de quimiocinas resulta em atração de leucócitos periféricos para o sítio da lesão (Stone et al., 2009; Chung et al., 2010).

Neurônios dopaminérgicos da SNpc são particularmente susceptíveis a neurotoxicidade induzida pela célula microglial devido a ampla densidade deste tipo celular nesta região (Lawson et al., 1990; Kim et al., 2000). Além disso, a importância da neuroinflamação na DP é suportada por estudos demonstrando que a administração de lipopolissacarídeo (LPS) resulta em significativa degeneração

dopaminérgica na SN (Qin et al., 2007) e que este efeito é baseado na ativação microglial (Gao et al., 2002; Gribbons and Dragunow, 2006). Ainda, estudos relatam que o tratamento com antiinflamatórios não-esteroidas (AINES) (Kurkowska-Jastrzebska et al., 2002; Teismann et al., 2003) e inibidores da ativação microglial (Wu et al., 2002; Tomás-Camardiel, et al., 2004; Ponzoni, 2012) atenuam a perda de neurônios na SN.

Conforme Qin e coworkers (2007), a inflamação periférica induzida por LPS e TNF- α sistêmico podem ativar células microglial, aumentar a expressão de fatores pró-inflamatórios cerebrais e induzir a perda de neurônios dopaminérgicos na SN, suportando a hipótese que fatores inflamatórios sistêmicos podem estar envolvidos na morte neuronal.

Nossos dados histológicos mostram que a administração intranigral de MPTP produz significativa redução de neurônios imunorreativos para enzima TH em todos os desenhos experimentais investigados. Entretanto, animais do grupo MPTP-BMMC, nos quais o transplante com BMMCs foi realizado imediatamente após a infusão da neurotoxina, apresentaram significativo aumento na perda de neurônios dopaminérgicos comparados aos animais que apenas receberam a infusão intranigral de MPTP. Por outro lado, sete dias após a cirurgia estereotáxica, ratos lesados com MPTP e tratados com BMMCs 24 h após a infusão da neurotoxina exibiram similar perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc ao grupo MPTP-Salina. Esses dados sugerem que o transplante com BMMCs imediatamente após a lesão com MPTP favoreceu a progressão da lesão, mas não teve qualquer efeito no número de neurônios TH-positivos quando essas células foram transplantadas no momento em que a lesão já estava instalada, ou seja, 24 h após a infusão do MPTP.

No presente estudo, células marcadas com Dil foram encontradas em cortes cerebrais de animais transplantados em todos os tempos investigados. Além disso, células positivas para CD45, o qual pode identificar células hematopoiéticas nucleadas (Trowbridge e Thomas, 1994), que recentemente tenham se infiltrado no cérebro e células microgliais (Consenza-Nashat et al., 2006), foram também observadas em cortes cerebrais de todos os animais investigados. Assim, nós acreditamos que a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc associada a ativação microglial possa ter sido exacerbada pelo infiltrado de células BMMCs transplantadas e por moléculas inflamatórias sistêmicas do hospedeiro devido o aumento da permeabilidade da BHE.

A neurotoxina MPTP causa distúrbio na função de neurônios dopaminérgicos devido a disfunção mitocondrial e produção de ROS (Dauer and Przedborski, 2003; Schulz and Fallkenburger, 2004). Em resposta a essa perturbação inicial e uma vez que células microgliais estão envolvidas no metabolismo do MPTP, várias vias gliais são ativadas resultando em liberação de glutamato, mais ROS, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-1 e TNF- α , e aumento na expressão de óxido nítrico sintase induzível e enzima cicloxigenase tipo-2 (COX-2) (Banati, et al.1993, Liberatore et al., 1999; Knott et al., 2000; McGeer et al., 2001; Lima et al., 2006). Em estudo prévio, nosso grupo demonstrou que a infusão de MPTP resultava em superexpressão da COX-2 16 h após a infusão da neurotoxina (Lima et al, 2006). Isto suporta a sugestão que BMMCs transplantadas podem ser recrutadas para o sítio da lesão por quimiocinas que podem atuar direta ou indiretamente através da estimulação de células microgliais residentes e piorar a lesão neuronal.

A fração de BMMCs compreende diferentes tipos celulares, incluindo monócitos, linfócitos, células precursoras/tronco hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais e células tronco mesenquimais, que não foram processadas no sentido de isolar ou cultivar subtipo específico de células tronco, o que poderia representar uma limitação a terapia celular (Shichinohe et al., 2010).

Há numerosos estudos investigando o efeito de células tronco mesenquimais (MSC) ou células estromais de medula óssea (Chao et al., 2009; Lee et al., 2010; Danielyan et al., 2011; Park et al., 2001; Sanchez-Ramos et al., 2000; Li et al., 2001) em desordens neurodegenerativas. Considerando que estas células derivadas de medula óssea selecionadas representam apenas uma fração das BMMCs, nosso estudo poderia refletir o efeito global do transplante de diferentes células, o qual poderia indicar um efeito diferente ou aditivo das células derivadas de medula óssea não-selecionadas. Além disso, estudos tem investigado o efeito da do transplante de BMMCs em desordens do SNC, incluindo lesão medula espinha (Sykova et al., 2006) e isquemia cerebral (Iihoshi et al., 2004; Baker et al., 2007; Kamiya et al., 2008), mas não há estudos suficientes investigando o efeito dessa população de células na DP.

Ribeiro-Resende e colaboradores (2009) investigando o efeito do transplante de BMMCs em lesão de nervo demonstraram que após o transplante com BMMCs houve significativo aumento de macrófagos no sítio da lesão, uma vez que precursores de monócitos e monócitos estavam presentes na fração transplantada, assim como em nosso trabalho. É fato, sabe-se que o SNC é capaz de incorporar células tronco e progenitores transplantados próximo ou dentro do sítio da lesão (Lundberg et al., 1997).

Além disso, estudos demonstram que células tronco adultas derivadas de medula óssea transplantadas podem adentrar ao cérebro adulto e assumir características de neurônios do SNC (Brazelton et al., 2000). Kokovay e Cunningham (2005) demonstraram que células derivadas de medula óssea em ratos lesados com MPTP podem se infiltrar no cérebro e expressarem marcador microglial C11b.

Estudos descrevem o transplante com BM-MSC como uma ferramenta promissora no tratamento de desordens neurológicas devido seu potencial de reparo tecidual e capacidade de ser recrutada para o sítio da lesão, onde elas poderiam liberar muitos fatores tróficos que acelerariam o reparo endógeno e controlariam a inflamação local associada a neurodegeneração (Glavaski e Bohn, 2013). De fato, houve vários estudos investigando o efeito do transplante de células tronco mesenquimais (MSC) em doenças neurodegenerativas (Hellman et al., 2006; Lee et al., 2010). Particularmente na DP, muitos trabalhos reportam o efeito benéfico do transplante de MSC em modelos animais da DP e nossos resultados reforçam o efeito benéfico das BM-MSC quando essas células são transplantadas sistemicamente via administração endovenosa.

Em resumo, nosso trabalho primeiramente mostrou que a redução nos níveis fisiológicos de melatonina por um período curto (10 dias) não resultou em maior perda de neurônios induzida por MPTP e 6-OHDA, entretanto, a pinealectomia por si só, resultou no maior número de células em estresse oxidativo, o que em longo prazo, poderia tornar essas células mais susceptíveis à lesão. Secundariamente, nossos resultados demonstraram que o transplante sistêmico de BMMC em ratos lesados com MPTP imediatamente após a infusão da neurotoxina favorece a perda

de neurônios dopaminérgicos, e induz o aparecimento de comportamento depressor nos animais. Esses achados estão associados à maior presença de células positivas para CD45 no sítio da lesão e alteração na permeabilidade da BHE. Por outro lado, o transplante sistêmico de BM-MSC mostrou efeito promissor na proteção de neurônios dopaminérgicos frente à lesão com MPTP. Esses dados em conjunto sugerem que é necessária cautela na hipótese de utilização de BMMC como terapia para DP no sentido de modulação do microambiente neuronal. Não obstante, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos moleculares e celulares destas ações.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

✓ A redução dos níveis de melatonina mediada pela pinealectomia, por si só, não produziu alterações motoras significativas dos animais avaliados no teste do campo aberto 24 h, 7 e 14 dias após cirurgia estereotáxica. Entretanto, a infusão intranigral de MPTP ou 6-OHDA resultou em comprometimento motor em ambos grupos Sham e Px, quando os animais foram avaliados 24 h após lesão. Sete e quatorze dias após lesão, os animais lesados exibiram recuperação das alterações motoras antes evidenciadas, com exceção dos grupos Px-MPTP e Px-6-OHDA no parâmetro imobilidade, os quais mantinham o comportamento de imobilidade no teste.

✓ Semelhantemente aos resultados obtidos no teste do campo, a pinealectomia, por si só, não produziu alterações significativas na avaliação do comportamento depressivo no teste de natação forçada versão modificada. Contudo, a administração das neurotoxinas, MPTP ou 6-OHDA, resultou em menor tempo de natação e aumento no tempo de imobilidade dos animais durante a execução do teste.

✓ A infusão intranigral de MPTP ou 6-OHDA produziu redução na quantidade de neurônios imunorreativos à enzima tirosina-hidroxilase 15 dias após a lesão, enquanto que a remoção da glândula pineal não resultou em efeito significativo sobre a quantidade de neurônios dopaminérgicos investigados.

✓ Na avaliação da produção de ânions superóxido celular, diferentemente dos resultados anteriores, a redução dos níveis de melatonina pela técnica de pinealectomia resultou em maior porcentagem de células contendo radical superóxido comparado aos animais controle. Além disso, a infusão das

neurotoxinas produziu aumento na quantidade células positivas para o dihidroetídio, embora a redução precoce dos níveis de melatonina nesses animais não tenha produzido efeito significativo na produção de espécies reativas.

✓ Na avaliação do efeito do transplante de BMMC ou BM-MSc imediatamente após a lesão com MPTP sobre a atividade motora geral 24 h após lesão, os animais lesados e transplantados não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo MPTP-salina no teste do campo aberto.

✓ Na avaliação do efeito do transplante de BMMC 24 h após a lesão com MPTP sobre o comportamento motor dos animais estudados, a administração de MPTP produziu redução na atividade motora geral (frequência de locomoção e levantar) e aumento no tempo de imobilidade e latência para início do movimento voluntário dos animais 24 h após a cirurgia estereotáxica. Entretanto, o transplante com BMMC 24 h após a lesão não produziu alterações significativas nos parâmetros e tempos investigados no campo aberto.

✓ Sete dias após a cirurgia estereotáxica animais lesados e transplantados com BMMC 24 h após a lesão apresentaram maior tempo de imobilidade no teste de natação forçada versão modificada em comparação ao grupo controle e lesado.

✓ Os estudos investigando efeito do transplante de BM-MSc e BMMC, seguido e 24 h após lesão, demonstraram que a administração de MPTP e tratamento com salina resultou em significativa redução na porcentagem de neurônios dopaminérgicos na substância negra; enquanto que o transplante com BM-MSc seguido à infusão de MPTP mostrou-se capaz de preservar esses neurônios da degeneração induzido pela neurotoxina. Entretanto, o tratamento

imediatamente após a lesão com BMMC resultou em aumento significativo na neurodegeneração induzido pela neurotoxina, fato esse não observado quando as mesmas células foram transplantadas em animais lesado 24 h após cirurgia estereotáxica.

✓ As células derivadas de medula óssea marcadas previamente ao transplante com marcador de superfície celular foram identificadas em todas as secções cerebrais investigadas dos animais transplantados.

✓ Na investigação da expressão de CD45 em mesencéfalos dos animais estudados foi observada maior quantidade de células CD45⁺ em animais lesados com MPTP e transplantados com BMMC seguido e 24 h após a lesão.

✓ Células microgliais com perfil ativado foram visualizadas no sítio da lesão dos grupos selecionados, porém tais células foram identificadas em abundância nos animais lesados e transplantados imediatamente com BMMC.

✓ Na avaliação do efeito do MPTP sobre a integridade da BHE 24 h e 7 dias após lesão, a administração unilateral de MPTP resultou em significativo extravasamento de azul de evans dentro do parênquima tecidual no sítio da lesão, indicando severa alteração da permeabilidade da BHE; enquanto na região contralateral à lesão, não foi identificada qualquer alteração.

7.1. CONCLUSÃO FINAL

O presente estudo visando investigar o efeito da manipulação do microambiente neuronal através da pinealectomia e transplante de células tronco derivadas de medula óssea demonstrou que, a redução dos níveis fisiológicos de melatonina previamente à lesão com MPTP ou 6-OHDA e por curto período de tempo, não resultou em alterações significativas ao comportamento e neurodegeneração dopaminérgica na espécie estudada. Além disso, o estudo mostrou que o transplante de BM-MSCs foi capaz de impedir o dano neuronal induzido pelo MPTP corroborando dados prévios da literatura. Entretanto, o transplante de BMMC imediatamente após a infusão de MPTP favoreceu a perda de neurônios dopaminérgicos e induziu o aparecimento de comportamento depressor nos animais.

Assim nossos resultados sugerem que o transplante com BM-MSC em animais lesados com MPTP module positivamente o microambiente neuronal favorecendo a sobrevivência celular, e que em contrapartida, o transplante de BMBCs logo após o insulto tóxico acelere a neurodegeneração através de um microambiente neuroinflamatório exacerbado. E ainda, que a redução fisiológica dos níveis de melatonina favoreça o estresse oxidativo celular, predispondo as células à lesão frente a insulto tóxico, embora os mecanismos pelos quais os efeitos acima mencionados ocorram ainda não estejam totalmente elucidados.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Abeliovich A, Doege CA. Reprogramming therapeutics: iPS cell prospects for neurodegenerative disease. *Neuron*. 2009; 61:337-9

Ali F, Stott SRW, Baker RA. Stem cell and the treatment of Parkinson's disease. *Experimental Neurol* 2013; pii: S0014-4886(13)00004-6.

Al-Kassab S, Skyhøj Olsen T, Skriver EB. Blood-brain barrier integrity in patients with cerebral infarction investigated by computer tomography and serum-CSF-albumin. *Acta Neurol Scand* 1981;64:438-45.

Anderson PB, Perry VH, Gordon S. The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neurosci* 1992; 48:169-186

Ates O, Cayli S, Gurses I, Yucel N, Iraz M, Altinoz E, Kocak A, Yologlu S. Effect of pinealectomy and melatonin replacement on morphological and biochemical recovery after traumatic brain injury. *Int J Dev Neurosci*. 2006; 24(6):357-63.

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats — similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 3908–3913.

Baker AH, Sica V, Work LM, Williams-Ignarro S, de Nigris F, Lerman LO, Casamassimi A, Lanza A, Schiano C, Rienzo M, Ignarro LJ, Napoli C. Brain protection using autologous bone marrow cell, metalloproteinase inhibitors, and metabolic treatment in cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 3597–3602.

Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993; 7:111-118.

Barcia C, Emborg ME, Hirsch EC, Herrero MT.. Blood vessels and parkinsonism. *Front Biosci* 2004; 9:277-282

Bartels AL, Leenders KL. Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex* 2009; 45:915-921.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2000; 30: 42–48.

Belayev L, Busto R, Watson BD, Ginsberg MD.. Post-ischemic administration of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, protects against blood-brain barrier disruption in photochemical cortical infarction in rats: a quantitative study. *Brain Res* 1995; 702:266-270.

Bertrand E, Lechowicz W, Szpak GM, Dymecki J. Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease. *Folia Neuropathol.* 1997;35(2):80-6.

Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2344–2349.

Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2000; 62(1):63-88.

Block ML, Hong, JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 2005; 76:77-98.

Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathway involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in PD. *Prog Neurobiol* 2001; 65:135-172.

Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosc Lett* 1994; 172:151–154.

Bonnefont-Rousselot D¹, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*. 2010 Nov 28;278(1):55-67

Borlongan CV, Lind JG, Dillon-Carter O, Yu G, Hadman M, Cheng C, Carroll J, Hess DC. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res* 2004; 1010:108-116.

Bouchez G, Sensebé L, Vourc'h P, Garreau L, Bodard S, Rico A, Guilloteau D, Charbord P, Besnard JC, Chalon S. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Int*. 2008; 52:1332-42.

Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangé P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends in Pharmacol of Aging* 2005; 26:412-419.

Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neurosc* 2012; 211:51-76.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Sci* 2000; 290:1775- 1779

Briennes LA, Emerson MN. Effects of resistance training for people with Parkinson's disease: a systematic review. *J Am Med Dir Assoc*. 2013;14(4):236-41

Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics In: Eisenk, H.J. (Ed), Experiments in personality: Routledge and Kegan Paul, pp 52-71, London.1960.

Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC, Hunot S.. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of parkinson's disease. *J Clin Invest* 2009; 119:182-192.

Buchman, A.S., Shulman, J.M., Nag, S., Leurgans, S.E., Arnold, S.E., Morris, M.C., Schneider, J.A., Bennett, D.A., 2012. Nigral pathology and Parkinsonian signs in elderswithout Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 71 (2), 258–266.

Cao W, Yang Y, Wang Z, Liu A, Fang L, Wu F, Hong J, Shi Y, Leung S, Dong C, Zhang JZ. Leukemia inhibitory factor inhibits T helper 17 cell differentiation and confers treatment effects of neural progenitor cell therapy in autoimmune disease. *Immunity* 2011; 35: 273-284.

Capitelli C, Sereniki A, Lima MM, Reksidler AB, Tufik S, Vital MABF. Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 594:101-108.

Capitelli CS, Lopes CS, Alves AC, Barbiero J, Oliveira LF, Dias da Silva VJ, Vital MABF. Opposite effects of bone marrow-derived cells transplantation in MPTP-rat model of Parkinson's disease: a comparison study of mononuclear and mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci* 2014; 11:1049-1064.

Cardinali DP, Pagano ES, Bernasconi PAS, Reynoso R, Scachini P. Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central system nervous. *Hormones and Behavior* 2013; 63: 322-330.

Cardinali DP, Pévet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev.* 1998; 2(3):175-90.

Carvey PM, Chen EY, Lipton JW, Tong CW, Ling ZD.. Intra-parenchymal injection of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1-beta produces dopamine neuron loss in the rat. *J Neural Transm* 2005; 112: 601-612.

Chao YX, He BP, Tay SSW. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2009; 216:39-50.

Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH; National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006; 5(3):235-45.

Chaudhuri KR, Odin P. The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2010;184:325-41.

Chiba K, Trevor AJ, Castagnoli Jr. Active uptake of MPP⁺, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 128:1228-1232.

Chopp M, Steinberg GK, Kondziolka D, Lu M, Bliss TM, Li Y, Hess DC, Borlongan CV. Who's in favor of translational cell therapy for stroke: STEPS forward please? *Cell Transplant* 2009; 18, 691–693.

Christophersen NS, Meijer X, Jørgensen JR, Englund U, Grønborg M, Seiger A, Brundin P, Wahlberg LU. Induction of dopaminergic neurons from growth factor expanded neural stem/progenitor cell cultures derived from human first trimester forebrain. *Brain Res Bull.* 2006; 70(4-6):457-66

Chung YC, Kim SR, Park JY, Chung ES, Park KW, Won SY, Bok E, Jin M, Park ES, Yoon SH, Ko HW, Kim YS, Jin BK. Fluoxetine prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation. *Neuropharmacology* 2011; 60:963-74.

Clarke CE. Medical management of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002; 72 Suppl 1:I22-I27

Claustrat B.; Brun J.; Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Review* 2005; 9: 11-24.

Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of PD. *Neuropharmacol* 2012; 62:2154-2168.

Collins M.A.; Neafsey E.J. Potential neurotoxic "agents provocateurs" in Parkinson's disease. *Neurotoxicol Teratol* 2002; 24: 571-577.

Çomoglu SS, Guven H, Acar M, Ozturk G, Koçer B. Tear levels of Tumor necrosis factor alpha in patients with Parkinson's disease. *Neurosc Lett* 2013; 553:63-67.

Cosenza-Nashat MA, Kim MO, Zhao ML, Suh HS, Lee SC.. CD45 isoform expression in microglia and inflammatory cells in HIV-1 encephalitis. *Brain Pathol* 2006; 16:256-265.

Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuroregulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuriteogenesis, *Exp. Neurol* 2006; 198: 54-64.

Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murth MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent development in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2004; 28: 771-779.

Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MABF, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi RN, Canteras NS. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* 2001; 124: 9-18.

Danielyan L, Schäfer R, von Ameln-Mayerhofer A, Bernhard F, Verleysdonk S, Buadze M, Lourhmati A, Klopfer T, Schaumann F, Schmid B, Koehle C, Proksch B, Weissert R, Reichardt HM, van den Brandt J, Buniatian GH, Schwab M, Gleiter CH, Frey WH. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of PD. *Rejuvenation Res* 2011; 14:1-14.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanism and models. *Neuron* 2003; 39:889-909.

De Butte M, Fortin T, Pappas BA. Pinealectomy: behavioral and neuropathological consequences in a chronic cerebral hypoperfusion model. *Neurobiol Aging*. 2002; 23(2):309-17.

De Butte M, Pappas BA. Pinealectomy causes hippocampal CA1 and CA3 cell loss: reversal by melatonin supplementation. *Neurobiol Aging*. 2007; 28(2):306-13

De Lella Ezcurra AL, Chertoff M, Ferrari C, Graciarena M, Pitossi F. Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor alpha in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation. *Neurobiol Dis* 2010; 37:630-640.

De Lima E, Soares JM Jr, del Carmen Sanabria Garrido Y, Gomes Valente S, Priel MR, Chada Baracat E, Abrão Cavalheiro E, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Amado D. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats. *Brain Res*. 2005; 1043(1-2):24-31.

De Mattos JP, Mattos VM. [New dopaminergic agonists] *Arq Neuropsiquiatr.* 1999; 57(2A):329-32.

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 1995; 121:66–72.

Dexter D, Jenner P. Parkinson's disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2013; 62:132-144.

Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease, *J Neurochem* 1989; 52:381–389

Dickie BGM. et al. Neurotoxic and neurotrophic effects of chronic N-methyl-D-aspartate exposure upon mesencephalic dopaminergic neurons in organotypic culture. *Neurosci* 1996; 72 (3):731-741.

D'Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral microglia recruits monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor-alpha signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* 2009; 29: 2089-2102.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315–317.

Dunnett SB; Bjorklund A. Prospect for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 1999; 399:A32-A39.

Elbaz A, Dufouil C, Alperovitch A. Interaction between genes and environmental in neurodegenerative disease. *C.R. Biologies* 2007; 330:318-328.

Fabene PF, Navarro Mora G, Martinello M, Rossi B, Merigo F, Ottoboni L, Bach S, Angiari S, Benati D, Chakir A, Zanetti L, Schio F, Osculati A, Marzola P, Nicolato E, Homeister JW, Xia L, Lowe JB, McEver RP, Osculati F, Sbarbati A, Butcher EC, Constantin G.. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanism in epilepsy. *Nat Med* 2008; 14:1377-1383

Fahn S, Sulzer D. Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's disease. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2004; 1:139-154

Ferrari E, Fioravanti M, Magri F, Solerte SB. Variability of interactions between neuroendocrine and immunological functions in physiological aging and dementia of the Alzheimer's type. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:582–596.

Ferrer I. Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's disease: convergence of multiple metabolic defects. *Prog Neurobiol.* 2009;88:89-103

Ferro MM, Belissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci MEM, Canteras NS, Da Cunha C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP- lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosc Meth* 2005; 148:78-87.

Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222 (3): 236–245.

Forno L.S. Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 259–272.

Franco EC, Cardoso MM, Gouvêia A, Pereira A, Gomes-Leal W. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. *Neurosc Res* 2012; 73:122-132.

Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, 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* 1992; 327:1549–55.

Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Wells TH, Barret JN, Grafton ST, Huang SC, Eidelberg D, Rottenberg DA. Transplantation of human fetal dopamine cells for Parkinson's disease: results at 1 year. *Arch Neurol* 1990; 47: 505–512.

Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, Haass C, LaFerla FM, Kretschmar H, Herms J. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 2010 ;13(4):411-3

Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends in Immunol* 2008; 29: 357-365.

Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W., Hong JS, Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002; 81:1285-1297.

García R, Aguiar J, Alberti E, de la Cuetara K, Pavo N. Bone marrow stromal cells produces nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 753–754.

Gevaerd MS, Miyoshi E, Silveira R, Canteras NS, Takahashi RN, Da Cunha C. L-dopa restores striatal dopamine levels but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol* 2001; 4:361-370

Gibbons e Draguno. Microglia induced neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. *Brain Res* 2006; 1084: 1-15.

Glavaski-Joksimovic A¹, Bohn MC. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2013 Sep;247:25-38

Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *J Physiol Paris* 2002; 96:81-90.

Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? *Exp Neurol* 2005; 193: 279-290

Hall VJ, Li JY, Brundin P. Restorative cell therapy for PD: a quest for the perfect cell. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18:859-869.

Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*. 2011;93(3):350-84.

Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *The International J Biochem Cell Biol* 2006; 38:313-316.

Hart AD, Wyttenbach A, Perry VH, Teeling JL. Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences. *Brain Behav Immun*. 2012;26(5):754-65.

Hathaway CA, Percy WH, Williams JL. Effects of free radicals and leukocytes on increases in blood-brain barrier permeability during colitis. *Dig Dis Sci*. 2000;45:967-75.

Hattori N, Sato S. Animal models of Parkinson's disease: similarities and differences between the disease and models. *Neuropathology* 2007; 27: 479-83.

He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 2001; 909 (1–2): 187–193.

Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 1984; 224:1451-1453.

Hellmann MA, Panet H, Barhum Y, Melamed E, Offen D. Increased survival and migration of engrafted mesenchymal bone marrow stem cells in 6- hydroxydopamine-lesioned rodents. *Neurosci. Lett* 2006; 395:124–128.

Hickey WF, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosc Res* 1991; 28:254-260.

Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 2009; 8:382-397

Ho YJ, Ho SC, Pawlak CR, Yeh KY. Effects of D-cycloserine on MPTP-induced behavioral and neurological changes: potential for treatment of Parkinson's disease dementia. *Behav Brain Res* 2011; 219:280-90.

Horstman JA, Wrona MZ, Dryhurst G. Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. *Bioorganic Chemistry* 2002; 30:371-382.

Huang B, Tabata Y, Gao JQ. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents and potential targets gene delivery vehicle for brain disease. *J Controlled Release* 2012; 162:464-473.

Hung HC, Lee EH. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:76-84.

Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, et al. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 1999; 19:3440-7.

Iihoshi, S., Honmou, O., Houkin, K., Hashi, K., Kocsis, J.D., 2004. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.* 1007, 1-9.

Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 2003; 106:518-526

Iranzo A, Molinuevo JL, Santamaría J, Serradell M, Martí MJ, Valldeoriola F, Tolosa E. Rapid-eye-movement sleep behavior disorder as an early marker for neurodegenerative disorder: a descriptive study. *Lancet Neurol* 2006; 5: 572-7.

Jellinger KA and Mizuno Y. Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders. *ISN Neuropath Press Basel* 2003; 159-187.

Jellinger KA. Morphological substrates of mental dysfunction in Lewy Body disease: an update. *J Neural Transm* 2000; 59: 185-212.

Jellinger KA. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov Disord* 2012; 27:8-30.

Jenner P. Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 2001; 24(5):245-7

Jenner P. The contributions of the MPTP-treated primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2003; 9:131-137

Jenner,P. Preclinical evidence for neuroprotection with monoamine oxidase-B inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology* 63:S13–S22; 2004.

Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochim Biophys Acta*. 2014 ;1842(8):1282-94.

Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer O, Nolte JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med* 2010; 5:933–946.

Kamiya N, Ueda M, Igarashi H, Nishiyama Y, Suda S, Inaba T, Katayama Y. Intra-arterial transplantation of bone marrow mononuclear cells immediately after reperfusion decreases brain injury after focal ischemia in rats. *Life Sci* 2008; 83:433-437.

Kanthasamy A, Jin H, Mehrotra S, Mishra R, Kanthasamy A, Rana A. Novel cell death signaling pathways in neurotoxicity models of dopaminergic degeneration: relevance to oxidative stress and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2010;31(5):555-61.

Kennaway DJ. Melatonin and development: Physiology and Pharmacology. *Seminars in Perinatology* 2000; 24 (4): 258-266.

Kidd PM. Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. *Altern Med Rev*. 2000;5(6):502-29.

Kim SU, Park IH, Kim TH, Kim KS, Choi HB, Hong SH, Bang JH, Lee MA, Joo IS, Lee CS, Kim YS. Brain transplantation of human neural stem cells transduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 provides functional improvement in animal models of Parkinson disease. *Neuropathology* 2006; 26:129–140.

Kim YJ, Park HJ, Lee G, Bang OY, Ahn YH, Joe E, Kim HO, Lee PH. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. *Glia* 2009; 7: 13–23.

Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat, *Exp. Neurol* 1989; 152:259–277.

Knopf PC, Harling-Berg CJ, Cserr HF, Basu D., Sirulnick EJ, Nolan SC, Park JT, Keir G, Thompson EJ, Hickey WF. Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. *J Immunol* 1998;161:692-701

Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: NOS-2, lipocortin-1 and cyclooxygenase-1 and-2. *Mol Cell Neurosci* 2000; 6:724-739

Kokaia Z, Martino G, Schwartz M, Lindvall O. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair? *Nature Neurosc* 2012; 15: 1078-1087.

Kokovay E, Cunningham A. Bone marrow-derived microglia contribute to the neuroinflammatory response and express iNOS in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol* 2005; 19:471-478.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:10711–10716.

Kortekaas R, Leenders KL, Van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT, Hendrikse NH. Blood brain barrier dysfunction in Parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol* 2005; 57:176-179

Kuno S. Problems in patients with advancing Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related disorders* 2006; 12:S47-S51.

Kurkowska-Jastrzebska I, Barbiuch M, Joniec I, Przybylkowski A. Indomethacin protects against neurodegeneration caused by MPTP intoxication in mice. *Int Immunopharmacol* 2002; 2:1213-1218

Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett* 2011;585: 3770-3780.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neurosci* 1990; 39:151-170.

Lee JK, Jin HK, Endo S, Schuchman EH, Carter JE, Bae JS.. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. *Stem cell* 2010; 28:329-343.

Lee JK, Tran T, Tansey MG. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009; 4:419-429.

Lee Mosley R, Benner E J, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C, Gendelman HE. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clinical Neurosci Res* 2006; 6:261-281.

Li J, Zhu H, Liu Y, Li Q, Lu S, Feng M, Xu Y, Huang L, Ma C, An Y, Zhao RC, Wang R, Qin C. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in *Macaca fascicularis*. *Brain Res* 2010; 1334: 65–72.

Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cell in a MPTP mouse model of PD. *Neurosci Lett* 2001; 316, 67-70.

Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of PD. *Nat Med* 1999; 5:1403-09.

Licker V, Kövari E, Hochstrasser DF, Burkhard PR. Proteomics in human Parkinson's disease research. *J Proteomics* 2009; 73:10-29.

Lim E. A walk through the management of Parkinson's disease. *Annals Acad Medic Singapore* 2005; 34:188-195.

Lima MMS, Reksidler AB, Zanata SM, Machado HB, Tufik S, Vital MABF. Different parkinsonism models produced time-dependent induction COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res* 2006; 1101:117-125

Lindvall O, Björklund A. Cell Therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx*. 2004; 1:382-93.

Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Sci* 1990; 247:574-7.

Lloyd KG, Davidson L, Hornykiewicz O. The neurochemistry of Parkinson's disease: effect of L-dopa therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 195:453-464

Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in Brain aging and neurodegeneration: Too much or too little? *Neuron* 2009; 64:110-118.

Lull ME, Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 2010; 7: 354-365.

Lundberg C, Martínez-Serrano A, Cattaneo E, McKay RD, Björklund A. Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp Neurol* 1997;145:342-60

Ma J, Shaw VE, Mitrofanis J. Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice? *Parkinsonism Relat Disord.* 2009 May;15(4):307-14.

Ma SY, Roytt M, Collan Y, Rinne JO. Unbiased morphometrical measurements show loss of pigmented nigral neurones with ageing. *Neuropathol. Appl. Neurobiol* 1999; 25 (5): 394–399.

Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2004;25: 177-195.

Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 2004; 21(1):33–9.

Mäkelä J, Ylitalo K, Lehtonen S, Dahlbacka S, Niemelä E, Kiviluoma K, Rimpiläinen J, Alaoja H, Paavonen T, Lehenkari P, Juvonen T, Anttila V. Bone marrow-derived mononuclear cell transplantation improves myocardial recovery by enhancing cellular recruitment and differentiation at the infarction site. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2007; 134: 565-573.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 1999; 103:697-705.

Manev H, Uz T, Kharlamov A, Joo JY. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. *FASEB J* 1996; 10:1546–1551.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25, 677-686.

Maranis S, Tsouli S, Konitsiotis S. Treatment of motor symptoms in advanced Parkinson's disease: a practical approach. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(8):1795-807

Martino G, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Brain regeneration in physiology and pathology: the immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. *Physiol. Rev.* 2011; 91:1281–1304.

Martins T, Baptista S, Gonçalves J, Leal E, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CF, Quintela O, Lendoiro E, López-Rivadulla M, Ambrósio AF, Silva AP.. Methamphetamine transiently increased the blood-brain barrier permeability in the hippocampus: role of tight junction proteins and matrix metalloproteinase-9. *Brain Res* 2011; 1411:28-40.

Mayberg HS, Starkstein SE, Sadzot B, Preziosi T, Andrezejewski PL, Dannals RF, Wagner HN Jr, Robinson RG. Selective hypometabolism in the inferior frontal lobe in depressed patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1990; 28:57-64.

McGeer PL, McGeer EG. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2004; 10:S3-S7

McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after MPTP administration. *Ann Neurol* 2003; 54:599-604.

McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Inflammation in PD. *Adv Neurol* 2001; 86:83-9

McGeer, PL, Itagaki S, Boyes EB, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988; 38: 1285–1291.

Mezey É, Chandross KJ, Harta G, Maki RA & McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779–1782.

Mihály A, Bozóky B. Immunohistochemical localization of extravasated serum albumin in the hippocampus of human subjects with partial and generalized epilepsies and epileptiform convulsions. *Acta Neuropathol.* 1984; 65:25-34.

Miller DW. Immunobiology of the blood-brain barrier. *J NeuroVirol* 1999; 5:570-578.

Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. umornecrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients, *Neurosci. Lett.* 1994; 165: 208–210.

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain, *J Neural Transm* 2000; 107:335–341.

Moore DJ. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Ver Neurosc* 2005; 28:57-87.

Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, Anisman H, Hayley S, Park DS. Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 2007; 27:3328–3337.

Muller T, Blum-Degen D, Przuntek H, Kuhn W. Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1998; 98:142-4.

Munoz, J.R., Stoutenger, B.R., Robinson, A.P., Spees, J.L., Prockop, D.J., 2005. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:18171-6.

Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol.* 2008; 36(9):1176-85.

Neumann H, Wekerle H. Brain microglia: watchdogs with pedigree. *Nat Neurosci.* 2013;16(3):253-5.

Newhouse K, Hsuan SL, Chang SH, Cai B, Wang Y, Xia Z. Rotenone-induced Apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinase in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicological Sciences* 2004; 79: 137-146.

Nikolic WV, Hou H, Town T, Zhu Y, Giunta B, Sanberg CD, Zeng J, Luo D, Ehrhart J, Mori T, Sanberg PR, Tan J. Peripherally administered human umbilical cord blood cells reduce parenchymal and vascular beta-amyloid deposits in Alzheimer mice. *Stem Cells Dev.* 2008;17(3):423-39.

Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's Disease. *Ann Neurol* 2003; 54:403-14.

Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 2001; 411: 42-43.

Park HJ, Lee PH, Bang OY, Lee G, Ahn YH. Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. *J*

Park KW, Eglitis MA, Mouradian MM. Protection of nigral neurons by GDNF-engineered marrow cell transplantation. *Neurosci Res* 2001; 40:315-323.

Patki G, Lau YS. Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011 Oct;99(4):704-11.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press: San Diego.1986

Payao SL, de Carvalho CV, da Silva ER, Lopes C, Markus RP, Winter LM, Smith MA. Pinealectomy-associated decrease in ribosomal gene activity in rats. *Biogerontology* 2001; 2: 105–108

Perry JC, Da Cunha C, Anselmo-Franci J, Andreatini R, Miyoshi E, Tufik S, Vital MABF. Behavioural and Neurochemical effects phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra of rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 484: 225-233.

Perry JC, Hipólido DC; Tufik S, Martins RD, Da Cunha C, Andreatini R, Vital MABF. Intra-nigral MPTP lesion in rats: Behavioural and autoradiography studies. *Experimental Neurol* 2005; 195:322-329.

Pienaar IS, Chinnery PF. Existing and emerging mitochondrial-targeting therapies for altering Parkinson's disease severity and progression. *Pharmacol Ther* 2013; 137(1):1-21

Pienaar IS, Lu B, Schallert T. Closing the gap between clinic and cage: sensori-motor and cognitive behavioural testing regimens in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012;36(10):2305-24.

Poewe W, Mahlknecht P. The Clinical progression of PD. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009; 15:S28-32.

Ponzoni, S. Macrophages-mediated neurotoxin effects of intra-nigral manganese administration are attenuated by minocycline. *Neurosci Lett* 2012; 506: 136-140.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978;47:379-391

Potter ED, Ling ZD, Carvey PM. Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons. *Cell Tissue Res* 1999; 296: 235–246.

Preynat-Seauve O, Burkhard PR, Villard J, Zingg W, Ginovart N, Feki A, Dubois-Dauphin M, Hurst SA, Mauron A, Jaconi M, Krause KH. Pluripotent stem cells as new drugs? The example of Parkinson's disease *Int J Pharm*. 2009; 381(2):113-21.

Przedborski S, Jackson-Lewis V. Mechanism of MPTP toxicity. *Mov Disord* 1998; 13:35-38.

Przedborski S, Vila M. MPTP: a review of its mechanisms of neurotoxicity. *Clinical Neuroscience Research* 2001; 1: 407–418

Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005; 11:S3-S7

Qiang L, Fujita R, Yamashita T, Angulo S, Rhinn H, Rhee D, Doege C, Chau L, Aubry L, Vanti WB, Moreno H, Abeliovich A. Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons. *Cell*. 2011;146(3):359-71

Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 2007; 55:453-462.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19:1-22.

Ramsey CP, Tansey MG. A survey from 2012 of evidence for the role of neuroinflammation in neurotoxin animal models of Parkinson's disease and potential molecular targets. *Exp Neurol* 2014; 256:126-132.

Reeve A, Simcox E, Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev.* 2014 Mar;14:19-30

Reichmann H. Etiology in Parkinson's disease. Dual hit or spreading intoxication. *J Neurol Sci* 2011; 310: 9-11.

Reiter JR, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J. Pineal Res* 2003; 34: 79–80.

Reiter RJ, Tan D, Kim SJ, Manchester LC, Qi W, Garcia JJ, Cabrera JC, El-Sokkary G, Rouvier-Garay V. Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats. *Mech. Ageing Dev* 1999; 110: 157–173.

Riaz SS, Bradford HF. Factors involved in the determination of the neurotransmitter phenotype of developing neurons of the CNS: applications in cell replacement treatment for Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2005 Jul;76(4):257-78.

Ribeiro-Resende VT, Pimentel-Coelho PM, Mesentier-Louro LA, Mello-Silva JPC, Cabral-da-Silva MC, De Mello FG, De Mello RA, Mendez-Otero R. Trophic activity derived from bone marrow mononuclear cells increased peripheral nerve

regeneration by acting on both neuronal and glial cell populations. *Neurosci* 2009;159 :540-549.

Ring HA, Bench CJ, Trimble MR, Brooks DJ, Frackowiak RS, Dolan RJ. Depression on Parkinson's disease. A positron emission study. *Br J Psychiatry* 1994; 165:333-339

Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, Launer L, White LR. Association of olfactory dysfunction with risk for future PD. *Ann Neurol* 2008;63: 167-73.

Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 363:1783–1793.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164:247-256

Santiago RM, Barbieiro J, Lima MM, Dombrowski PA, Andreatini R, Vital MA. Depressive-like behavior alterations induced by intranigral MPTP-6-OHDA, LPS and rotenone models of PD are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34:1104-1114.

Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y. Iba1 is an actin cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 292–297.

Sawamoto K, et al. Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci* 2001;21(11):3895–903.

Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JT, Bezdard E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet*. 2014;384(9942):545-55.

Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008; 7: 97–109.

Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *The Lancet* 1989;333(8649):1269.

Schrag A. Entacapone in the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2005; 4 (6): 366–370.

Schrag A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease-an update. *J Neurol* 2004; 251:795-804

Schulz JB, Falkenburger BH. Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004; 318:135-147

Sedelis M, Schwarting RKW, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2001; 125:109-125.

Shan L, Bossers K, Luchetti S, Balesar R, Lethbridge N, Chazot PL, Bao AM, Swaab DF. Alterations in the histaminergic system in the substantia nigra and striatum of Parkinson's patients: a postmortem study. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(7):1488.e1-13.

Sharma R, McMillan CR, Tenn CC, Niles LP. Physiology neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2006; 1068:230-236.

Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 179:9–16.

Shetty P, Ravindran G, Sarang S, Thakur A, Rao HS, Viswanathan C. Clinical grade mesenchymal stem cells transdifferentiated under xenofree conditions alleviates motor deficiencies in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Biol Int* 2009; 33(8): 830–8.

Shichinohe H, Kuroda S, Maruichi K, Osanai T, Sugiyama T, Chiba Y, Yamaguchi A, Iwasaki Y. Bone marrow stromal cells and bone marrow-derived mononuclear cells: Which are suitable as cell source of transplantation for mice infarct brain? *Neuropath* 2010; 30:113-122.

Shihabuddin LS, Aubert I. Stem cell transplantation for neurometabolic and neurodegenerative diseases. *Neuropharmacol* 2010 May;58(6):845-54.

Sian J, Dexter DJ, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 1994; 36:348–355.

Singh N, Pillay V. Choonara YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2007 Jan;81(1):29-44

Singh S, Das T, Ravindran A, Chaturvedi RK, Shukla Y, Agarwal AK, Dikshit M. Involvement of nitric oxide in neurodegeneration: a study on the experimental models of Parkinson's disease. *Redox Rep.* 2005;10(2):103-9.

Siuciak JA, Dubocovich ML. Effect of pinealectomy and the light/dark cycle on 2-[125I]iodomelatonin binding in the chick optic tectum. *Cell Mol Neurobiol.* 1993;13(3):193-202.

Skene DJ, Vivien-Roels B, Sparks DL, Hunsaker JC, Pevet P, Ravid D, Swaab DF. Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. *Brain Res* 1990; 528: 170–174.

Speciale SG. MPTP Insights into parkinsonian neurodegeneration. *NeurotoxicolTeratol* 2002; 24:607-620.

Stone DK, Reynolds AD, Mosley RL, Gendelman HE. Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:2151-2166

Storch A, et al. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol* 2001;170(2):317–25.

Strauer BE and Ran KS. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 2003; 107:929-934

Subramaniam SR, Chesselet M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiol* 2013; 106-107:17-32.

Sugama S, Yang L, Cho BP, DeGiorgio LA, Lorenzl S, Albers DS, Beal MF, Volpe BT, Joh TH. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. *Brain Res* 2003; 964: 288–294.

Sy HN, Wu SL, Wang WF, Chen CH, Huang YT, Liou YM, Chiou CS, Pawlak CR, Ho YJ. MPTP-induced dopaminergic degeneration and deficits in object recognition in rats are accompanied by neuroinflammation in the hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 95:158-165.

Syková E, Homola A, Mazanec R, Lachmann H, Konrádová SL, Kobylka P, Pádr R, Neuwirth J, Komrska V, Vávra V, Stulík J, Bojar M. (2006) Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant* 2006;15:675-87

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–872.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663–676.

Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R, Langston J. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 1999; 281: 341–346.

Taylor JM, Main BS, Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 2013; 62:803-819.

Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:5473-5478

Tolwani RJ, Jakowec MW, Petzinger GM, Green S, Waggie K. Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models. *Lab Anim Sci.* 1999; 49(4):363-71.

Tomás-Camardiel M, Rite I, Herrera AJ, de Pablos RM, Cano J, Machado A, Venero JL. Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption of the blood-brain barrier, and damage in the nigral dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 2004; 16:190-201.

Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:85-116

Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2009; 1792 :643–650.

Ungerstedt, U. Stereotaxic mapping of the monoamine path-ways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 1971; Suppl. 367, 1–48.

Valko M, Leibfritz D; Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathol* 2007; 27:494-506.

Wang WF, Wu SL, Liou YM, Wang AL, Pawlak CR, Ho YJ. MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. *Behav Neurosc* 2009;123:1261–70.

Watanabe Y, Himeda T, Araki T. Mechanism of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. *Medical Science Monitor* 2005; 11(1):RA17-23.

Weissman L, Souza-Pinto NC, Stevsner T, Bohr VA. DNA repair, mitochondria and neurodegeneration. *Neurosc* 2007; 145:1318-1329.

Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 2007; 1792:688-702.

Wijeyekoon R, Barker RA. Cell replacement therapy for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792:688-702

Winter C, von Rumohr A, Mundt A, Petrus D, Klein J, Lee T, Morgenstern R, Kupsch A, Juckel G. Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like-behavior in rats. *Behav Brain Res* 2007; 184:133-141.

Witt-Enderly PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanism. *Life Science* 2003; 72: 2183-2198.

Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 2002; 22:1763-1771

Xu, L, Fagan SC, Waller JL, Edwards D, Borlongan CV, Zheng J, Hill WD, Feuerstein G, Hess DC et al. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurol* 2004; 4: 1–7.

Yanagisawa N. Natural history of Parkinson's disease: From dopamine to multiple systems involvement. *Parkinsonism Relat Disord* 2006; 12:S40-S46

Zhao C, Ling Z, Newman MB, Bhatia A, Carvey PM.. TNF- α knockout and minocycline treatment attenuates blood-brain barrier leakage in MPTP-treated mice. *Neurobiol Dis* 2007; 26:36-46.

Zhou Y, Su Y, Li B, Liu F, Ryder JW, Wu X, Gonzalez-DeWhitt PA, Gelfanova V, Hale JE, May PC, Paul SM, Ni B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic Abeta42 by inhibiting Rho. *Science* 2003; 302:1215-1217.

Ziemssen T, Reichmann H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord* 2007; 13: 323–332.

Zuo L, Motherwell MS. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene*. 2013;532(1):18-23

Zweig RM, Jankel WR, Hedreen JC, Mayeux R, Price DL. The pedunculo pontine nucleus in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1989 Jul;26(1):41-6.